

ROMPIENDO EL PARADIGMA TAXONÓMICO-METABÓLICO DE LA BIOSÍNTESIS DE PIOCIANINA, MOLÉCULA DE ALTO VALOR INDUSTRIAL

Paulina M. Mejía-Ponce*, Mario A. Torres-Acosta, Jesús Hernández-Pérez, Héctor Castañeda-Aponte, José M. Aguilar-Yáñez y Cuauhtémoc Licona-Cassani

Centro de Biotecnología FEMSA, Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey. Monterrey, Nuevo León, C.P. 64849

*paumayell@gmail.com

Pluralibacter, piocianina, minería genómica

Introducción. La piocianina es un metabolito perteneciente al grupo de las fenazinas que, por su composición química, tiene la capacidad de oxidar y reducir una gran variedad de moléculas (Fig.1). La piocianina es reconocida por ser el compuesto responsable del pigmento verde-azul característico de *Pseudomonas*, lo cual facilita ampliamente su detección. La importancia biotecnológica de esta molécula radica en su actividad antifúngica y antibacteriana, así como agente activo para el biocontrol de enfermedades en plantas y la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos [1, 2]. Reportes históricos han sugerido que la piocianina es un metabolito exclusivo del género *Pseudomonas*, cuya biosíntesis está codificada en dos operones distantes en el genoma conformados por siete genes que sintetizan la base fenazínica (*phzABCDEFGHI*) y tres genes que la convierten en piocianina (*phzM*, *phzS* y *phzH*) [3]. En este trabajo se presenta la caracterización química del pigmento piocianina, la cual tiene un alto valor en la industria de la biorremediación, así como su predicción biosintética en un aislado ambiental.

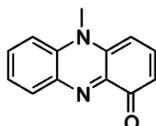


Fig. 1 Estructura química de la piocianina (C₁₃H₁₀N₂O)

Metodología. *Sitio de aislamiento:* La cepa ambiental proviene de un suelo contaminado con hidrocarburos en Nuevo León, México. *Análisis genómico:* El DNA genómico se obtuvo mediante la extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y posterior purificación con el DNA Clean and Concentrator Kit (Zymo Research). El genoma fue secuenciado con la tecnología NovaSeq de Illumina (Macrogen, Seúl, Rep. de Corea). El análisis de calidad, ensamblado y anotación del genoma se realizó con FastQC, PATRIC y RAST, respectivamente. Para la identificación de genes biosintéticos de productos naturales, incluyendo los genes relacionados a la piocianina, se utilizaron las herramientas antiSMASH y ClusterFinder. *Identificación y caracterización de la piocianina:* La producción de piocianina se realizó usando Medio Nutritivo (Peptona 5g/L; Extracto de carne 3g/L; NaCl 8g/L) en incubación a 37°C, por 18-20h y 200rpm. Posterior a la fermentación, el cultivo fue filtrado a 0.22µm para eliminar la biomasa celular. Sobre el producto filtrado, se realizó la extracción de piocianina agregando cloroformo en una proporción de 1:0.6 y recuperando la fase orgánica, a la cual posteriormente se añadió HCl 0.2N en proporción 1:0.5 para transferir la piocianina contenida hacia la fase acuosa. La piocianina purificada en HCl 0.2N se usó para

los posteriores análisis de absorbancia, HPLC-MS y NMR. Las especificaciones de la corrida en HPLC-MS para la muestra obtenida y el estándar de piocianina (Pyocyanine from *Pseudomonas*, ≥98% (HPLC), SIGMA-ALDRICH®) fueron: 10µL de muestra; columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 250mm, 5µm), Agilent Technologies; Fase A: Agua:TFA (99.99:0.01), Fase B ACN:TFA (99.99:0.01); 1mL/min, λ= 368.

Resultados. En el presente estudio se logró obtener el genoma completo de una cepa ambiental aislada de un derrame petrolero, la cual fue identificada como *Pluralibacter* sp. *Pluralibacter* sp. fue cultivada en Medio Nutritivo, obteniendo una fermentación color verde-azul característico de la piocianina. Posterior a la purificación de este pigmento, se realizaron análisis cromatográficos y de resonancia magnética cuyos resultados demostraron que la molécula purificada era piocianina, ya que al comparar los datos obtenidos de la muestra contra el estándar y referencias previas [4], coincidían en gran medida. El rendimiento de producción de piocianina obtenido fue de 5mg/L (±0.5mg). Estos resultados atrajeron gran atención debido a que se demuestra que *Pseudomonas* no es el único género bacteriano productor de piocianina. Al realizar la minería genómica, encontramos que el operón *phzABCDEFGHI*, *phzM*, *phzS* y *phzH* no estaba presente en *Pluralibacter* sp., lo cual sugiere que probablemente exista una manera distinta de sintetizar piocianina. Las hipótesis biosintéticas están siendo comprobadas con mutantes simples utilizando técnicas tradicionales de biología molecular y análisis metabólicos.

Conclusiones. Este estudio demuestra que nuestra cepa ambiental pertenece al género *Pluralibacter* sp. y tiene la capacidad de producir piocianina en condiciones estándar de laboratorio. El análisis genómico señala que *Pluralibacter* sp. no conserva la misma ruta de biosíntesis conocida en *Pseudomonas*, sugiriendo la existencia de una ruta alternativa para la producción de piocianina. Estos descubrimientos servirán de base para futuras aplicaciones biotecnológicas, principalmente en la industria de la biorremediación.

Agradecimientos. A la Fundación FEMSA y a StrainBiotech por los recursos asignados al presente proyecto.

Bibliografía

- [1] Jayaseelan S, Ramaswamy D & Dharmaraj S. (2014) *World J Microbiol Biotechnol.* 30(4):1159-68.
- [2] Das P & Ma LZ. (2013) *Int Biodeterior Biodegradation.* 85:278-83.
- [3] Mavrodi DV et al. (2001) *J Bacteriol.* 183(21):6454-65.
- [4] Watson D et al. (1986) *Eur J Biochem.* 59(2):309-13.

