



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA

UNIDAD CUAJIMALPA

POSGRADO EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

MAESTRÍA

*“Estudio de la biotransformación de furfural en cepas de *Acinetobacter*”*

PRESENTA:  
JOSÉ EDUARDO ARTEAGA GÓMEZ

DIRECTOR:  
DR. JUAN CARLOS SIGALA ALANIS

ASESORA:  
DRA. SYLVIE LE BORGNE

CUAJIMALPA, CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2020

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Procesos y Tecnología (DPT) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Sigala Alanís y la asesoría de la Dra. Sylvie Le Borgne. Además, se contó con la asesoría del Dr. Ernesto Rivera Becerril para la síntesis orgánica e identificación del difurfuril éter, y el apoyo técnico del Dr. Gabriel Viguera Ramírez para el uso del HPLC.

Esta ICR contó para su realización del patrocinio del CONACyT (CB-2012-183813), de la Dirección de Superación Académica (PRODEP-SEP) a través del proyecto "Desarrollo de plataformas robustas para el análisis transcripcional en diversos modelos celulares" (Conv. 2019 Fortalecimiento de Cuerpos Académicos en Formación) otorgado al cuerpo académico UAM-C-CA-42-Biotecnología Celular y Tisular, y del Programa Especial de Apoyo a la Investigación 2019 otorgado por la Rectoría General de la Universidad Autónoma Metropolitana.

José Eduardo Arteaga Gómez contó con beca de posgrado CONACyT (CVU 868633) para realizar este trabajo, así como de un apoyo extraordinario para conclusión de Tesis, otorgado por la Rectoría General de la Universidad Autónoma Metropolitana.

Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Maestría 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 cepas de *Acinetobacter*” fue realizado de 09-2017 al 02-2020 en los laboratorios del Departamento de Procesos y Tecnología de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería.

## DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 17 del mes febrero del año 2020, el (la) que suscribe José Eduardo Arteaga Gómez alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor (a) intelectual de la presente idónea comunicación de resultados intitulada; "Estudio de la biotransformación de furfural en cepas de *Acinetobacter*" 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 (la) director (a) del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: [jsigala@correo.cua.uam.mx](mailto:jsigala@correo.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 (a) del Programa de Maestría 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.”

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José Eduardo Arteaga Gómez', enclosed within a large, loopy oval shape.

José Eduardo Arteaga Gómez

DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

El que suscribe, José Eduardo Arteaga Gómez alumno (a) del Programa de Maestría 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.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José Eduardo Arteaga Gómez', enclosed within a hand-drawn oval border.

José Eduardo Arteaga Gómez

## Contenido

Contenido de figuras. ....	11
Contenido de tablas. ....	14
Abreviaturas y símbolos. ....	16
Resumen. ....	18
Capítulo I. Introducción. ....	19
Capítulo II. Antecedentes. ....	21
Biomasa lignocelulósica. ....	21
Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica. ....	22
Furano. ....	23
Toxicidad de los compuestos inhibidores. ....	29
Ácidos orgánicos débiles. ....	30
Compuestos fenólicos. ....	33
Furano y sus derivados. ....	35
Mecanismos de detoxificación de hidrolizados de biomasa lignocelulósica mediante el uso de microorganismos. ....	37
El género <i>Acinetobacter</i> . ....	38
Transcriptoma. ....	40
Análisis de expresión de genes. ....	41
RT qPCR. ....	42
Transcripción reversa. ....	42

<b>Capítulo III. Justificación y objetivos.....</b>	<b>46</b>
<b>Objetivo general. ....</b>	<b>47</b>
<b>Objetivos particulares. ....</b>	<b>47</b>
<b>Capítulo IV. Materiales y métodos. ....</b>	<b>48</b>
<b>Cepas bacterianas.....</b>	<b>48</b>
<b>Medios, inóculos y condiciones de cultivo. ....</b>	<b>48</b>
<b>Determinación de la MIC en las cepas <i>A. schindleri</i> y <i>A. baylyi</i> ADP1.....</b>	<b>50</b>
<b>Cinéticas de crecimiento de las cepas de <i>Acinetobacter</i> en presencia de acetato como fuente de carbono y ausencia de furfural. ....</b>	<b>50</b>
<b>Cinéticas de crecimiento de las cepas de <i>Acinetobacter</i> en presencia de acetato como fuente de carbono y furfural.....</b>	<b>50</b>
<b>Cinéticas de crecimiento de las cepas de <i>Acinetobacter</i> en presencia de acetato como fuente de carbono, alcohol furfurílico y furfural más alcohol furfurílico.....</b>	<b>51</b>
<b>Cinéticas de crecimiento de las cepas de <i>Acinetobacter</i> en presencia de acetato (3 g/L) y pulsos de furfural (0.5 g/L).....</b>	<b>51</b>
<b>Cinéticas de crecimiento de las cepas de <i>Acinetobacter</i> en presencia de acetato (4 g/L) y pulsos de furfural (0.5, 1.0 y 2.0 g/L).....</b>	<b>52</b>
<b>Obtención sintética del compuesto difurfuril éter.....</b>	<b>52</b>
<b>Identificación de genes que codifiquen enzimas responsables de la biotransformación de furfural a un compuesto menos tóxico.....</b>	<b>58</b>
<b>Diseño de oligonucleótidos para amplificar genes de enzimas responsables de la biotransformación de furfural. ....</b>	<b>59</b>



<b>Obtención de ARN total para análisis de expresión de genes posiblemente involucrados en la biotransformación de furfural por qPCR.</b> .....	61
Lisis celular. ....	61
Extracción y purificación de ARN: método RNeasy®Protect Bacteria mini Kit .....	62
Extracción y purificación de ARN: método fenol – cloroformo. ....	63
<b>Cuantificación de ARN.</b> .....	65
Digestión de ARN con DNAsa. ....	65
<b>PCRs de punto final de verificación usando como templado muestras de ARN digeridas con DNAsa.</b> .....	67
<b>Evaluación de integridad de ARN.</b> .....	68
<b>Síntesis de ADN complementario.</b> .....	73
<b>Elección de un gen de referencia endógeno y determinación de la eficiencia de reacción de amplificación.</b> .....	75
<b>RT-qPCR.</b> .....	78
<b>Capítulo V. Resultados y discusión.</b> .....	80
<b>Concentración mínima inhibitoria de furfural.</b> .....	80
<b>Velocidad específica de crecimiento en presencia y ausencia de furfural.</b> .....	82
<b>Velocidad específica de crecimiento en presencia de furfural y alcohol furfúrico.</b> .....	85
<b>Cinéticas de crecimiento en presencia de acetato (3 g/L) y pulsos de furfural (0.5 g/L).</b> .....	89
<b>Cinéticas de crecimiento en presencia de acetato (4 g/L) y pulsos de furfural (0.5, 1.0 y 2.0 g/L).</b> .....	91

<b>Síntesis orgánica e identificación del compuesto difurfuril éter. ....</b>	<b>93</b>
<b>Cinética de crecimiento de <i>A. baylyi</i> ADP1 en presencia de acetato 4 g/L como fuente de carbono y furfural en pulsos equivalentes a 0.5 g/L. ....</b>	<b>105</b>
<b>Identificación de genes de posibles enzimas responsables de la biotransformación del furfural. ....</b>	<b>107</b>
<b>Diseño de oligonucleótidos para amplificar genes de enzimas responsables de la biotransformación de furfural. ....</b>	<b>108</b>
<b>Elección del gen de referencia para el análisis transcripcional. ....</b>	<b>110</b>
<b>Eficiencia de la reacción de amplificación del gen de referencia <i>gyrA</i>. ....</b>	<b>111</b>
<b>Concentración, pureza e integridad del ARN obtenido durante el crecimiento en ausencia y presencia de furfural. ....</b>	<b>112</b>
<b>Análisis de expresión de genes posiblemente involucrados en la biotransformación de furfural por RT-qPCR. ....</b>	<b>113</b>
<b>Características de las enzimas <i>AreB</i> y <i>FrmA</i>. ....</b>	<b>115</b>
<b>Capítulo VI. Conclusiones y perspectivas. ....</b>	<b>121</b>
<b>Conclusiones. ....</b>	<b>121</b>
<b>Perspectivas. ....</b>	<b>122</b>
<b>Capítulo VII. Referencias. ....</b>	<b>123</b>
<b>Capítulo VIII. Apéndices. ....</b>	<b>130</b>
<b>Apéndice A. Purificación del difurfuril éter. ....</b>	<b>130</b>
<b>Apéndice B. Genes y oligonucleótidos considerados para el estudio de RT-qPCR. ....</b>	<b>131</b>

<b>Apéndice C.</b> Determinación cualitativa de furfural. ....	135
<b>Apéndice D.</b> Productos de PCR de los genes de estudio en <i>A. baylyi</i> ADP1. ....	138

## Contenido de figuras.

Figura 1. Estructura y componentes principales de la biomasa lignocelulósica.....	22
Figura 2. Estructura química del HMF y el furfural .....	24
Figura 3. Biomasa lignocelulósica: rutas de transformación hacia productos de interés.....	26
Figura 4. Productos obtenidos durante el pretratamiento de hidrólisis ácida diluída .....	27
Figura 5. Productos obtenidos a partir de la degradación de la biomasa lignocelulósica .....	28
Figura 6. Mecanismos de toxicidad de los compuestos inhibidores.....	30
Figura 7. Reacción de disociación de un ácido débil y curva de titulación del ácido acético .....	31
Figura 8. Estructura de la vainillina .....	33
Figura 9. Detoxificación del furfural en la cepa <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	38
Figura 10. Representación de la biotransformación del furfural a difurfuril éter .....	40
Figura 11. Flujo de información genética.....	44
Figura 12. Síntesis orgánica del difurfuril éter. ....	53
Figura 13. Cromatografía en capa fina para comprobar la síntesis de furfuril éter.....	56
Figura 14. Cromatografía en capa fina para comprobar la síntesis de furfuril éter concentrado ....	57
Figura 15. Cinéticas de crecimiento en presencia y ausencia de furfural.....	82
Figura 16. Crecimiento ADP1 en presencia de acetato y furfural.....	84
Figura 17. Crecimiento ACE en presencia de acetato y furfural .....	84
Figura 18. Crecimiento de ADP1 en presencia de furfural y alcohol furfurílico.....	86

Figura 19. Crecimiento de ACE en presencia de furfural y alcohol furfurílico .....	86
Figura 20. ADP1 en presencia de acetato y alcohol furfurílico .....	88
Figura 21. ACE en presencia de acetato y alcohol furfurílico.....	88
Figura 22. Cinéticas de crecimiento de ACE y ADP1 con furfural en pulsos equivalentes a 0.5 g/L. 90	
Figura 23. Cinéticas de crecimiento de ACE y ADP1 con furfural en pulsos equivalentes a 0.5, 1.0 y 2.0 g/L .....	92
Figura 24. Espectro de IR del compuesto difurfuril éter proveniente de sobrenadantes del cultivo celular de cepas de <i>Acinetobacter</i> . .....	95
Figura 25. Espectro de IR del compuesto difurfuril éter sintetizado. ....	96
Figura 26. Espectro <sup>1</sup> H-RMN a 500 MHz del compuesto difurfuril éter proveniente de sobrenadantes de cultivo celular de cepas de <i>Acinetobacter</i> .....	98
Figura 27. Espectro RMN-COSY ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H).....	99
Figura 28. Espectro depurado RMN-COSY ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H) .....	100
Figura 29. Espectro <sup>1</sup> H-RMN a 60 MHz del compuesto difurfuril éter sintetizado .....	101
Figura 30. Espectro de <sup>13</sup> C-RMN del compuesto difurfuril éter proveniente de sobrenadantes de cultivo celular de cepas de <i>Acinetobacter</i> .....	103
Figura 31. Espectro de RMN-HSQC .....	104
Figura 32. Cromatograma de HPLC del difurfuril éter.....	105
Figura 33. Cinética de crecimiento de ADP1 con 4 (g/L) de acetato y furfural en pulsos.....	106
Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE 0.5X de productos de amplificación de la PCR en punto final .....	109

Figura 35. Curva de eficiencia de la amplificación del gen <i>gyrA</i> . .....	111
Figura 36. Nivel de expresión de genes en la cepa <i>A. baylyi</i> ADP1. ....	114
Figura 37. Reacción posiblemente catalizada por la enzima AreB.....	116
Figura 38. Cromatografía en columna mostrando los tipos de compuestos obtenidos de la síntesis orgánica del difurfuril éter .....	130
Figura 39. Cromatografía en capa fina de las eluciones provenientes de la cromatografía en columna .....	130
Figura 40. Cromatografía en columna mostrando la fracción que contiene al difurfuril éter.....	131
Figura 41. Electroforesis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE 0.5X de productos de amplificación de la PCR punto final (I).....	138
Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE 0.5X de productos de amplificación de la PCR punto final (II) .....	139
Figura 43. Electroforesis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE 0.5X de productos de amplificación de la PCR punto final (III) .....	140
Figura 44. Electroforesis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE 0.5X de productos de amplificación de la PCR punto final (IV) .....	141
Figura 45. Electroforesis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE 0.5X de productos de amplificación de la PCR punto final (V). C .....	142
Figura 46. Electroforesis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE 0.5X de productos de amplificación de la PCR punto final (VI) .....	143

## Contenido de tablas.

Tabla 1. Conversión química del furfural y el hidroximetil furfural .....	25
Tabla 2. Solución stock 10X para preparar medio M9 (100 mL). .....	49
Tabla 3. Medio mineral M9 con acetato de sodio a 3 g/L.....	49
Tabla 4. Condiciones de amplificación de la PCR de punto final para genes de enzimas posiblemente involucradas en la biotransformación de furfural.....	60
Tabla 5. Condiciones de reacción de la PCR en punto final .....	60
Tabla 6. Condiciones para la elaboración del gel de agarosa al 3% (p/v). .....	60
Tabla 7. Condiciones de la PCR de punto final para el gen <i>pntB</i> .....	67
Tabla 8. Condiciones de reacción de la PCR punto final para el gen <i>pntB</i> . .....	68
Tabla 9. Mezcla de reacción para la obtención de ADNc .....	74
Tabla 10. Lista de genes de referencia comúnmente utilizados en células procariotas.....	76
Tabla 11. Mezcla de reacción para amplificación de genes de referencia endógenos.....	76
Tabla 12. Condiciones de amplificación de la RT-qPCR para genes de referencia endógenos.....	77
Tabla 13. Mezcla de reacción para RT-qPCR .....	78
Tabla 14. Condiciones de amplificación de la RT-qPCR.....	79
Tabla 15. MIC de furfural en cepas de <i>Acinetobacter</i> .....	80
Tabla 16. $\mu$ en ausencia y presencia de furfural 1 (g/L) .....	83
Tabla 17. $\mu$ en ausencia y presencia de furfural y alcohol furfurílico .....	87
Tabla 18. $\mu$ en ausencia y presencia de alcohol furfurílico .....	89

Tabla 19. $\mu$ de cepas de <i>Acinetobacter</i> en presencia de acetato y pulsos de furfural equivalentes a 0.5 g/L.....	90
Tabla 20. Concentración de furfural acumulada mediante pulsos .....	90
Tabla 21. Furfural en pulsos a diferentes concentraciones y tiempos durante la cinética.....	91
Tabla 22. $\mu$ de cepas de <i>Acinetobacter</i> en presencia de acetato y furfural en pulsos equivalentes a 0.5, 1.0 y 2.0 (g/L).....	92
Tabla 23. Concentración de furfural acumulada por los pulsos de 0.5, 1.0 y 2.0 (g/L).....	93
Tabla 24. $\mu$ de <i>A. baylyi</i> ADP1 en medio mineral M9 con 4 g/L de acetato y pulsos de furfural de 0.5 (g/L). .....	106
Tabla 25. Posibles genes de enzimas oxidorreductasas involucrados en la biotransformación de furanos en la cepa <i>A. baylyi</i> ADP1.....	108
Tabla 26. Valores de Cq del gen de referencia <i>gyrA</i> en ADP1 .....	110
Tabla 27. Eficiencia de la reacción de amplificación del gen <i>gyrA</i> . .....	111
Tabla 28. Concentración, pureza e integridad de las muestras de ARN .....	112
Tabla 29. Características de los genes <i>areB</i> y <i>frmA</i> .....	115
Tabla 30. Vías metabólicas en las que participan las enzimas AreB y FrmA (Kegg, 2019). .....	117
Tabla 31. Motivos/Dominios de la enzima AreB. ....	118
Tabla 32. Motivos/Dominios de la enzima FrmA. ....	119
Tabla 33. Genes considerados en el estudio de RT-qPCR para la cepa <i>A. baylyi</i> ADP1 .....	131
Tabla 34. Secuencia de oligonucleótidos empleados en el estudio de RT-qPCR de la cepa <i>A. baylyi</i> ADP1.....	133



## **Abreviaturas y símbolos.**

**$\mu$ :** Velocidad específica de crecimiento.

**ACE:** *Acinetobacter schindleri* cepa ACE.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario.

**ADP1:** *Acinetobacter baylyi* cepa ADP1.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.

**ATP:** Adenosin trifosfato.

**COSY:** Espectroscopía de correlaciones (*Correlation Spectroscopy*).

**FAD:** Dinucleótido de flavina y adenina

**FOH:** Alcohol furfurílico.

**HSQC:** Correlación cuántica heteronuclear simple (*Heteronuclear Simple Quantum Correlation*).

**IR:** Infrarrojo.

**MIC:** Concentración mínima inhibitoria.

**NADH:** Dinucleótido de nicotinamida y adenina.

**NADPH:** Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato.

**OF:** oligonucleótido *forward*.

**OR:** oligonucleótido *reverse*.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

**RF:** Factor de retención.

**RIN:** Número de integridad del ARN (*RNA integrity number*).

**RMN:** Resonancia magnética nuclear.

**RT-qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa.

**TMS:** Tetrametil silano

## Resumen.

Actualmente, la necesidad de sustituir derivados del petróleo va en aumento. Compuestos que anteriormente eran considerados “desechos”, ahora son alternativas prometedoras. La biomasa lignocelulósica es una de estas alternativas. Para tal fin, la biomasa lignocelulósica debe someterse a un tratamiento para ser aprovechada por microorganismos que produzcan compuestos de interés. Lamentablemente, los tratamientos más comunes producen sustancias, como el furfural, que son tóxicas para los microorganismos en cuestión. Se tienen reportes de microorganismos (bacterias y levaduras) capaces de tolerar las sustancias tóxicas provenientes de estos tratamientos e inclusive, catabolizarlas o biotransformarlas en compuestos menos tóxicos. Las cepas *A. schindleri* ACE y *A. baylyi* ADP1 no utilizan el furfural como fuente de carbono, en su lugar, lo transforman en un compuesto menos tóxico identificado como difurfuril éter. La MIC del furfural es de 1.25 g/L para ambas cepas en agar medio mineral M9. La presencia de 1 g/L de furfural disminuye la  $\mu$  de ACE en un 55% y en un 28% en ADP1. La cepa ADP1 biotransforma el furfural a una velocidad mayor en comparación con la cepa ACE. La cepa ADP1 logró biotransformar hasta 8 g/L de furfural mediante la adición de éste en forma de pulsos. El alcohol furfurílico por sí sólo, y en conjunto con el furfural, también es biotransformado al compuesto difurfuril éter por ambas cepas. En la cepa ADP1 se observa una sobreexpresión de los genes *areB* y *frmA*. Hasta donde sabemos, estos resultados son los primeros en donde se reporta la formación de difurfuril éter a partir de furfural y alcohol furfurílico por la posible actividad de las enzimas AreB y FrmA, proponiendo así, un mecanismo diferente a lo ya reportado para otros microorganismos como *E. coli* y *S. cerevisiae*.

## **Capítulo I. Introducción.**

Actualmente, la producción de una amplia gama de productos y energía recaen en el uso de fuentes fósiles. La disminución de las reservas de petróleo y sus efectos ambientales amenazan el futuro de varias industrias y principalmente, el medio ambiente. Las crecientes preocupaciones con respecto a estos temas exigen a nuestra sociedad el desarrollo de energías alternas a las derivadas del petróleo y la elaboración de productos más amigables con la naturaleza a partir de fuentes renovables. México es un país con una extensa industria agrícola, de la cual, se generan residuos de biomasa vegetal como el bagazo de caña, el rastrojo de maíz, la cascarilla de arroz y la leña, que en su conjunto son denominados “biomasa lignocelulósica”.

Esta biomasa representa una materia prima ideal para la obtención de energía y productos, debido a su origen natural y amplia distribución. Dado que la biomasa lignocelulósica está conformada por una matriz compleja, es necesario aplicarle un pretratamiento como el de la hidrólisis ácida a altas temperaturas, que permite obtener hidratos de carbono que pueden ser utilizados por microorganismos para la generación de productos de valor agregado, como el bioetanol.

Lamentablemente, el tratamiento ácido de la biomasa lignocelulósica trae consigo la generación de sustancias tóxicas indeseables como: ácidos débiles, furanos y fenoles. Estas sustancias pueden perjudicar la actividad de los microorganismos que se emplean en el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica, por tal motivo, es importante asegurar su eliminación.

Una de las estrategias más prometedoras para la eliminación de dichas sustancias tóxicas es el uso de otro tipo de microorganismos capaces de biotransformar los compuestos tóxicos en compuestos menos tóxicos, logrando así la detoxificación del medio previo a su utilización para aprovechar los hidratos de carbono. La presente investigación estudia la biotransformación del furano furfural en medio mineral M9 mediante el uso de dos cepas del género *Acinetobacter*, las cuales, tienen la peculiaridad de convertir el furfural en un componente menos tóxico y de utilizar al acetato como única fuente de carbono dejando los hidratos de carbono de la biomasa intactos. Estas características hacen a dichas cepas un atractivo modelo de estudio que hasta el momento no ha sido lo suficientemente explorado.

## Capítulo II. Antecedentes.

### **Biomasa lignocelulósica.**

La biomasa lignocelulósica (figura 1) es considerada como una de las alternativas más prometedoras para la generación de productos de valor agregado, este material se genera a partir de CO<sub>2</sub> atmosférico, agua y luz solar por medio de la fotosíntesis.

La biomasa lignocelulósica ha sido considerada como la única fuente sostenible de carbono orgánico en la tierra y equivalente al petróleo para la producción de combustibles y productos químicos con una emisión de carbono neta igual a cero, contribuyendo así a la disminución de emisiones de CO<sub>2</sub> y contaminación a la atmósfera. Los azúcares polimerizados contenidos en la biomasa lignocelulósica pueden ser separados a su forma monomérica mediante hidrólisis y ser aprovechados por microorganismos fermentadores para la producción de etanol, también llamado *bioetanol* (Furkan, 2015; Palmqvist, 2000).

La conversión de la biomasa lignocelulósica en combustibles, químicos finos y otros productos sigue siendo un gran desafío para una eventual aplicación comercial. La lignocelulosa, material que constituye la pared de las células vegetales, ha evolucionado para resistir la degradación. Esta propiedad inherente de los materiales lignocelulósicos los hace resistentes a la degradación enzimática y química. Para liberar los azúcares de la biomasa, se deben cambiar las propiedades físicas y químicas de la matriz lignocelulósica, para ello se recurre al pretratamiento previo de la biomasa lignocelulósica, el cual, es un procedimiento costoso, pero,

esencial. Los materiales lignocelulósicos son abundantes y, por lo general, tienen un precio bajo.

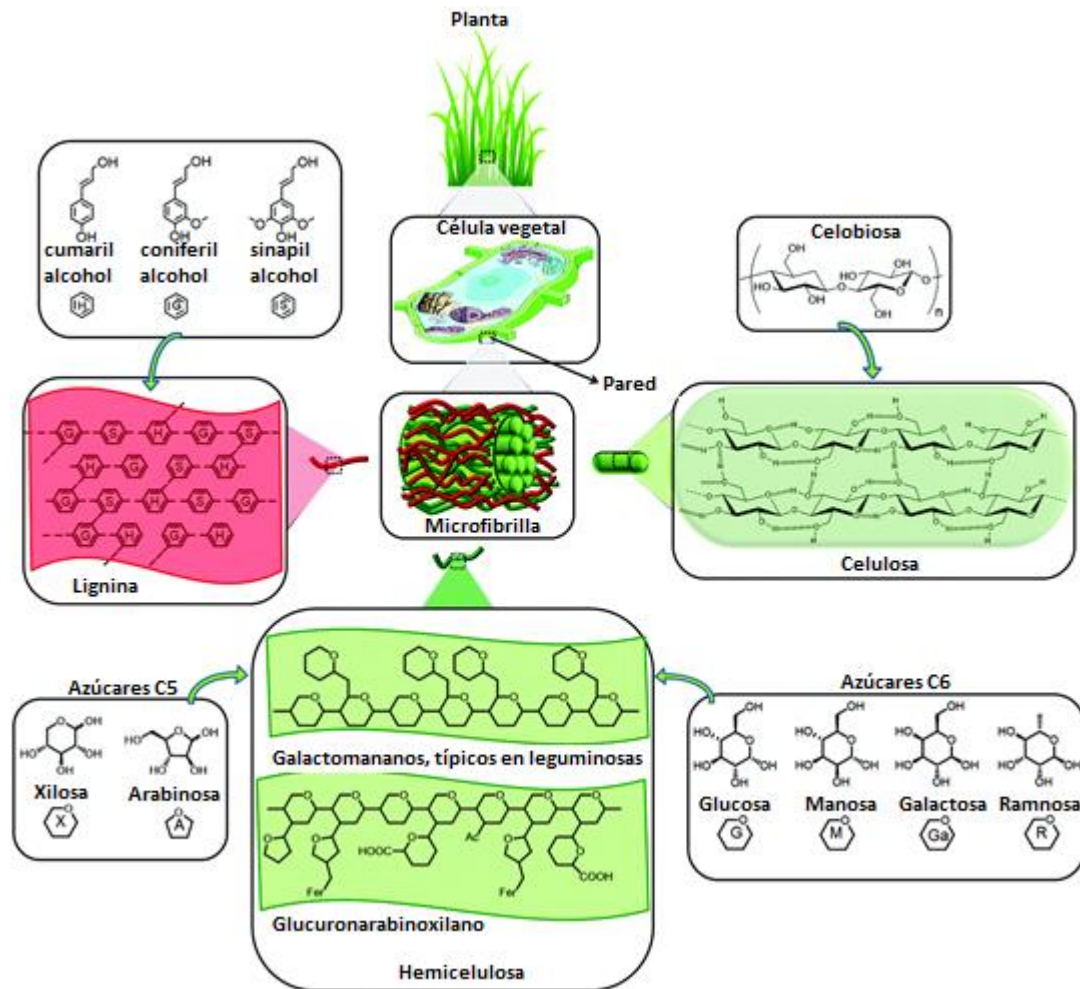


Figura 1. Estructura y componentes principales de la biomasa lignocelulósica. Esta biomasa contiene 35-50% de celulosa, 20-35 % hemicelulosa y 10-25 % de lignina (Furkan, 2015).

### Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.

Los métodos de pretratamiento se dividen en diferentes categorías: mecánicos, químicos, físicos y biológicos o combinaciones de éstos. Se conocen varias opciones de pretratamiento para fraccionar, solubilizar, hidrolizar y separar los componentes de celulosa, hemicelulosa y lignina. Algunos de ellos incluyen fresado, irradiación,

microondas, explosión de vapor, explosión de fibra de amoníaco (AFEX), CO<sub>2</sub> supercrítico y su explosión, SO<sub>2</sub>, hidrólisis alcalina, pretratamiento de agua caliente, solventes orgánicos, oxidación húmeda, ozonólisis, hidrólisis ácida diluida y concentrada, y pretratamientos biológicos. El objetivo común de estos métodos es modificar la estructura física y química de la biomasa. Se ha reportado que cada uno de estos métodos tiene distintas ventajas y desventajas (Furkan, 2015). Actualmente, los pretratamientos de hidrólisis ácida son los más usados debido a su bajo costo, practicidad y eficiencia. El pretratamiento por hidrólisis ácida diluida es el más utilizado dada su rapidez y facilidad de implementación y tiene como finalidad liberar los azúcares contenidos en la biomasa lignocelulósica dejándolos disponibles para microorganismos fermentadores, los cuales, pueden aprovecharlos para generar diversas sustancias. No obstante, este procedimiento también genera sustancias que tiene como base el anillo de furano (Furkan, 2015).

### **Furano.**

El furano es un compuesto orgánico heterocíclico que consta de cuatro átomos de carbono y un oxígeno. Es soluble en solventes orgánicos, pero es insoluble en agua. Este compuesto está presente en varios alimentos, la ingesta de hasta 3.5 g/kg de peso corporal/día representa un riesgo potencial para la salud humana por ser considerado mutágeno (Izzotti, 2014). La formación de furanos se origina con la degradación térmica de azúcares (reacción de Maillard), aminoácidos, ácido ascórbico, ácidos grasos poliinsaturados y carotenoides (Izzotti, 2014). Con base en la descripción de Majumdar y colaboradores (2011), el anillo de furano está presente



en una gran variedad de productos naturales, desde acetogeninas, policétidos, fenilpropanoides, terpenos y alcaloides complejos. Varios de estos productos tienen una potente actividad biológica: algunos son feromonas sexuales, otros compuestos de defensa y varios han sido estudiados clínicamente para tratar enfermedades. Por ejemplo, los alcaloides del tipo morfina han sido usados desde tiempos ancestrales para el tratamiento del dolor intenso; terpenos como el Salvinorin A o el disidiolide, son conocidos por sus propiedades citostáticas y alucinógenas. En general, los compuestos que contienen anillos de furano y sus derivados han sido encontrados en toda clase de organismos marinos (bacterias, hongos, algas y moluscos) y terrestres (hongos, plantas, insectos y bacterias).

Los furanos obtenidos a partir de la hidrólisis ácida diluida de la biomasa lignocelulósica son el furfural y el hidroximetil furfural (HMF) (figura 2). Estos furanos pueden servir como plataforma para modificarlos químicamente y usarse en muchas aplicaciones dentro de la industria. Ejemplos de productos donde los derivados del furfural y del HMF son utilizados los encontramos en pinturas, barnices, combustibles y plásticos (tabla 1). Dado que el material de partida es de base biológica, estos productos tienen un gran potencial para convertirse en sustitutos de este mismo tipo de productos que actualmente tienen como base sustancias fósiles (Alqmvist, 2018).

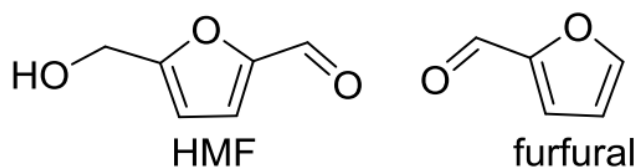


Figura 2. Estructura química del HMF y el furfural (Alqmvist, 2018).

Tabla 1. Conversión química del furfural y el hidroximetil furfural.

<b>Furano</b>	<b>Derivados</b>	<b>Aplicaciones</b>
Furfural	Metil tetrahidrofurano (MeTHF)	Solvente y biocombustible
	Alcohol furfurílico	Intermediario para la síntesis de polímeros, aglutinante y saborizante
Hidroximetil furfural	Dimetil furano (DMFu)	Biocombustible
	Caprolactona	Recubrimientos, adhesivos, elastómeros, bioplásticos y espumas
	Ácido levulínico	Precursor de MeTHF, resina, biocombustible, anticongelante, herbicida, fragancia y tintes textiles

La figura 3 muestra un esquema general de las rutas que sigue la biomasa lignocelulósica para convertir furanos en productos de interés industrial tras el pretratamiento de hidrólisis ácida diluida.

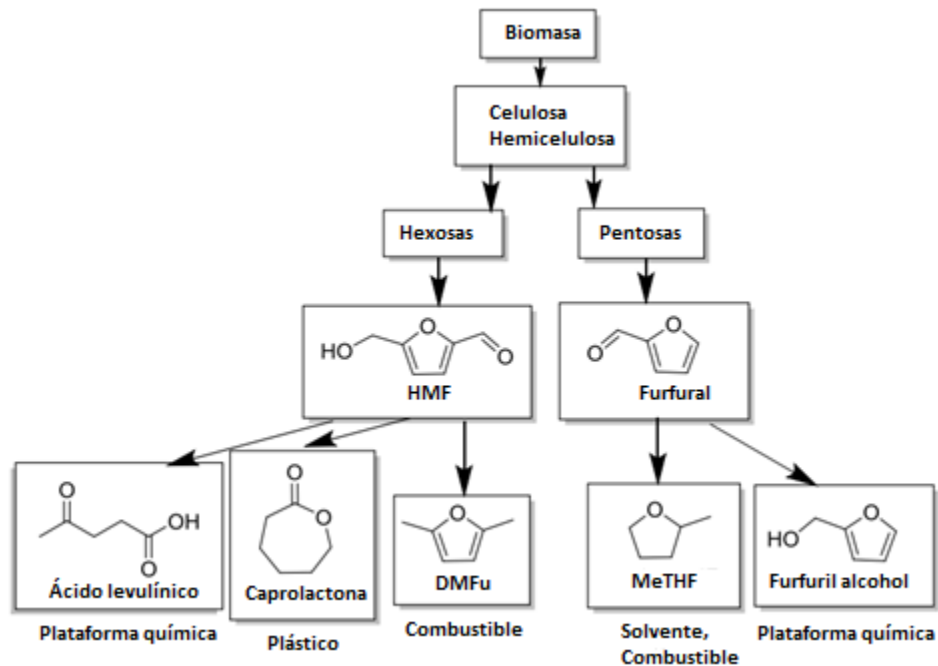


Figura 3. Biomasa lignocelulósica: rutas de transformación de furanos hacia productos de interés industrial (Almqvist, 2018).

Sin embargo, los furanos presentan la desventaja de ser sustancias tóxicas -*también llamadas inhibidores*- para los microorganismos fermentadores, limitando su capacidad fermentativa (Palmqvist, 2000).

Además de estos, otros compuestos inhibidores son formados por la degradación parcial de los diferentes componentes de la matriz lignocelulósica durante el pretratamiento y se clasifican en 3 grupos:

- Ácidos orgánicos débiles.
- Derivados del furano.
- Compuestos fenólicos.

La degradación de la hemicelulosa libera xilosa, arabinosa, manosa, ácido acético, galactosa y glucosa, mientras que la celulosa libera glucosa. A su vez, la xilosa puede

ser transformada a furfural. De manera similar, el 5-hidroximetil furfural (HMF) es formado por la degradación de hexosas. El ácido fórmico es producido cuando el furfural y el HMF son degradados. El ácido levulínico es formado por degradación del HMF. Los compuestos fenólicos son generados durante el rompimiento parcial de la lignina, aunque también se ha reportado su formación a partir de la degradación de la xilosa y la glucosa presentes en la hemicelulosa (Figura 4 y 5).

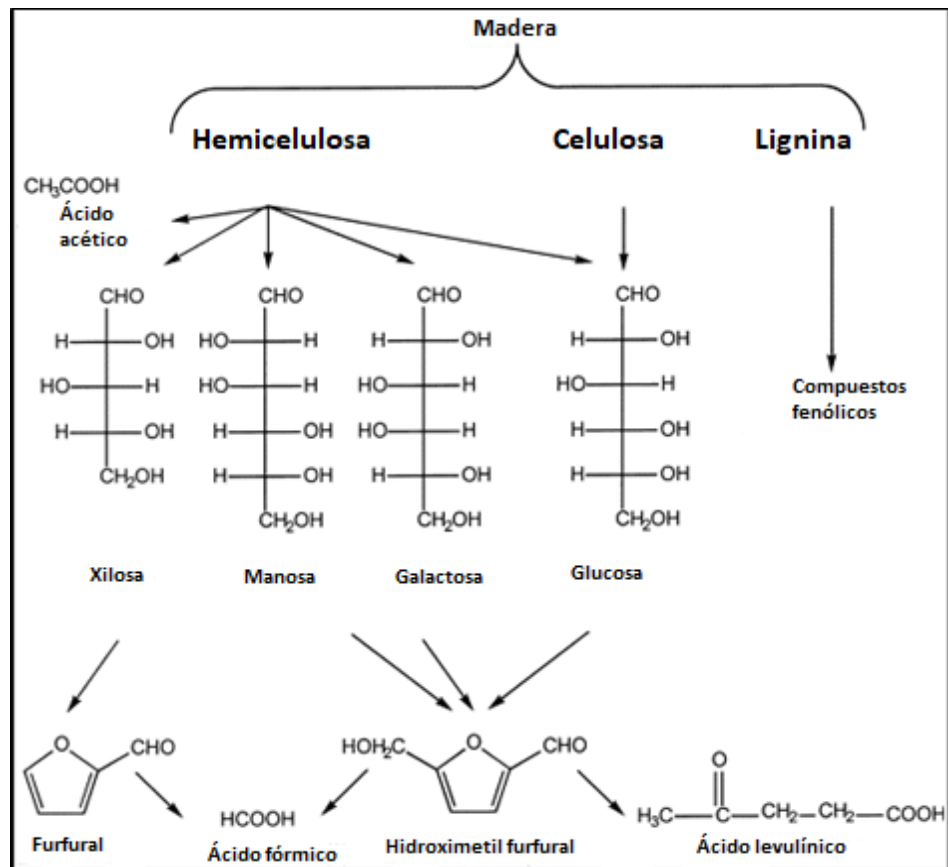


Figura 4. Productos obtenidos durante el pretratamiento de hidrólisis ácida diluída de materiales lignocelulósicos. Los compuestos fenólicos y derivados del furano reaccionarán para formar algunos materiales poliméricos (Palmqvist, 2000).

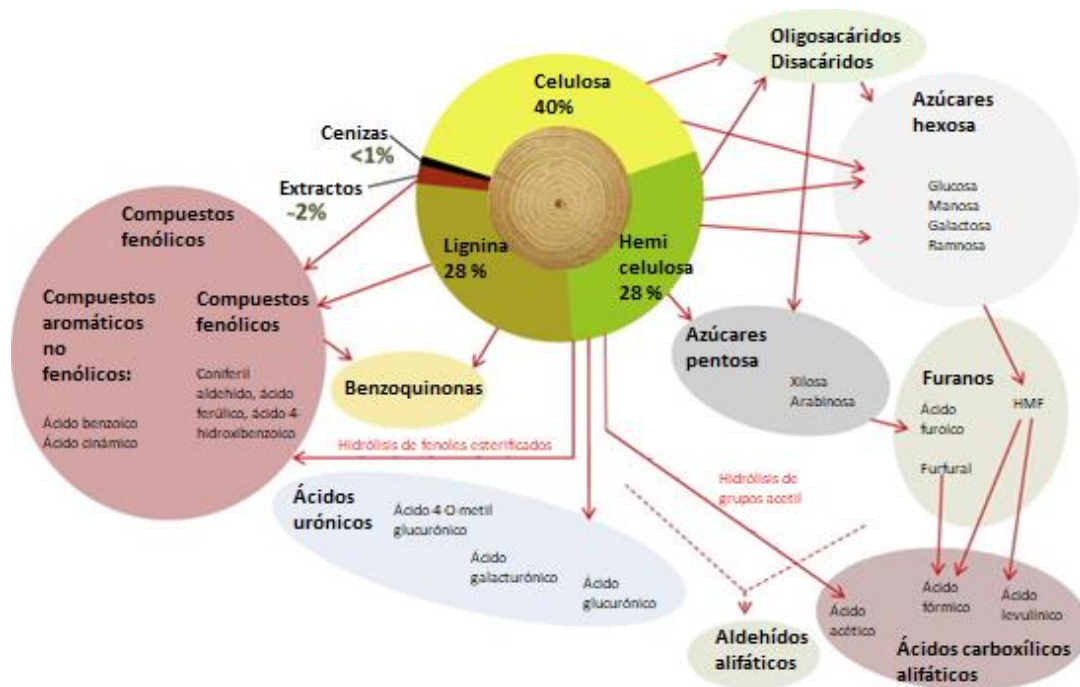


Figura 5. Productos obtenidos a partir de la degradación de la biomasa lignocelulósica como resultado del pretratamiento de hidrólisis ácida diluida (Jönson, 2016).

Los hidrolizados de biomasa lignocelulósicas pueden ser empleados/aprovechados junto con todos sus componentes (tóxicos y no tóxicos). Sin embargo, existen estrategias de detoxificación de las cuales destacan (Jönson, 2016):

- Detoxificación previa a la etapa de fermentación mediante el uso de métodos fisicoquímicos.
- Detoxificación previa a la etapa de fermentación mediante el uso de enzimas.
- Detoxificación previa a la etapa de fermentación mediante el uso de microorganismos.

- Empleo de microorganismos resistentes a los compuestos inhibidores, por ejemplo, levaduras o bacterias naturalmente tolerantes, adaptadas o bien modificadas por ingeniería genética.

### **Toxicidad de los compuestos inhibidores.**

Tras el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, ésta es convertida en azúcares y compuestos inhibidores, principalmente. Estos inhibidores pueden afectar el metabolismo microbiano de varias formas, desde mutaciones en el ADN, disrupción de la membrana celular, descenso del pH intracelular, inhibición de enzimas esenciales y hasta otros blancos no especificados dentro de la célula (figura 6). A pesar de que se han optimizado los pretratamientos de la biomasa lignocelulósica, inhibidores como el ácido acético, se liberan directamente por la descomposición de la hemicelulosa, y están siempre presentes en los hidrolizados. Hasta el momento, de los organismos existentes usados en procesos industriales para la producción de bioetanol los más prometedores son *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*. Cada uno de estos microorganismos tiene sus limitaciones en la utilización de sustrato, capacidad de producción y tolerancia a componentes tóxicos. Algunos de los compuestos inhibitorios y sus mecanismos de toxicidad se detallan a continuación (Mills, 2009).

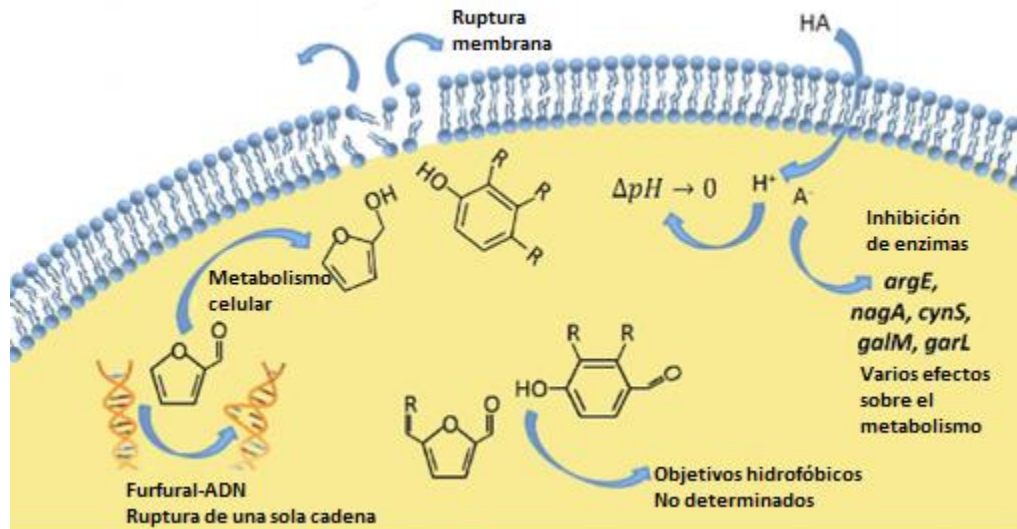


Figura 6. Mecanismos de toxicidad de los compuestos inhibidores. (Mills, 2009).

### Ácidos orgánicos débiles.

El ácido acético es formado por la hidrólisis del *acetil xilano*, el principal componente de la hemicelulosa; otros, como el ácido fórmico o el ácido levulínico, son resultado de la degradación de azúcares (figura 4 y 5). El ácido acético es usualmente encontrado en concentraciones elevadas dentro de los hidrolizados, de 1 a 10 g/L, dependiendo del tipo de biomasa y del método y condiciones de pretratamiento. El ácido fórmico, que es mucho más tóxico que el ácido acético para el caso de *E. coli*, se encuentra presente en concentraciones mucho menores (comúnmente una décima parte de la concentración del ácido acético). Otros ácidos débiles pueden estar presentes dentro de los hidrolizados, aunque en concentraciones muy por debajo de las reportadas para el ácido fórmico y el ácido acético. Los ácidos orgánicos débiles inhiben la producción de masa celular (crecimiento), pero no inhiben el proceso de fermentación. El ácido acético es el inhibidor ácido más estudiado hasta el momento, además de ser un metabolito celular formado por la

fermentación, el cual, se acumula debido al “sobreflujo metabólico” inhibiendo el crecimiento celular. Los ácidos débiles en su forma no disociada pueden permear la membrana celular, y, una vez dentro, disociarse para liberar el anión y el protón (Figura 7).

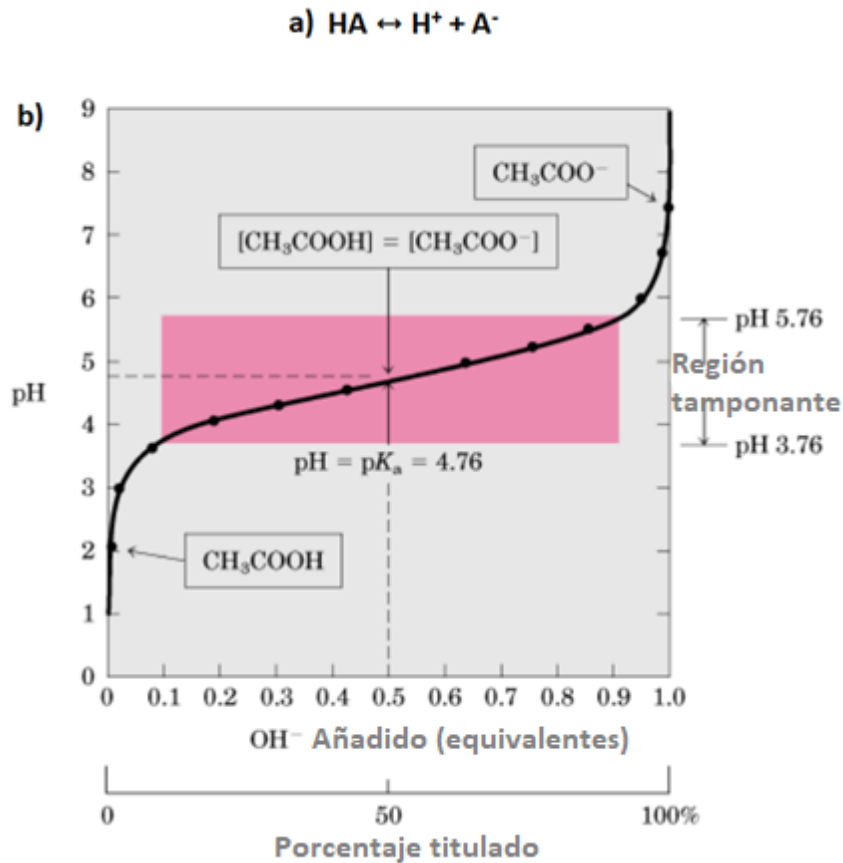


Figura 7.a) Reacción de disociación de un ácido orgánico débil.  
 b) Curva de titulación del ácido acético (Nelson & Cox, 2006).

El protón interrumpe el potencial de pH transmembranal atravesando la membrana sin la creación de ATP. La disociación del ácido débil dentro del citoplasma es causada por el pH intracelular, el cual, es de aproximadamente 7.8 en *E. coli*, valor mucho más alto que el pKa de los ácidos débiles. Como estos ácidos se encuentran disociados dentro de la célula, el pH disminuye, lo cual, inhibe el crecimiento.



Experimentos realizados con *E. coli* han demostrado una mayor toxicidad por parte del ácido fórmico comparado con el ácido acético. La hidrofobicidad es un marcador de la toxicidad de los compuestos orgánicos (Mills, 2009). El ácido fórmico puede ser más tóxico debido a que tiene una permeabilidad mucho más alta que el ácido acético a través de la membrana; esto debido a un menor coeficiente de partición octanol/agua, ( $\log P_{\text{octanol/agua}}$ ), el cual, lo vuelve más hidrofóbico (Zaldivar, 1999). El pH externo tiene un gran efecto sobre la toxicidad de los ácidos débiles, este pH extracelular afecta a la célula debido a que el ácido existe en su forma no dissociada y en concentraciones muy altas, lo que permite una mayor permeación a través de la membrana celular. Una vez dentro de la célula, los aniones del ácido dissociado se acumulan y afectan la presión turgente provocando un desequilibrio e inhibición del crecimiento, además de que los protones liberados disminuyen el pH intracelular (Roe, 1998). Se ha demostrado que la inhibición puede ser aniónica-específica y que la toxicidad de los ácidos depende en gran medida de su hidrofobicidad. Experimentos han demostrado que la adición de ácido fórmico y propiónico en el medio de cultivo inhibe la síntesis de macromoléculas como el ADN, sin embargo, no existe evidencia de que estos ácidos actúen directamente sobre el ADN. Finalmente, se ha mostrado que los ácidos débiles reducen la concentración citoplasmática de algunos aminoácidos dentro de la célula como son el glutamato y el aspartato, precursores de importantes macromoléculas (Roe, 1998). El glutamato es un importante osmolito de naturaleza aniónica, protector durante el crecimiento celular. En *E. coli* se ha concluido que se produce un intercambio de glutamato por

iones acetato para mantener la neutralidad dentro de la célula, sin embargo, el mecanismo por el cual disminuye la concentración del glutamato aún no está claro, pudiendo ser debido a su entrada en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, su excreción o su transformación por la glutamato descarboxilasa, que está implicada en la supervivencia a pH ácidos (Roe, 1998). La lisina, arginina, glutamina y metionina que están directamente relacionadas con el glutamato y el aspartato a través del metabolismo, también se encontraron en bajas concentraciones tras el cultivo con un ácido débil (Mills, 2009; Roe, 2002). Sin embargo, los mecanismos por los cuales estos aminoácidos también disminuyen su concentración tampoco están del todo claros (Roe, 2002).

#### **Compuestos fenólicos.**

La biomasa lignocelulósica puede contener hasta un 30% en peso de lignina. La mayoría de los compuestos fenólicos se generan por la degradación de la lignina (figura 4 y 5) y estos contienen los grupos funcionales carboxilo, formilo o hidroxilo (figura 8).

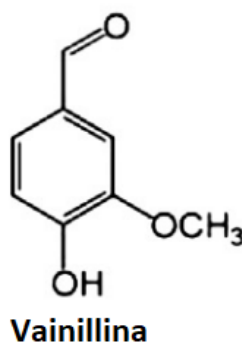


Figura 8. Estructura de la vainillina. Compuesto fenólico proveniente de los hidrolizados de biomasa lignocelulósica (Monlau, 2014).

Los compuestos fenólicos pueden inhibir tanto el crecimiento de los microorganismos fermentadores, como su rendimiento en la elaboración de productos de valor agregado. Su efecto tóxico es debido a diferentes mecanismos y puede estar relacionado a grupos funcionales específicos, pero en la mayoría de los casos los mecanismos no están bien determinados. Se cree que los fenoles interfieren con el arreglo de la membrana celular, interfiriendo en su función y cambiando la proporción proteína-lípido, comprometiendo la integridad celular (Jönson, 2013). En general, el grado de toxicidad de un compuesto fenólico se correlaciona con el coeficiente de partición octanol/agua,  $\log(P_{\text{octanol/agua}})$ , que es una medida del grado de hidrofobicidad. Estudios han demostrado que compuestos fenólicos como la vainillina ( $\log P_{\text{octanol/agua}} = 1.43$ ) son más tóxicos que el ácido acético ( $\log P_{\text{octanol/agua}} = -0.17$ ) y el furfural ( $\log P_{\text{octanol/agua}} = 0.41$ ), inclusive, si cuentan con el mismo grupo funcional. Un experimento demostró que la vainillina, un aldehído fenólico comúnmente encontrado en los hidrolizados, es un compuesto bacteriostático y activo dentro de la membrana celular (Mills, 2009). Es causante de la interrupción de los gradientes transmembranales de  $K^+$  en cultivos de *E. coli*. 29% de la población bacteriana de estos cultivos experimentó una desestabilización de la membrana tras el tratamiento con vainillina durante una hora a más del triple de la concentración mínima inhibitoria, sin embargo, 13 % de la población se restauró al continuar con el cultivo durante toda la noche. Este estudio mostró también que la producción de ATP continuó sin interrupción significativa y que el daño a la membrana no contribuía significativamente a la toxicidad. Se han desarrollado

hipótesis que afirman que además de la membrana celular, otros componentes hidrófobos dentro de la célula son objetivo de los compuestos fenólicos (Mills, 2009).

### **Furano y sus derivados.**

Los compuestos derivados del furano son el resultado de la deshidratación de los azúcares durante el pretratamiento. El furfural y el hidroximetil furfural (HMF) son los primeros derivados del furano que se forman en los hidrolizados (figura 4 y 5). Su concentración típica se encuentra entre 0 y 5 g/L para cada uno de ellos (Mills, 2009).

El furfural ha sido identificado como un inhibidor clave dentro de los hidrolizados lignocelulósicos debido a su toxicidad intrínseca y al efecto sinérgico que tiene con otros inhibidores. De forma general los compuestos altamente hidrofóbicos han mostrado comprometer la integridad de la membrana celular al modificar su estructura. Sin embargo, no se ha mostrado un daño perceptible a la membrana de *E. coli* durante la exposición a furfural, a pesar de su ya conocido valor de log ( $P_{\text{Octanol/agua}}$ ) de 0.41. 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. Las deshidrogenasas glucolíticas como la alcohol deshidrogenasa (ADH) es blanco del furfural teniendo como consecuencia la no transformación del aldehído en su correspondiente alcohol (Mills, 2009). Un estudio realizado *in vitro* ha confirmado que la conversión de acetaldehído a etanol fue inhibida por furfural e hidroximetil

furfural (Modig, 2002). Los ensayos enzimáticos *in vitro* posteriores demostraron que el furfural era un sustrato de la enzima alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), aunque con un aumento de 5 veces la  $K_m$  y una disminución de 5 veces su  $V_{m\acute{a}x}$  (Mills, 2009). El valor de  $K_m$  representa la afinidad de una enzima por un sustrato; a menor valor de  $K_m$ , mayor afinidad de la enzima por el sustrato, y a mayor  $K_m$ , menor afinidad. En el mismo estudio, se investigó la inhibición de la aldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.5) y el complejo piruvato deshidrogenasa y se encontró que es mayor la inhibición de estas enzimas comparado con la alcohol deshidrogenasa (ADH), según lo indicado por una reducción de la actividad de más del 80% en presencia de 0.12 (g/L) de furfural, mientras que la actividad de la ADH solo fue inhibida en un 60%. Estos descubrimientos sugieren que el furfural puede afectar múltiples enzimas que se encuentran en el nodo del piruvato, afectando varias partes del metabolismo, no solo la ruta que lleva a la producción de etanol. El furfural y el HMF han mostrado características citotóxicas tanto en bacterias como en levaduras. El furfural es un mutágeno que puede estar presente en los alimentos y ha estado bajo investigación por efectos directos en el ADN (Mills, 2009). Una serie de estudios realizados por Hadi y colaboradores (1989) confirmaron que se producen interacciones entre el furfural y el ADN. 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. Finalmente, 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 (Mills, 2009).

### **Mecanismos de detoxificación de hidrolizados de biomasa lignocelulósica mediante el uso de microorganismos.**

Se ha reportado que varias bacterias y levaduras son capaces de transformar el furfural a alcohol furfurílico o ácido furoico, o una combinación de ambos. Algunos ejemplos de organismos detoxificadores son mencionados a continuación.

*Saccharomyces* spp ha mostrado reducir el furfural a alcohol furfurílico. También se ha demostrado que algunas bacterias entéricas como *E. coli* KO11 y LY01 y *Klebsiella oxytoca* pueden metabolizar el furfural a alcohol bajo condiciones aerobias y anaerobias, reportándose la reducción completa del furfural a alcohol furfurílico por las cepas arriba mencionadas (Preston, 2002).

*E. coli* LY01 usa una enzima denominada furfural reductasa (FFR) para catalizar la reducción de furfural a alcohol furfurílico (Preston, 2006). También se sabe que 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, 2011).

Bajo condiciones anaeróbicas en levaduras, el furfural se reduce a alcohol furfurílico por deshidrogenasas acopladas a NADH. Una enzima alcohol deshidrogenasa dependiente de NADH, ADH6, tiene una amplia especificidad para este sustrato (Liu, 2006). En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se conocen 4 enzimas involucradas

en la reducción de furfural e hidroximetil furfural (HMF) a furan metanol (alcohol furfurílico) y furan dimetanol, respectivamente (Liu, 2008).

Finalmente, FurX es una enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) dependiente de zinc, tetramérica, proveniente de *Cupriavidus necator* JMP134. Es encargada de la reducción de furfural a compuestos menos tóxicos utilizando NADH como cofactor; de manera similar, el gen *cgl0331* (designado *FudC*) es el principal responsable de la reducción de furfural a alcohol furfurílico en *Corynebacterium glutamicum*, figura 9 (Kang, 2012; Tsuge, 2015).

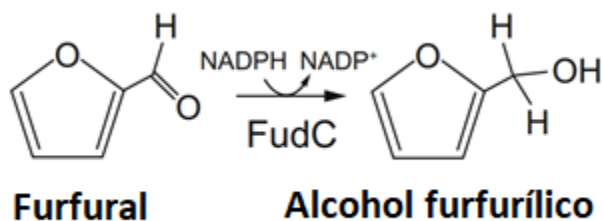


Figura 9. Detoxificación del furfural en la cepa *Corynebacterium glutamicum*. *FudC* es responsable de la reducción de furfural a alcohol furfurílico con NADPH como cofactor.

### **El género *Acinetobacter*.**

El género *Acinetobacter* pertenece al orden de *Pseudomonadales* y comprende bacterias estrictamente aerobias, no fermentativas y gramnegativas 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. Algunas especies, como *A. baumannii*, pueden ser patógenas y se consideran oportunistas, con una incidencia especial en entornos nosocomiales. Por el contrario, la cepa no patógena *A. baylyi* ADP1 tiene un interés biotecnológico notable por su excelente

capacidad de transformación natural, recombinación genética eficiente y su capacidad para degradar compuestos aromáticos (Sigala, 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. 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. Sin embargo, a pesar de la extensa investigación sobre *A. baumannii* y *A. baylyi* ADP1, y de las secuencias de los genomas completos de otras especies de *Acinetobacter* disponibles, aun no se explican las bases de la adaptación de estas bacterias a entornos tan diferentes (Sigala, 2017).

De acuerdo con trabajos previos, las cepas de *A. baylyi* ADP1 y *A. schindleri* ACE no utilizan al furfural como fuente de carbono, sino que este es biotransformado, al parecer, a un compuesto menos tóxico. Dicho compuesto se detectó al observar una nueva señal en los cromatogramas de HPLC, se obtuvo mediante una extracción líquido-líquido con cloroformo del sobrenadante de los medios de cultivo al término de las cinéticas de crecimiento y finalmente, se caracterizó mediante cromatografía en capa fina, Resonancia Magnética Nuclear de protón y carbono ( $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$ ) e Infrarrojo (IR) determinándose que este compuesto menos tóxico es el difurfuril éter (Figura 10) (Cerros, 2017).



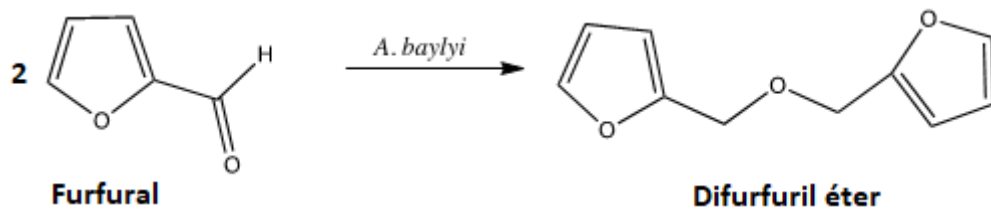


Figura 10. Representación de la biotransformación del furfural a difurfuril éter mediante *A. baylyi* ADP1.

### Transcriptoma.

La cantidad de moléculas producidas de determinado ARNm dependen de la función que este tenga en un proceso celular específico. Así, cuando se requiera dar respuesta a una condición determinada en la cual un gen tiene una participación importante, más moléculas de este transcrito se producirán. De manera similar, bajo ciertas circunstancias particulares hay genes que permanecen apagados, pero un estímulo hace que se expresen y se inicia entonces la transcripción. De esta manera, la determinación de dónde, cómo y cuándo es generado un transcrito, bajo una condición dada, es fundamental para el entendimiento de la actividad biológica de un gen.

Más aún los niveles de ARNm pueden dar una visión clara de patrones de expresión, y su cuantificación en la mayoría de los casos puede estar altamente correlacionada con la abundancia de las proteínas asociadas. En conjunto, a todos los transcritos derivados de genes que se producen en una célula en un momento y bajo una condición fisiológica determinada se les denomina *transcriptoma* (Soto, 2012).

### **Análisis de expresión de genes.**

El estudio y análisis de la expresión de genes es esencial para el entendimiento de la función de estos, y se le conoce de manera genérica como análisis o estudios transcripcionales. De manera general, se puede establecer que si un gen se expresa en una condición o célula determinada es porque cumple ahí una función. El estudio global del transcriptoma permite también establecer patrones de regulación génica coordinada, lo que contribuye no solo a dilucidar la función y agrupamiento de varios genes bajo un estímulo o condición específica, sino también a identificar elementos promotores comunes a varios genes. Para llevar a cabo este análisis es necesario echar mano de alguna técnica que permita cuantificar el número de transcritos y determinar la cantidad de actividad de los genes, en un tipo específico de células o tejidos y bajo una condición de interés (Soto, 2012). Cada microorganismo contiene genes esenciales para su supervivencia, los cuales, muestran diferentes patrones de expresión de acuerdo con las características fisiológicas de cada especie. Estas diferencias son las responsables de distintas propiedades y comportamientos a nivel celular.

Al obtener y comparar transcritos de distintos microorganismos se puede adquirir un conocimiento más profundo de su función bajo condiciones de interés. Las principales técnicas para llevar al cabo el análisis de transcritos son:

- a. Microarreglos de ADN (microarrays).
- b. RT-qPCR.
- c. ARN-seq (secuenciación del ARN).

## **RT qPCR.**

Los primeros ensayos efectuados en PCR tiempo real fueron reportados por Higuchi en 1993, utilizando bromuro de etidio como agente intercalante, empleando un termociclador modificado que permitía irradiar las muestras con luz ultravioleta y detectar la fluorescencia mediante una cámara CCD (*charge coupled device*) encargada de la conversión de la señal luminosa a una señal eléctrica. Con esta técnica se efectuaron los primeros ensayos de PCR en tiempo real, sin embargo, tenía muchas desventajas, la baja sensibilidad del bromuro de etidio, la falta de especificidad y el riesgo a la salud que involucra trabajar con este compuesto. Las características que los agentes detectores o reporteros deben cumplir son:

- a. La fluorescencia que generan debe ser directamente proporcional al número de copias obtenidas en cada ciclo de la PCR.
- b. Que la molécula fluorescente no inhiba o disminuya la eficiencia de amplificación durante la reacción de PCR.

Actualmente los agentes reporteros más comunes, utilizados para ensayos de tiempo real son: 1) SYBR GREEN<sup>®</sup>, que igual que el bromuro de etidio es un intercalante de bases de ADN y 2) Sondas Taqman<sup>®</sup>, que son fragmentos de ADN específicos que tienen unido un fluoróforo y un apagador (o quencher) (*Thermo Fisher Scientific, 2017*).

## **Transcripción reversa.**

La transcripción reversa es la síntesis de un ADN monocatenario (ADN complementario o ADNc) tomando un ARN monocatenario como plantilla, mediado

por enzimas denominadas transcriptasas reversas. El ADNc puede utilizarse como plantilla para la amplificación por PCR o para generar una biblioteca de ADNc.

El dogma central original de la biología molecular sostuvo que el ADN se transcribió a ARN, que a su vez se tradujo en proteína (Figura 11). Sin embargo, este concepto fue desafiado en la década de 1970 cuando dos equipos científicos, uno liderado por Howard Temin de la Universidad de Wisconsin y el otro dirigido por David Baltimore del MIT (*Massachusetts Institute of Technology*), identificaron de forma independiente nuevas enzimas asociadas con la replicación de virus ARN llamados retrovirus. Estas enzimas convierten el genoma del ARN viral en una molécula de ADN complementaria (ADNc), que entonces es capaz de integrarse en el genoma del huésped. Estas son ADN polimerasas dependientes de ARN y se denominan transcriptasas reversas porque, en contraste con el flujo de ADN a ARN, transcriben plantillas de ARN en moléculas de ADNc. En 1975, Temin y Baltimore recibieron el Premio Nobel de Fisiología por su trabajo pionero en la identificación de transcriptasas reversas (*Thermo Fisher Scientific, 2017*).

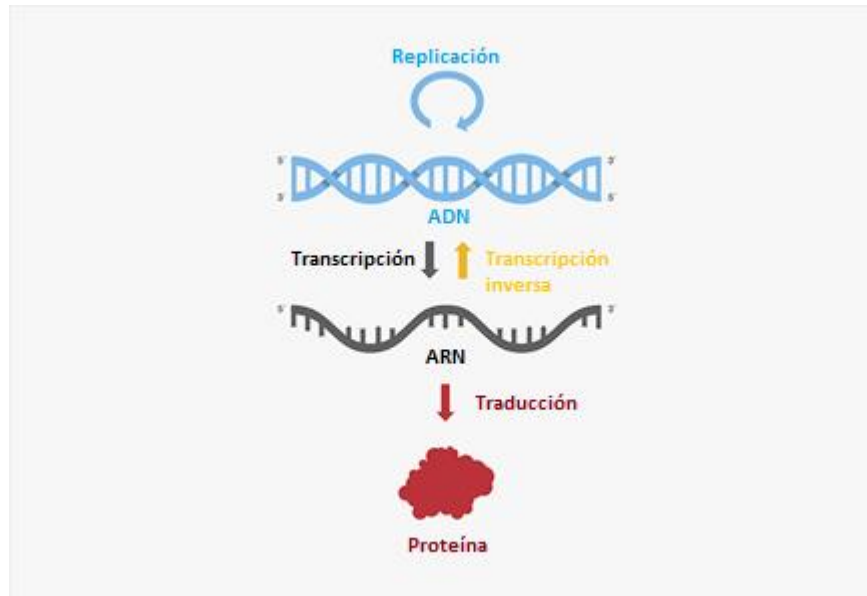


Figura 11. Flujo de información genética, incluye la transcripción inversa. La molécula de ADN es transcrita a una molécula de ARN que posteriormente se traduce en una proteína (© 2017 Thermo Fisher Scientific Inc).

Se han identificado transcriptasas reversas en muchos organismos, incluyendo virus, bacterias, animales y plantas. De esta manera, la transcripción reversa contribuye a la:

- a. Propagación de retrovirus, como: el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la mieloblastosis aviar (AMV).
- b. Diversidad genética en eucariotas a través de elementos móviles transponibles llamados retrotransposones.
- c. Replicación de los extremos cromosómicos llamados telómeros.
- d. Síntesis de elementos quiméricos extracromosómicos de ADN/ARN llamados ADN de una sola cadena multicopia (msDNA) en bacterias.

Mientras que las transcriptasas reversas tienen diversas funciones en los sistemas biológicos, también sirven como herramientas importantes para estudiar las

poblaciones de ARN. Uno de los primeros protocolos de Biología Molecular utilizó transcriptasas reversas para la producción de ADNc y así construir bibliotecas que contenían copias de ADN de ARNm de células y tejidos (*Thermo Fisher Scientific, 2017*).

Aunque la creación de bibliotecas de ADNc fue un paso importante en la caracterización de los genes expresados, el reto se mantuvo para el estudio de la baja abundancia de ARN. Posteriormente con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una técnica para amplificar pequeñas cantidades de material genético, la anterior aplicación mejoró. La transcripción reversa combinada con PCR o qPCR de transcripción reversa (RTqPCR), permite la detección de ARN incluso a niveles muy bajos de expresión génica y abre el camino para la detección de ARN circulante, virus de ARN y fusiones de genes cancerosos en diagnósticos moleculares. Además, el ADNc puede servir como plantilla en aplicaciones tales como microarreglos y RNA-sequencing, para caracterizar ARN's desconocidos con un alto rendimiento (*Thermo Fisher Scientific, 2017*).

### **Capítulo III. Justificación y objetivos.**

#### **Justificación.**

Dentro de los hidrolizados de biomasa lignocelulósica, el furfural proviene de la deshidratación de azúcares pentosas; ha mostrado inhibir el crecimiento celular de microorganismos etanológicos, induciendo daño en el ADN y la inhibición de varias enzimas involucradas en la glucólisis (Ask, 2013).

La importancia de este trabajo radica en caracterizar fisiológica y molecularmente la biotransformación del furfural al compuesto difurfuril éter en cepas de *Acinetobacter* como posibles agentes para la detoxificación de hidrolizados de biomasa lignocelulósica. Es de suma importancia conocer que enzimas llevan a cabo dicho proceso para saber en que vía de biotransformación están involucradas, y a su vez, que productos generan y si éstos son menos tóxicos para microorganismos etanológicos.

Para tal fin, se determinó la concentración mínima inhibitoria de furfural en ambas cepas, se comparó la velocidad específica de crecimiento en medios con furfural y sin furfural, se determinó la velocidad de biotransformación y se cuantificaron los transcritos de aquellos genes que consideramos están involucrados en la biotransformación del furfural por parte de *A. baylyi* ADP1, campo no estudiado hasta el momento.

### **Objetivo general.**

Caracterizar fisiológica y transcripcionalmente la biotransformación de furanos en cepas de *Acinetobacter*.

### **Objetivos particulares.**

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de furfural en cepas de *A. schindleri* ACE y *A. baylyi* ADP1.
- Determinar la  $\mu$  en cepas de *Acinetobacter* en presencia de furfural y alcohol furfurílico, por separado y en conjunto, con acetato como fuente de carbono.
- Calcular la velocidad de biotransformación de furfural.
- Identificar en el genoma de *A. baylyi* ADP1 genes que puedan codificar para enzimas que biotransformen el furfural en un compuesto menos tóxico como alcohol furfurílico, difurfuril éter o polímeros derivados.
- Realizar análisis de expresión por RT-qPCR de los genes que posiblemente estén involucrados en la biotransformación de furanos en *A. baylyi* ADP1, al crecer en ausencia y presencia de furfural.



## **Capítulo IV. Materiales y métodos.**

### **Cepas bacterianas.**

Se utilizaron las cepas *Acinetobacter schindleri* ACE y *Acinetobacter baylyi* ADP1 (ATCC®33305) (Sigala, 2017), las cuales, fueron obtenidas del banco celular del laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. La cepa ACE tiene como característica que es resistente al antibiótico kanamicina.

### **Medios, inóculos y condiciones de cultivo.**

Se tomaron muestras de las cepas ACE y ADP1 provenientes de un ultracongelador a -80°C, las cuales, estaban contenidas dentro de crioviales con medio LB y glicerol al 25% como agente crioprotector. Las cepas se inocularon por estriado en placas de agar LB con kanamicina 30 mg/mL y sin kanamicina, para ACE y ADP1, respectivamente y se incubaron durante 24 horas a 30 °C. Transcurrido ese tiempo, se tomaron colonias aisladas de cada cepa y se inocularon por separado en matraz de 250 mL con 25 mL de medio mineral M9 con acetato de sodio 3 g/L como fuente de carbono durante 24 horas a 30°C y 250 rpm. Todos los cultivos correspondientes a ACE deben contener el antibiótico Kanamicina, por el contrario, los cultivos de ADP1 deben ir sin antibiótico. En la tabla 2 y 3 se presenta la composición de las sales stock y el medio M9.

Tabla 2. Solución stock 10X para preparar medio M9 (100 mL).

Sustancia.	Cantidad (gramos).
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
NaCl	0.5
NH <sub>4</sub> Cl	1

Tabla 3. Medio mineral M9 con acetato de sodio a 3 g/L.

Volumen total	25 mL
H <sub>2</sub> O	19.6 mL
Sales M9 10X	2.5 mL
FeSO <sub>4</sub> 10X	2.5 mL
Acetato de sodio 20%	375 µL
MgSO <sub>4</sub> (1M)	50 µL
Vitamina B1	5.0 µL
CaCl <sub>2</sub> (1M)	2.5 µL
Kanamicina*	25 µL

\*Añadir kanamicina 30 mg/mL a los medios en los que se desarrolla *Acinetobacter schindleri* ACE.

Se determinó la D.O. de cada matraz (inóculo) y se calculó el volumen necesario para comenzar una cinética de crecimiento a una D.O de 0.2 en el volumen y condiciones de trabajo deseadas. Estos cultivos fueron hechos y usados como inóculos en cada experimento.

### **Determinación de la MIC en las cepas *A. schindleri* y *A. baylyi* ADP1.**

- a. A partir de los inóculos de cada cepa, se tomaron muestras de 2  $\mu$ L y se añadieron en cada cuadrante de placas que contenían agar medio mineral M9 con acetato de sodio 3 g/L como fuente de carbono, distintas concentraciones de furfural (0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 y 2.00 g/L) y kanamicina; ésta última para el caso de la cepa ACE.
- b. Se incubaron las placas durante 24 horas a 30°C.
- c. Tras finalizar la incubación, se observó si existía crecimiento y se determinó la concentración mínima inhibitoria de furfural en cada cepa.

### **Cinéticas de crecimiento de las cepas de *Acinetobacter* en presencia de acetato como fuente de carbono y ausencia de furfural.**

- a. El volumen necesario de cada cepa se añadió a matraces de 250 mL con 25 mL de medio mineral M9, conteniendo 3 g/L de acetato y se incubaron a 30°C y 250 rpm.
- b. Se monitoreó la absorbancia a 600 nm cada hora hasta alcanzar la fase estacionaria y se tomó una muestra de 500  $\mu$ L a los tiempos 0, 2, 4, 6 y 8 para determinar la concentración de acetato remanente en el medio mediante HPLC.

### **Cinéticas de crecimiento de las cepas de *Acinetobacter* en presencia de acetato como fuente de carbono y furfural.**

- a. El volumen necesario de cada cepa se añadió a matraces de 250 mL con 25 mL de medio mineral M9 conteniendo 2 g/L de acetato y 1 g/L de furfural. Se incubaron a 30°C y 250 rpm.

- b. Se monitoreó la absorbancia a 600 nm cada hora hasta alcanzar la fase estacionaria y se tomó una muestra de 500  $\mu$ L a los tiempos 0, 2, 4, 6 y 8 para determinar la concentración de acetato y furfural remanente en el medio mediante HPLC.

**Cinéticas de crecimiento de las cepas de *Acinetobacter* en presencia de acetato como fuente de carbono, alcohol furfurílico y furfural más alcohol furfurílico.**

- a. El volumen necesario de cada cepa se añadió a matraces de 250 mL con 25 mL de medio mineral M9 conteniendo 2 g/L de acetato, 0.5 g/L de furfural y 0.5 g/L de alcohol furfurílico, por otra parte, 2 g/L de acetato y 1 g/L alcohol furfurílico. Se incubaron a 30°C y 250 rpm.
- b. Se monitoreó la absorbancia a 600 nm cada hora hasta alcanzar la fase estacionaria y se tomó una muestra de 500  $\mu$ L a los tiempos 0, 2, 4, 6 y 8 para determinar la concentración de acetato, furfural y alcohol furfurílico residual en el medio mediante HPLC.

**Cinéticas de crecimiento de las cepas de *Acinetobacter* en presencia de acetato (3 g/L) y pulsos de furfural (0.5 g/L).**

- a. El volumen necesario de cada cepa se añadió a matraces de 250 mL con 25 mL de medio mineral M9 conteniendo 3 g/L de acetato y se incubaron a 30°C y 250 rpm.
- b. Se monitoreó la absorbancia a 600 nm y una vez alcanzada 1 D.O., se añadió un pulso de furfural correspondiente a 0.5 g/L cada hora hasta que se alcanzó la fase estacionaria.

c. Se verificó mediante una prueba cualitativa (ver apéndice C) la presencia de furfural tras la adición de los pulsos.

d. Se determinó la velocidad de biotransformación.

**Cinéticas de crecimiento de las cepas de *Acinetobacter* en presencia de acetato (4 g/L) y pulsos de furfural (0.5, 1.0 y 2.0 g/L).**

a. El volumen necesario de cada cepa se añadió a matraces de 250 mL con 25 mL de medio mineral M9 conteniendo 4 g/L de acetato para conseguir mayor cantidad de biomasa y se incubaron a 30°C y 250 rpm.

b. Se monitoreó la absorbancia a 600 nm y una vez alcanzada 1 D.O., se añadieron pulsos de furfural correspondientes a 0.5 g/L cada hora, desde la hora 2.5 hasta la 7.5. A la hora 10 un pulso correspondiente a 2.0 g/L de furfural, a la hora 27 un pulso correspondiente a 1 g/L de furfural y a la hora 30 un pulso correspondiente a 2 g/L de furfural.

c. Se verificó mediante una prueba cualitativa (ver apéndice C) la presencia de furfural tras la adición de los pulsos.

d. Se determinó la velocidad de biotransformación.

**Obtención sintética del compuesto difurfuril éter.**

La síntesis se realiza a partir de alcohol furfurílico (C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>), cloruro de tionilo (SOCl<sub>2</sub>) y trietilamina (C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N). Esto comprende una halogenación seguida de un paso de eterificación en medio alcalino (figura 12).

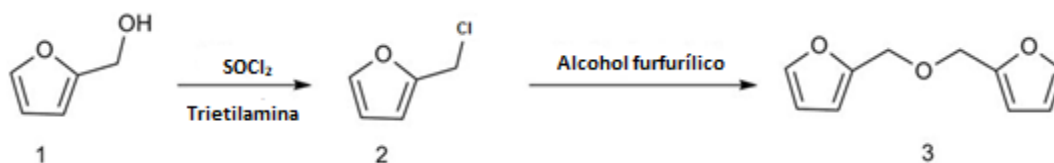


Figura 12. Síntesis orgánica del difurfuril éter.

Se debe trabajar esta mezcla de reacción dentro de la campana de extracción en todo momento, debido a la formación de vapores irritantes.

Estequiometría de la reacción.

Para dicha reacción, la relación molar estequiométrica se estableció como alcohol furfurílico: cloruro de tionilo (2:1) para la formación de un intermediario clorado. La mitad de mol del alcohol furfurílico no reaccionarán con el cloruro de tionilo pero si con el aloalcano formado llevándose a cabo una sustitución nucleofílica bimolecular con este último y generar el difurfuril éter.

El volumen de alcohol furfurílico con el que se trabajó fue de 0.5 mL. Por lo tanto, con base en la estequiometría propuesta, los volúmenes adicionados fueron:

a. Alcohol furfurílico ( $\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_2$ ):

Peso molecular: 98.1 g/mol

Densidad: 1.135 g/mL

Pureza del reactivo: 98%

$$0.5 \text{ mL FOH} \times \frac{1.135 \text{ g}}{\text{mL}} = \frac{0.5675 \text{ g (FOH)}}{98 \%} \times \frac{100 \%}{98.1 \text{ g/mol}}$$

$$= 0.0059 \text{ moles FOH}$$

b. Cloruro de tionilo ( $\text{SOCl}_2$ ):

Peso molecular: 118.96 g/mol

Pureza del reactivo: 98%

Densidad= 1.638 g/mL

$$\frac{0.0059 \text{ moles FOH}}{2} = 0.0029 \text{ moles necesarias de SOCl}_2$$

$$0.0029 \text{ mol} \times \frac{118.96 \text{ g}}{\text{mol}} = \frac{0.3449 \text{ g}}{1.638 \text{ g/mL}} = \frac{0.2 \text{ mL}}{98 \%} \times 100 \%$$
$$= 0.200 \text{ mL necesarios}$$

Para el caso de la trietilamina, esta deberá estar en la misma proporción que el cloruro de tionilo para neutralizar el HCl formado durante la adición del cloruro de tionilo.

c. Trietilamina (C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N):

Peso molecular: 101.19 g/mol

Densidad: 0.726 g/mL

Pureza: 98 %

$$\frac{0.0059 \text{ moles FOH}}{2} = 0.0029 \text{ moles necesarias de trietilamina}$$

$$0.0028 \text{ mol trietilamina} \times \frac{101.19 \text{ g}}{\text{mol}} = \frac{0.2934 \text{ g}}{0.726 \text{ g/mL}} = \frac{0.4041 \text{ mL}}{98 \%} \times 100 \%$$
$$= 0.41 \text{ mL}$$

Síntesis y cromatografía en capa fina.

a. En un matraz bola de 100 mL adicionar 10 mL de THF (Tetrahidrofurano), el cual, es un compuesto de polaridad intermedia que se usará como disolvente en nuestro medio de reacción. Añadir una barra de agitación magnética pequeña (0.5 – 1 cm aprox.)

- b. Adicionar 500  $\mu\text{L}$  (0.0059 moles) de alcohol furfurílico ( $\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_2$ ).
- c. Adicionar 400  $\mu\text{L}$  (0.0029 moles) de trietilamina ( $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$ ).
- d. Adicionar muy lentamente 204  $\mu\text{L}$  (0.0029 moles) de cloruro de tionilo ( $\text{SOCl}_2$ ).  
PRECAUCIÓN este reactivo es muy irritante al tacto y al olfato, no olvidar manejarlo dentro de la campana de extracción.
- e. Dejar esta mezcla de reacción durante una hora a temperatura ambiente y agitación constante.
- f. Tomar una pequeña muestra desde el matraz bola con pipeta Pasteur y colocarla sobre una placa de sílica.
- g. Eluír con una mezcla de Hexano: acetato de etilo (8:2).
- h. Revelar dicha placa impregnando ácido fosfomolibdico sobre la superficie con ayuda de unas pinzas y una torunda, posteriormente, calentarla sobre una parrilla hasta la aparición de un color azulado característico.

La figura 13 muestra el resultado de la cromatografía en capa fina obtenida al término de la reacción. Se observa que como resultado de la reacción se obtienen al menos dos tipos de compuestos. La mancha señalada dentro del círculo rojo representa al posible compuesto de interés. Esto se sabe debido a que en experimentos anteriores se determinó que el compuesto de interés tenía casi la misma distancia de recorrido o factor de retención (RF) desde el punto de aplicación que la muestra de alcohol furfurílico, además de que al observarse dentro de una lámpara de luz UV a 254 nm, este último no aparecía y el difurfuril éter sí. El furfural no es observado con estos reveladores.



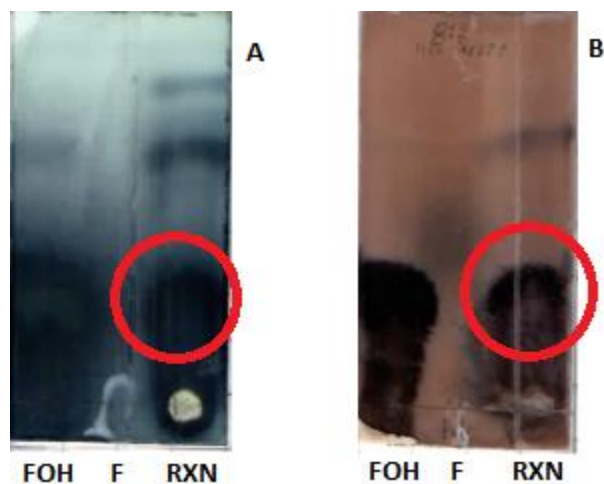


Figura 13. Cromatografía en capa fina para comprobar la síntesis de furfuril éter.  
FOH: alcohol furfurílico; F: furfural; RXN: muestra proveniente de la reacción.  
A) Revelado con ácido fosfomolibdico; B) Revelado con vainillina.  
Mezcla de elución hexano: acetato de etilo (8:2).

En la siguiente figura 14 se muestra el compuesto de interés una vez que este se concentró, eliminando el exceso de solvente al término de la reacción. Se puede apreciar nuevamente que el compuesto tiene casi el mismo RF que el alcohol furfurílico, además de que el color del relevado con ácido fosfomolibdico es diferente, lo que hace pensar que no son el mismo compuesto, aunque tengan el mismo RF.



Figura 14. Cromatografía en capa fina para comprobar la síntesis de furfuril éter concentrado. FOH: alcohol furfurílico; RXN: muestra proveniente de la reacción. Revelado con ácido fosfomolibdico. Mezcla de elución hexano: acetato de etilo (8:2).

Purificación por cromatografía en columna.

- a. Adicionar 1 mL aproximadamente de una solución de bicarbonato al 5% al matraz bola con la mezcla de reacción.
- b. Adicionar a esta mezcla aproximadamente 10 mL de cloroformo, el compuesto de interés difurfuril éter se quedará dentro de la fase orgánica de cloroformo, la cual, fue secada empleando sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y posteriormente filtrada.
- c. Separar ésta última fase, llevarla a otro matraz bola y por medio de un rotavapor evaporar el exceso de solvente<sup>1</sup>, dejar el tiempo necesario hasta que se observe una cantidad mínima de solvente.
- d. Una vez que nuestro compuesto se encuentra concentrado, se adsorbió en sílica gel para su separación cromatográfica, se formará un polvo seco.

<sup>1</sup> Condiciones del rotavapor= 16°C y 45 rpm.

- e. Posteriormente, preparar una cromatografía en columna con sílica gel dentro de una columna cromatográfica de 1m x 2 cm de diámetro, añadir sílica gel hasta cubrir 7 pulgadas de altura; añadir el polvo seco (compuesto de interés) obtenido en el paso d y homogenizar empleando hexano, posteriormente comenzar a eluir con la fase móvil conformada por la mezcla de hexano/acetato de etilo en proporciones de 10:0, 9:1, 8:2, 0:10 y metanol puro al final.
- f. Hacer una cromatografía en placa fina con cada una de las muestras eluidas para confirmar en que mezcla de elución se encuentra el compuesto de interés.
- g. Unir estas mezclas y dejar que se evapore el exceso de solvente a temperatura ambiente o baño maría a 50°C aproximadamente.
- h. Tomar una pequeña muestra del compuesto y analizar por IR, RMN de H<sup>+</sup> y HPLC<sup>2</sup>.

**Identificación de genes que codifiquen enzimas responsables de la biotransformación de furfural a un compuesto menos tóxico.**

- a. Se identificaron dentro del genoma de *A. schindleri* ACE y *A. baylyi* ADP1 genes que codifican para enzimas alcohol y aldehído deshidrogenasas.
- b. Se seleccionaron aquellos que demostraban ser los más viables en la biotransformación del furfural.

---

<sup>2</sup> Para analizar la muestra sintetizada en HPLC, se mezclaron 25µL de ésta, 25µL de metanol y 25µL agua MQ (Vt= 75µL). Posteriormente se filtró la mezcla con filtro de 0.2µm y se inyectaron manualmente 30µL. Condiciones de corrida: 60°C, Fase móvil= H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 mM): Acetonitrilo → (90-10%). Columna Aminex HPX 87.

- c. Se copiaron las secuencias de dichos genes y se hizo un alineamiento múltiple entre ellas, con ayuda del *software Muscle: ClustalW2* de *European Bioinformatics Institute* <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
- d. Se determinó si existía homología entre las secuencias evaluadas, tanto en número de aminoácidos, como en número de nucleótidos.
- e. Posteriormente, cada una de estas secuencias fueron sometidas a un segundo *Blast* usando la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Esto con la finalidad de confirmar la homología de estas secuencias con las de otras especies de *Acinetobacter*.

#### **Diseño de oligonucleótidos para amplificar genes de enzimas responsables de la biotransformación de furfural.**

Una vez identificados los genes que pudieran llevar al cabo la biotransformación del furfural, se copiaron las secuencias de dichos genes, además de un grupo de genes que podrían ser de referencia durante la cuantificación de transcritos. Se procedió a diseñar los oligonucleótidos mediante la herramienta *Primer Design-Primer BLAST* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). La secuencia de los oligonucleótidos de los genes seleccionados para este estudio se detalla en el apéndice B de este documento. Una vez sintetizados los oligonucleótidos (Unidad de Síntesis y Secuenciación, Instituto de Biotecnología, UNAM), se registraron las concentraciones que cada uno de ellos tenía. Posteriormente se tomó el volumen necesario y se hicieron diluciones a 50 pmol/ $\mu$ L (50  $\mu$ M). de cada uno y se procedió a comprobar que estos producían un solo producto de amplificación con un tamaño

de 101 pb mediante PCR de punto final (Tablas 4 y 5) con ADN genómico de ambas cepas y los productos de amplificación fueron analizados en geles de agarosa al 3% (p/v) (Tabla 6).

Tabla 4. Condiciones de amplificación de la PCR de punto final para genes de enzimas posiblemente involucradas en la biotransformación de furfural.

Temperatura	Tiempo	
95°C	2 minutos	
94°C	45 segundos	35 ciclos
60°C	30 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	5 minutos	
4°C	5 minutos	

Tabla 5. Condiciones de reacción de la PCR en punto final para comprobar la producción de un solo producto de amplificación de los oligonucleótidos diseñados.

Componente	Volumen (µL)
H <sub>2</sub> O	4.75
Master mix	6.25
OF	0.5
OR	0.5
Templado	0.5
<b>Total</b>	12.5

Tabla 6. Condiciones para la elaboración del gel de agarosa al 3% (p/v).

Componente	Cantidad
Agarosa	3 gramos
TBE 0.5X	100 mL
Syber Green I	0.75 µL por cada 30 mL de gel

\*Disolver la agarosa con el TBE 0.5X calentando, posteriormente, sin dejar enfriar, añadir el Syber Green I.

Mezclar bien y vaciar sobre la placa, colocando el peine antes de su enfriamiento.

**Obtención de ARN total para análisis de expresión de genes posiblemente involucrados en la biotransformación de furfural por qPCR.**

Obtención y tratamiento previo de muestras de cultivo.

- a. El volumen necesario de cada cepa se añadió a matraces de 500 mL con 50 mL de medio mineral M9 conteniendo 4 g/L de acetato. Se incubaron a 30°C y 250 rpm.
- b. Se monitoreó la absorbancia a 600 nm cada hora y una vez que alcanzó la fase estacionaria de crecimiento se tomó una alícuota de 7.5 mL del medio de cultivo, la cual, se mezcló con 7.5 mL del reactivo *RNAprotect Bacteria Reagent*<sup>®</sup> (Qiagen, Cat No./ID: 76506) dentro de un tubo estéril de 50 mL para llevar al cabo la extracción de ARN de la condición sin furfural en el medio de cultivo; posteriormente, se comenzaron a añadir pulsos de furfural equivalentes a 0.5 g/L cada 30 min, siendo 4 pulsos en total. Tras 30 minutos del último pulso, se tomó otra alícuota de 7.5 mL del medio de cultivo y se mezcló nuevamente con 7.5 mL de reactivo *RNAprotect*<sup>®</sup> dentro de un tubo estéril de 50 mL para llevar al cabo la extracción de ARN de la condición con furfural en el medio de cultivo.

Lisis celular.

- a. Inmediatamente de la adición y mezcla de medio de cultivo y reactivo *RNA protect*<sup>®</sup>, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente obteniendo un volumen final de 15 mL.
- b. En 10 tubos eppendorf de 1.5 mL se colocaron 1.5 mL de la mezcla anterior a cada tubo y se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 minutos.

- c. Se desechó el sobrenadante y se agregaron nuevamente 1.5 mL de la mezcla a cada uno de los 10 tubos.
- d. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 minutos, se desechó el sobrenadante.
- e. El pellet formado al fondo del tubo fue llevado al congelador a -80°C.

Extracción y purificación de ARN: método RNeasy®Protect Bacteria mini Kit (Qiagen, Cat No. /ID: 74524).

- a. Se preparó el buffer RLT añadiendo 10 µL de β-mercaptoetanol por cada 1 mL de buffer RLT usado. Mezclar bien esta solución.
- b. Se añadió a las muestras 100 µL de buffer TE con lisozima (1 mg/mL), mezclar con agitación tipo vórtex durante 10 segundos.
- c. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, dentro de una incubadora para tubos eppendorf (*Thermomixer*) a 500 rpm. Se agitó por inversión cada 2 minutos.
- d. Terminado este tiempo se agregaron 350 µL de buffer RLT a cada tubo y se hizo agitación tipo vórtex.
- f. Se añadió a cada tubo 250 µL de etanol al 96-100% y se homogenizó por inversión.
- g. Se añadieron los 700 µL del lisado a la columna de RNAeasy mini, la cual, estaba colocada dentro de un tubo colector de 2 mL, se centrifugó 15 segundos a 10,000 rpm. Se desechó el sobrenadante.

- h. Se añadieron 700  $\mu$ L de buffer RW1 a la columna (la cual está dentro del tubo colector de 2 mL). Se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos. Se desechó el sobrenadante.
- i. Se añadieron 500  $\mu$ L de buffer RPE a la columna dentro del tubo colector, se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos. Se desechó el sobrenadante.
- j. Se colocó la columna en un nuevo tubo colector y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto para secar lo más posible la membrana de la columna.
- k. Se colocó la columna en un nuevo tubo colector y se añadieron 30  $\mu$ L de agua libre de RNasas directamente sobre la columna. Se centrifugó durante un minuto a 10,000 rpm para eluir el ARN. Se repitió la elución con el mismo volumen (30  $\mu$ L) del ARN ya eluído.
- l. Se cuantificó la cantidad de ARN y se llevó a congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

Extracción y purificación de ARN: método fenol – cloroformo.

- a. Descongelar dos tubos de células almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  dentro de reactivo RNAprotect Bacteria Reagent® (Qiagen, Cat No./ID: 76506).
- b. Resuspender cada tubo en 0.2 mL de solución con lisozima 10 mg/mL. Mezclar con ligero vortex.
- c. Incubar a  $30^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Dar agitación tipo vórtex ligera cada 3 min, aproximadamente.



- d. Adicionar 0.2 mL de solución SDS 2% y acetato de sodio 0.01 M (en agua DEPC y filtrado) y mezclar por vortex durante 30s a velocidad máxima.
- e. Calentar máximo 10 min a 70°C, dependiendo de la lisis.
- f. Adicionar 0.75 mL de fenol a 70°C (mezclar por inversión) y dar agitación tipo vórtex durante 30s a velocidad máxima.
- g. Incubar 3 min a 70°C.
- h. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min a 4°C.
- i. Recuperar fase acuosa superior, transferirla a un tubo eppendorf.
- j. Adicionar un volumen equivalente de fenol a 70°C y dar vortex durante 30s a velocidad máxima.
- k. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5min a 4°C.
- l. Recuperar la mayor cantidad de fase acuosa superior evitando tomar la interfase.
- m. Adicionar un volumen equivalente de fenol/cloroformo/Isoamílico (25:24:1) y dar vortex durante 30s a velocidad máxima.
- n. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min a 4°C y recuperar la fase acuosa superior cuidando de no tomar interfase.
- o. Adicionar un volumen equivalente de cloroformo y dar agitación vórtex durante 1 min a velocidad máxima (2X si la interfase es gruesa).
- p. Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C.
- q. Recuperar la fase acuosa superior evitando tomar la interfase.

- r. Adicionar 1/10 volumen de acetato de sodio 3M y dar agitación vórtex suave por 10 segundos.
- s. Agregar 2.5 volúmenes de etanol absoluto y dar agitación vórtex suave por 10 segundos.
- t. Centrifugar a 10,000 rpm durante 15 min a 4°C (se observa pastilla blanca).
- u. Eliminar sobrenadante y dejar secando los tubos boca abajo sobre un pañuelo.
- v. Resuspender el pellet en 30 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y almacenar a -80°C hasta su uso.

#### **Cuantificación de ARN.**

Obtenido el ARN, se cuantificó mediante un espectrofotómetro NanoDrop UV-Vis (*Thermo Scientific, USA*). Se encendió el instrumento y dentro del software se eligió la opción de cuantificación de ARN. Se limpió el porta muestras con agua grado Biología Molecular y con ayuda de un paño suave. Se calibró a cero, agregando en el porta muestras 2 µL de agua grado Biología Molecular. Una vez calibrado, se retiraron con un paño suave los 2 µL de agua del porta muestras. Cada muestra fue homogenizada perfectamente y se colocaron 2 µL en el porta muestras del aparato para su cuantificación. Una vez cuantificada, la muestra se retiró y se procedió a cuantificar el resto del mismo modo descrito anteriormente, limpiando el porta muestras con 2 µL de agua entre cada lectura.

#### Digestión de ARN con DNAsa.

Este procedimiento se realizó conforme al protocolo del kit *Turbo DNA free Kit* (*Thermo Scientific, Cat No. AM1907*).

- a. De acuerdo con la concentración obtenida de ARN en cada muestra, se tomó el volumen necesario que garantice llevar la cantidad de 31.5  $\mu\text{g}$  de ARN. Esto debido a que para el ensayo con DNAsa se sugiere hacerlo en un stock de ARN de concentración de 350  $\text{ng}/\mu\text{L}$  en un volumen de 90  $\mu\text{L}$ . de tal manera que al tener una alícuota con una cantidad de 31,500  $\text{ng}$  de ARN y llevarla hasta 90  $\mu\text{L}$  de volumen total con agua grado Biología Molecular, la concentración de esta solución será de 350  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , concentración recomendada de trabajo para la DNAsa.
- b. Se añadieron a las muestras 10  $\mu\text{L}$  de reactivo 10X Turbo DNase buffer y se mezcló mediante pipeteo.
- c. Se agregaron 1.5  $\mu\text{L}$  de enzima DNAsa y se mezcló por pipeteo.
- d. Se incubó a 37°C durante 30 minutos.
- e. Se agregaron otros 1.5  $\mu\text{L}$  de enzima y se mezcló por pipeteo.
- f. Se incubó a 37°C durante otros 30 minutos.
- g. Se transfirió el volumen de digestión (aprox 103  $\mu\text{L}$ ) a un nuevo tubo de 0.6 mL (el uso de un tubo de esta capacidad se recomienda para facilitar la remoción del reactivo de inactivación de la DNAsa en los pasos siguientes)
- h. Se añadieron 12  $\mu\text{L}$  del reactivo de inactivación de DNAsa y se dio vortex.
- i. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, mezclando ocasionalmente.
- j. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 minutos y transfirió el ARN a un tubo eppendorf de 0.6 mL evitando traer el reactivo de inactivación de DNAsa, el cual, estaba en el fondo.

- k. Se colocó el tubo con ARN digerido en hielo.
- l. Se midió la concentración de ARN.
- m. Se almacenó a -80°C.

**PCRs de punto final de verificación usando como templado muestras de ARN digeridas con DNAsa.**

Una vez que las muestras de ARN fueron digeridas con la enzima DNAsa, se corroboró la ausencia de ADN en ellas mediante la amplificación por PCR de punto final del gen *pntB*, el cual, es una transhidrogenasa de la que se obtuvo una mayor cantidad de productos de amplificación al llevar al cabo la PCR de punto final para confirmar el diseño de oligonucleótidos (ver apéndices B y D). Posteriormente, los productos de amplificación fueron revelados en un gel de agarosa al 3% (p/v). Como control positivo se usó como templado ADN genómico de *A. baylyi* ADP1. Las condiciones de este ensayo se muestran en las tablas 7, 8 y 6.

Tabla 7. Condiciones de la PCR de punto final para el gen *pntB*.

Temperatura	Tiempo	
95°C	2 minutos	
94°C	45 segundos	35 ciclos
56°C	30 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	5 minutos	
4°C	5 minutos	

Tabla 8. Condiciones de reacción de la PCR punto final para el gen *pntB*.

Componente	Volumen $\mu\text{L}$
Agua	4.75
PCR Master Mix	6.25
OF= ACIAD3078F (50 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0.5
OR= ACIAD3078R (50 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0.5
Templado	0.5
Total	12.5

### Evaluación de integridad de ARN.

Para esta evaluación se empleó el equipo Bioanalizador modelo *Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent GC systems, USA)*.

- I. Instalación de la estación del chip.
  - a. Se desatornilló la vieja jeringa de la tapa de la estación de chip.
  - b. Se liberó la jeringa del clip del soporte superior y se desechó.
  - c. Se obtuvo una nueva jeringa y se removió el empaque, se insertó dentro del clip del soporte superior.
  - d. Se deslizó hacia el orificio de la tapa de la estación y se atornilló.
  
- II. Ajustar la base de la placa.
  - a. Se abrió la estación del chip.
  - b. Se abrió el tornillo en la parte inferior de la placa base.
  - c. Se subió la placa base e insertó nuevamente en la posición denominada "C". Se volvió a ajustar el tornillo.
  
- III. Ajuste del clip de la jeringa.

- a. Se liberó la palanca del clip y deslizó hasta la posición superior.
- IV. Limpieza del cartucho de electrodos del equipo.
- a. Se abrió un chip de limpieza.
  - b. Se abrió la tapa del equipo y se colocó dicho chip en la posición indicada.
  - c. Se cerró la tapa del instrumento y se dejó reposar durante un minuto.
  - d. Se abrió la tapa y se removi6 el chip de limpieza.
  - e. Se guard6 dicho chip para limpiezas futuras.
- V. Preparaci6n del gel.
- a. Se dej6 que todos los reactivos tengan la temperatura ideal dej6ndolos al menos 30 minutos a temperatura ambiente antes de usarse.
  - b. Se colocaron 550  $\mu\text{L}$  del reactivo *Agilent RNA 6000 nano gel matrix*® (Cat No. 5067-1511) dentro del recept6culo de un filtro spin.
  - c. Se coloc6 el filtro spin dentro de una microcentrifuga y se centrifug6 a 4,000 rpm durante 10 minutos.
  - d. Se tom6 una al6cuota de 65  $\mu\text{L}$  del gel filtrado y se coloc6 dentro de un tubo eppendorf de 0.5 mL el cual viene contenido en el kit. Se almacen6 a 4°C hasta su uso.

- VI. Preparación de la mezcla gel/colorante.
- a. Se dejó que todos los reactivos tuvieran la temperatura ideal dejándolos al menos 30 minutos a temperatura ambiente antes de usarse.
  - b. Se hizo una agitación tipo vórtex al reactivo *RNA 6000 Nano Dye concentrate*® (Cat No. 5067-1511) durante 10 segundos y posteriormente, se centrifugó a máxima velocidad durante 3 segundos.
  - c. Se añadió 1 µL de reactivo *RNA 6000 Nano Dye concentrate*® a los 65 µL de gel filtrados previamente.
  - d. Se cerró el tubo y se dio agitación tipo vórtex vigorosa, se inspeccionó la correcta homogenización de ambos reactivos.
  - e. Se centrifugó el tubo a temperatura ambiente durante 10 minutos a 14,000 rpm. Se usó la mezcla lo antes posible.
- VII. Carga de la mezcla colorante/gel dentro de un chip de ARN.
- a. Se dejó que todos los reactivos tuvieran la temperatura ideal dejándolos al menos 30 minutos a temperatura ambiente antes de usarse.
  - b. Se tomó un nuevo *chip RNA nano*® (Cat No. 5067-1511) y se retiró de su empaque.
  - c. Se colocó dicho chip en la estación del chip.

- d. Se pipetearon 9  $\mu\text{L}$  de la mezcla gel/colorante dentro del fondo del pozo marcado con la letra **G** señalada en el chip.
- e. Se aseguró de que el embolo de la jeringa estuviera en la posición de 1 mL y a continuación se cerró la estación, esto debió hacer un clic si fue cerrado correctamente.
- f. Se presionó el embolo de la jeringa hacia abajo hasta que este permaneció sujetado por el clip.
- g. Se esperaron 30 segundos y después se liberó el embolo del clip.
- h. Visualmente se inspeccionó que el embolo se movió hasta la posición de 0.3 mL de la jeringa.
- i. Se esperaron 5 segundos, después lentamente se colocó el embolo nuevamente hasta la posición de 1 mL en la jeringa.
- j. Se abrió la estación del chip.
- k. Se pipetearon 9  $\mu\text{L}$  de la mezcla gel/colorante dentro de los pozos marcados en el chip.

VIII. Carga del marcador dentro del chip de ARN.

- a. Se pipetearon 5  $\mu\text{L}$  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, descongeló el marcador de peso molecular, se hicieron alícuotas y se mantuvieron en hielo.
  - b. Para minimizar estructuras secundarias, se desnaturalizaron las muestras calentado a 70°C durante 2 minutos antes de cargarlas al chip.
  - c. Se pipeteó 1 µL de ARN marcador de peso molecular dentro del pozo marcado (se aprecia un símbolo de escalera).
  - d. Se pipeteó 1 µL de muestra dentro del pozo destinado para esto (hasta 12 muestras).
  - e. Se colocó el chip dentro del aparato destinado para hacer vortex (IKA vortex mixer) y se hizo agitación tipo vórtex durante 60 segundos a 2,400 rpm.
  - f. Se insertó cuidadosamente el chip dentro del Bioanalizador.
- X. Insertar el chip dentro del Bioanalizador.
- a. Se encendió el equipo y se aseguró de que el software y las conexiones estuvieran funcionando correctamente.
  - b. Se abrió la tapa del instrumento.
  - c. Se verificó que el cartucho de electrodos estuviera insertado correctamente y el selector del chip estuviera en posición 1.

- d. Se colocó el chip cuidadosamente dentro del receptáculo. El chip embona solo de una manera.
- e. Cuidadosamente se cerró la tapa del instrumento. Los electrodos dentro del cartucho de electrodos encajan dentro de los pozos del chip.
- f. El software indicó en la pantalla que el chip había sido insertado y la tapa había sido cerrada.
- g. Se inició la corrida del chip seleccionando los parámetros adecuados para nuestro ensayo (Electroforesis – ARN).
- h. Se indicó al software donde se guarda nuestro archivo.
- i. Se dio clic en Start.
- j. Al finalizar el proceso se removió el chip y posteriormente se dio limpieza al cartucho de electrodos con el correspondiente chip de limpieza, colocándolo dentro del aparato y cerrando la tapa dejando reposar 1 minuto.

#### **Síntesis de ADN complementario.**

- a. De acuerdo con la concentración reportada en cada oligonucleótido *reverse*, se tomó el volumen equivalente de cada uno de ellos para tener una cantidad de 10 pmol.
- b. Se multiplicó este volumen por 20, ya que así nos permitió tomar un volumen significativo con la micropipeta.
- c. Se añadió cada uno de estos volúmenes dentro de un tubo.

- d. La suma de cada volumen de los oligonucleótidos *reverse* nos dio el volumen total de nuestra mezcla, la cual, tuvo una concentración característica e igual para cada uno de los oligonucleótidos. Esta mezcla se aforó a 200 microlitros con agua grado Biología Molecular.
- e. La concentración de la mezcla de oligonucleótidos fue de 1 pmol/ $\mu\text{L}$  (200 pmol/200  $\mu\text{L}$ )
- f. Esta solución es la que se utilizó para llevar al cabo la síntesis de ADN complementario de acuerdo con la tabla 9. El kit utilizado para este paso fue *RevertAid H Minus Reverse Transcriptase Kit (Thermo Scientific, Cat No. EP0451)*.

Tabla 9. Mezcla de reacción para la obtención de ADNc

Item	Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Observaciones
1	ARN-ADN free	X $\mu\text{L}$	$\mu\text{L}$ necesarios que garanticen una cantidad de 3 $\mu\text{g}$ de ARN dentro de la reacción.
2	Mezcla de oligonucleótidos	10 $\mu\text{L}$	
3	Agua	X $\mu\text{L}$	$\mu\text{L}$ necesarios para completar un volumen final de 60 $\mu\text{L}$ en la reacción.
4	Buffer 5X Kit ADNc	12 $\mu\text{L}$	
5	Inhibidor RNAsas	1.5 $\mu\text{L}$	
6	dNTPs 10 mM	6 $\mu\text{L}$	
7	Transcriptasa Reversa	3 $\mu\text{L}$	
	<b>Volumen total</b>	<b>60 <math>\mu\text{L}</math></b>	

- g. Se añadieron en orden los primeros 3 ítems de la tabla 7 dentro de un tubo.
- h. Se mezcló suavemente, se dio un golpe de centrifuga e incubó a 65°C durante 5 minutos.
- i. Se dio nuevamente un golpe de centrifuga y se llevó a hielo.

- j. Se añadieron los ítems del 4 al 7 respetando ese orden.
- k. Se mezcló suavemente, se dio golpe de centrifuga.
- l. Se incubó a 45°C durante una hora.
- m. Se incubó a 70°C durante 5 minutos.
- n. Se congeló a -20 o -70°C.

NOTA: en este punto se obtuvo una concentración de ADNc equivalente a 50 ng/μL dentro de la reacción, con base en la cantidad añadida de ARN y el volumen total de la reacción. Posteriormente, este ADNc se diluyó para obtener una solución de concentración de 5 ng/μL para llevar a cabo las RT-qPCRs.

**Elección de un gen de referencia endógeno y determinación de la eficiencia de reacción de amplificación.**

- a. Del grupo de genes candidatos para ser el control endógeno (Tabla 10) se decidió analizar únicamente a los genes *secA* y *gyrA*, debido a que en trabajos anteriores (Arteaga, 2017) fueron reportados como los más adecuados para la cepa de *A. schindleri* ACE. Se corrieron PCRs de tiempo real bajo los siguientes parámetros de reacción (Tablas 11 y 12).

Tabla 10. Lista de genes de referencia comúnmente utilizados en células procariotas (Rocha, 2015).

<b>Gen</b>	<b>Descripción</b>
<i>gyrA</i>	ADN girasa A
<i>gyrB</i>	ADN girasa B
<i>secA</i>	Proteína translocasa sub A
<i>dnaG</i>	ADN primasa
<i>adkA</i>	Adenilato quinasa
<i>gmk</i>	Guanilato quinasa
<i>ftsZ</i>	Proteína de división celular
<i>recA</i>	Recombinasa A
<i>rpoB</i>	ARN polimerasa sub B
<i>rpoC</i>	ARN polimerasa sub beta prime

Tabla 11. Mezcla de reacción para amplificación genes de referencia endógenos.

<b>Componente</b>	<b>Volumen <math>\mu\text{L}</math></b>
ADNc	1
OF	0.5 (5 pmol/ $\mu\text{L}$ )
OR	0.5 (5 pmol/ $\mu\text{L}$ )
Master mix Syber Green	6
Agua grado Biología Molecular	4
<b>Volumen total de cada reacción</b>	<b>12</b>

Tabla 12. Condiciones de amplificación de la RT-qPCR para genes de referencia endógenos.

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	

- b. Se analizaron los datos obtenidos en la RT-qPCR (principalmente el Cq) y se determinó cual fue el mejor candidato para ser gen de referencia.
- c. Una vez seleccionado el gen, se llevó al cabo una prueba de eficiencia con 6 diluciones seriadas de 1:5 a partir del ADNc concentrado (50 ng/μL) de cada condición experimental<sup>3</sup>.
- d. Con los datos obtenidos se hizo una curva patrón y se calculó el número de copias de ADN de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

Donde:

$6.022141 \times 10^{23}$  = Número de Avogadro

Cantidad de ADN= muestras de concentración 50, 10, 2, 0.4, 0.08, 0.016 (ng/μL)

Longitud ADN = 101 pb (tamaño del amplicón de los oligos diseñados)

<sup>3</sup> Condiciones: cinética de crecimiento sin furfural y con furfural, cada una por duplicado. Cepa: *A. baylyi* ADP1.

660= Factor de conversión.

La eficiencia del ensayo puede ser calculada mediante la fórmula:

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

Donde:

m= pendiente

### RT-qPCR.

Antes de comenzar con las RT-qPCR se hicieron diluciones de los oligonucleótidos *forward* y *reverse* a una concentración de 5 pmol/μL. Para esto se partió de las soluciones de oligonucleótidos que tienen una concentración de 50 pmol/μL.

- a. A continuación, se realizó la siguiente mezcla de reacción para cada gen por duplicado (tabla 13), sin olvidar incluir en ningún ensayo el gen de referencia (*gyrA*).

Tabla 13. Mezcla de reacción para RT-qPCR de genes posiblemente involucrados en la biotransformación de furfural.

Componente	Volumen μL
ADNc	1 [5 ng/μL]
OF	0.5 (5 pmol/μL)
OR	0.5 (5 pmol/μL)
Master mix Syber Green	6
Agua grado Biología Molecular	4
<b>Volumen total de cada reacción</b>	<b>12</b>

- b. De forma general en el análisis de PCR en tiempo real se agregaron reacciones de control sin amplificación, denominadas *No Template Control* o **NTC**. Estos

controles se constituyen con todos los elementos de la reacción excluyendo el ADNc y sustituyendo por agua grado Biología Molecular.

- c. Una vez agregados los reactivos en la placa, se realizó el sellado:
1. Se extrajo una membrana óptica adhesiva y se identificó la superficie brillante. Esta membrana no debe ser tocada en la superficie.
  2. Se doblaron los extremos de la membrana y se retiró la cubierta de papel blanco, evitando tocar la superficie en todo momento.
  3. Se colocó la membrana sobre la placa de plástico sin hacer presión. Se aseguró que ésta quedará centrada.
  4. Usando un aplicador limpio (uñeta plástica) se fijó la membrana.
- d. Las mezclas de reacción se corrieron dentro de un termociclador para RT-qPCR 7500 Real Time PCR System (*Thermo Fischer Scientific, USA*) bajo las condiciones de la tabla 14:

Tabla 14. Condiciones de amplificación de la RT-qPCR para genes posiblemente involucrados en la biotransformación de furfural.

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	

- e. Finalmente, con los datos obtenidos se procedió a hacer el análisis de expresión de genes.



## Capítulo V. Resultados y discusión.

### Concentración mínima inhibitoria de furfural.

El intervalo de concentraciones de furfural para determinar la MIC fue de 0.5 a 2.0 (g/L), con incrementos de 0.25. La tabla 15 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 15. MIC de furfural en cepas de *Acinetobacter* en placas con medio mineral M9 y acetato 3 g/L. (+) crecimiento, (-) sin crecimiento.

Concentración de furfural (g/L)	Crecimiento de la cepa	
	ACE	ADP1
0.50	+	+
0.75	+	+
1.00	+	+
1.25	-	-
1.50	-	-
1.75	-	-
2.00	-	-

Para ambas cepas la MIC fue de 1.25 g/L, por lo que, en este caso la presencia del furfural repercute por igual sin importar la especie. El furfural ha sido identificado como un inhibidor clave dentro de los hidrolizados lignocelulósicos debido a la toxicidad causada por sí mismo y al efecto sinérgico que tiene con otros inhibidores (Mills, 2009). El mecanismo por el cual el furfural causa daño a las cepas de *Acinetobacter* no está del todo claro.

Los compuestos altamente hidrofóbicos comprometen la integridad de la membrana celular. Sin embargo, no se ha mostrado un daño perceptible a la

membrana de *E. coli* durante la exposición a furfural, parece ser que los sitios blancos del furfural se encuentran ubicados al interior de la célula. Los ensayos *in vitro* demostraron la reducción de actividad en algunas enzimas como alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), la aldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.5) y el complejo piruvato deshidrogenasa, lo cual, sugiere que el furfural puede afectar múltiples enzimas esenciales del metabolismo central.

Finalmente, estudios realizados en la cepa de *E. coli* LY180 EMFR9 mostraron que, las enzimas YqhD y DkgA dependientes de NADPH y encargadas de la reducción del furfural compiten por este cofactor, el cual, es indispensable para el crecimiento celular (Miller, 2010). Con esto, se deduce que concentraciones de furfural a partir de 1.25 g/L en las cepas de *A. baylyi* ADP1 y *A. schindleri* ACE podrían inhibir el crecimiento debido a tres posibles causas: perturbación de enzimas esenciales del metabolismo central, rupturas en la cadena de ADN y disminución indirecta del cofactor NADPH.

### Velocidad específica de crecimiento en presencia y ausencia de furfural.

La figura 15 representa el comportamiento cinético de las cepas en ausencia y presencia de furfural.

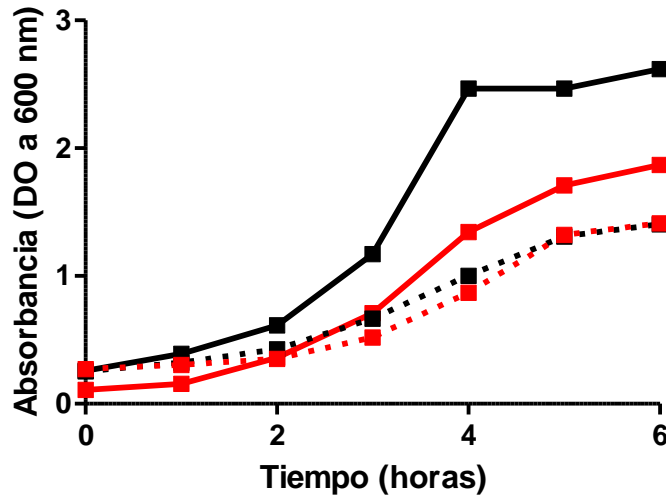


Figura 15. Cinéticas de crecimiento en ausencia de furfural y 3 g/L de acetato (líneas continuas), y en presencia de furfural 1 g/L y acetato 2 g/L (líneas discontinuas), de las cepas ACE (negro) y ADP1 (rojo). Experimentos hechos por triplicado, se muestra una gráfica representativa.

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) durante la fase exponencial en medio mineral M9 con acetato 3 (g/L) como fuente de carbono y ausencia de furfural es de  $0.7 \text{ h}^{-1}$  y  $0.9 \text{ h}^{-1}$ , para ADP y ACE, respectivamente (tabla 16). En presencia de furfural, la  $\mu$  disminuye 28% y 55% en ADP1 y ACE, respectivamente, con respecto los medios sin furfural. Es importante remarcar que la cepa ACE tiene una capacidad superior para catabolizar el acetato como única fuente de carbono (Sigala *et al.*, 2017; Sigala *et al.*, 2019). Sin embargo, la cepa ADP1 es la que se muestra una menor afectación en su velocidad específica de crecimiento al estar en presencia del furfural.

Tabla 16.  $\mu$  en ausencia de furfural y 3 (g/L) acetato vs  $\mu$  en presencia de furfural 1 (g/L) y acetato 2 (g/L). Experimentos hechos por triplicado.

Cepa	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ) sin furfural	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ) con furfural
ACE	0.9 ± 0.08	0.4 ± 0.03
ADP1	0.7 ± 0.03	0.5 ± 0.04

Actualmente, uno de los campos de investigación más estudiados es el del desarrollo de cepas tolerantes al furfural. Algunas cepas de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* son los modelos más estudiados dada su importancia en el uso de hidrolizados de biomasa lignocelulósica. Como ejemplo, se ha demostrado que en cepas de *E. coli* tolerantes a furfural (alrededor de 1 g/L) y xilosa como fuente de carbono, la  $\mu$  se encuentra alrededor de 0.2 h<sup>-1</sup> (Wang, 2012). Para el caso de cepas de *S. cerevisiae* tolerantes a concentraciones de furfural de 0.8 (g/L) y glucosa como fuente de carbono, la  $\mu$  se encuentra entre valores de 0.2 a 0.3 h<sup>-1</sup> (Xiao, 2014). Con base en estos datos podemos observar que en medio mineral M9 con acetato como única fuente de carbono y presencia de furfural 1 (g/L), las cepas de *Acinetobacter* ADP1 y ACE tiene una  $\mu$  mucho mayor a algunas de las cepas de interés industrial más usadas.

Durante las cinéticas de crecimiento se obtuvieron muestras para determinar el porcentaje de acetato y furfural residual al paso del tiempo. En las figuras 16 y 17 podemos observar los resultados obtenidos para las cepas ADP1 y ACE, respectivamente. La cepa ADP1 es una mejor detoxificadora al degradar la totalidad de furfural a la hora 4, mientras que la cepa ACE lo logra más allá de la hora 8.

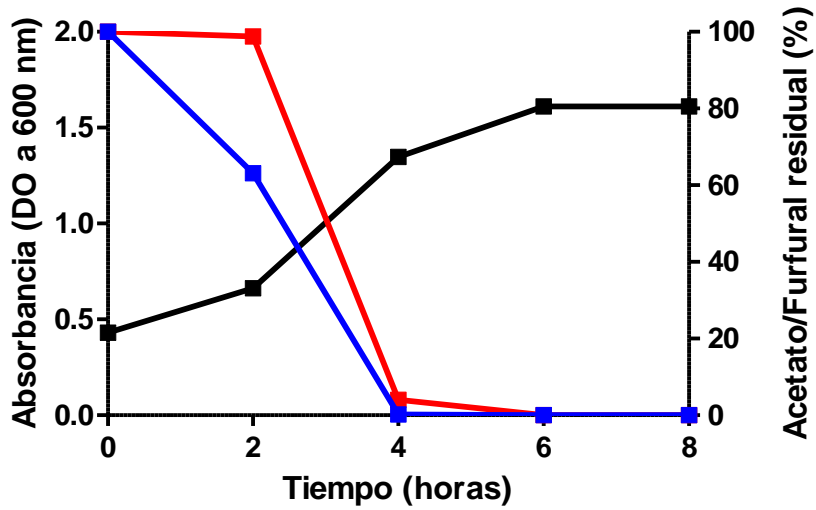


Figura 16. Crecimiento ADP1 (línea continua negra) en presencia de acetato 2 g/L y furfural 1 g/L. Porcentaje de acetato (línea continua roja) y furfural residual (línea continua azul). Experimentos hechos por triplicado, se muestra una gráfica representativa.

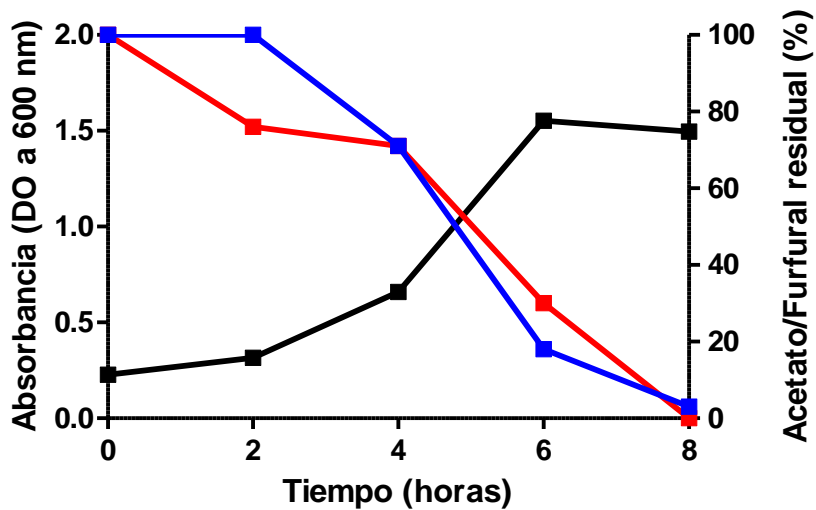


Figura 17. Crecimiento ACE (línea continua negra) en presencia de acetato 2 g/L y furfural 1 g/L. Porcentaje de acetato (línea continua roja) y furfural residual (línea continua azul). Experimentos hechos por triplicado, se muestra una gráfica representativa.

### **Velocidad específica de crecimiento en presencia de furfural y alcohol furfurílico.**

Se ha reportado que varias bacterias y levaduras son capaces de transformar el furfural a alcohol furfurílico, como es el caso de *Saccharomyces Spp* (Preston, 2002). También se ha demostrado que algunas bacterias entéricas pueden metabolizar el furfural a alcohol bajo condiciones aerobias y anaerobias (Preston, 2002). En otros casos se comprobó la degradación de furfural por cepas de *E. coli* KO11 y LY01, y por *Klebsiella oxytoca* (Preston, 2002). El furfural fue reducido por completo por cada cepa con una relación estequiométrica casi equivalente entre el furfural y el alcohol furfurílico (Preston, 2002). Con base en estos antecedentes, se estudió el comportamiento de las dos cepas estudiadas en presencia de la mezcla de furfural y alcohol furfurílico. Las figuras 18 y 19 muestran el comportamiento cinético de crecimiento en presencia de estos compuestos, además, la tabla 17 muestra el valor de  $\mu$  para cada caso.

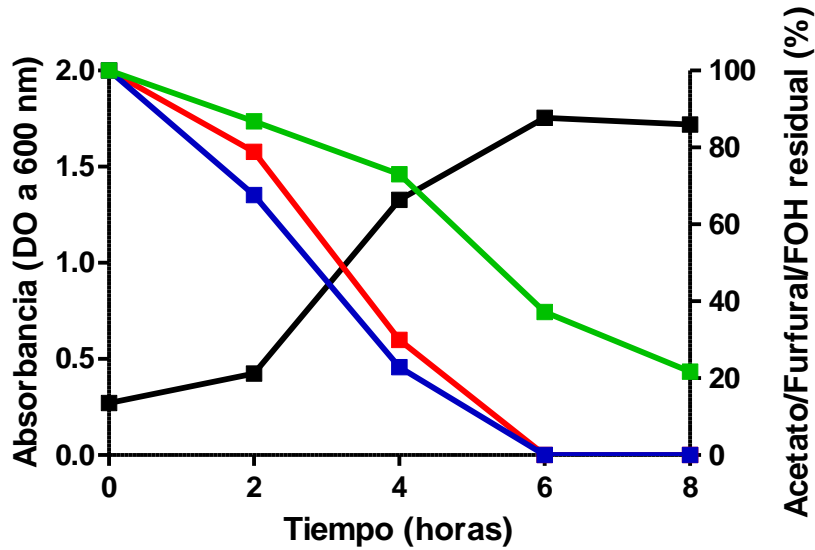


Figura 18. Crecimiento de ADP1 (línea continua negra) en presencia de acetato 2 g/L (línea continua roja), furfural 0.5 g/L (línea continua azul) y alcohol furfurílico (FOH) 0.5 g/L (línea continua verde). Experimentos hechos por duplicado, se muestra una gráfica representativa.

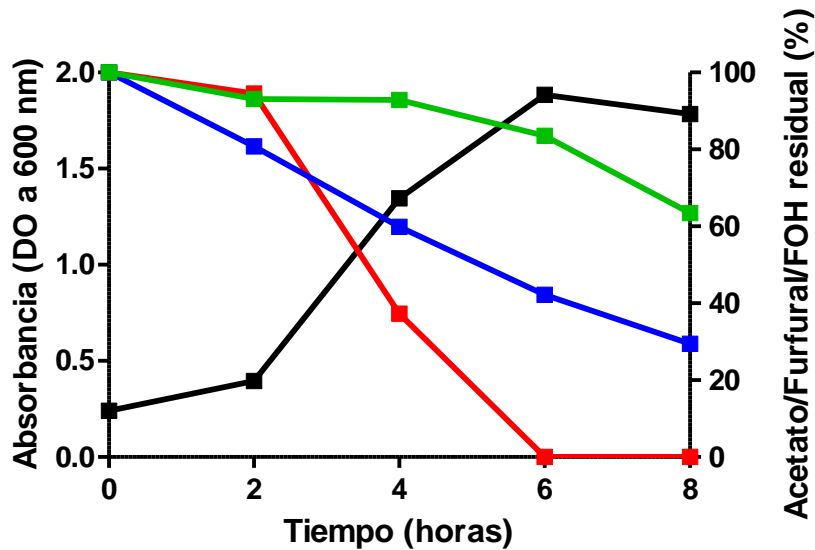


Figura 19. Crecimiento de ACE (línea continua negra) en presencia de acetato 2 g/L (línea continua roja), furfural 0.5 g/L (línea continua azul) y alcohol furfurílico (FOH) 0.5 g/L (línea continua verde). Experimentos hechos por duplicado, se muestra una gráfica representativa.

La presencia en conjunto de 0.5 g/L de furfural y 0.5 g/L de alcohol furfurílico disminuye la  $\mu$  un 28% y 33% en ADP1 y ACE, respectivamente, en comparación con medios sin la presencia de estos compuestos (Tabla 17). En la cepa ADP1, ambos

compuestos son degradados más rápidamente en comparación con ACE. Es importante señalar que la producción del difurfuril éter se llevó al cabo en ambas cepas; la concentración de alcohol furfurílico se mantuvo disminuyendo a lo largo de la cinética, no se observó un aumento de ésta durante algún punto del tiempo que demuestre su acumulación por efecto de una primera biotransformación del furfural a alcohol furfurílico como pasa en otros microorganismos, sin embargo, esto no significa que no haya formación del alcohol, sino que posiblemente su degradación o biotransformación a otro compuesto (posiblemente el difurfuril éter) es muy rápida.

Tabla 17.  $\mu$  en ausencia y presencia de furfural 0.5 g/L y alcohol furfurílico 0.5 g/L.

Cepa	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ) sin furfural y alcohol furfurílico	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ) con furfural y alcohol furfurílico
ACE	0.9 ± 0.08	0.6 ± 0.06
ADP1	0.7 ± 0.03	0.5 ± 0.02

Posteriormente, se evaluó el comportamiento cinético en presencia de acetato y alcohol furfurílico (figuras 20 y 21) a una concentración de 1 g/L, y se determinó que la  $\mu$  disminuye un 25% y 11% en ADP1 y ACE (tabla 18), respectivamente, en comparación con medios sin la presencia del alcohol; además se observa que el alcohol furfurílico se degrada más lentamente en ADP1 en comparación con ACE. Posiblemente, esta degradación más lenta en la cepa ADP1 se debe a que este alcohol de naturaleza aromática no es tóxico a dicha concentración y la célula no emplea demasiados recursos en su degradación. Es importante señalar que se detectó la presencia de difurfuril éter en estos experimentos con ambas cepas, por



lo que, podemos deducir que el alcohol furfurílico puede ser intermediario para la formación de dicho éter.

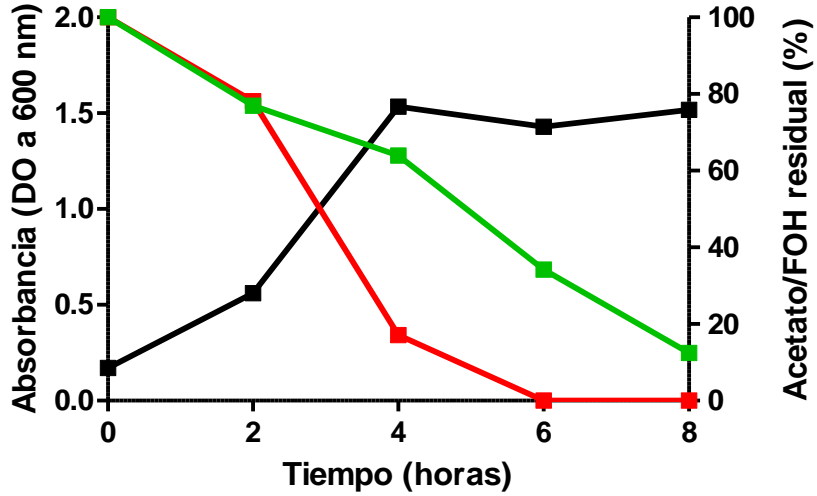


Figura 20. ADP1 (línea continua negra) en presencia de acetato 2 g/L (línea continua roja) y alcohol furfurílico 1 g/L (línea continua verde). Experimentos hechos por duplicado, se muestra una gráfica representativa.

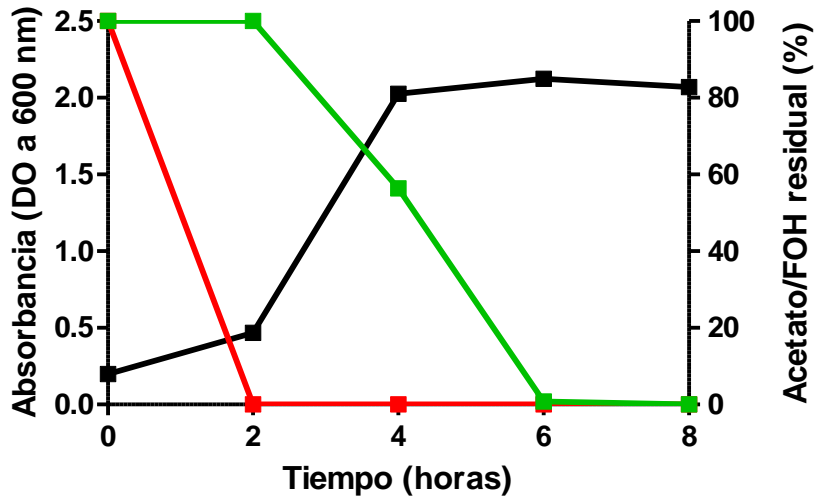


Figura 21. ACE (línea continua negra) en presencia de acetato 2 g/L (línea continua roja) y alcohol furfurílico 1 g/L (línea continua verde). Experimentos hechos por duplicado, se muestra una gráfica representativa.

Tabla 18.  $\mu$  en ausencia y presencia de alcohol furfurílico 1 g/L.

Cepa	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ) sin alcohol furfurílico	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ) con alcohol furfurílico
ACE	0.9 ± 0.08	0.8 ± 0.02
ADP1	0.7 ± 0.03	0.5 ± 0.02

Finalmente, es importante hacer notar que en las cinéticas con presencia de furfural y alcohol furfurílico la síntesis del difurfuril éter fue mayor que en aquellas dónde solamente había alcohol furfurílico, esto se determinó mediante el análisis de las áreas de los picos representativos del éter en los cromatogramas obtenidos del análisis de HPLC (datos no mostrados).

**Cinéticas de crecimiento en presencia de acetato (3 g/L) y pulsos de furfural (0.5 g/L).**

La figura 22 muestra el comportamiento cinético de las cepas tras la adición de furfural en pulsos equivalentes a 0.5 g/L cada hora a partir de una DO de 1. Bajo estas condiciones la  $\mu$  no se ve alterada con respecto a los experimentos en ausencia de furfural (tabla 19). Sin embargo, aunque ambas cepas son buenas detoxificadoras, la cepa ACE no logra biotransformar la totalidad del furfural añadido en forma de pulsos tras determinar su presencia con un ensayo cualitativo (ver apéndice C) (tabla 20); caso contrario de la cepa ADP1, la cual, logra biotransformar la totalidad del furano al no haber presencia de éste al tratar de determinarlo con un ensayo cualitativo (ver apéndice C).

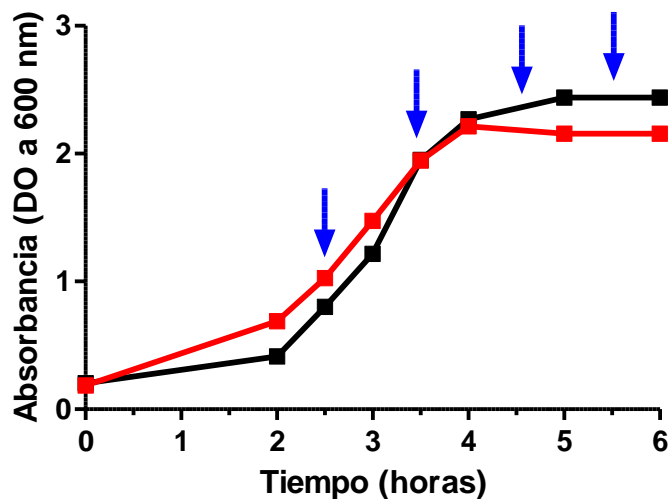


Figura 22. Cinéticas de crecimiento de las cepas ADP1 (línea continua roja) y ACE (línea continua negra) en presencia de acetato 3 g/L y furfural en pulsos equivalentes a 0.5 g/L (flechas azules).

Tabla 19.  $\mu$  de cepas de *Acinetobacter* crecidas en medio mineral M9 con 3 g/L de acetato y furfural en pulsos equivalentes a 0.5 g/L.

Cepa	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ) sin furfural	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ) con pulsos de furfural
ACE	0.9	0.9
ADP1	0.7	0.7

Tabla 20. Concentración de furfural acumulada mediante pulsos. Se determinó la presencia del furfural a la hora 4 y 6 de la cinética de crecimiento. Biotransformación por cepas de *Acinetobacter*. (+): presencia de furfural, (-): ausencia de furfural.

	4 horas	6 horas
Furfural acumulado	1 g/L	2 g/L
ADP1	(-)	(-)
ACE	(+)	(+)

**Cinéticas de crecimiento en presencia de acetato (4 g/L) y pulsos de furfural (0.5, 1.0 y 2.0 g/L).**

Con la finalidad de conseguir una mayor cantidad de biomasa y observar una mayor capacidad de biotransformación del furfural, se añadieron acetato a una concentración de 4 g/L y furfural en pulsos equivalentes a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 (g/L) a partir de una DO de 1 y distintos tiempos (tabla 21 y figura 23).

Tabla 21. Furfural en pulsos a diferentes concentraciones y tiempos durante la cinética.

<b>Pulso de furfural (g/L)</b>	<b>Tiempo de la cinética (horas)</b>
0.5	2.5
0.5	3.5
0.5	4.5
0.5	5.5
0.5	6.5
0.5	7.5
2.0	10
1.0	27
2.0	30
Total: 8 g/L furfural	Total: 48 horas de cinética

Como se puede observar en los resultados (tabla 22), la  $\mu$  disminuye un 11% y un 14% en ACE y ADP1, respectivamente. Esto puede deberse a una competencia por el cofactor NADPH, el cual, es utilizado para la biosíntesis durante el catabolismo de acetato y a su vez, es usado por las enzimas oxidorreductasas responsables de la biotransformación del furfural (Kang, 2012; Liu, 2006; Tsuge, 2015; Zheng, 2013). Sin

embargo, podemos confirmar que la cepa ADP1 es la mejor detoxificadora, ya que logra biotransformar la totalidad del furfural añadido en forma de pulsos (tabla 23), al no haber presencia de éste tras realizar el ensayo cualitativo (ver apéndice C). Finalmente, se determinó que la velocidad de biotransformación en la cepa ADP1 es de 0.5 g/L de furfural cada 30 minutos.

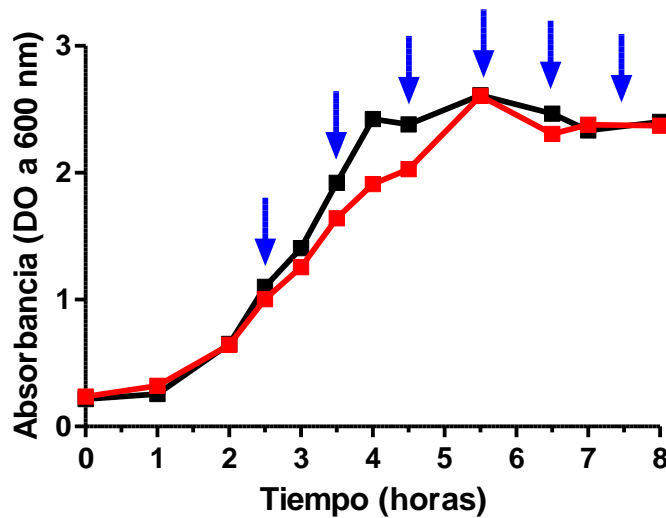


Figura 23. Cinéticas de crecimiento de las cepas ADP1 (línea continua roja) y ACE (línea continua negra) en presencia de acetato 4 g/L y furfural en pulsos equivalentes a 0.5, 1.0 y 2.0 g/L. Se muestra solo hasta la hora 8.

Tabla 22.  $\mu$  de cepas de *Acinetobacter* crecidas en medio mineral M9 con 4 g/L de acetato y furfural en pulsos equivalentes a 0.5, 1.0 y 2.0 g/L.

Cepa	$\mu$ ( $h^{-1}$ )
ACE	0.8
ADP1	0.6

Tabla 23. Concentración de furfural acumulada por los pulsos. Se determinó la presencia del furfural a la hora 8, 24 y 48 de la cinética de crecimiento. Biotransformación por cepas de *Acinetobacter*. (+): presencia de furfural, (-): ausencia de furfural

	<b>8 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
Furfural acumulado	3 (g/L)	5 (g/L)	8 (g/L)
ADP1	(-)	(-)	(-)
ACE	(+)	(+)	(+)

### **Síntesis orgánica e identificación del compuesto difurfuril éter.**

Actualmente, no existen proveedores de difurfuril éter grado analítico, el cual, serviría como referencia para determinar cuantitativamente el producto proveniente de la biotransformación del furfural por cepas de *Acinetobacter*. Por tal motivo, se realizó su síntesis en el laboratorio mediante una reacción de halogenación a partir del alcohol furfurílico y cloruro de tionilo (Yang, 2017). La síntesis de este compuesto se da en un proceso de dos pasos partiendo de la materia prima alcohol furfurílico y se describe en detalle en la sección de materiales y métodos. La purificación del compuesto se detalla en el apéndice A.

En trabajos anteriores (Cerros, 2017) se caracterizó por  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN e IR el compuesto proveniente del sobrenadante de medios de cultivo donde se lleva a cabo la biotransformación del furfural y se determinó que este compuesto es denominado difurfuril éter. A continuación, se presenta su caracterización.

#### Análisis Infrarrojo.

La zona situada a la derecha de la longitud de onda de  $1400\text{ cm}^{-1}$  de un espectro infrarrojo es, por lo general, notablemente compleja, debido a que en ella aparecen bandas de vibraciones tanto de alargamiento como de flexión y se le denomina “región de huellas dactilares”. Por tal motivo, no pueden efectuarse correlaciones seguras entre bandas de absorción y grupos funcionales determinados en esta zona (Fessenden, 1983). Sin embargo, esta parte del espectro puede ser específica y única al momento de diferenciar compuestos similares.

Como se puede observar en la figura 24, el compuesto de interés muestra señales importantes más allá de los  $1500\text{ cm}^{-1}$ , específicamente entre los  $2800$  y  $3000\text{ cm}^{-1}$ , señales que representan interacciones “C-H” dentro de un anillo aromático e interacciones “C-H” de carbonos con hibridación  $sp^2$ , lo cual, es consistente con la fuente de origen del compuesto que es el furfural.

Por otra parte, la señal encontrada alrededor de los  $3300\text{ cm}^{-1}$  se debe a interacciones entre puentes de hidrógeno causadas muy posiblemente por el contenido de agua en la muestra.

Los éteres exhiben una banda de alargamiento debida al enlace “C-O”, que cae dentro de la región “dactiloscópica” entre los  $1050$ - $1260\text{ cm}^{-1}$ . Esta absorción es,

por lo general, bastante fuerte, pues la electronegatividad del oxígeno produce, durante la vibración, un cambio grande en el momento de enlace (Fessenden, 1983).

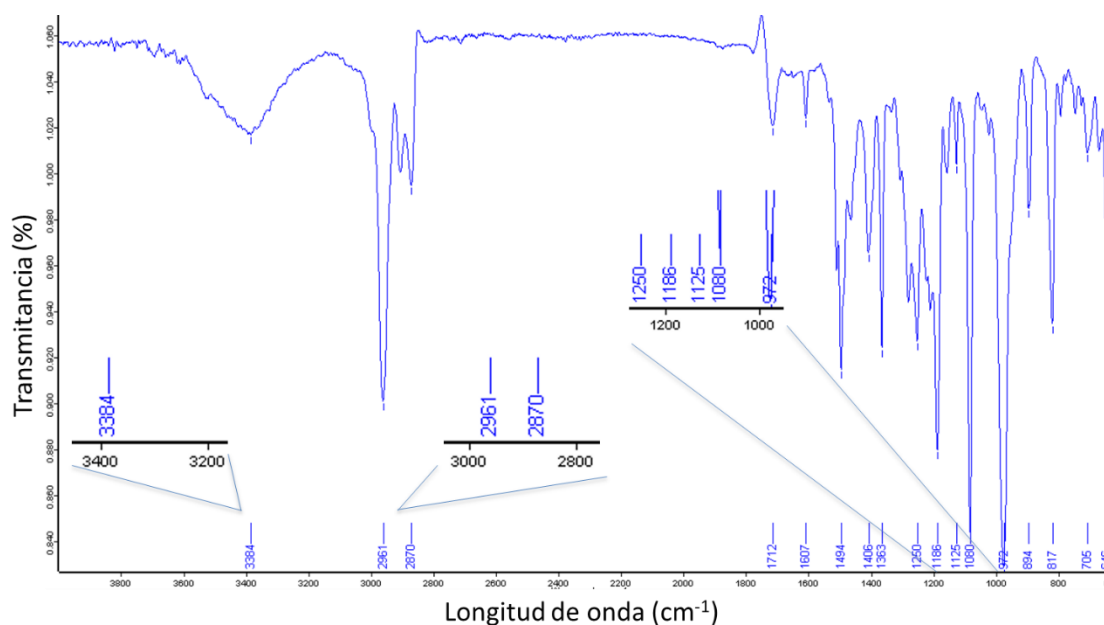


Figura 24. Espectro de IR del compuesto difurfuril éter proveniente de sobrenadantes del cultivo celular de cepas de *Acinetobacter*.

Al analizar la muestra proveniente de nuestra reacción de síntesis mediante IR (figura 25), observamos que el espectro derivado contiene las señales o picos característicos del compuesto “difurfuril éter”, principalmente aquellas ubicadas en una longitud de onda alrededor de 2800 y 3100  $\text{cm}^{-1}$ . Esto con base en el espectro del difurfuril éter obtenido de las muestras de sobrenadante de los cultivos bacterianos de *Acinetobacter*. También se puede apreciar la existencia de una señal fuerte a una longitud de onda alrededor de los 1000  $\text{cm}^{-1}$ , la cual, sugiere la formación de un éter por la señal del enlace “C-O”. De esta manera, se tuvo una primera confirmación de la síntesis del éter deseado, además, la señal característica



del carbonilo del aldehído del furfural en  $1700\text{ cm}^{-1}$  desaparece por completo, lo cual, confirma que ya no es furfural.

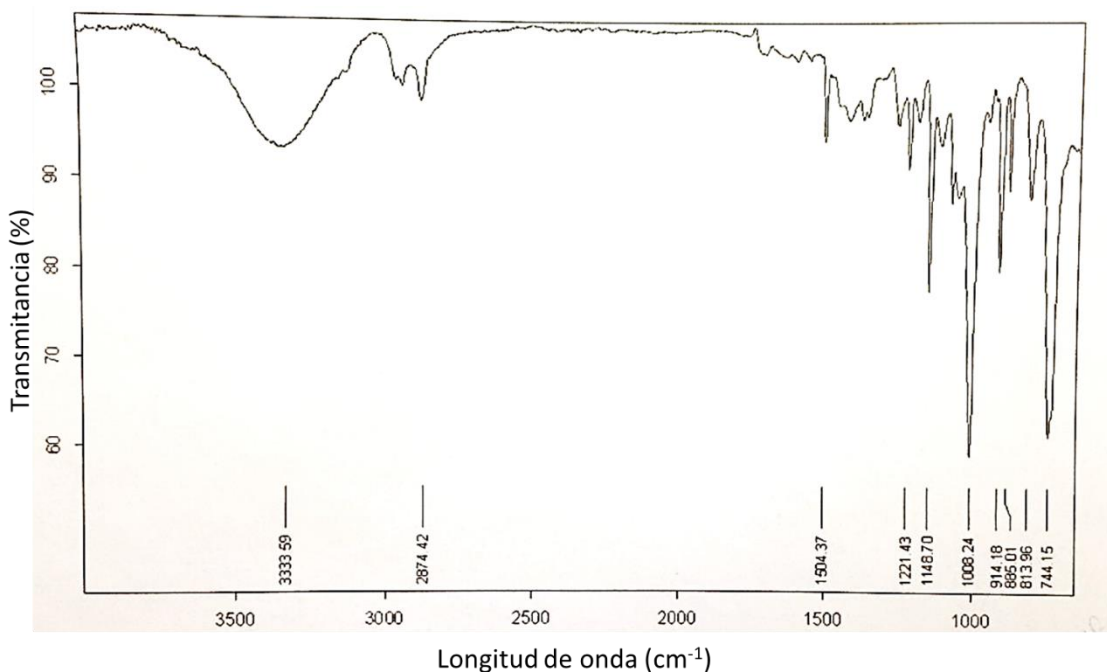


Figura 25. Espectro de IR del compuesto difurfuril éter sintetizado.

Análisis por  $^1\text{H}$ -RMN.

En la figura 26 se muestran las señales que representan los núcleos de hidrogeno del difurfuril éter en un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN obtenido a 500 MHz, empleando cloroformo deuterado. El número de núcleos existentes en cada señal se puede obtener por medio de la integración del área bajo la curva de la señal, siendo un valor de integración igual a 1 la representación de un solo núcleo o átomo de hidrógeno.

La señal del H correspondiente al carbono marcado con el número 4 es la más sencilla de identificar, debido a que en presencia de un campo magnético las señales de los núcleos de H muestran diferentes desplazamientos ( $\delta$ ) causados por el

entorno molecular que los rodea. La influencia de átomos electronegativos dentro de la molécula provoca disminución de la densidad electrónica del H, fenómeno conocido como desapantallamiento (Fessenden, 1983).

Por tal motivo, se sabe que la señal más alejada del cero es la que presenta el fenómeno de desapantallamiento, siendo ésta la marcada con el número 4 (figura 26) que corresponde a un hidrógeno aromático perteneciente al átomo de carbono en la posición "orto" del anillo, el cual, contiene un hidrógeno con una densidad electrónica más baja debido a su cercanía al átomo de oxígeno (Fessenden, 1983). La señal se aprecia claramente como un doble, dada la regla de multiplicidad  $n+1$  aplicada al hidrogeno vecino del átomo de carbono marcado con el número 3.

Con base en estas observaciones, se asignó un valor de integración de 1.0 a la señal perteneciente al carbono marcado con el número 4, la cual, tiene un desplazamiento de  $\delta = 7.42$  ppm. Ésta se tomó como referencia para el análisis de las áreas bajo la curva de las señales restantes marcadas con los números 1,2 y 3, las cuales, tienen valores de integración de 2.0, 1.0 y 1.0, respectivamente, siendo estos valores coincidentes con el número de hidrógenos que contienen sus relativos átomos de carbono, teniendo éstos configuración  $sp^3$ ,  $sp^2$  y  $sp^2$ , respectivamente.

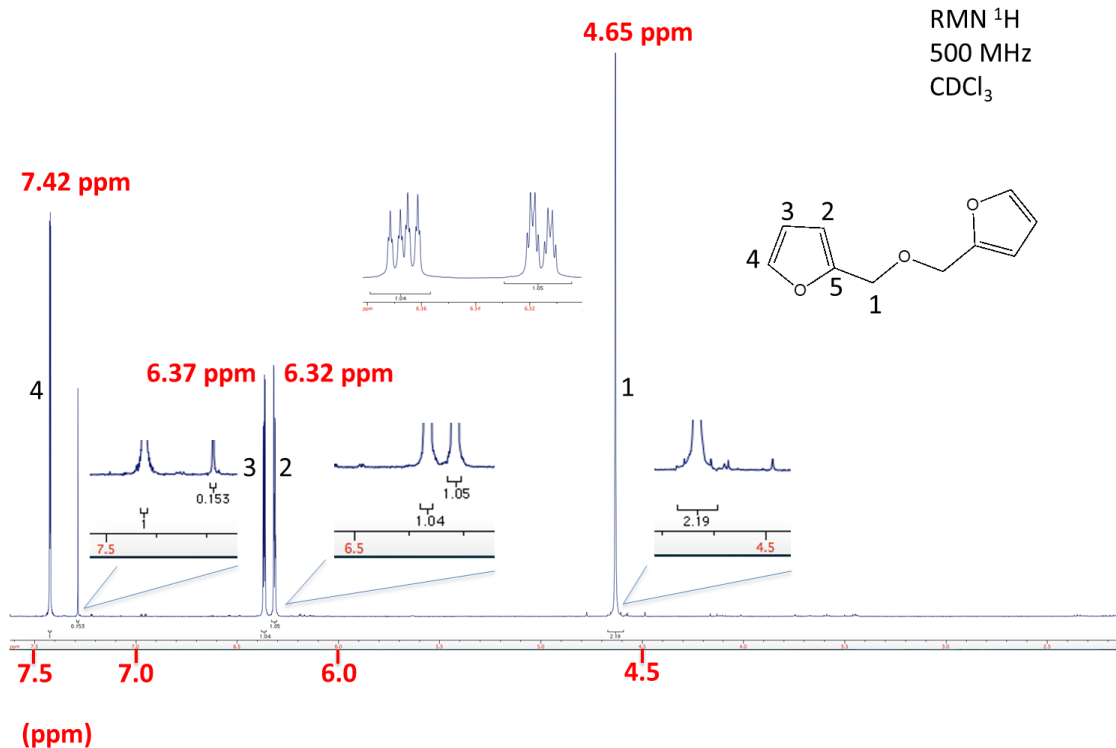


Figura 26. Espectro 1H-RMN a 500 MHz obtenido del estudio de sobrenadantes provenientes del cultivo celular en cepas de *Acinetobacter* una vez que ha biotransformado el furfural.

Por otro lado, al hacer un acercamiento de las señales 2 y 3 podemos observar lo siguiente:

- Señal 2: la señal se interpreta como una señal “doble” al aplicar la regla de multiplicidad sobre el hidrógeno vecino situado en el átomo de carbono marcado con el número 3. A su vez, dicha señal se ve partida en otro doble debido a la influencia o acoplamiento de los hidrógenos vecinos pertenecientes a los carbonos marcados con los números 3 y 4.
- Señal 3: la señal se interpreta como una señal “doble de doble” al aplicar la regla de la multiplicidad sobre los hidrógenos vecinos situados en los átomos de carbono marcados con los números 2 y 4, los cuales, tienen la mayor influencia sobre esta señal.

RMN-COSY (1H-1H).

Con respecto al análisis del espectro de RMN-COSY (*Correlation Spectroscopy*) se observaron las relaciones homonucleares de los hidrógenos al enfrentar sus señales en dos dimensiones (figura 27).

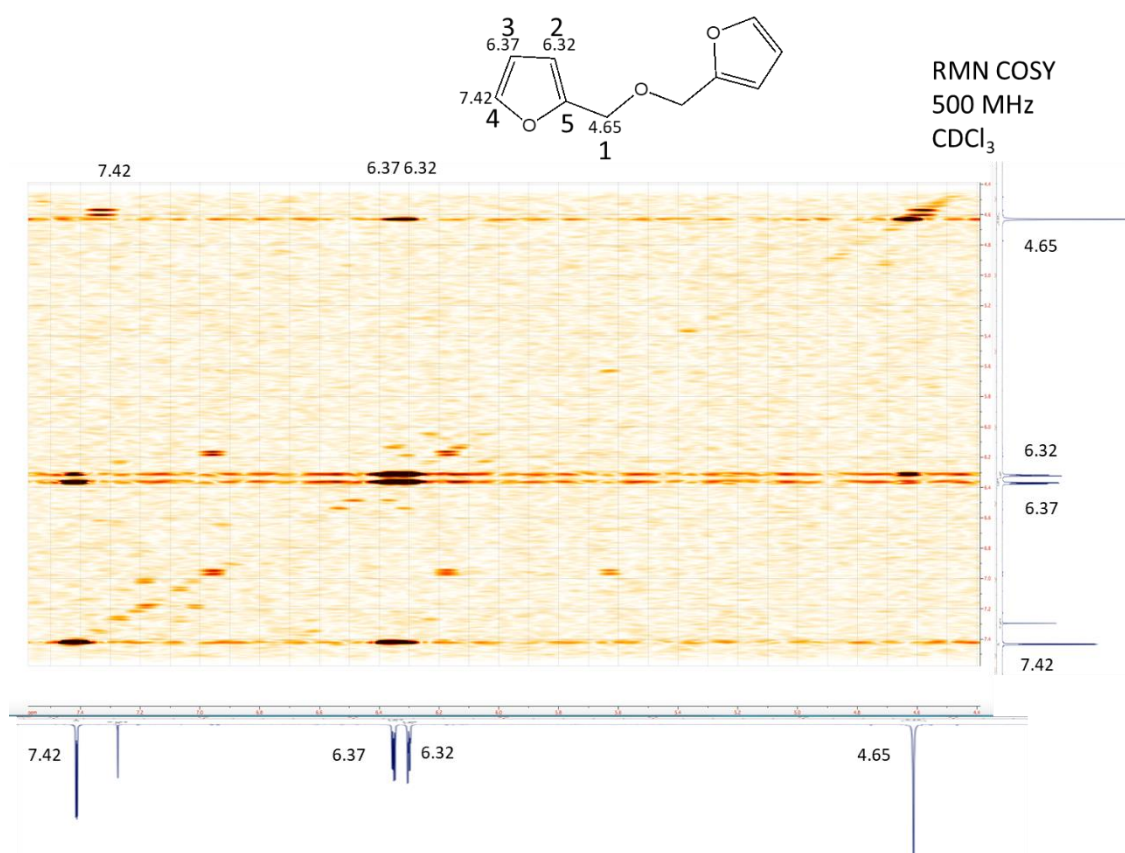


Figura 27. Espectro RMN-COSY (1H-1H) obtenido del estudio de sobrenadantes provenientes del cultivo celular en cepas de *Acinetobacter*

Las correlaciones de los cuatro hidrógenos encontrados (pertenecientes a los átomos de carbono marcados con los números 1, 2, 3 y 4) son coincidentes, se observa una tendencia lineal (correlación) y puntos de mayor intensidad donde la señal de cada hidrógeno converge con su igual y con la de los hidrógenos más

cercanos, la figura 28 muestra el espectro de RMN-COSY depurado y resaltando las señales.

Conforme esta señal se correlaciona con las señales de los hidrógenos vecinos observamos una disminución en la intensidad de las marcas dentro del plano, lo cual, indica que tan alejado se encuentra dicho hidrógeno de sus hidrógenos vecinos, por lo tanto, entre más alejados se encuentren, menor será la influencia o acoplamiento entre ellos, de esta manera observamos que el H asignado en 4.65 correspondiente al metileno de la posición 1 tiene una correlación con el H en 6.32 asignado al H de la posición 2.

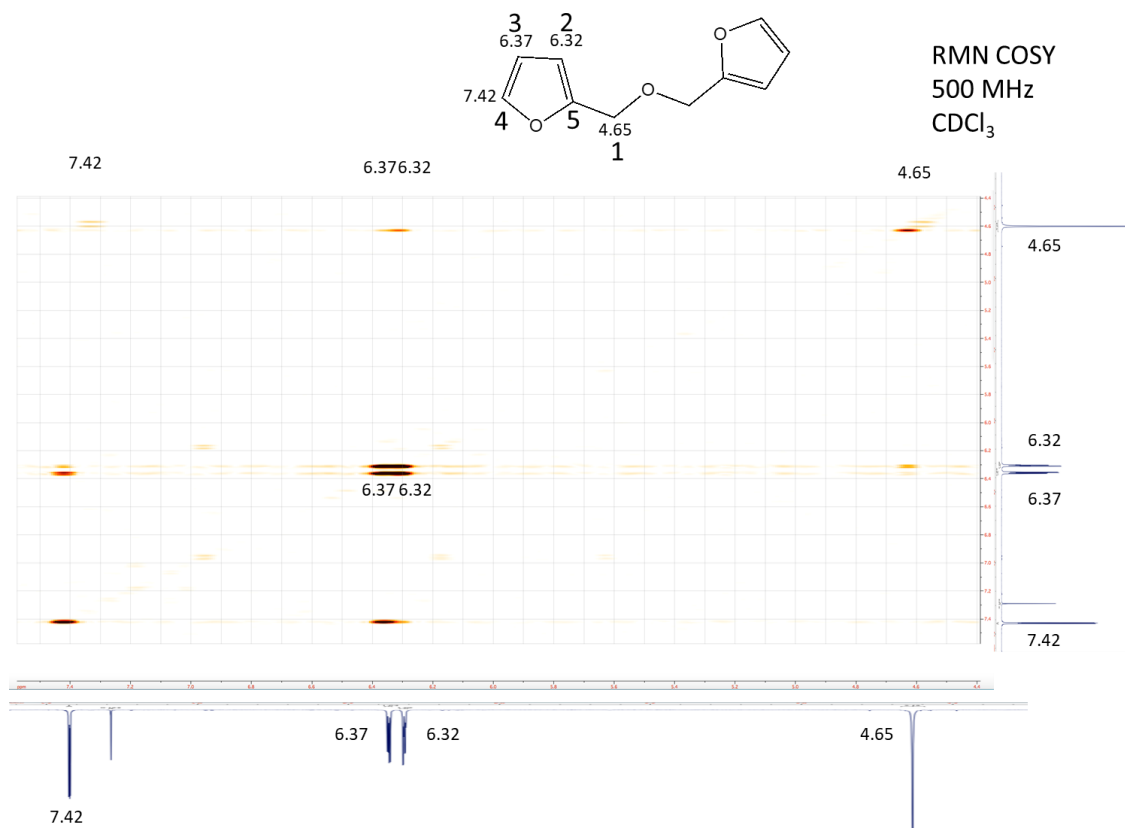


Figura 28. Espectro depurado RMN-COSY (1H-1H) obtenido del estudio de sobrenadantes provenientes del cultivo celular en cepas de *Acinetobacter*

El hidrógeno aromático asignado a la posición 2 en 6.32 ppm, correlaciona fuertemente con el hidrógeno en 6.37, alcanza a correlacionar con 4.65 y muy tenuemente con 7.42 y finalmente, esta señal correlaciona exclusivamente con el hidrógeno en 6.37.

En la figura 29 se muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN proveniente del compuesto obtenido por medio de síntesis orgánica del difurfuril éter. Se puede corroborar que las señales características alrededor de 4.65, 6.32, 6.37 y 7.42 ppm, así como las multiplicidades, son coincidentes con el espectro de la figura 30. Con esto se puede concluir que el producto de síntesis fue el esperado. No obstante, es importante señalar que las diferencias entre las señales de los espectros de la figura 26 y 29 se debe a la diferencia de resolución en cada uno de ellos, siendo el primero obtenido a 500 MHz y éste último a 60 MHz, cabe mencionar que tanto el espectro de infrarrojo como la cromatografía en capa fina también fueron coincidentes.

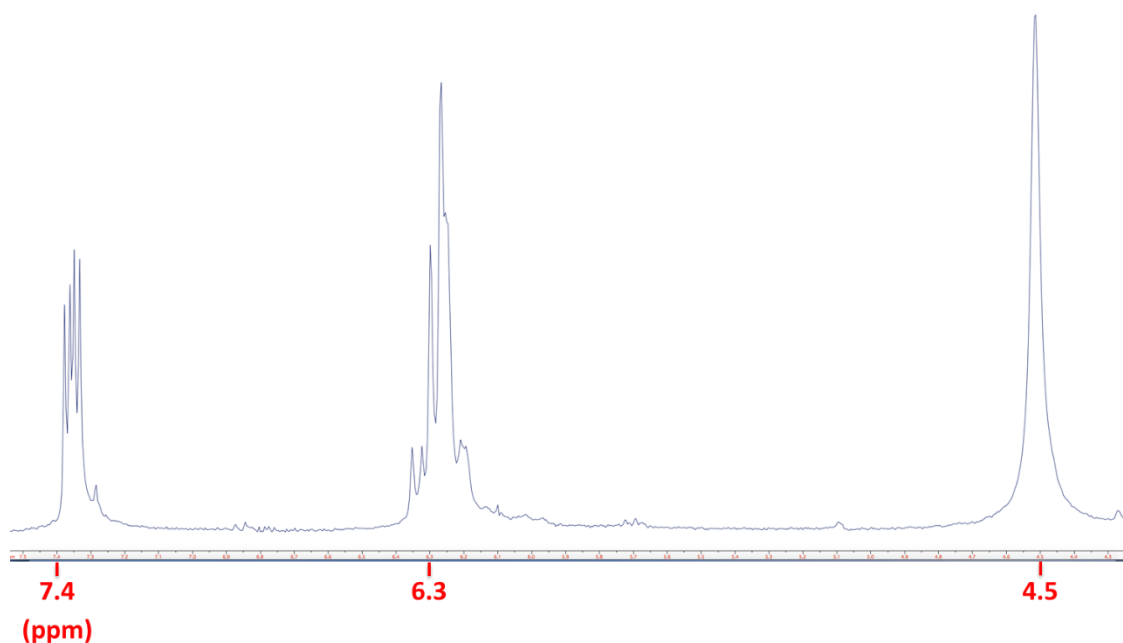


Figura 29. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN a 60 MHz obtenido del proceso de síntesis orgánica del difurfuril éter.

Análisis por  $^{13}\text{C}$ -RMN.

La espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN proporciona una descripción de los átomos de hidrógeno en una molécula orgánica, por otro lado, la espectroscopía de  $^{13}\text{C}$ -RMN proporciona una descripción de los átomos de carbono. En la espectroscopía de  $^{13}\text{C}$ -RMN los desplazamientos químicos son mayores que los observados en  $^1\text{H}$ -RMN. Con  $^{13}\text{C}$ , la zona de absorción se extiende en el intervalo de 0-200 ppm hacia el campo menor que la señal de TMS (tetrametil silano, considerado como cero). Esto permite que los espectros de  $^{13}\text{C}$  sean más sencillos que los de  $^1\text{H}$ , ya que en un espectro de  $^{13}\text{C}$  es poco probable que se observen señales superpuestas (Fessenden, 1983).

La figura 30 muestra un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN desacoplado de hidrógenos, donde como su nombre lo indica, el núcleo de  $^{13}\text{C}$  no está acoplado con los de  $^1\text{H}$  y por consecuencia, no hay desdoblamiento de picos y la señal para cada grupo de átomos de carbono magnéticamente equivalentes aparece como un "singulete" (Fessenden, 1983). Esto permite determinar de manera sencilla los diferentes tipos de carbono en la molécula, que en este caso son cinco.

Las señales fueron asignadas a cada átomo de carbono con base en el desplazamiento ( $\delta$ ) que presentan. Señales en el intervalo de 0 a 60 ppm representan carbonos con configuración  $sp^3$ , señales entre 100 y 150 ppm representan carbonos con configuración  $sp^2$ , pudiendo ser alquenos o aromáticos y finalmente, carbonos que no contienen hidrógeno más allá de las 150 ppm (Fessenden, 1983). De esta manera, se determinaron los tipos y número de átomos

de carbono dentro de la molécula. No obstante, es importante señalar la presencia de una señal a un  $\delta$  aproximado de 77 ppm, lo cual, indica la presencia de cloroformo empleado para disolver la muestra.

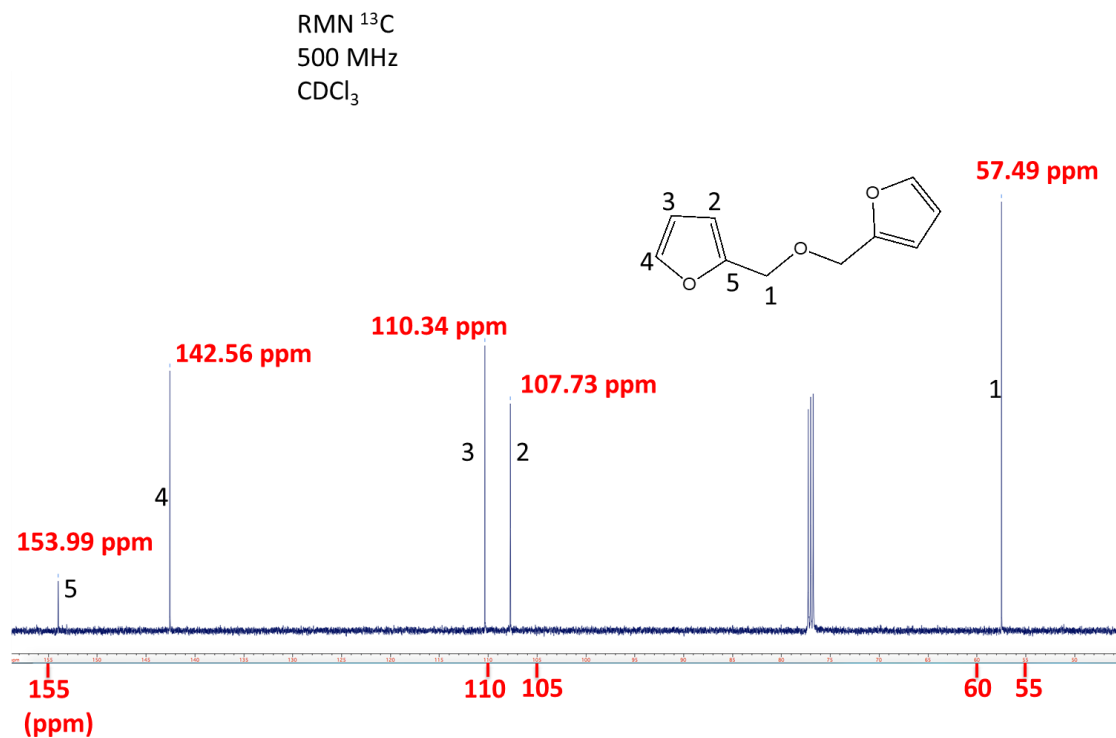


Figura 30. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN obtenido del estudio de sobrenadantes provenientes del cultivo celular en cepas de *Acinetobacter*

RMN HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ).

Los núcleos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  que están directamente unidos se correlacionan en los espectros denominados HSQC (*Heteronuclear Simple Quantum Correlation*). En la figura 31 podemos ver un espectro de este tipo, en donde se correlaciona de manera íntegra las señales de cada uno de los tipos de átomos de carbono de la molécula con su respectivo átomo de hidrógeno. Las marcas color amarillo y azul, corresponden a las señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , respectivamente. Se observa una perfecta



correlación de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para los carbonos marcados con los números 1, 2, 3 y 4. En el caso del átomo de carbono marcado con el número 5 ( $\delta = 159.99$  ppm), no se observa correlación con un hidrógeno debido a que se trata del único átomo de carbono dentro del anillo que no contiene un átomo de hidrógeno dado su carácter cuaternario.

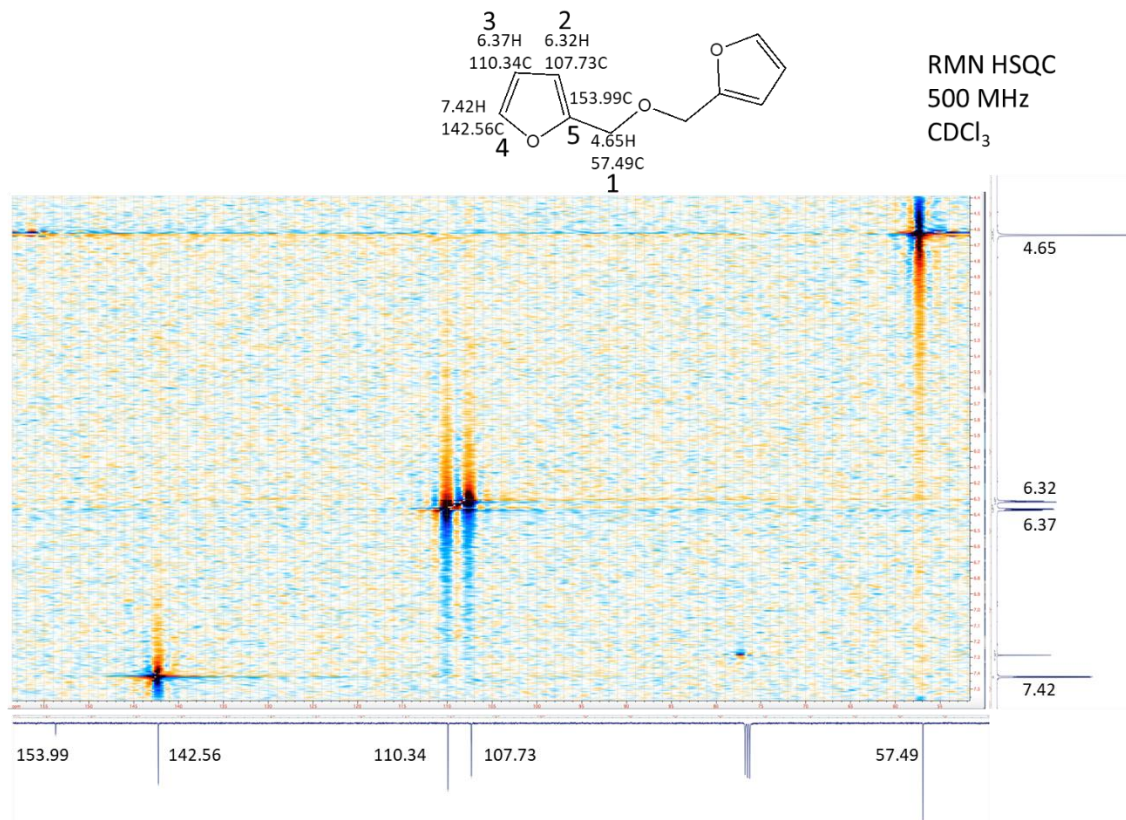


Figura 31. Espectro de RMN-HSQC obtenido del estudio de sobrenadantes provenientes del cultivo celular en cepas de *Acinetobacter*

#### Análisis por HPLC.

Una vez que la bacteria *A. baylyi* ADP1 ha biotransformado el furfural en difurfuril éter, éste se aprecia a un tiempo de retención alrededor de los 18 minutos dentro de un cromatograma obtenido mediante HPLC.

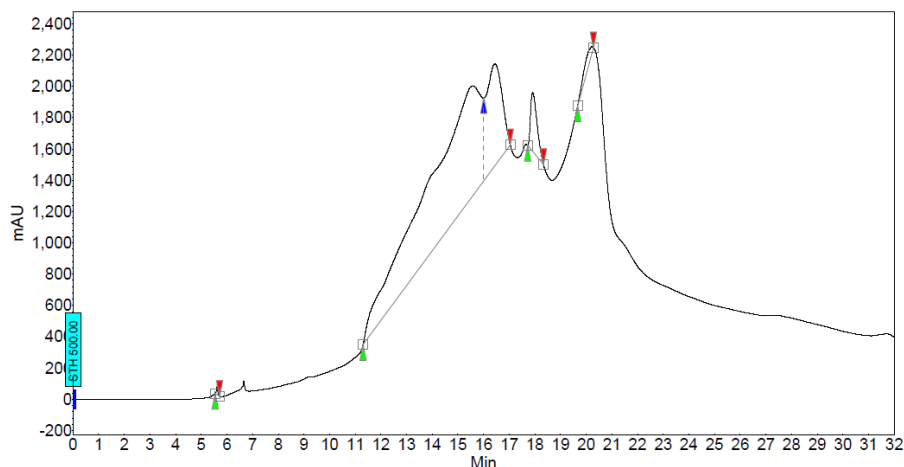


Figura 32. Cromatograma de HPLC del difurfuril éter obtenido en el laboratorio.  
Tiempo de retención de 17.94 minutos.

La figura 32 muestra una señal a un tiempo de retención de 17.94 minutos, la cual, coincide con la señal que aparece en experimentos anteriores y permite confirmar la correcta síntesis del difurfuril éter. No obstante, se deberá evaluar y probar cuál disolvente es el más adecuado para poder amplificar la señal del difurfuril éter sintetizado en el laboratorio y hacer más fina su determinación en HPLC, ya que como se muestra en la figura 32, aún persisten algunas otras señales, las cuales, posiblemente sean de algunos otros polímeros derivados de la síntesis orgánica del difurfuril éter.

**Cinética de crecimiento de *A. baylyi* ADP1 en presencia de acetato 4 g/L como fuente de carbono y furfural en pulsos equivalentes a 0.5 g/L.**

Con base en los resultados anteriores, se decidió estudiar como modelo de detoxificación a la cepa *A. baylyi* ADP1. Para tal efecto, el furfural en pulsos equivalentes a 0.5 g/L se comenzó a añadir a partir de la fase estacionaria de

crecimiento cada 30 minutos y hasta completar el equivalente de 2 g/L de concentración total añadida (figura 33).

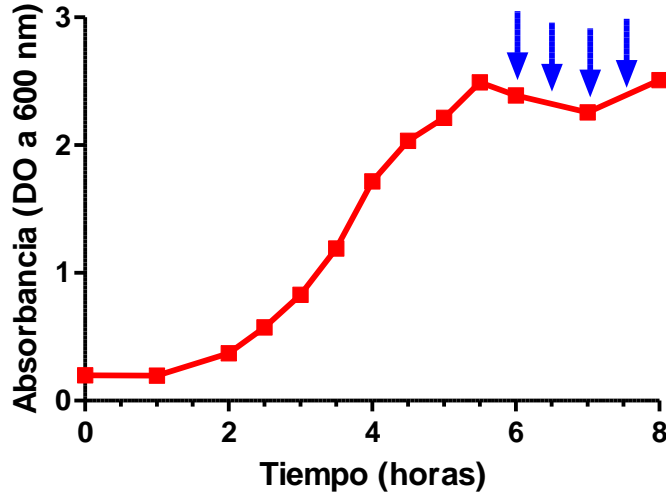


Figura 33. Cinética de crecimiento de ADP1 con 4 (g/L) de acetato y furfural en pulsos equivalentes a 0.5 g/L (flechas azules). Experimento realizado por duplicado, se muestra solo una gráfica representativa.

Es importante señalar que antes de la adición del primer pulso y tras 30 minutos de la adición del último pulso, se tomaron muestras para el análisis transcripcional correspondiente. Como se puede observar en la tabla 24, la  $\mu$  es igual a aquellos experimentos con ausencia de furfural, lo que indica que, bajo estas condiciones de experimentación, el furfural es biotransformado a tal velocidad que no presenta efecto fisiológico negativo en esta cepa.

Tabla 24.  $\mu$  de *A. baylyi* ADP1 en medio mineral M9 con 4 g/L de acetato y pulsos de furfural de 0.5 (g/L).

Cepa	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
ADP1	0.7 ± 0.00

## **Identificación de genes de posibles enzimas responsables de la biotransformación del furfural.**

Se ha reportado que varias bacterias y levaduras son capaces de transformar el furfural a alcohol furfurílico (Preston, 2002). Algunos resultados mostraron la degradación de furfural por cepas de *E. coli* KO11 y LY01 y por *Klebsiella oxytoca* mediante la reducción completa del furfural a alcohol furfurílico (Preston, 2002).

*E. coli* LY01 usa una enzima denominada furfural reductasa (FFR) para catalizar la reducción de furfural a alcohol furfurílico (Preston, 2006). También se sabe que 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, 2011).

Por otro lado, se ha reportado que la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) FurX es dependiente de zinc, tetramérica, de *Cupriavidus necator* JMP134. Se encarga de la reducción de furfural a compuestos menos tóxicos; de manera similar, el gen *cgl0331* (designado *fudC*) es el principal responsable de la reducción de furfural en alcohol furfurílico en *Corynebacterium glutamicum* (Kang, 2012; Tsuge, 2015).

Con estos antecedentes en mente se realizó una búsqueda dentro del genoma de *A. baylyi* APD1 para identificar genes homólogos involucrados en la biotransformación del furfural a difurfuril éter. Los resultados se muestran en la tabla 25.

Tabla 25. Posibles genes de enzimas oxidoreductasas involucrados en la biotransformación de furanos en la cepa *A. baylyi* ADP1.

Tipo de enzima	Número de genes encontrados
Alcohol deshidrogenasas	8
Aldehído deshidrogenasas	9
Deshidrogenasas	4
Reductasas	2
Transhidrogenasas	4
Total	27

**Diseño de oligonucleótidos para amplificar genes de enzimas responsables de la biotransformación de furfural.**

Las secuencias de ARNm de los genes de la tabla 25 sirvieron como plantilla para el diseño de oligonucleótidos (ver apéndice B), los cuales, tienen la función de cebadores o *primers* dentro de una reacción de PCR al hibridarse con las muestras de ADNc, definiendo una región de interés que será amplificada y nos ayudará a corroborar la existencia y nivel de expresión de un transcrito. De este modo, conoceremos de manera precisa cuales de estos posibles genes están involucrados en la biotransformación del furfural en la cepa *A. baylyi* ADP1.

El correcto diseño de oligonucleótidos es esencial para asegurar la especificidad y eficiencia de los productos de amplificación. Para corroborar lo anterior, se realizaron PCRs de punto final sobre el ADN genómico de ambas cepas. Posteriormente, los productos de amplificación se revelaron en geles de agarosa.

Los productos de amplificación tuvieron el tamaño esperado de 101 pb (Figura 34) en todos los casos (ver apéndice D). De acuerdo con las directrices MIQE, los amplicones de PCR en tiempo real deben estar entre 75 – 150 pb. Por otro lado, la temperatura de alineamiento a la plantilla debe estar entre 55-65°C; nuestros oligonucleótidos tienen una temperatura de 60°C, cumpliendo así con lo propuesto por Sean Taylor (Taylor, 2010).

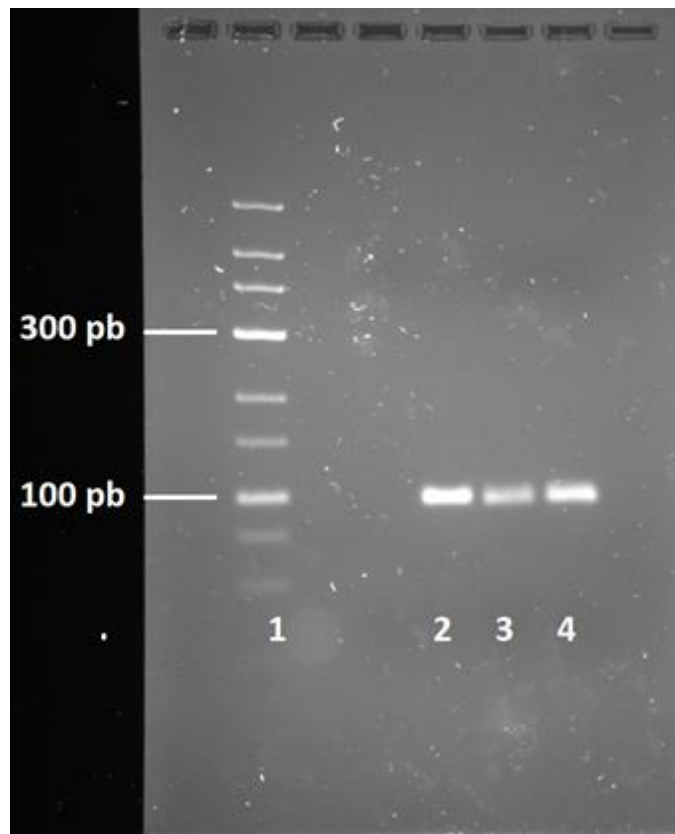


Figura 34. Electroforésis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE 0.5X de productos de amplificación de la PCR punto final. Carriles, 1: marcador de peso molecular *GeneRuler Low Range DNA Ladder*, 2: gen *pntA-2*, 3: gen *pntA-1* y 4: gen *calB*.

### Elección del gen de referencia para el análisis transcripcional.

A partir del experimento descrito en la figura 33, se tomaron muestras antes y después de la adición de furfural para poder extraer ARN y hacer el análisis transcripcional correspondiente en la cepa *A. baylyi* ADP1. Se determinó que el gen *gyrA* sería el gen más adecuado para su uso como gen de referencia, con base en los antecedentes obtenidos por Quiroz (2019). En la tabla 26 se muestran los valores Cq de dicho gen en las diferentes condiciones de estudio. Se aprecia que el valor de  $\Delta Cq$  es menor a 1, además de que el valor promedio de NTC se encuentra muy por encima del valor de Cq de las muestras y es  $\geq 35$ , cumpliendo así los requisitos para su elección como gen de referencia, de acuerdo con las directrices MIQE (Bustin, 2009). Los valores de Cq fueron obtenidos considerando un valor Threshold de 0.05.

Tabla 26. Valores de Cq del gen de referencia *gyrA* en las condiciones de este estudio para la cepa ADP1.

Gen de referencia	Condición de estudio			
	Antes de furfural		Después de furfural	
	Muestra	Valor de Cq	Muestra	Valor de Cq
<i>gyrA</i>	NTC	36.3	NTC	Sin amplificación
	Lote 1	23.15	Lote 1	23.45
	Lote 1	22.59	Lote 1	22.94
	Lote 2	23.3	Lote 2	22.45
	Lote 2	22.97	Lote 2	22.34
	Cq promedio: 23.00 $\pm$ 0.31		Cq promedio: 22.79 $\pm$ 0.51	
	$\Delta Cq$ : 0.21 NTC promedio: 36.3			

### Eficiencia de la reacción de amplificación del gen de referencia *gyrA*.

La figura 35 muestra la curva de eficiencia de reacción de amplificación para el gen de referencia *gyrA*. Se puede apreciar un coeficiente de correlación  $>0.99$ . Además, el porcentaje de eficiencia de amplificación obtenido fue de 94% encontrándose así dentro del intervalo aceptable (90-110%) (Taylor, *et al.*, 2010).

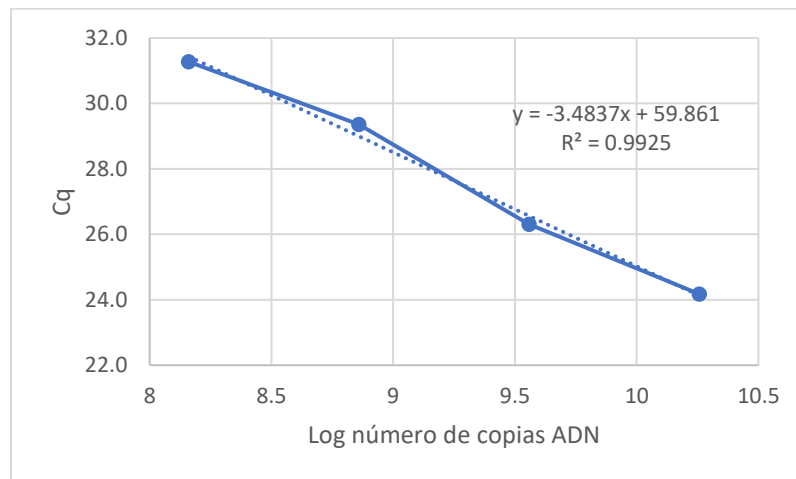


Figura 35. Curva de eficiencia de la amplificación del gen *gyrA*.

Los valores de pendiente entre -3.1 y -3.6 se consideran aceptables, representando eficiencias del 90% y 110%, respectivamente. La  $R^2$  es el coeficiente de correlación al cuadrado entre los datos de la curva, valores de  $R^2$  mayores a 0.98 indican que el ensayo es estable y confiable (figura 35). En la tabla 27 se presentan los valores de eficiencia de reacción de amplificación, pendiente y correlación lineal al cuadrado.

Tabla 27. Eficiencia de la reacción de amplificación del gen *gyrA*.

Gen de referencia <i>gyrA</i>		
Pendiente	Eficiencia	$R^2$
-3.4837	94%	0.9925



**Concentración, pureza e integridad del ARN obtenido durante el crecimiento en ausencia y presencia de furfural.**

Se estudió la biotransformación del furfural durante la fase estacionaria del crecimiento para evitar la competencia que puede surgir por NADPH en la fase exponencial entre la síntesis de biomasa y la reducción del furfural, situación que se ha determinado va en detrimento de la segunda (Kang, *et al.*, 2012; Liu, *et al.*, 2006; Tsuge, *et al.*, 2015; Zheng, *et al.*, 2013). Se extrajo y se purificó ARN a partir de dos lotes en matraz durante la fase estacionaria de crecimiento antes de añadir furfural al medio y tras la biotransformación de 2 g/L de furfural en la cepa ADP1, por ser ésta, como se mencionó antes, mejor detoxificadora del furano en comparación con la cepa ACE.

Las concentraciones obtenidas del ARN, así como su pureza e integridad, se muestran en la tabla 28. Dichos valores fueron los adecuados para que las muestras pudieran ser utilizadas para continuar con el análisis transcripcional.

Tabla 28. Concentración, pureza e integridad de las muestras de ARN antes y después de la digestión con DNasa.

Muestra		[ARN] (ng/uL)	260/230	260/280	[ARN] (ng/uL)	260/230	260/280	RIN
Lote 1	Antes furfural	852	1.82	2.18	126	1.24	2.03	9.6
	Después furfural	651	2.03	2.11	257	1.79	2.09	9.1
Lote 2	Antes furfural	927	1.44	2.26	135	1.05	2.02	9.7
	Después furfural	240	2.13	2.14	453	2.07	2.09	8.3
		Antes del tratamiento con DNasa			Después del tratamiento con DNasa			

Respecto a la pureza, se puede apreciar que las relaciones de absorbancias 260/280 estuvieron siempre por encima del valor mínimo recomendado en todas las muestras (1.8). Por otro lado, en algunas muestras la relación 260/230 se encuentra por debajo del valor mínimo recomendado, esto debido a la presencia de algún componente del kit de extracción que absorba a 230 nm. Sin embargo, esto no compromete la confiabilidad de estas muestras ya que, de acuerdo con el proveedor del kit, incluso con valores de 0.5 en la relación 260/230 se comprobó que no existían consecuencias durante el procesamiento posterior. Para el caso de la integridad, el valor de RIN de las muestras después de la digestión con DNasa fue elevada en todos los casos. Dichos valores están muy por encima del valor mínimo recomendado (RIN = 7) para llevar a cabo experimentos de RT-qPCR (Fleige, 2006). Los picos de los electroferogramas, así como las bandas del gel virtual tienen muy buena definición, representando una degradación mínima del ARN de las muestras, lo cual, concuerda con los altos valores de RIN obtenidos. Con los resultados obtenidos se asegura un buen control de calidad del ARN, cumpliendo con lo estipulado por las directrices MIQE.

#### **Análisis de expresión de genes posiblemente involucrados en la biotransformación de furfural por RT-qPCR.**

Una vez que se definió a *gyrA* como gen de referencia, se llevaron a cabo las reacciones de RT-qPCR de los posibles genes involucrados en la biotransformación del furfural en la cepa *A. baylyi* ADP1, y algunos otros genes del metabolismo cuyos cofactores son NADPH o NADH. Durante este procedimiento, se obtuvieron

productos únicos de amplificación en todos los casos al analizar cada una de las curvas de disociación. De la misma manera, la ausencia de productos de amplificación en los controles NTCs demostró la ausencia de contaminación, así como una síntesis de oligonucleótidos satisfactoria y condiciones óptimas de amplificación.

En la figura 36 se puede observar que existen diferencias importantes en el nivel de expresión de algunos de los genes de enzimas oxidoreductasa que podrían estar involucradas en la biotransformación del furfural, siendo las más probables *areB* y *frmA*. Otros genes que se sobreexpresan en *A. baylyi* ADP1 son *ACIAD1578*, *ACIAD2287*, y las transhidrogenasas *pntB*, *pntA-2* y *pntA-1*. Por otro lado, los genes que muestran una subexpresión son *ACIAD1950*, *sthA*, *ACIAD1577* y los genes metabólicos *adhA*, *icd*, *sfcA*.

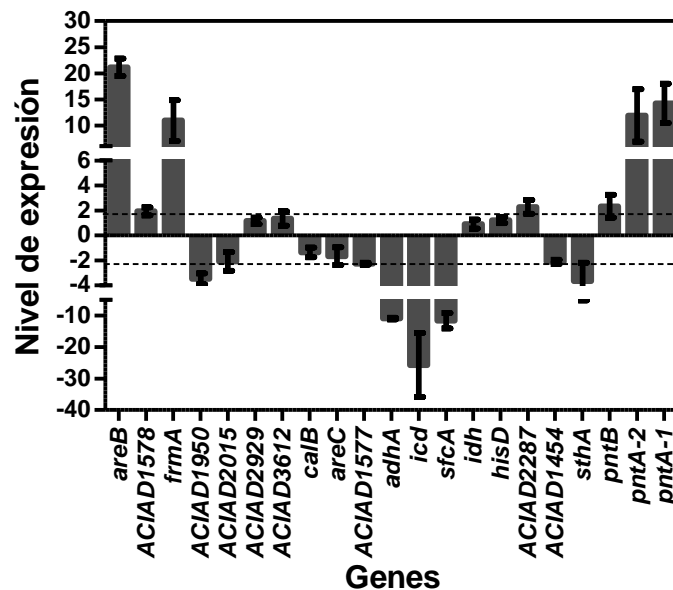


Figura 36. Nivel de expresión de genes en la cepa *A. baylyi* ADP1. El nivel de expresión es calculado mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .

Para considerar que un gen de estudio en la cepa *A. baylyi* ADP1 tenga una diferencia significativa en su nivel de expresión, éste debe tener un valor mayor o igual a 2 o -2 con respecto al gen de referencia *gyrA*.

Esto se debe a que el nivel de expresión para el gen de referencia se establece en 1, ya que su valor de  $\Delta\Delta Cq = 0$  y, por lo tanto,  $2^0 = 1$  (Rao, 2013).

Al obtener valores mayores o iguales a 2 o -2 se está por encima del nivel de expresión del gen de referencia ( $2^0 = 1$ ) y de su coeficiente de variación (CV), que en experimentos de PCR se recomienda sea  $<30\%$  (Karlen, 2007).

De este modo, aseguramos que la sobreexpresión o subexpresión de un gen de estudio es válida. El garantizar un valor de expresión al menos del doble con base en el valor del gen de referencia, asegura que aun con el máximo porcentaje de error en alguna muestra, ésta estará por encima del valor de normalización (=1).

#### **Características de las enzimas AreB y FrmA.**

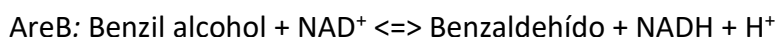
En la tabla 29 se muestran algunas características relevantes de los genes *areB* y *frmA* y sus productos.

Tabla 29. Características de los genes *areB* y *frmA*.

<b>Característica</b>	<b><i>areB</i></b>	<b><i>frmA</i></b>
Proteína que codifica	Bencil alcohol deshidrogenasa	Alcohol deshidrogenasa
Localización (locus)	ACIAD1429	ACIAD1879
EC number	1.1.1.90	1.1.1.1 / 1.1.1.284
# nucleótidos	1116	1110
# aminoácidos	371	369
Cofactor	NAD / NAD(P)	NAD / NAD(P)
Sitio de unión estructural (ión)	Zn <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>

Como se puede observar, las similitudes son muy cercanas en cuanto al número de nucleótidos de los genes y por tanto al número de aminoácidos de sus productos. Además, ambas enzimas emplean el mismo cofactor y tienen sitios de unión estructural dependientes de  $Zn^{2+}$ .

Las reacciones que catalizan los productos de los genes que se sobreexpresaron en mayor medida en presencia de furfural en ADP1 son las siguientes:



Como se puede observar en ambos casos, la enzima reduce el grupo carbonilo (aldehído) u oxida el grupo alcohol de una molécula, con la consecuente reducción del cofactor asociado. Por tal motivo, el mecanismo que se seguiría en el caso del furfural es la reducción del grupo carbonilo (aldehído) presente en el furano para convertirlo en un primer paso a alcohol furfurílico (figura 37) y posteriormente a difurfuril éter.

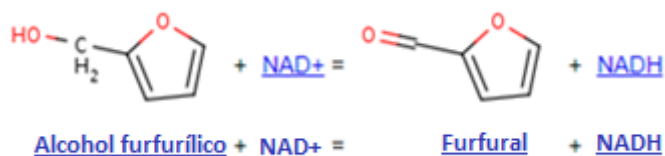


Figura 37. Reacción posiblemente catalizada por la enzima AreB (benzil alcohol deshidrogenasa).

Con respecto a las vías metabólicas en las que estas enzimas participan, la tabla 30 muestra un compendio de éstas. Es importante remarcar aquellas en las que ambas

coinciden, siendo la más notable en relación con los furanos, la de degradación de compuestos aromáticos.

Tabla 30. Vías metabólicas en las que participan las enzimas AreB y FrmA (Kegg, 2019).

Enzima	AreB	FrmA
Vía metabólica	Metabolismo de tirosina	Glucolisis/Gluconeogénesis
	Metabolismo de fenilalanina	Degradación de ácidos grasos
	Degradación de xileno	Metabolismo de tirosina
	Degradación de tolueno	Degradación de cloroalcanos y cloroalquenos
	Degradación de compuestos aromáticos	Degradación de naftaleno
		Metabolismo de metano
		Biosíntesis de metabolitos secundarios
		Biosíntesis de antibióticos
		Metabolismo de carbono
		Degradación de compuestos aromáticos.

Con respecto a nuestras cepas de estudio y basados en su *EC number*, la enzima AreB se ha encontrado en otro organismo del mismo género: *Acinetobacter calcoaceticus* (Beauchamp, *et al.*, 2003). Su masa molecular es de 40 KDa, su principal actividad se centra en la oxidación de alcoholes primarios unidos a un anillo aromático, siendo altamente específica al alcohol bencílico. Además, se sabe que su actividad es muy pobre sobre alcoholes primarios alifáticos (Curtis, 1999). Está conformada por una

sola cadena denominada “cadena A” y cuenta con 4 sitios de unión a ligandos, los cuales son (Beauchamp, *et al.*, 2003):

- Sitio de unión a Zn.
- Sitio de unión a sulfato.
- Sitio de unión a cofactor NAD.
- Sitio de unión a etanol.

Con respecto a los motivos/dominios en la enzima AreB en *A. baylyi* ADP1 se han determinado los de la tabla 31 (Kegg, 2019).

Tabla 31. Motivos/Dominios de la enzima AreB.

Motivo/Dominio	Definición
ADH_N_2	Dominio N-terminal oxidorreductasa
ADH_N	Dominio alcohol deshidrogenasa tipo GroES
AlaDh_PNT_C	Dominio C-terminal Alanina deshidrogenasa/PNT
Glu_dehyd_C	Glucosa deshidrogenasa C-terminal
ADH_Zinc_N	Unión a zinc deshidrogenasa
ADH_Zinc_N_2	Unión a zinc deshidrogenasa

Por su parte, la enzima FrmA está catalogada de dos maneras. La primera de ellas es como una S-(hidroximetil) glutatión deshidrogenasa (EC= 1.1.1.284), la cual tiene una acción redox sobre grupos alcohol usando como aceptor de electrones NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup>. En los humanos, esta enzima pertenece a la familia de las alcohol deshidrogenasas dependientes de zinc (Barber, 1996; Sanghani, 2000). Por otro lado, también es denominada como una enzima alcohol deshidrogenasa (1.1.1.1), la

cual actúa sobre alcoholes primarios, secundarios e inclusive hemiacetales, usando como aceptor de electrones  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ . Sin embargo, la oxidación del metanol es muy pobre en comparación con la del etanol con esta enzima. En animales, esta enzima puede actuar sobre alcoholes cíclicos secundarios, lo cual, no ocurre en levaduras (Jörnóvall, 1977).

Su tamaño es de alrededor de 40 KDa. Con respecto a sus motivos y dominios, estos se muestran en la tabla 32 (Kegg, 2019).

Tabla 32. Motivos/Dominios de la enzima FrmA.

Motivo/Dominio	Definición
ADH_N	Dominio alcohol deshidrogenasa tipo GroES
MinC_C	Dominio C-terminal, formación inhibidora MinC
Met_10	Proteína tipo Met-10+
2-Hacid_dh_C	D-isomero específico de 2-hidroxiácido deshidrogenasa, Dominio de unión a $\text{NAD}^+$
ADH_Zinc_N	Unión a zinc deshidrogenasa
ADH_Zinc_N_2	Unión a zinc deshidrogenasa
Glu_dehyd_C	Glucosa deshidrogenasa, C-terminus
TrkA_N	Dominio TrkA_N (transporte de $\text{NAD}^+$ dentro de la bacteria)

Los motivos/dominios proteicos en los que estas dos enzimas coinciden son:

- ADH Zinc N
- ADH N
- ADH Zinc N2



- Glu Dehyd C

Con base en los motivos y/o dominios reportados, es importante mencionar las características de aquellos con la denominación “ADH” (alcohol deshidrogenasa), en los cuales, recae la principal actividad biotransformante del furfural. Las enzimas con este tipo de motivos y/o dominios catalizan la oxidación reversible de alcoholes a sus correspondientes aldehídos o cetonas con la concomitante reducción del cofactor NAD. Frecuentemente, tres tipos estructurales y catalíticos de enzimas alcohol deshidrogenasas son conocidos (Interpro, 2019):

- Alcohol deshidrogenasas de cadena larga que contiene zinc.
- Alcohol deshidrogenasa de cadena corta o de tipo insecto.
- Alcohol deshidrogenasas que contiene hierro.

Generalmente, las enzimas que contiene motivos y/o dominios de unión a zinc están conformadas por dímeros o tetrámeros que unen dos átomos de zinc por subunidad. Uno de estos átomos de zinc es esencial para la actividad catalítica, mientras que el otro no lo es. Ambos átomos de zinc están coordinados tanto por residuos de cisteína o histidina; el zinc catalítico está coordinado por dos cisteínas y una histidina. Estas enzimas están presentes en mamíferos, bacterias, levaduras, plantas y hongos (Jörnvall, 1987; Sun, 1992). En varias especies existen más de una isoenzima (por ejemplo, los humanos tienen al menos seis, las levaduras tres, etc). Estudios estructurales indican que estos dominios forman un plegamiento muy común denominado “*Rossmann*” el cual, se une de manera reversible al cofactor NAD(H) (Pauly, 2003; Rubach, 2003; Thorn, 1995).

## Capítulo VI. Conclusiones y perspectivas.

### Conclusiones.

- La MIC del furfural es de 1.25 g/L para ACE y ADP1 en agar medio mineral M9.
- La presencia de 1 g/L de furfural desde el comienzo de la cinética de crecimiento disminuye la  $\mu$  de ACE en un 55% y en un 28% para ADP1, respecto a medios sin furfural.
- La velocidad de biotransformación del furfural en cepas de *A. baylyi* ADP1 es de 1 g/L de furfural por 1 hora.
- Con la cepa ADP1 se logró biotransformar hasta 8 g/L de furfural mediante pulsos equivalentes a 0.5, 1.0 y 2.0 g/L.
- El alcohol furfurílico por sí sólo, y en conjunto con el furfural, también es biotransformado al compuesto difurfuril éter por ambas cepas de este estudio.
- La sobreexpresión de enzimas alcohol deshidrogenasas sugiere que la biotransformación de furfural puede llevarse al cabo mediante una primera conversión a alcohol furfurílico y posteriormente, a difurfuril éter.
- De manera específica, los dos genes que posiblemente estén involucrados en la biotransformación del furfural a difurfuril éter son: *areB* y *frmA*, estos codifican para una enzima bencil alcohol deshidrogenasa (AreB) y una enzima alcohol deshidrogenasa (FrmA), respectivamente.

### **Perspectivas.**

- Inactivar los genes *areB* y *frmA* en la cepa ADP1 para comprobar su implicación en la biotransformación del furfural.
- Clonar los genes *areB* y *frmA* en un plásmido para transformar a alguna cepa de *E. coli* y determinar si adquieren la capacidad de tolerancia y biotransformación del furfural.
- Caracterizar cinéticamente a las enzimas AreB y FrmA y determinar su constante de actividad ( $K_m$ ) y  $V_{max}$ , con lo cual, se podría saber cuál de las dos es más adecuada cinéticamente para la detoxificación.

## Capítulo VII. Referencias.

- Almqvist, J. (2018). *Furans from biomass: Production, applications and techno economic potential*. Recuperado de <http://www.processum.se/images/dokument/FoU/Furans-from-biomass-Bioraff-Botnia.pdf> el 08 de abril del 2019.
- Arteaga, J. (2017). *Análisis transcripcional por RT-qPCR entre Escherichia coli JM101 y Acinetobacter schindleri ACE empleando acetato como fuente de carbono*. Especialización en Ciencias Naturales e Ingeniería. Universidad Autónoma Metropolitana. Ciudad de México, México.
- Ask, M., Bettiga, M. and Mapelli, V. (2013). *The influence of HMF and furfural on redox balance and energy-state of xylose-utilizing Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*. 6:22.
- Baber, R., et al. (1996). *Characterization of Glutathione-Dependent Formaldehyde Dehydrogenase from Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*. 178(5): 1386-1393.
- Beauchamp, J.C., et al. (2003). *Crystal structure of benzyl alcohol dehydrogenase from Acinetobacter calcoaceticus*. RCSB Protein Data Bank. Recuperado de <http://www.rcsb.org/structure/1F8F> el 11 de diciembre del 2019.
- Bustin, S., et al. (2009). *The MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real Time PCR Experiments*. *Clinical Chemistry*. 55(4): 611-622.
- Cerros, K. (2017). *Evaluación de Acinetobacter baylyi ADP1 como agente detoxificador de hidrolizados de rastrojo de maíz*. Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería (en proceso). Universidad Autónoma Metropolitana. Ciudad de México, México.

- Curtis, A.J., et al. (1999). *Allylic or benzylic stabilization is essential for catalysis by bacterial benzyl alcohol dehydrogenases*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 259(1): 220-223.
- Fleige, S., and Pfaffl, W. (2006). *RNA integrity and the effect on the real time qRT-PCR performance*. Molecular Aspects of Medicine. 27(2-3): 126-139.
- Furkan, H. and Remzi, B. (2015). *Lignocellulosic Biomass: A sustainable platform for production of bio-based chemicals and polymers*. Polymer Chemistry. 6 (25): 4497 – 4559.
- InterPro: Classification of protein families. Alcohol dehydrogenase: ADH\_C. (2019). Recuperado de <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR013149/> el 14 de diciembre de 2019.
- Izzotti, A., and Pulliero, A. (2014). *The effects of environmental chemical carcinogens on the microRNA machinery*. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 217 (6), 601-627.
- Jönson, L. and Martín, C. (2016). *Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects*. Bioresource Technology. 199 (2016): 103 – 112.
- Jönson, L., Alriksson, B. and Nilvebrant, N. (2013). *Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification*. Biotechnology for Biofuels. 6: 16.
- Jörnvall, H. (1977). *Differences between alcohol dehydrogenases: structural properties and evolutionary aspects*. European Journal of Biochemistry. 72(3): 443-52.

- Jörnvall, H., et al. (1987). *Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. The zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases*. European Journal of Biochemistry. 167: 195-201.
- Kang, C. et al. (2012). *Furfural reduction mechanism of a zinc-dependent alcohol dehydrogenase from Cupriavidus necator JMP134*. Molecular Microbiology. 83 (1): 432-439.
- Karlen, Y., et al. (2007). *Statistical significance of quantitative PCR*. BMC Bioinformatics. 8 (1): 131-147
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: KEGG genes. (2019). Recuperado de [https://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?aci:ACIAD1429](https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?aci:ACIAD1429) el 9 de diciembre del 2019.
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: KEGG genes. (2019). Recuperado de [https://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?aci:ACIAD1879](https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?aci:ACIAD1879) el 9 de diciembre del 2019.
- Liu, Z. (2006). *Genomic adaptation of ethanologenic yeast to biomass conversion inhibitors*. Applied Microbiology and Biotechnology. 73: 27 – 36.
- Liu, Z. et al. (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 Microbial and Cell Physiology. 81: 743 – 753.
- Majumdar, K., and Chattopadhyay, S. (2011). *Heterocycles in Natural Products Synthesis*. Kalyani, India. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Páginas: 99-106.

- Miller, E. et al. (2010). *Genetic changes that increase 5-hydroxymethyl furfural resistance in ethanol-producing Escherichia coli LY180*. *Biotechnology Letters*. 32(5): 661-667.
- Mills, T., Sandoval, N. and Gill, R. (2009). *Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in Escherichia coli*. *Biotechnology for Biofuels*. 2:26.
- Modig, T., et al. (2002). *Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase*. *Biochemical Journal*. 363: 769-776.
- Monlau, F., et al. (2014). *Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review*. *Biotechnology Advances*. 32(5): 934-951.
- Nelson, D. & Cox, M. (2006). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Cuarta edición. Omega. Barcelona. Páginas: 63 y 64.
- Palmqvist, E. and Hahn, B. (2000). *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification*. *Bioresource Technology*. 74 (2000): 17 – 24.
- Palmqvist, E. and Hahn, B. (2000). *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition*. *Bioresource Technology*. 74 (2000): 25 – 33.
- Pauly, T. et al. (2003). *X-ray crystallographic and kinetic studies of human sorbitol dehydrogenase*. *Structure*. 11(9): 1071-1085.
- Preston, J. et al. (2002). *Reduction of furfural to furfuryl alcohol by ethanologenic strains of bacteria and its effect on ethanol production from xylose*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 98(100): 327-340.

- Preston, J. et al. (2006). *Purification and characterization of a furfural reductase (FFR) from Escherichia coli strain LY01 – An enzyme important in the detoxification of furfural during ethanol production*. Journal of Biotechnology. 121: 154 – 164.
- Quiroz, L. (2019). *Comparación fisiológica y transcripcional del catabolismo de acetato entre Escherichia coli JM101 y Acinetobacter schindleri ACE*. Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería. Universidad Autónoma Metropolitana. Ciudad de México, México.
- Rao, X., et al. (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.
- Rocha, D., Santos, C. and Pacheco, L. (2015). *Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis*. Antonie Van Leeuwenhoek. 108: 685 – 693.
- Roe, A. et al. (1998). *Perturbation of anion balance during inhibition of growth of Escherichia coli by weak acids*. American Society for Microbiology: Journal of Bacteriology. 180(4): 767-772.
- Roe, A. et al. (2002). *Inhibition of Escherichia coli growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity*. Microbiology. 148(7): 2215-2222
- Rubach, J. and Plapp, B. (2003). *Amino acid residues in the nicotinamide binding site contribute to catalysis by horse liver alcohol dehydrogenase*. Biochemistry. 42(10): 2907-2915.



- Sanghani, P., et al. (2000). *Kinetic Mechanism of Human Glutathione-Dependent Formaldehyde Dehydrogenase*. *Biochemistry*. 39(35): 10720-10729.
- Sigala, J.C., et al. (2017). *Genomic and physiological characterization of a laboratory-isolated Acinetobacter schindleri ACE strain that quickly and efficiently catabolizes acetate*. *Microbiology*. 163: 1052 – 1064.
- Sigala, J.C., et al. (2019). *Physiological and transcriptional comparison of acetate catabolism between Acinetobacter schindleri ACE and Escherichia coli JM101*. *FEMS Microbiology letters*. 366 (12).
- Soto, J. and López, C. (2012). *RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno*. *Fitosanidad* 16(2): 101-113.
- Sun, H. and Plapp, B. (1992). *Progressive sequence alignment and molecular evolution of the Zn-containing alcohol dehydrogenase family*. *Journal of Molecular Evolution*. 34: 522-535.
- Taylor S., et al. (2010). *A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines*. *Methods*.50(4)
- Thorn, J. et al. (1995). *Crystal structure of Escherichia coli QOR quinone oxidoreductase complexed with NADPH*. *Journal of Molecular Biology*. 249(4): 785-799.
- Tsuge, Y. et al. (2015). *FudC, a protein primarily responsible for furfural detoxification in Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100: 2685 – 2692.

- Turner, P. et al. (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: 432 – 439.
- Wang, X., et. al. (2012). *Increased furan tolerance in Escherichia coli due to a cryptic ucpA Gene*. Applied and Environmental Microbiology. 78(7): 2452 – 2455.
- Windholz, M., et. al. (1976). The Merck Index. New Jersey, USA. Merck & Co., Inc.
- Xiao, H., Zhao H. (2014). *Genome-wide RNAi screen reveals the E3 SUMO-protein ligase gene SIZ1 as a novel determinant of furfural tolerance in Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology for Biofuels. 7:78.
- Zaldivar, J. & Ingram, L. (1999). *Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic Escheichia coli LY01*. Biotechcnology and bioengineering. 66(4): 203-210.
- Zheng, H., et. al. (2013). *Improving Escherichia coli FucO for Furfural Tolerance by Saturation Mutagenesis of Individual Amino Acid Positions*. Applied and Environmental Microbiology. 79 (10): 3202–3208.

## Capítulo VIII. Apéndices.

### Apéndice A. Purificación del difurfuril éter.

La cromatografía en columna se realizó para la purificación del compuesto de interés (figura 38).



Figura 38. Cromatografía en columna mostrando los tipos de compuestos obtenidos de la síntesis orgánica del difurfuril éter.

Cada uno de estos compuestos fue eluído con las mezclas hexano: acetato de etilo (10:0, 9:1, 8:2, 0:10) y metanol puro al final. De estas eluciones se sabe que el compuesto de interés eluye con una mezcla de hexano:acetato de etilo (8:2) (figura 39).

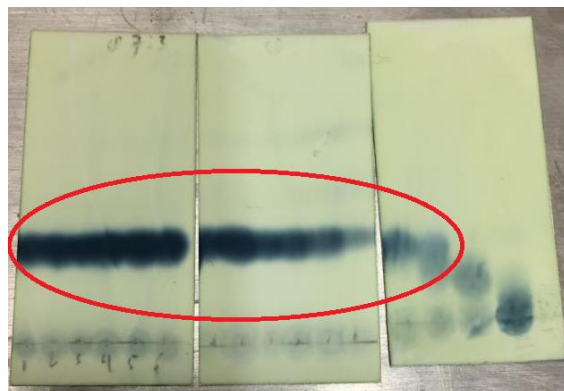


Figura 39. Cromatografía en capa fina de las eluciones provenientes de la cromatografía en columna. Productos de elución.

Se puede observar dentro del círculo rojo el producto de interés (figura 39); éste fue eluído principalmente con una mezcla de hexano:acetato de etilo (8:2) y corresponde a la siguiente fracción central dentro de la cromatografía en columna (figura 40).



Figura 40. Cromatografía en columna mostrando la fracción que contiene al compuesto de interés difurfuril éter.

#### Apéndice B. Genes y oligonucleótidos considerados para el estudio de RT-qPCR.

Tabla 33. Genes considerados en el estudio de RT-qPCR para la cepa *A. baylyi* ADP1.

Alcohol deshidrogenasas		
ORF	Gen	Descripción
ACIAD1429	<i>areB</i>	aril alcohol deshidrogenasa
ACIAD1578	-	ail alcohol deshidrogenasa putativa (bencil alcohol deshidrogenasa)
ACIAD1879	<i>frmA</i>	Alcohol deshidrogenasa clase 3
ACIAD1950	-	Alcohol deshidrogenasa putativa con hierro
ACIAD2015	-	Alcohol deshidrogenasa putativa
ACIAD2929	-	Alcohol deshidrogenasa putativa
ACIAD3339	<i>adhA</i>	Alcohol deshidrogenasa
ACIAD3612	-	Alcohol deshidrogenasa putativa

<b>Transhidrogenasas</b>		
ORF	Gen	Descripción
ACIAD2274	<i>sthA</i>	Piridina nucleotida transhidrogenasa, (NAD(P)(+)transhidrogenasa [B-específica])
ACIAD3078	<i>pntB</i>	Piridina nucleotida transhidrogenasa, subunidad beta
ACIAD3079	<i>pntA-2</i>	Piridina nucleotida transhidrogenasa (bomba protón), alfa
ACIAD3080	<i>pntA-1</i>	Piridina nucleotida transhidrogenasa (bomba protón), alfa
<b>Aldehído deshidrogenasas</b>		
ORF	Gen	Descripción
ACIAD0503	<i>calB</i>	Coniferil aldehído deshidrogenasa
ACIAD0998	-	Aldehído deshidrogenasa putativa
ACIAD1430	<i>areC</i>	benzaldehído deshidrogenasa II
ACIAD1577	-	Aldehído deshidrogenasa putativa
ACIAD1725	<i>hcaB</i>	Hidroxibenzaldehído deshidrogenasa
ACIAD1879	<i>frmA</i>	Alcohol deshidrogenasa clase 3
ACIAD2018	<i>acoD</i>	Acetaldehído deshidrogenasa 2
ACIAD2542	-	Aldehído deshidrogenasa putativa
ACIAD3616	<i>alrA</i>	Aldehído reductasa
ACIAD3642	-	Aldehído deshidrogenasa putativa
<b>Deshidrogenasas</b>		
ORF	Gen	Descripción
ACIAD0663	<i>hisD</i>	Histidinol deshidrogenasa
ACIAD1187	<i>idh</i>	Isocitrato deshidrogenasa
ACIAD1190	<i>icd</i>	Isocitrato deshidrogenasa
ACIAD2287	-	Proteína bifuncional putativa
<b>Reductasas</b>		
ORF	Gen	Descripción

ACIAD1454	-	Oxidoreductasa dependiente de Zn putativa
ACIAD0166	<i>sfcA</i>	Malato deshidrogenasa unida a NAD

Tabla 34. Secuencia de oligonucleótidos empleados en el estudio de RT-qPCR de la cepa *A. baylyi* ADP1

<b>Alcohol deshidrogenasas</b>		
ORF	Oligonucleótido	Secuencia
ACIAD1429	OF	TACGCCATCAGCCGTGAAAA
	OR	GCACCTGCACCAGTTTGTATG
ACIAD1578	OF	GGTGATGCGTTCCTGGCTT
	OR	ACTGTTGAATGACGGCTCCC
ACIAD1879	OF	GCGTTCGGCATTAGAGTGTG
	OR	CGAGCTGAAAAGGTCGAGTTG
ACIAD1950	OF	GTCTCACCTCAGCTTTATGCC
	OR	ACCATCGCATCAATACCCGT
ACIAD2015	OF	TGGCGATTGTAGATTGGCGT
	OR	ATCCATACCAGTCGCAGCAG
ACIAD2929	OF	GGCGGAGATGACCTGCTAAA
	OR	GCTTCAGAGCCTGTACCAGA
ACIAD3339	OF	AGGTGTAGGTGAGGTGGTCG
	OR	CACAATGACCACATGCCGAA
ACIAD3612	OF	GGGCTGTGAAATTACTGCGT
	OR	TTTCGGCATCATCACGGCTA
<b>Transhidrogenasas</b>		
ORF	Oligonucleótido	Secuencia
ACIAD2274	OF	GTGGTGTAACGGACGCTCAG
	OR	GGTATTTCTCGTTGACCGCC
ACIAD3078	OF	TCTCGACGGGCAATATGACG
	OR	TACTGGCATATCACCGCCAC
ACIAD3079	OF	ACGCCGCTTATGGCAGTG
	OR	ACGCTACCTTCCACACCAAT
ACIAD3080	OF	CGTCCAACGGCTAAAGAGCA
	OR	TTTTTGGCAGCTTCATCGGC
<b>Aldehído deshidrogenasas</b>		
ORF	Oligonucleótido	Secuencia
ACIAD0503	OF	CCCCTTGGAATATCCGCTAC
	OR	ATGTGCTGATGCGCTGAAA
ACIAD0998	OF	GCGGCATGTGAAACAATGAAC
	OR	GTAATCGCAGCAACCACACC
ACIAD1430	OF	GGCTGGCTTACCAAAGGGAT
	OR	CCGTAAACTGAATGCTGGCAA

ACIAD1577	OF OR	CATGCGTATAGCCGTCGTCA GCTAGTGCAGGCGCAATTTT
ACIAD1725	OF OR	TGATGTACCGGGCAATCTGG GTGCTCGGGTTGGCAAATA
ACIAD1879	OF OR	GCGTTCGGCATTAGAGTGTG CGAGCTGAAAAGGTCGAGTTG
ACIAD2018	OF OR	GGTGAAGTATGTACCTGCCCT CCCGTCTTGATGCGTTTGAC
ACIAD2542	OF OR	AGCCAGATATGCAGGCATGG GCCAACTTTAACCGCAGACA
ACIAD3616	OF OR	TCAGAGCATCAGGCATCGAC CTGATGAGATGTTGCGTTTGG
ACIAD3642	OF OR	GTAACGCTTGAGCTTGCGG TGTCATAGCCGCCAGTTATC
<b>Deshidrogenasas</b>		
ORF	Oligonucleótido	Secuencia
ACIAD0663	OF OR	GACGCTATACACCAGAAGCGA ATACACCCCAAGAGGCGATG
ACIAD1187	OF OR	GTGTCAGGTGAAAGACGCAC GGTACGGGTCAAGCCAGAAA
ACIAD1190	OF OR	CCAGTGGGTGGAGGTATTCG CTTGGTACACCTTCAAACCAGC
ACIAD2287	OF OR	ATCAGCCTCCTTTGGTCGTG CAGAATCCATCGCTGCCTGA
<b>Reductasas</b>		
ORF	Oligonucleótido	Secuencia
ACIAD1454	OF OR	AGGCGATGAAGTCTGGTATGC GGCGTTTCGGTTTATGCC
ACIAD0166	OF OR	TTGGGTCTAGGCGATCAGGG GGCAATGTATAGGCAGGGCT

### **Apéndice C.** Determinación cualitativa de furfural.

El furfural, también llamado “2-Furaldehído” o “Furan-2-carboxaldehído”, es un aldehído aromático derivado del procesamiento de varios productos de la industria agrícola como lo son: el maíz, la caña de azúcar, el trigo, la avena, entre otros.

Su obtención es mediante la deshidratación en medio ácido de los azúcares pentosas contenidos en la biomasa vegetal. Algunos de sus usos recaen en la fabricación de plásticos, base química para herbicidas, fungicidas e insecticidas y aromatizante en la industria de alimentos.

La Norma Oficial Mexicana “NOM-142-SSA1-1995. Bienes y Servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial” tiene por objeto establecer las especificaciones sanitarias y disposiciones de etiquetado sanitario y comercial de las bebidas alcohólicas que se comercialicen en el territorio nacional. Dicha NOM concentra otras Normas Mexicanas de Método para la determinación de diversos analitos contenidos en las bebidas alcohólicas.

#### Antecedentes.

La Norma Mexicana “NMX-V-004-NORMEX-2013” establece los métodos de ensayo para la determinación de furfural en las bebidas alcohólicas que se comercializan en los Estados Unidos Mexicanos, así como en las materias primas empleadas en su elaboración.

El protocolo que se presenta a continuación se basa en la determinación colorimétrica del compuesto colorido que se forma al hacer reaccionar el furfural



que contenga la bebida alcohólica con anilina, en presencia de ácido después de un tiempo de 20 min a 20°C. En nuestro caso, la bebida alcohólica será sustituida por medio mineral M9 adicionado con furfural.

La intensidad de la coloración rojo-cereza que se produce es proporcional a la concentración de furfural presente en la muestra. La intensidad de color producida en la muestra se mide en el espectro visible a 520 nm (determinación de absorbancia).

#### Reactivos.

- Furfural con una densidad de 1.1594 g/mL.
- Anilina.
- Ácido acético glacial o ácido clorhídrico concentrado.
- Alcohol etílico 95%, libre de furfural.
- Alcohol etílico 50%, libre de furfural.
- Agua destilada.

#### Procedimiento.

1. Se toman  $1 \times 10^{-3}$  g de furfural (0.86  $\mu$ L) y se aforan a 1 mL con medio mineral M9. Ésta es la solución patrón de furfural a 1 g/L.
2. Se preparan una serie de diluciones de 100  $\mu$ L cada una a partir de la solución patrón de furfural que contengan 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 [g/L] de furfural. Se llevan al volumen con medio mineral M9.

3. Se adiciona 2  $\mu\text{L}$  de anilina a cada una de las diluciones y 1  $\mu\text{L}$  de HCl concentrado, se homogenizan en agitación tipo vórtex y se deja reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos, al término de los cuales, se lee la absorbancia espectrofotométricamente a 520 nm, previamente ajustar el cero del equipo con el blanco (dilución cero).
4. Se grafican las absorbancias de cada dilución contra la concentración (g/L) de furfural, se obtiene su correlación lineal, la cual, debe ser  $>0.97$ . Esta es nuestra curva patrón.
5. Para la muestra problema, se toman 100  $\mu\text{L}$  y se le añaden 2  $\mu\text{L}$  de anilina y 1  $\mu\text{L}$  de HCl concentrado, se homogeniza con agitación tipo vórtex y se deja reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos, al término de los cuales, se lee la absorbancia espectrofotométricamente a 520 nm.
6. El resultado se interpola dentro de la curva patrón y se obtiene la concentración en [g/L] de la muestra problema.

**Apéndice D.** Productos de PCR de los genes de estudio en *A. baylyi* ADP1.

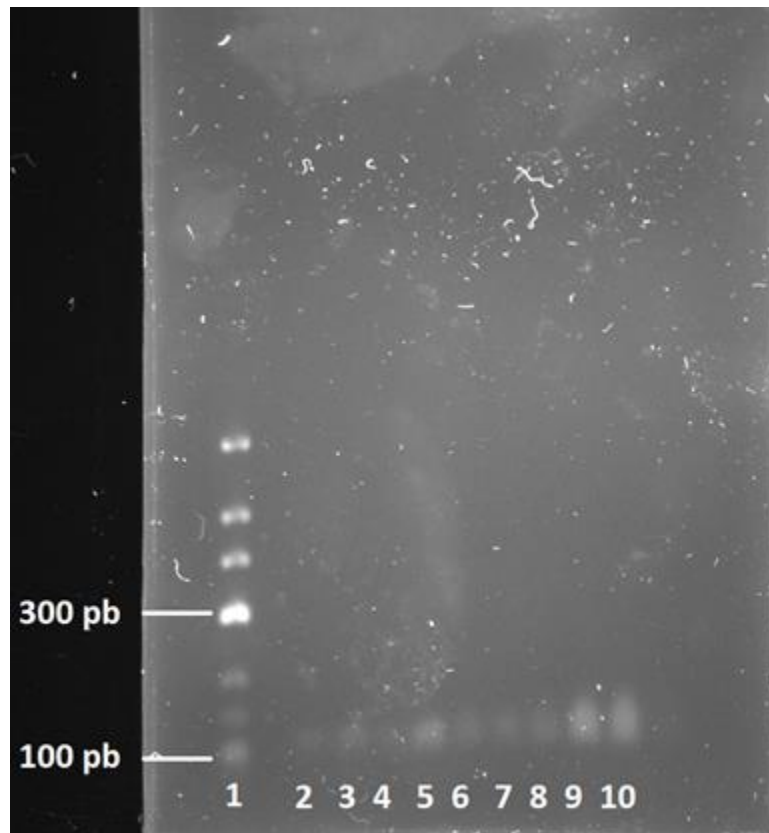


Figura 41. Electroforésis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE 0.5X de productos de amplificación de la PCR punto final (I). Carriles, 1: marcador de peso molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder, 2: gen *ACIAD1950*, 3: gen *ACIAD1578*, 4: gen *areB*, 5: gen *frmA*, 6: gen *ACIAD2929*, 7: gen *ACIAD2015*, 8: gen *idh*, 9: *hisD*, 10: gen *adk*.

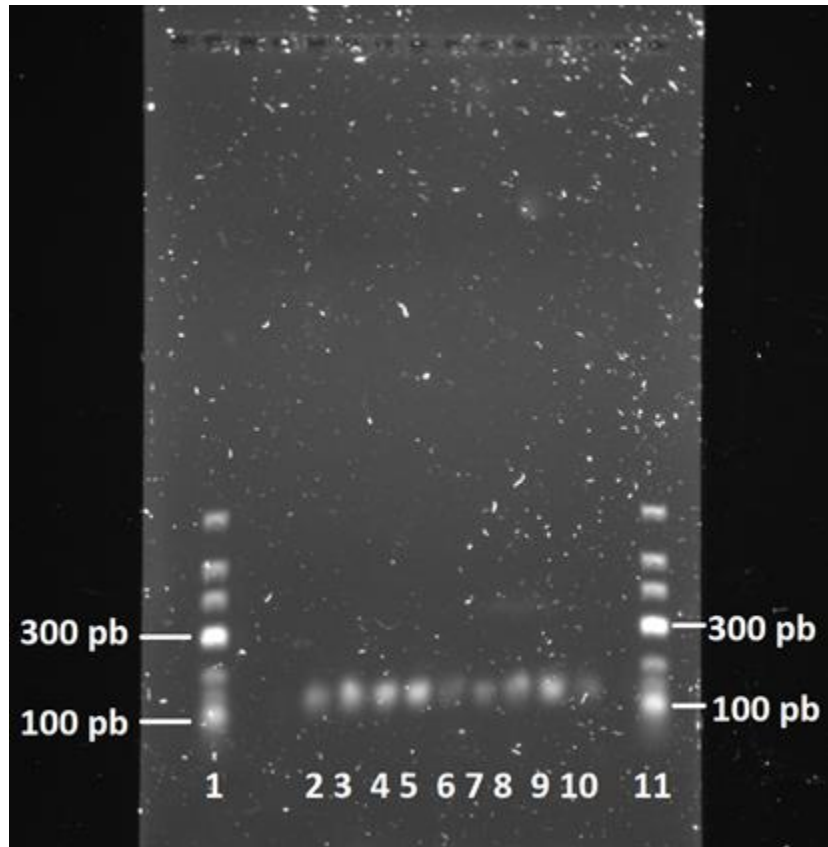


Figura 42. Electroforésis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE 0.5X de productos de amplificación de la PCR punto final (II). Carriles, 1 y 11: marcador de peso molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder, 2: gen *rpoC*, 3: gen *rpoB*, 4: gen *gyrA*, 5: gen *ftsZ*, 6: gen *secA*, 7: gen *dnaG*, 8: gen *gyrB*, 9: gen *adhA*, 10: gen *ACIAD3612*.

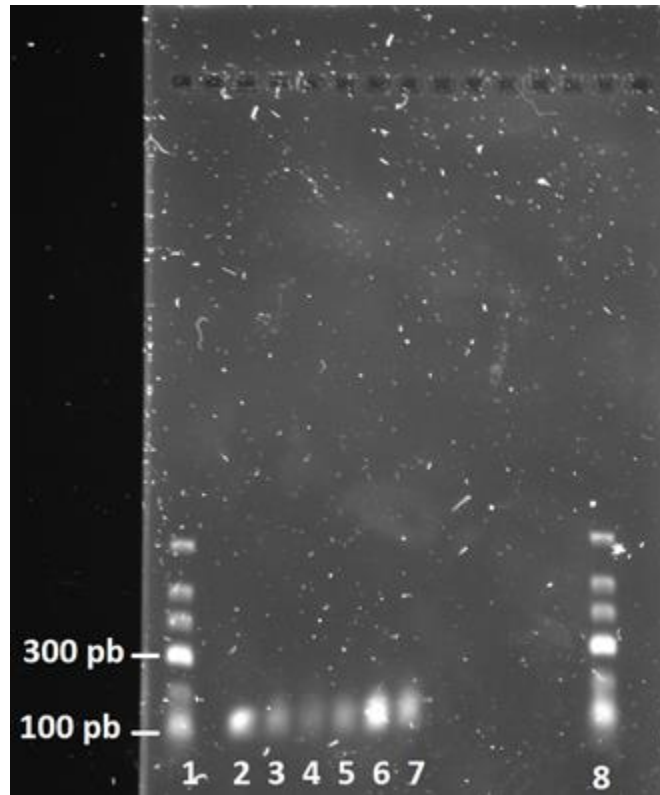


Figura 43. Electroforésis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE 0.5X de productos de amplificación de la PCR punto final (III). Carriles, 1 y 8: marcador de peso molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder, 2: gen *ACIAD1454*, 3: gen *icd*, 4: gen *ACIAD2287*, 5: gen *ACIAD0166*, 6: gen *pntB*, 7: gen *sthA*.

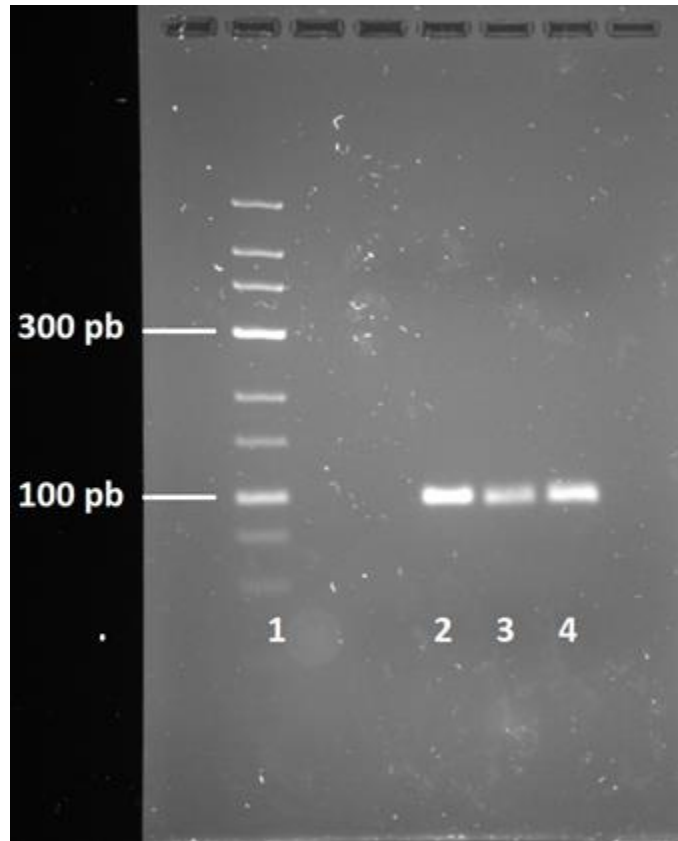


Figura 44. Electroforésis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE 0.5X de productos de amplificación de la PCR punto final (IV). Carriles, 1: marcador de peso molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder, 2: gen *pntA-2*, 3: gen *pntA-1*, 4: gen *calB*.

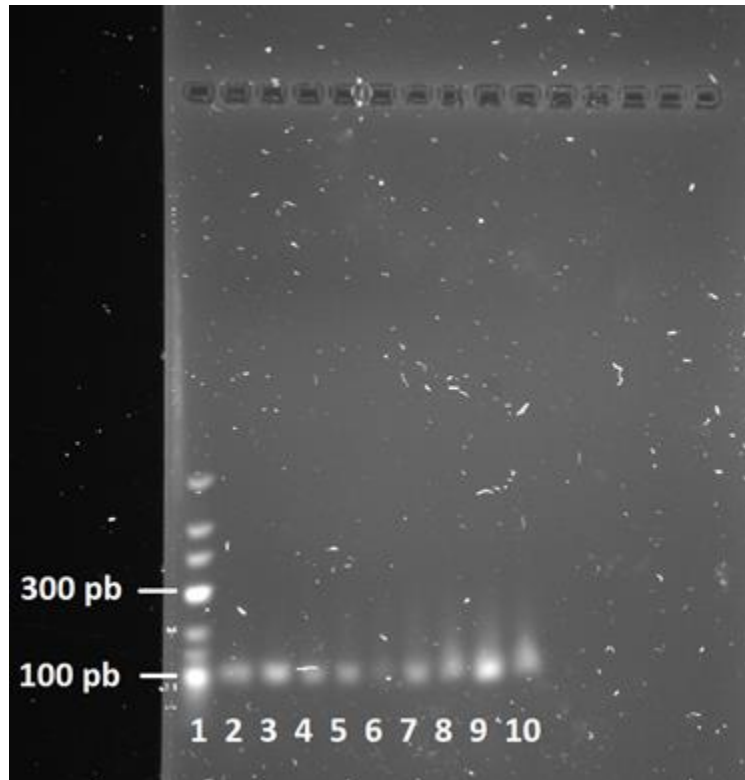


Figura 45. Electroforésis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE 0.5X de productos de amplificación de la PCR punto final (V). Carriles, 1: marcador de peso molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder, 2: gen *frmA*, 3: gen *acoD*, 4: gen *hcaB*, 5: gen *ACIAD0998*, 6: gen *alrA*, 7: gen *ACIAD2542*, 8: gen *ACIAD1577*, 9: gen *areC*, 10: gen *ACIAD3642*.

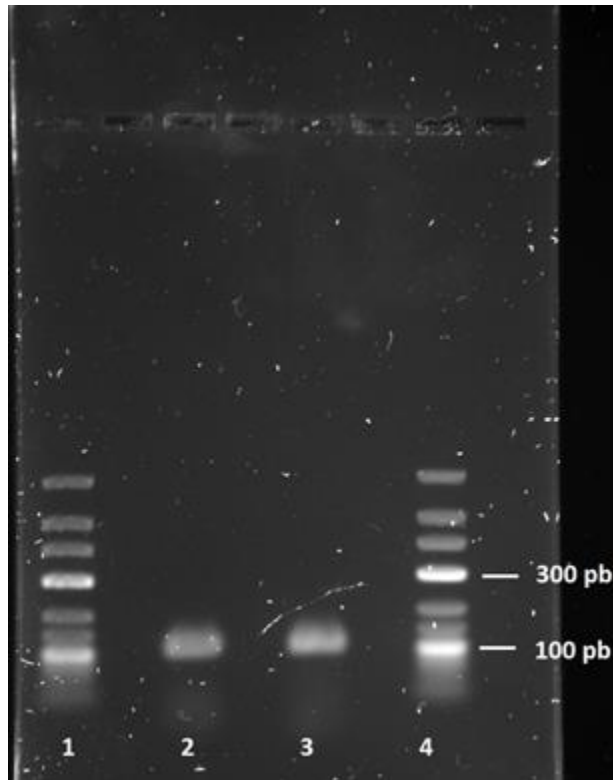


Figura 46. Electroforésis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE 0.5X de productos de amplificación de la PCR punto final (VI). Carriles, 1 y 4: marcador de peso molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder, 2: gen *gmk*, 3: gen *recA*.