



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

Biosíntesis de 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina
(L-DOPA) en *Escherichia coli* a partir de glucosa

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

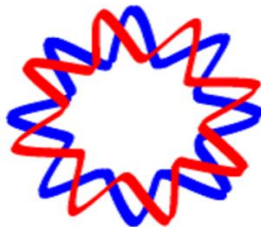
P R E S E N T A :

BIOL. ANA JOYCE MUÑOZ ARELLANO

TUTOR

DR. GUILLERMO GOSSET LAGARDA

2010



INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGÍA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Guillermo Gosset Lagarda en el departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

JURADO ASIGNADO

Presidente *Dr. Mario Rocha Sosa*

Secretario *Dr. Lorenzo Segovia Forcella*

Vocal *Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos*

Suplente *Dr. Daniel Genaro Segura González*

Suplente *Dr. Joel Osuna Quintero*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

Al Dr. Guillermo Gosset por su asesoría, apoyo y confianza en la realización de este trabajo.

A los Dres. Octavio Tonatiuh Ramírez y Mario Soberón Chávez, por formar parte de mi comité tutorial y enriquecer el proyecto y mi formación profesional con sus críticas, siempre constructivas.

Al Dr. Adelfo Escalante por su apoyo, cariño y amistad.

A la M. en C. Georgina Hernández por su paciencia y apoyo técnico.

A Mercedes Enzaldo por su cariño y dedicación.

Y a cada uno de los amigos y compañeros del grupo Bolívar-Gosset que fueron parte fundamental en mi formación y crecimiento personal y profesional.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico:

A DIOS. Por amarme y llenarme de bendiciones.

A mi mamá: Anabell Arellano, por todo su amor y entrega; por ser una inspiración y un claro ejemplo de esfuerzo, constancia, alegría y amor.

A mi papá: Fidel Muñoz, por su paciencia y amor; por enseñarme que el orden y la disciplina son fundamentales para lograr mis objetivos.

A mis hermanos Uriel e Ittamar, por todo su amor, alegría y honestidad.

A mi Eugenio, por todo su amor y apoyo incondicional; por su compañía y paciencia; por compartir conmigo su esencia y hacer de mí una mejor persona.

A mis Tíos Pablito y Bety, por abrirme las puertas de su hogar y hacerme parte de su familia. Por todo el cariño, alegría y apoyo. Siempre los recordaré y llevaré en mi corazón.

A mi abuelo Francisco, por su cariño, sus consejos y todas sus enseñanzas; por ser un claro ejemplo de lucha, valentía y fe. Confío en que algún día nos volveremos a encontrar.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
NOMENCLATURA	ix
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	
III.I Producción de L-Tyr en <i>E. coli</i>	6
III.II Papel de la proteína reguladora TyrR en la vía del SHIK	7
III.II.I Activación de la expresión de genes por TyrR	8
III.II.II Represión mediada por TyrR	8
III.III Síntesis de 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) a partir de L-Tyr	10
III.IV Producción biológica de L-DOPA	11
III.IV.I Tirosinasa	12
III.IV.II Tirosina Fenol Liasa (TPL)	13
III.IV.III 4-hidroxifenilacetado 3-hidroxilasa	14
IV. JUSTIFICACIÓN	16
V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
V.I HIPÓTESIS	17
V.II OBJETIVOS	17
V.II.I Objetivo general	17
V.II.II Objetivos particulares	17
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	
VII.1 Cepas y Plásmidos	18
VII.1.1 Plásmidos	18

VI.I.II Cepas	19
VI.II Medios de cultivo y antibióticos	20
VI.II.I Medios de cultivo	20
VI.II.II Antibióticos	21
VI.III Método de transferencia genética	21
VI.III.I Transformación bacteriana	21
VI.IV Método de mutagénesis bacteriana	22
VI.IV.I Inactivación de genes cromosomales usando productos de PCR	22
VI.IV.I.I Generación del fragmento de PCR	22
VI.IV.I.II Preparación de células competentes	22
VI.IV.I.III Eliminación de la resistencia al antibiótico	23
VI.V Técnicas de análisis de ácidos nucleicos	24
VI.V.I Extracción de DNA	24
VI.V.I.I Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina	24
VI.V.I.II Extracción de DNA plasmídico por kit comercial	24
VI.V.I.III Extracción de DNA cromosomal	24
VI.V.II Uso de enzimas de restricción y ligasa	24
VI.V.III Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	25
VI.V.IV Electroforesis de DNA	25
VI.V.V Aislamiento de DNA digerido a partir de geles de agarosa	25
VI.VI Construcción del plásmido pTrchpaBC	26
VI.VII Construcción del plásmido pTrchpaBCTrctyrCpheA _{CM}	27
VI.VIII Condiciones de cultivo	28
VI.VIII.I Cultivos para comprobar la expresión del operón <i>hpaBC</i> clonado en pTrchpaBC en la producción de L-DOPA	28

VI.VIII.II Cultivos para la producción de L-Tyr o L-DOPA	28
VI.VIII.II.I Cultivo para la producción de L-Tyr	28
VI.VIII.II.II Cultivo para la producción de L-DOPA	29
VI.IX Métodos Analíticos	30
VI.IX.I Determinación de biomasa	30
VI.IX.II Cuantificación de los metabolitos excretados mediante HPLC.....	30
VI.IX.III Determinación de glucosa, ácidos orgánicos e intermediarios de la vía de aromáticos	30
VI.IX.IV Determinación de aminoácidos aromáticos	31
VI.X Cálculo de parámetros cinéticos	31
VII. RESULTADOS	
VII.I Generación de las cepas productoras de L-Tyr	32
VII.I.I Inactivación cromosomal del gen <i>tyrR</i>	32
VII.I.II Expresión de una transcetolasa y una versión insensible a inhibición de la DAHPS y de la CM/PDH (<i>tktA</i> , <i>aroG^{fb}</i> , <i>tyrCpheA_{CM}</i>)	34
VII.II Caracterización de las cepas productoras de L-Tyr	34
VII.III Construcción del plásmido pTrchpaBC	39
VII.III.I Cultivos para comprobar la expresión del operón <i>hpaBC</i> , clonado en pTrchpaBC, con la producción de L-DOPA	40
VII.IV Generación de las cepas productoras de L-DOPA	42
VII.IV.I Construcción del plásmido pTrchpaBCTrctyrCpheA _{CM}	42
VII.IV.II Expresión del operón <i>hpaBC</i> (4-HPA 3-hidroxilasa) en las cepas productoras de L-Tyr	43
VII.V Caracterización de las cepas productoras de L-DOPA	43
VIII. DISCUSIÓN	48
IX. CONCLUSIONES	55

X. PERSPECTIVAS	57
XI. APÉNDICE	58
XII. REFERENCIAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía de síntesis de compuestos aromáticos	4
Figura 2. Transporte de glucosa por PTS y galactosa permeasa	5
Figura 3. Síntesis de L-DOPA a partir de L-Tyr	11
Figura 4. Formación de melanina a partir de L-Tyr	12
Figura 5. Uso del ácido ascórbico para prevenir la oxidación de L-DOPA	12
Figura 6. Producción de L-DOPA por la TPL	13
Figura 7. Reacciones acopladas catalizadas por HpaC y HpaB	14
Figura 8. Representación de los oligonucleótidos diseñados para comprobar la sustitución del gen <i>tyrR</i> por el casete de Cm.....	23
Figura 9. Representación del proceso de mutagénesis	24
Figura 10. Representación del plásmido construido pTrchpaBC	26
Figura 11. Plásmidos utilizados para obtener el vector e inserto en la construcción del plásmido pTrchpaBC <trctyrcphea<="" td=""> <td>27</td> </trctyrcphea>	27
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR al amplificar el casete de resistencia a Cm	32
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para verificar la inactivación del gen <i>tyrR</i>	33
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para verificar la eliminación del casete de resistencia a Cm	33
Figura 15. Velocidades específicas de crecimiento (μ) de las cepas con y sin plásmidos	35
Figura 16. Biomasa, consumo de glucosa, acumulación de ácido acético, y producción de L-Tyr determinados en los experimentos de los cultivos realizados en matraz	36
Figura 17A. Velocidad específica de consumo de glucosa (q_{Glc}) y productividad específica de L-Tyr (q_{L-Tyr}) de las cepas	37
Figura 17B. Rendimientos absolutos de L-Tyr a partir de Glucosa (Y_{L-Tyr}/Glc)	37

Figura 18A. Tasa específica de consumo de glucosa (q_{Glc}), Tasa específica de producción de L-Tyr (q_{L-Tyr}), tasa específica de producción de DHS (q_{DHS}) y tasa específica de producción de SHIK (q_{SHIK})	38
Figura 18B. Rendimientos absolutos de L-Tyr (Y_{L-Tyr}/Glc), DHS (Y_{DHS}/Glc) y SHIK (Y_{SHIK}/Glc) sintetizados a partir de glucosa	38
Figura 18C. Carbono recuperado en forma de intermediarios aromáticos (DHS y SHIK) y producto (L-Tyr), reportado en g/l	38
Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR del operón <i>hpaBC</i>	39
Figura 20. Foto de una caja de LB con la cepa XL1-Blue/pTrchpaBC después de 20 hrs de incubación	40
Figura 21A. Sitios de restricción para el corte con la enzima <i>EcoRV</i> en el plásmido pTrchpaBC	40
Figura 21B. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos al cortar el plásmido pTrchpaBC, de dos colonias candidatas, con la enzima <i>EcoRV</i>	40
Figura 22. Caja de LB/Cb ¹⁰⁰ utilizada para la selección de candidatas	41
Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos generados al linearizar el vector y obtener el inserto para la construcción del plásmido pTrchpaBCTrctyrCpheA _{CM}	42
Figura 24A. Sitios de restricción para el corte con las enzimas <i>BamHI</i> , <i>BglII</i> y <i>NcoI</i> en el Plásmido pTrchpaBCTrctyrCpheA _{CM}	43
Figura 24B. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos al cortar el plásmido pTrchpaBCTrctyrCpheA _{CM} , de cinco candidatas, con la enzima <i>BamHI</i>	43

Figura 24C. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos al cortar el plásmido $pTrchpaBCTrctyrCpheA_{CM}$, de la candidata 1, con la enzima <i>Bgl</i> III y <i>Nco</i> I	43
Figura 25. Consumo de glucosa, Acumulación de ácido acético y Producción de L-DOPA determinados en los experimentos de los cultivos realizados en matraz	45
Figura 26. Velocidad específica de consumo de glucosa (q_{Glc}); productividad específica de L-DOPA (q_{L-DOPA}) y Rendimiento absoluto de L-DOPA a partir de Glucosa (Y_{L-DOPA}/Glc) de las cepas W3110 Δ <i>tyrR</i> _DOPA y VH33 Δ <i>tyrR</i> _DOPA con y sin ácido ascórbico	46
Figura 27. Fotografía de los cultivos realizados para la producción de L-DOPA con y sin la adición de ácido ascórbico	47
Figura 28A. Carbono recuperado en forma de intermediarios aromáticos (DHS, SHIK y L-Tyr) y producto (L-DOPA), reportado en g/l	47
Figura 28B. Rendimientos absolutos de L-DOPA (Y_{L-DOPA}/Glc) y de compuestos aromáticos (Y_{arom}/Glc) sintetizados a partir de glucosa	47
Figura 29. Caja de LB con la cepa XL1-Blue/ <i>pTrchpaBC</i> y con una cepa productora de melanina	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Expresión de los promotores del regulón TyrR bajo distintas condiciones.....	8
Tabla 2. Plásmidos utilizados en la realización de éste trabajo	18
Tabla 3. Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas en este trabajo	19
Tabla 4. Parámetros cinéticos y de producción de L-Tyr de las cepas TIR	34
Tabla 5. Producción de L-DOPA a partir de L-Tyr. Prueba 1	41
Tabla 6. Producción de L-DOPA a partir de L-Tyr. Prueba 2	41
Tabla 7. Parámetros estequiométricos determinados de los cultivos de producción de L-DOPA	44

NOMENCLATURA

Generales

Simbolo	Definición
AA	Aminoácidos aromáticos
Ap	Ampicilina
ATP	Adenosín trifosfato
Cb	Carbamicina
Cm	Cloramfenicol
DO	Densidad Óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. herbicola</i>	<i>Erwinia herbicola</i>
fbr	Resistencia a inhibición por retroalimentación
FADH2	Flavina Adenín Dinucleótido
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
IVM	Ingeniería de Vías Metabólicas
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MM	Medio mínimo
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido
O ₂	Oxígeno
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PP	Vía de las pentosas fosfato
PTS	Sistema de fosfotransferasa
Tc	Tetraciclina
TCA	Ciclo de los acidos tricarbóxicos
<i>Z. mobilis</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>
Δ	Eliminación

Genes y Enzimas

Gen	Enzima
<i>aroE, ydiB</i>	Shikimato deshidrogenasa
<i>aroF, aroG, aroH</i>	DAHP sintasa
<i>aroL, aroK</i>	Shikimato kinasa
<i>aroP</i>	Transportador de aminoácidos aromáticos
<i>galP</i>	Galactosa permeasa (GalP)
<i>glk</i>	Glucokinasa (Glk)
<i>hpaBC</i>	4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilasa (4-HPA 3-hidroxilasa)
<i>mela</i>	Tirosinasa
<i>mtr</i>	Transportador de L-Trp
<i>pheA</i>	Corismato mutasa/prefenato deshidratasa (CM/PDT)
<i>ppc</i>	PEP carboxilasa (Ppc)
<i>pps</i>	PEP sintasa
<i>ptsI, ptsH, crr</i>	PTS
<i>pykA, pykF</i>	Piruvato cinasa
<i>tktA</i>	Transcetolasa
<i>tpl</i>	Tirosina Fenol Liasa (TPL)

<i>trpR</i>	Regulador de L-Trp
<i>tyrA</i>	Corismato mutasa/prefenato deshidrogenasa (CM/PDH)
<i>tyrB</i>	Transaminasa
<i>tyrC</i>	Ciclohexadienil deshidrogenasa (CDH)
<i>tyrP</i>	Transportador de L-Tyr
<i>tyrR</i>	Regulador de L-Tyr

Metabolitos

Metabolito	Nombre
CHA	Corismato
DAHP	3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato
DHS	3-dehidroshikimato
E4P	Eritrosa-4-fosfato
Glc	Glucosa
HPA	Hidroxifenilacetato
HPP	4-Hidroxifenilpiruvato
L-asc	L-ascórbico
L-DOPA	3,4-dihidroxi-L-fenilalanina
L-Phe	L-Fenilalanina
L-Tyr	L-Tirosina
L-Trp	L-Triptofano
OAA	Oxaloacetato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PPA	Prefenato
PYR	Piruvato
SHIK	Shikimato

Parámetros de cultivo

Símbolo	Definición	Unidades
DCW	Peso seco de células	gDW/l
μ	Velocidad específica de crecimiento	h^{-1}
q_{Glc}	Velocidad específica de consumo de glucosa	$g_{Glc}/g_{DW} \cdot h$
q_{L-DOPA}	Productividad específica de L-DOPA	$g_{L-DOPA}/g_{DW} \cdot h$
q_{L-Tyr}	Productividad específica de L-tirosina	$g_{L-Tyr}/g_{DW} \cdot h$
Y_{Arom}/Glc	Rendimiento g/g de aromáticos a partir de glucosa	g_{Arom}/g_{Glc}
Y_{Biom}/Glc	Rendimiento g/g de biomasa a partir de glucosa	g_{DW}/g_{Glc}
Y_{L-DOPA}/Glc	Rendimiento g/g de L-DOPA a partir de glucosa	g_{L-DOPA}/g_{Glc}
$Y_{L-DOPA}/L-Tyr$	Rendimiento g/g de L-DOPA a partir de L-Tyr	g_{L-DOPA}/g_{L-Tyr}
Y_{L-Tyr}/Glc	Rendimiento g/g de L-Tyr a partir de glucosa	g_{L-Tyr}/g_{Glc}

I. RESUMEN

La L-Tirosina (L-Tyr) es el aminoácido aromático que se utiliza principalmente como materia prima en la biosíntesis de 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA), un producto farmacéutico de alto valor comercial, empleado para tratar la enfermedad de Parkinson. En este trabajo se llevó a cabo la producción biotecnológica de L-DOPA a partir de glucosa, al generar una cepa cuyo flujo de carbono se dirige a la síntesis de L-Tyr y expresa la enzima 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilasa (4-HPA 3-hidroxilasa), una monooxigenasa de compuestos aromáticos. Aplicando diversas estrategias de ingeniería de vías metabólicas (IVM) fue posible eliminar los mecanismos de regulación alostérica y transcripcional que se ejercen sobre las enzimas clave de la vía común de síntesis de aminoácidos aromáticos (vía del SHIK) y en los genes que las codifican.

La sobreexpresión de las enzimas transcetolasa (gen *tktA*) y las versiones insensibles a inhibición alostérica de la enzima DAHP sintasa (gen *aroG^{fbr}*) y de la corismato mutasa/prefenato deshidrogenasa (CM/PDH, operón *tyrCpheA_{CM}*) en las cepas W3110 y VH33 (PTS⁻Glc⁺), permitió incrementar el flujo de carbono hacia la síntesis de L-Tyr. Estas cepas, denominadas W3110_TIR y VH33_TIR se evaluaron en 50 ml de medio M9 suplementado con 10g/l de glucosa. Las cepas presentaron una disminución importante en la velocidad de crecimiento, siendo más drástica en la cepa PTS⁻Glc⁺. La cepa W3110_TIR presentó un rendimiento de L-Tyr en glucosa (Y_{L-Tyr}/Glc) de 0.0314 g/g y una productividad (q_{L-Tyr}) de 0.012 g_{L-Tyr}/gDW*h, mientras que la cepa VH33_TIR presentó un Y_{L-Tyr}/Glc de 0.12 g/g y una q_{L-Tyr} de 0.033 g_{L-Tyr}/gDW*h, lo cual resulto en un incremento de 2.8 veces y 1.7 veces, respectivamente. La cepa VH33_TIR, cuyo flujo de carbono hacia la vía del SHIK fue mayor, presentó la acumulación de los intermediarios shikimato (SHIK) y 3-dehidroshikimato (DHS).

Para eliminar la regulación transcripcional ejercida sobre genes relevantes que participan en la vía del SHIK, se llevó a cabo la inactivación cromosomal del gen *tyrR* (que codifica para la proteína reguladora TyrR), dando lugar a las cepas W3110 Δ *tyrR*_TIR (PTS Δ *tyrR*) y VH33 Δ *tyrR*_TIR (PTS⁻Glc⁺ Δ *tyrR*). La inactivación de *tyrR* tuvo un impacto significativo en el Y_{L-Tyr}/Glc y la q_{L-Tyr} , incrementando en un 31% y 67% en la cepa W3110 Δ *tyrR*_TIR y de 200% y 97% en la cepa VH33 Δ *tyrR*_TIR. La cepa VH33 Δ *tyrR*_TIR, que resultó ser mejor productora de L-Tyr, presentó un Y_{L-Tyr}/Glc de 0.36 g/g, lo cual representa el 60% del Y^{\max} teórico reportado. No se detectó la acumulación de intermediarios aromáticos por la cepa VH33 Δ *tyrR*_TIR. Sin embargo, esto no se reflejó en el título final de L-Tyr que fue de 0.15 g_{L-Tyr}/L, lo que sugiere la presencia de pasos limitantes en la vía del SHIK.

La enzima 4-HPA 3-hidroxilasa, codificada por el operón *hpaBC*, puede reconocer a la L-Tyr como sustrato y convertirla a L-DOPA, su derivado dihidroxilado. Al sobreexpresar el operón *hpaBC*, de manera simultánea con los genes *tktA*, *aroG^{fb}* y *tyrCpheA_{CM}*, en las cepas de *E. coli* con el fondo *PTSΔtyrR* y *PTS⁻Glc⁺ΔtyrR*, se generaron las cepas *W3110ΔtyrR_DOPA* y *VH33ΔtyrR_DOPA*. Para evaluar la producción de L-DOPA se realizaron cultivos de células en reposo en medio M9 suplementado con 10g/l de glucosa y Cm.

La cepa *W3110ΔtyrR_DOPA* presentó un Y_{L-DOPA}/Glc de 0.0368 g/g y una q_{L-DOPA} de 0.0117 $g_{L-DOPA}/gDW \cdot h$, mientras que la cepa *VH33ΔtyrR_DOPA* presentó un Y_{L-DOPA}/Glc de 0.0517 g/g y una q_{L-DOPA} de 0.0136 $g_{L-DOPA}/gDW \cdot h$, lo cual resultó en un incremento del 40% y 16%, respectivamente. Bajo estas condiciones, la cepa *VH33ΔtyrR_DOPA* fue la mejor productora de L-DOPA alcanzando un título de 0.313 g_{L-DOPA}/L en 35 ml de cultivo, superior al de la cepa *W3110ΔtyrR_DOPA* que fue de 0.235 g_{L-DOPA}/L . La cepa *W3110ΔtyrR_DOPA* acumuló principalmente SHIK (0.248g/l), mientras que la cepa *VH33ΔtyrR_DOPA* acumuló tanto DHS como SHIK a una concentración de 0.303 y 0.226 g/l respectivamente. El Y_{Arom}/Glc , estimado al considerar los intermediarios DHS, SHIK y L-Tyr, así como del producto final L-DOPA, reflejó incrementos significativos en los rendimientos de ambas cepas. La adición de ácido ascórbico a los cultivos, con el fin de evitar la oxidación de L-DOPA, no mejoró significativamente el título final de L-DOPA.

II. INTRODUCCIÓN

Los aminoácidos aromáticos (AA) L-Triptófano (L-Trp), L-Fenilalanina (L-Phe) y L-Tirosina (L-Tyr) son metabolitos primarios con múltiples aplicaciones comerciales ya sea como productos finales o como precursores de otros productos de mayor interés. Entre las aplicaciones del L-Trp esta su uso como un medicamento para mejorar el estado de sueño y como un aditivo alimenticio; la L-Phe y la L-Tyr se usan principalmente como materia prima para la producción del endulzante aspartame bajo en calorías y de la droga L-DOPA para tratar la enfermedad del Parkinson, respectivamente (Ikeda, 2006).

Se han empleado diversas estrategias de ingeniería de vías metabólicas (IVM) para la producción de compuestos aromáticos en microorganismos tales como *Escherichia coli* (*E. coli*), dándole la capacidad de producir L-Phe, L-Tyr, L-Trp e intermediarios de la vía como el dehidroshikimato (DHS), a partir de glucosa, la fuente de carbono preferencial, (Berry, 1996). El aplicar estrategias de ingeniería de vías metabólicas y de ingeniería de proteínas ha hecho posible desarrollar cepas bacterianas que utilizan a la glucosa u otras fuentes de carbono renovables como materia prima en procesos biotecnológicos no contaminantes.

La vía común de síntesis de compuestos aromáticos en *E. coli*, también llamada la vía del shikimato (SHIK), inicia con la condensación del fosfoenolpiruvato (PEP) y la eritrosa-4-fosfato (E4P) para producir 3-deoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato (DAHPS) en una reacción catalizada por la enzima DAHPS sintasa (DAHPS). Después de siete pasos enzimáticos se produce el corismato (CHA) a partir del cual derivan las vías terminales de síntesis de cada uno de los aminoácidos aromáticos (Ikeda, 2006) (Figura 1).

Debido a la regulación presente en la vía del SHIK, *E. coli* no puede sobreproducir ninguno de los compuestos aromáticos. En primer lugar, existen tres isoenzimas de la DAHPS, codificadas por los genes *aroG*, *aroF* y *aroH*, que son inhibidas alostéricamente por L-Phe, L-Tyr y L-Trp, respectivamente. En la generación de cepas productoras ha sido fundamental la expresión de una DAHPS sintasa (DAHPS) insensible a regulación alostérica, con lo cual se incrementa significativamente la magnitud del flujo de carbono proveniente del metabolismo central hacia la vía del SHIK. Adicionalmente cada aminoácido inhibe a la primera enzima de su vía terminal de síntesis; en la vía de síntesis de L-Tyr, este aminoácido inhibe a la enzima corismato mutasa/prefenato deshidrogenasa (CM/PDH), codificada por el gen *tyrA* y, en su caso, la L-Phe inhibe a la enzima corismato mutasa/prefenato deshidratasa (CM/PDT) codificada por el gen *pheA* (Bongaerts *et al.*, 2001). Por lo anterior, para la producción de AA es necesario además eliminar la inhibición ejercida por cada aminoácido aromático sobre su propia vía de síntesis. Ha sido posible obtener enzimas insensibles a inhibición por producto final mediante mutagénesis e ingeniería de proteínas ((Lütke-Eversloh, *et al.*, 2005, Chávez *et al.*, 2008).

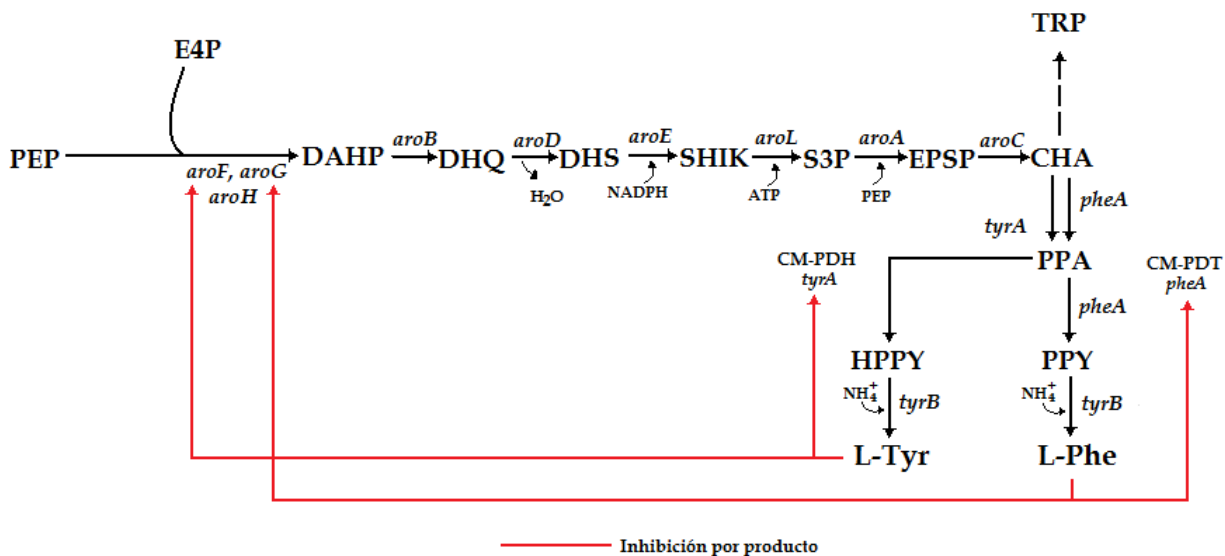


Figura 1. Vía de síntesis de compuestos aromáticos. PEP, fosfoenolpiruvato; E4P, eritrosa-4-fosfato; DAHP, 3-deoxi-D-arabinoheptuloso-7-fosfato; DHQ, 3-dihidroquinato; DHS, 3-dihidrosolikimato; SHIK, shikimato; S3P, shikimato-3-fosfato; EPSP, enolpiruvilshikimato-3-fosfato; CHA, corismato; PPA, prefenato; PPI, fenilpiruvato; HPP, 4-hidroxifenilpiruvato; L-Trp, L-Triptofano; L-Phe, L-Fenilalanina; L-Tyr, L-Tirosina.

Ya que la mayoría de los metabolitos y precursores para biosíntesis se producen en el metabolismo central de carbono y es a partir de éste que se compromete el flujo de carbono hacia la vía de síntesis de AA, se han valorado algunas estrategias para incrementar la disponibilidad de los precursores PEP y E4P a la vía del SHIK (Figura 2A).

La E4P se produce en el ciclo de las pentosas fosfato (PP) mediante la acción de la enzima transcetolasa (TktA), de tal forma que para incrementar la disponibilidad de E4P se ha sobreexpresado el gen *tktA* en cepas de *E. coli* que sobreexpresan una DAHPS insensible a regulación alostérica, lo que desregula el primer paso de la vía del SHIK, obteniéndose un incremento del doble en el flujo de carbono dirigido hacia la síntesis de compuestos aromáticos (Draths *et al.*, 1992).

Por otro lado, el PEP es un metabolito que puede ser utilizado de diversas maneras por la célula y el lugar que ocupa en el metabolismo central de carbono recibe el nombre de “nodo”. En este nodo, el flujo de carbono puede dirigirse hacia el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) a través del piruvato (PYR), reacción catalizada por las isoenzimas piruvato kinasa (PykA y PykF) y por el sistema fosfotransferasa (PTS); la enzima PEP carboxilasa (Ppc) cataliza la conversión de PEP a oxaloacetato (OAA) y finalmente, la condensación de PEP con E4P como primer paso hacia la síntesis de AA (Figura 2A). Entre las estrategias que se han evaluado para incrementar la disponibilidad de PEP, se encuentra la inactivación del sistema PTS, de las isoenzimas piruvato kinasas (*pykA* y *pykF*) (Ponce *et al.*, 1995;

Gosset, *et al.* 1996) y de la PEP carboxilasa (*ppc*) (Miller *et al.*, 1987), cuyas actividades compiten con la vía de aromáticos por este precursor. Además, se ha analizado la sobreexpresión de la enzima PEP sintasa (*pps*), que interviene en la conversión de piruvato en PEP (Patnaik *et al.*, 1995).

PTS es el mayor consumidor de PEP cuando una bacteria crece en glucosa ya que utiliza el 50% de PEP para transportar y fosforilar un mol de glucosa. Por esta razón se generaron cepas de *E. coli* con el sistema PTS inactivo (PTS⁻), pero con la capacidad de asimilar glucosa eficientemente (PTS⁻Glc⁺) mediante la acción conjunta de la galactosa permeasa (GalP) y de la glucokinasa (GlcK) (Figura 2B). Se demostró que una cepa PTS⁻Glc⁺ que sobreexpresa una DAHPS insensible a regulación alostérica incrementa 2.9 veces la producción de DAHP con respecto a una cepa PTS⁺ bajo las mismas condiciones, por lo que se infirió que aumenta el flujo de carbono hacia la vía del SHIK (Flores *et al.*, 1996).

Se han generado cepas de *E. coli* PTS⁻Glc⁺ que sobreexpresan las enzimas transcetolasa (gen *tktA*) y las versiones de DAHPS (*aroG^{fbr}*) y CM/PDT (*pheA^{ev2}*) insensibles a inhibición alostérica, para la producción de L-Phe. Mediante esta estrategia se obtuvo el 60% del rendimiento máximo teórico de L-Phe a partir de glucosa (Báez *et al.*, 2004).

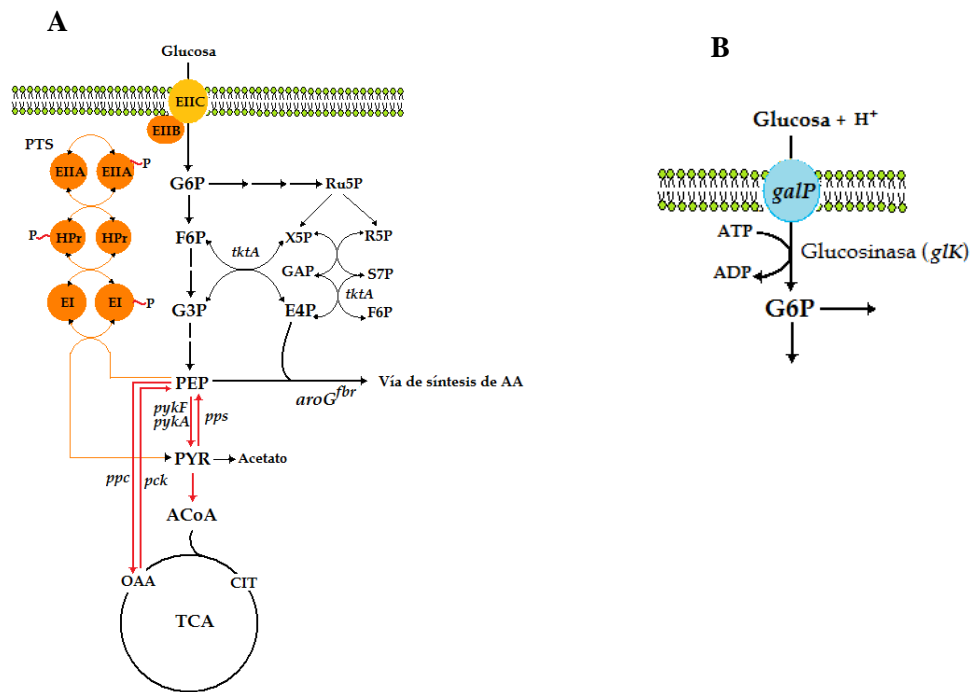


Figura 2. Transporte de glucosa por PTS y galactosa permeasa. **A.** PTS, sistema de fosfotransferasa; G6P, glucosa-6-fosfato; F6P, fructosa-6-fosfato; G3P, gliceraldehido-3-fosfato; E4P, eritrosa-4-fosfato; PEP, fosfoenol piruvato; PYR, piruvato; ACoA, acetil CoA; TCA, ciclo de ácidos tricarbónicos; CIT, citrato; OAA, oxaloacetato; *pykF* y *pykA*, piruvato kinasas; *pps*, PEP sintasa; *ppc*, PEP carboxilasa; *pck*, PEP carboxikinasa; *tktA*, transcetolasa; *aroG^{fbr}*, DAHPS insensible a regulación alostérica. **B.** *galP*, galactosa permeasa.

III. ANTECEDENTES

III.I Producción de L-Tyr en *E. coli*

Algunos esfuerzos se han centrado en generar cepas de *E. coli* productoras de L-Tyr, para lo cual ha sido indispensable identificar y eliminar los controles alostéricos y transcripcionales que este aminoácido ejerce sobre las enzimas clave de su vía de síntesis y en los genes que las codifican.

En la vía terminal de síntesis de L-Tyr, la enzima bifuncional CM/PDH, codificada por el gen *tyrA*, cataliza en primer lugar, la conversión del corismato (CHA) en pefenato (PPA) debido a la actividad corismato mutasa (CM) y posteriormente, descarboxila y oxida al PPA en 4-hidroxifenilpiruvato (HPP), empleando NAD^+ como cofactor por la actividad pefenato deshidrogenasa (PDH). Finalmente, la conversión de HPP en L-Tyr es catalizada por la aminotransferasa de L-Tyr, codificada por el gen *tyrB* (Dell *et al.*, 1993).

La enzima CM/PDH forma parte de la familia de proteínas TyrA, la cual conforma el grupo de deshidrogenasas que participan en la biosíntesis de L-Tyr. Las deshidrogenasas, además de presentar diversas especificidades por los sustratos, también tienen distinta sensibilidad a la inhibición por L-Tyr. En el caso de la deshidrogenasa de *E. coli*, se sabe que la L-Tyr inhibe en un 90% la actividad PDH, y en un 45% a la actividad CM (Turnbull *et al.*, 1990). Se ha reportado la generación y la caracterización de mutantes de la CM/PDH de *E. coli* resistentes a la inhibición por L-Tyr (TyrA^{tbr}) obtenidas por mutagénesis del gen *tyrA* empleando *meta*-fluoro-D,L-tirosina (Lütke-Eversloh *et al.*, 2005). Takai *et al.*, Lütke-Eversloh y Stephanopoulos construyeron cepas de *E. coli* productoras de L-Tyr sobreexpresando variantes resistentes a inhibición por retroalimentación de la DAHPS y CM/PDH (Lütke-Eversloh *et al.*, 2007).

Existen proteínas de la familia TyrA que no son inhibidas de manera natural por este aminoácido, un ejemplo de ello es la enzima ciclohexadienil deshidrogenasa (CDH), de *Zymomonas mobilis* (*Z. mobilis*) la cual puede usar PPA como un sustrato para la biosíntesis de L-Tyr (Zhao, G. *et al.*, 1993).

En un estudio realizado por Chávez-Béjar *et al.* (2008) se construyó el plásmido pTrctyrCphea_{CM} como una alternativa para eliminar la regulación alostérica en la vía terminal de síntesis de L-Tyr. Este operón sobreexpresa el gen *tyrC* que codifica para la enzima CDH de *Z. mobilis* y cataliza la conversión de PPA a HPP; y un fragmento del gen *pheA* que corresponde al dominio CM de la enzima corismato mutasa/prefenato deshidratasa (CM/PDT) para reconstituir la vía completa de CHA a HPP.

La enzima bifuncional CM/PDT de *E. coli* está involucrada en la biosíntesis de L-Phe. Cuando el dominio CM de la proteína CM-PDT se expresa sólo (PheA_{CM}), éste retiene su actividad catalítica y es insensible a la inhibición por L-Phe (Zhang *et al.*, 2003). En contraste, el dominio CM de la enzima

CM/PDH, que participa en la síntesis de L-Tyr, pierde su actividad catalítica cuando no está fusionado a su dominio correspondiente PDH (Chen *et al.*, 2003).

Para evaluar el efecto de la expresión del operón *TrctyrCpheA_{CM}* sobre la producción de L-Tyr, Chávez-Béjar y colaboradores realizaron cultivos en matraz de la cepa PB12 (PTS⁻Glc⁺) sobreexpresando los genes *aroG^{fbr}* (pJLBaroG^{fbr}) y *tyrCpheA_{CM}* (pTrctyrCpheA_{CM}) ó el gen silvestre *tyrA^{WT}* (pTrctyrA^{WT}). Los cultivos se crecieron a 30°C en medio mínimo M9 suplementado con 10g/l de glucosa e IPTG 0.1 mM. Se observó que la velocidad específica de crecimiento de la cepa transformada con el plásmido pTrctyrCpheA_{CM} disminuyó en un 40% con respecto a la cepa que expresó el gen *tyrA^{WT}*. Sin embargo, fue capaz de producir más L-Tyr que la cepa que expresaba simultáneamente los genes *aroG^{fbr}* y *tyrA^{WT}*, teniendo una productividad (q_{L-Tyr}) y un rendimiento (Y_{L-Tyr/Glc}) 5.8 y 6.4 veces mayores. Estos resultados mostraron que la expresión del gen *tyrC* tiene un efecto positivo sobre la producción de L-Tyr en cultivos realizados en la cepa PB12 transformada con los plásmidos pJLBaroG^{fbr} y pTrctyrCpheA_{CM}.

III.II Papel de la proteína reguladora TyrR en la vía del SHIK

La proteína TyrR regula la transcripción de varios genes, actuando como represor y, algunas veces, como activador. El principal efector de TyrR es la L-Tyr por lo que, además de actuar como un regulador alostérico al inhibir la actividad de las enzimas DAHPS y CM-PDH, la L-Tyr regula la expresión de varios genes de la vía del SHIK (Pittard, 2005).

La proteína TyrR de *E. coli* controla la expresión de un grupo de unidades de transcripción (regulón TyrR) cuyos productos de traducción están involucrados en la biosíntesis o en el transporte de los aminoácidos aromáticos. El regulón TyrR de *E. coli* abarca por lo menos ocho unidades de transcripción, cada una de las cuales está regulada de manera distinta por la proteína TyrR. Para que ocurra la regulación de manera eficiente, la proteína TyrR debe interactuar con pequeñas moléculas ligando: ATP, L-Tyr y L-Phe. En solución, en la ausencia de cofactores o en la presencia sólo de L-Phe, la proteína TyrR existe como un dímero. Sin embargo, en la presencia de ATP y L-Tyr la proteína TyrR forma hexámeros (Pittard, 2005).

Las secuencias de DNA reconocidas por la proteína TyrR se refieren como cajas TyrR. Siete miembros del regulón tienen dos o más cajas TyrR, las cuales se clasifican como fuertes o débiles. Las cajas fuertes son aquellas en las que se une la proteína TyrR *in vitro* en la ausencia de cualquier cofactor. En contraste, las cajas débiles se unen únicamente por TyrR en la presencia de L-Tyr; o en el caso de *tyrB*, L-Tyr o L-Phe (Pittard, 2005).

En la tabla 1 se describen los genes y las enzimas del regulón TyrR y se muestran los niveles de expresión de sus promotores bajo diferentes condiciones. Los datos se presentan como actividades

específicas de β -galactosidasa de fusiones transcripcionales utilizando el gen *lacZ* como gen reportero (Pittard, 2005).

Tabla 1. Expresión de los promotores del regulón TyrR bajo distintas condiciones. (Adaptado de Pittard, 2005)

Gene	Función	Actividades específicas de β -galactosidasa			
		<i>tyrR</i> ⁺			<i>tyrR</i> ⁻
		MM	MM+L-Tyr	MM+L-Phe	MM
<i>aroF</i>	DAHP sintasa (L-Tyr)	300	10	30	5000
<i>aroL</i>	Shikimato cinasa	230	40	130	520
<i>tyrP</i>	Transportador de L-Tyr	60	10	500	200
<i>mtr</i>	Transportador de L-Trp	900	1800	5000	600
<i>aroP</i>	Transportador de aromáticos	450	50	60	700
<i>tyrB</i>	Aminotransferasa	400	120	160	500
<i>aroG</i>	DAHP sintasa (L-Phe)	750	---	850	1300
<i>tyrR</i>	Regulador	270	280	230	550

MM, medio mínimo; MM+L-Tyr, medio mínimo mas 1mM de L-Tyr, MM+L-Phe, medio mínimo más 1mM de L-Phe.

III.II.I Activación de la expresión de genes por TyrR

Se ha reportado que TyrR activa a: *mtr*, *tyrP* y *aroP*. En la presencia de cualquier aminoácido aromático, la proteína TyrR activa la transcripción interaccionando con la subunidad α de la RNA polimerasa.

El gen *aroP* codifica para un transportador general de aminoácidos aromáticos y cuenta con tres promotores, lo que le provee un mecanismo por el cual cada uno de los sustratos del transportador influye en su síntesis. El gen *mtr* codifica para un transportador específico de triptófano y su expresión se activa por L-Tyr o L-Phe, pero se reprime por L-Trp. El gen *tyrP* codifica un transportador específico de L-Tyr y su expresión se activa por L-Phe o L-Trp, pero se reprime por L-Tyr (Pittard, 2005).

III.II.II Represión mediada por TyrR.

a) Represión mediada por TyrR independiente de cofactor.

La represión independiente de cofactor únicamente requiere de una caja fuerte TyrR posicionada de tal modo que la unión de la proteína TyrR interfiera con la unión de la RNA polimerasa al promotor. Los promotores de *aroF*, *aroL*, *tyrP*, *aroG* y *tyrR* están sujetos a diferentes grados de represión independiente de cofactor. En los primeros tres genes, la presencia de TyrR disminuye la actividad del promotor; en el caso de *aroG* y *tyrR*, la represión independiente de cofactor resulta de la competencia directa entre la proteína TyrR y la holoenzima de la RNA polimerasa para unirse a la región promotora (Pittard, 2005).

b) Represión de TyrR mediada por L-Tyr.

En la presencia de L-Tyr, la proteína TyrR forma un hexámero y después se une a una caja fuerte y a las cajas débiles adyacentes en *aroF*, *aroL* y *tyrP*. En cepas TyrR⁺, la expresión de *aroL* también es reprimida por L-Trp, a través de TrpR que se une al DNA. En la ausencia de TyrR, tal unión no tiene efecto en la expresión de *aroL*, lo cual sugiere que se necesita alguna interacción entre TyrR y TrpR para la represión mediada por L-Trp (Pittard, 2005).

c) Represión mediada por TyrR involucrando la L-Tyr o L-Phe.

Solamente *tyrB* muestra represión fuerte por TyrR en la presencia de L-Tyr o L-Phe. Este gen codifica una aminotransferasa involucrada en la síntesis de ambos aminoácidos. Tanto la L-Tyr como la L-Phe facilitan la unión de la proteína TyrR a un par de cajas TyrR. Aunque la L-Phe facilita la unión de TyrR a las dos cajas TyrR de *tyrB*, la L-Tyr es más efectiva. La proteína TyrR y la RNA polimerasa se pueden unir juntas al promotor *tyrB*. En la presencia de L-Tyr la unión del hexámero previene la formación del complejo abierto, pero no interfiere con la unión de la RNA polimerasa al promotor (Pittard, 2005).

d) Represión mediada por TyrR involucrado la L-Tyr, L-Phe o L-Trp.

TyrR reprime la expresión del gen *aroP*, que codifica para un transportador general de aminoácidos aromáticos, en presencia de L-Tyr, L-Phe o L-Trp. Los genes *aroG* y *pheA* que codifican para las dos enzimas cuya actividad es inhibida por L-Phe han involucrado diferentes estrategias de control. Los niveles de la proteína TyrR funcional controlan la expresión de *aroG*, en una manera independiente de cofactor (Pittard, 2005).

De los estudios de varias unidades de transcripción reguladas por TyrR, es claro que los cambios en el nivel de la proteína TyrR pueden tener un impacto dramático en la naturaleza y en la fuerza de cada evento regulador. Mediante análisis comparativos de los perfiles de expresión de genes de cepas de *E. coli* WT y $\Delta tyrR$, se han obtenido evidencias de que la inhibición del crecimiento causada por concentraciones altas de L-Phe está mediada por TyrR, sugiriendo que la delección del gen *tyrR* puede mejorar la producción de este aminoácido (Polen et al. 2005).

Se han generado cepas de *E. coli* productoras de L-Tyr por la delección del gen *tyrR* y la sobreexpresión de variantes resistentes a inhibición por retroalimentación de los genes *aroG* y *tyrA*. Tales modificaciones resultaron en la producción de 3.8 g/l de L-Tyr en fermentaciones de alta densidad celular. La cepa mejorada, con modificaciones genéticas adicionales en el metabolismo central, produjo 9.7 g/l de L-Tyr, con un rendimiento de L-Tyr en glucosa ($Y_{L-Tyr/Glc}$) de 0.10 g/g y una tasa de

producción específica de L-Tyr de (q_{L-Tyr}) de 73 mg/g (gramos de peso seco)/h en fermentación tipo lote alimentado. (Lütke-Eversloh and Stephanopoulos 2007).

III.III Síntesis de 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) a partir de L-Tyr

La L-Tyr es un aminoácido aromático que se utiliza principalmente como materia prima para la síntesis de un producto farmacéutico de alto valor comercial: la 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA). La L-DOPA es una droga cuyo principal uso es el tratamiento de la enfermedad del Parkinson, un desorden degenerativo asociado a la disminución del nivel de dopamina como resultado de la pérdida de células cerebrales y en lesiones neurogénicas del miocardio (Ikram, 2002). La administración de dopamina no es efectiva en el tratamiento de la enfermedad del Parkinson, ya que no cruza la barrera sangre-cerebro, mientras que la L-DOPA, el precursor metabólico de la dopamina, cruza esta barrera y se convierte en dopamina, aliviando los síntomas de la enfermedad.

La oxidación de L-Tyr a L-DOPA involucra la introducción de un grupo hidroxilo al anillo aromático; en todos los organismos vivos esta reacción la catalizan dos diferentes tipos de enzimas: la tirosina hidroxilasa o la tirosinasa (Ali and Haq, 2002).

La tirosina hidroxilasa (TH; tirosina 3-monooxigenasa), cataliza el paso limitante en la biosíntesis de catecolaminas. La enzima se encuentra principalmente en la medula adrenal, el sistema nervioso periférico, y en las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas en el sistema nervioso central de organismos superiores. Debido a que la L-DOPA es precursor de la dopamina, a partir de la cual derivan las catecolaminas norepinefrina y epinefrina, se le atribuyen amplias aplicaciones terapéuticas (Kaufman, 1995).

La tirosinasa es otra enzima capaz de catalizar la oxidación de L-Tyr a L-DOPA. Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza en todos los reinos de la vida. Es esencial para la pigmentación y, en plantas superiores y en algunos invertebrados, es un factor importante en la respuesta inmune primaria (Huffnagle, 1995). La tirosinasa es una monofenol monooxigenasa cuyo sitio activo se caracteriza por un par de iones de cobre acoplados. La función mejor conocida es la formación del pigmento biológico melanina de L-Tyr vía L-DOPA. En esta reacción la tirosinasa usa su centro binuclear de cobre para unir una molécula de oxígeno atmosférico y catalizar la *orto*-hidroxilación de L-Tyr (monofenol) a L-DOPA (*o*-difeno) en su actividad cresolasa y la subsecuente oxidación de L-DOPA a dopaquinona (*o*-diquinona) en su actividad catecolasa, la cual reacciona espontáneamente para dar origen a las melaninas (Seo *et al.*, 2003) (Figura 3).

Por otro lado, en la especie *Beta vulgaris*, las betacianinas constituyen una clase de metabolitos secundarios donde la principal betacianina, la betanina, se sintetiza por la oxidación de L-Tyr a L-DOPA por la acción de una tirosina hidroxilasa, y la siguiente oxidación de L-DOPA a

dopaquinona por acción de una tirosinasa o una polifenol oxidasa. Seguido de esto viene una reacción de glucosilación dando lugar a la producción de los pigmentos amarillo (ácido betalámico), rosa-violeta (betanidina) y rojo-violeta (betanina) usados como aditivos en alimentos como colorantes naturales (Sepúlveda *et al.*, 2004) (Figura 3).

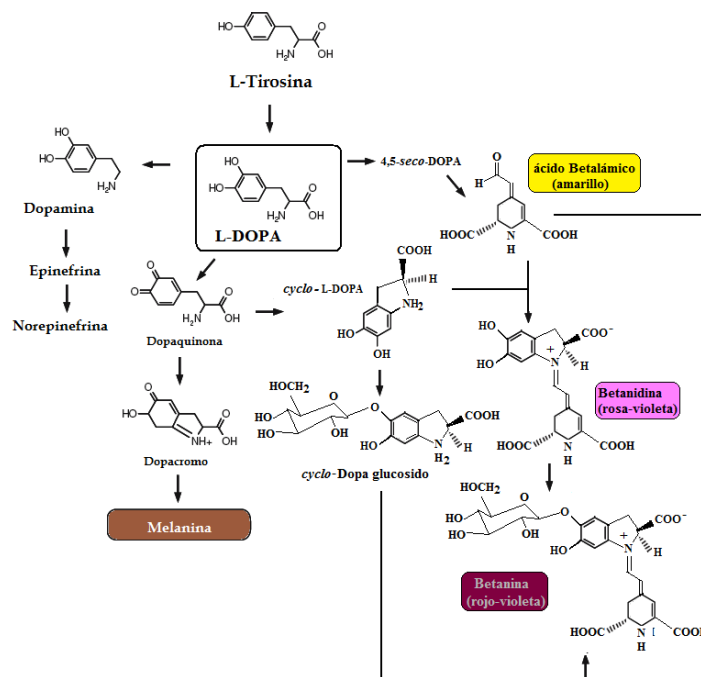


Figura 3. Síntesis de L-DOPA a partir de L-Tyr.

III.IV Producción biológica de L-DOPA

La L-DOPA producida químicamente a una escala comercial (Knowles, 2003) se sintetiza de la vanilina y la hidantoina por un proceso que involucra ocho pasos de reacción; la L-DOPA también se produce por síntesis catalítica asimétrica usando el ligando difosfina DiPAPM (Nobelprize.org). La síntesis química de L-DOPA es un proceso que consume tiempo e involucra varios químicos que son extremadamente costosos y que requiere catalizadores poco amigables al ambiente.

La extracción de la L-DOPA a partir de fuentes biológicas donde ésta existe abundantemente es un procedimiento alternativo a la síntesis química. Cierta variedad de plantas, como vainas de *Vicia faba* y más comúnmente de especies de leguminosas, donde la L-DOPA es formada como un precursor de la melanina, se han usado para su producción. Cultivos de la especie de la planta *Mucura pruriens* se han considerado como posibles fuentes de L-DOPA por la facilidad con la cual puede ser aislada (Huizing, 1985; Pras N., 1993).

Por el alto costo de producción y su alto valor comercial algunos investigadores se han centrado en estudiar la bioconversión de L-Tyr a L-DOPA para su explotación comercial. En contraste a la producción química, la producción enzimática de L-DOPA por microorganismos es ambientalmente

amigable y permite un producto mejorado bajo procesos simples. Se han estudiado diversas rutas biológicas para la producción de L-DOPA por diferentes catalizadores, algunos de los cuales se describen a continuación:

III.IV.I Tirosinasa

Una enzima clave en la biosíntesis de L-DOPA es la tirosinasa. Esta enzima se ha estudiado en los hongos *Neurospora crassa*, *Agaricus bisporous*, *Aspergillus oryzae* y *Yarrowia lipolytica*. Sin embargo, hay variación en la producción de L-DOPA ya que ésta se descompone rápidamente a otros metabolitos por acción de la tirosinasa, que cataliza no solamente la formación de L-DOPA si no también su oxidación a L-2,3,4-trihidroxifenilalanina, haciendo la formación estequiométrica de L-DOPA difícil de alcanzar (Kumagai *et al.*, 1969; Ikram and Ali, 2002).

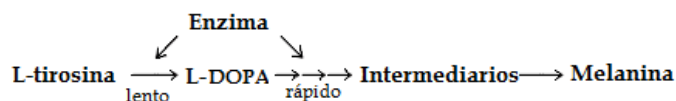


Figura 4. Formación de Melanina a partir de L-Tyr

Para prevenir la subsecuente conversión de L-DOPA a melanina en la presencia de tirosinasa se ha utilizado ácido L-ascórbico como un antioxidante para obtener L-DOPA como producto final (Selma Ates *et al.*, 2006) (Fig. 5). Adicionalmente, ya que la L-DOPA y la L-Tyr son estructural y químicamente similares, la presencia de L-Tyr en la mezcla de reacción complica el proceso de purificación de la L-DOPA como producto final.

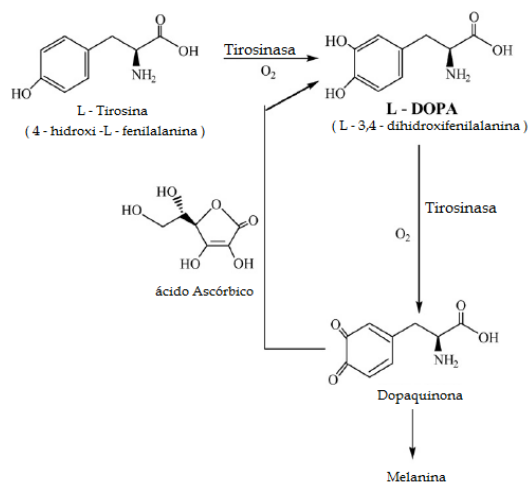


Figura 5. Uso del ácido ascórbico para prevenir la oxidación de L-DOPA

III.IV.II Tirosina Fenol Liasa (TPL)

Aproximadamente la mitad de la L-DOPA producida al año se sintetiza por un método enzimático que involucra a la tirosina fenol liasa (TPL), presente en *Erwinia herbicola* (*E. herbicola*). La TPL es una enzima inducible por L-Tyr que normalmente cataliza la α , β -eliminación de L-Tyr para producir piruvato, fenol y amonio, por lo tanto permite a la bacteria utilizar L-Tyr como una fuente de carbono y nitrógeno. Esta reacción es reversible y cuando el fenol se substituye por catecol, se produce L-DOPA (Koyanagi, 2005).

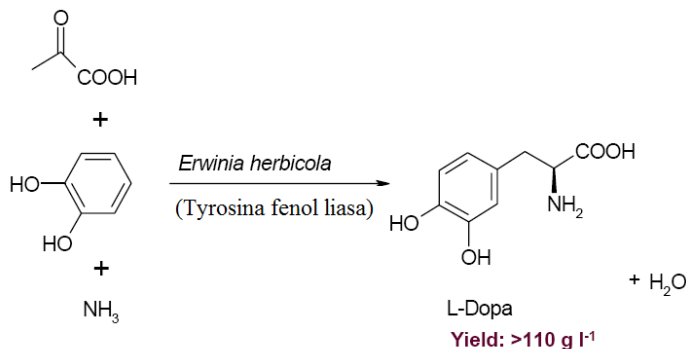


Figura 6. Producción de L-DOPA por la TPL

Ya que la TPL se sintetiza al ser inducida por L-Tyr, la cual impide preparaciones puras de L-DOPA como producto final, se han utilizado células de *E. herbicola* recombinante que acarrean una mutación transcripcional del regulador TyrR, el cual es capaz de activar el promotor *tpl* en la ausencia de L-Tyr.

Ajinomoto Co. Ltd. inició la producción comercial de L-DOPA por esta nueva ruta biológica usando a la bacteria *E. herbicola* en un proceso de lote alimentado en el que se puede obtener una concentración final de producto de hasta 110 g l⁻¹, y el cual presenta grandes ventajas sobre los procesos químicos clásicos (Swiss Industrial Biotechnology, Swiss Biotech Association, Bern. Available at: <http://www.swissbiotechassociation.ch/files/membersadd/O.Ghisalba.pdf>).

A pesar de que la reacción catalizada por la enzima TPL bajo estas condiciones favorece la formación de L-DOPA, las concentraciones de sustrato (catecol, piruvato y amonio) se deben mantener altas, lo que impone ciertas restricciones al proceso ya que el catecol en altas concentraciones es tóxico para el microorganismo, y el costo del piruvato como sustrato es alto. Adicionalmente en este proceso se genera una mezcla de L-DOPA y los sustratos iniciales como el catecol, por lo que se requiere la subsecuente separación y purificación de L-DOPA lo cual implica un alto costo de este proceso (Lee, 1998).

III.IV.III 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilasa

Se ha determinado que *E. coli* W, es la única cepa de *E. coli* capaz de utilizar tanto ácido fenilacético así como 3 o 4-Hidroxifenilacetato (HPA, dos sustratos que no pueden ser metabolizados por K-12) como fuentes de carbono (Prieto, 1996). La 4-HPA 3-hidroxilasa de *E. coli* W es una monooxigenasa aromática de dos componentes: una flavoproteína y una proteína acopladora, codificada por dos genes los cuales forman parte del mismo operón (*hpaBC*). El operón *hpaBC*, el cual forma parte de una vía degradativa de compuestos aromáticos, codifica para las proteínas HpaB y HpaC que en conjunto catalizan la oxidación efectiva del sustrato en la presencia de NADH y FAD; donde HpaC es una flavin reductasa que puede reducir FAD a FADH₂ utilizando NADH, y HpaB es la monooxigenasa que utiliza FADH₂ (Xun, 2000). Por lo tanto la 4-HPA 3-hidroxilasa normalmente cataliza la conversión de 4-HPA a 3,4-dihidroxifenilacetato con el co-consumo de NADH y O₂ (Figura 7).

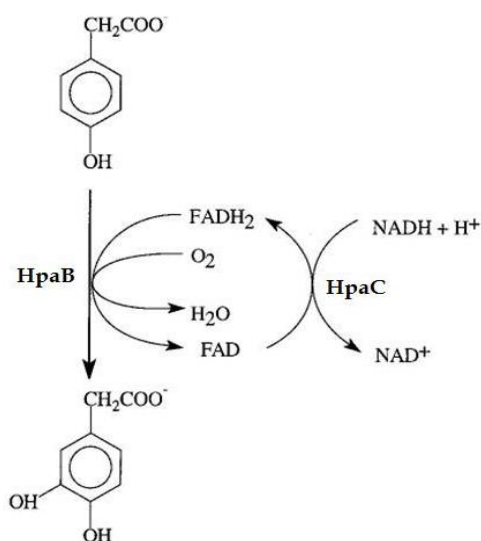


Figura 7. Reacciones acopladas catalizadas por HpaC y HpaB

La 4-HPA 3-hidroxilasa es una enzima bacteriana, distinta a la tirosinasa, que se asocia a la producción de un pigmento como melanina. Este mecanismo puede ser similar al de la tirosinasa en la síntesis de melaninas. Sin embargo, el ion cobre en la tirosinasa juega un papel relevante en la unión del grupo fenol del sustrato, mientras que la 4-HPA 3-hidroxilasa no contiene cobre en su estructura, por lo que la unión del sustrato involucra un mecanismo diferente (Gibello *et al.*, 1995).

Debido a que la 4-HPA 3-hidroxilasa es una enzima con un amplio rango de sustratos y puede convertir 3 o 4-hidroxifenilacetato, fenol, p-cresol, e hidroquinona a su derivado dihidroxilado, indica que a la enzima le basta reconocer un grupo hidroxilo unido al anillo aromático y por tanto, puede convertir L-Tyr a L-DOPA (Prieto *et al.*, 1993).

En una cepa de *E. coli* con la actividad 4-HPA 3-hidroxilasa, Lee y colaboradores (1998) desarrollaron un método para la producción de L-DOPA utilizando a la L-Tyr como el sustrato. En este trabajo, a una suspensión de *E. coli* DH1 transformada con un plásmido que tiene clonado el operón *hpaBC*, se le adicionó 3mM de L-Tirosina y se incubó a 37°C. Como la enzima 4-HPA 3-hidroxilasa requiere NADH, se adicionó glicerol para mantener el potencial reductor dentro de la célula y regenerar así el NADH. Después de una hora de incubación, el sobrenadante se analizó por HPLC. Se obtuvo una producción de 2.66 mM de L-DOPA (88%) a una velocidad de 44 μ M /min.

IV. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Parkinson aflige a uno de cada 1700 individuos, para lo cual el tratamiento más efectivo ha sido la administración oral de L-DOPA. La L-DOPA es una droga que puede ser generada eficientemente por procesos biocatalíticos cuyas condiciones de producción son menos agresivas al ambiente que las utilizadas en procesos químicos. Además de su uso en la industria farmacéutica, la L-DOPA se puede usar como sustrato en la producción de pigmentos como las betacianinas.

Ya que la L-Tyr se utiliza como materia prima en la síntesis de L-DOPA, en este trabajo se propone generar una cepa modificada por ingeniería de vías metabólicas, cuyo flujo de carbono se dirija a la síntesis de L-Tyr, y que exprese el operón *hpaBC* que contiene los genes que codifican para la enzima 4-HPA 3-hidroxilasa, como una metodología para la producción de L-DOPA utilizando como sustrato a la glucosa. El utilizar a la glucosa como sustrato, en lugar de la L-Tyr o catecol como ocurre en los procesos actuales, puede resultar en una reducción de costos y simplificar el proceso de purificación de la L-DOPA, el cual se complica por la presencia de estos metabolitos en la mezcla de reacción.

V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

V.I HIPÓTESIS

Si una cepa de *E. coli*, modificada por ingeniería de vías metabólicas para incrementar la producción de L-Tirosina, expresa los genes que codifican para la enzima 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilasa (4-HPA 3-hidroxilasa), tendrá la capacidad de producir L-DOPA a partir de glucosa.

V.II OBJETIVOS

V.II.I Objetivo General

Generar y caracterizar una cepa de *E. coli* que tenga la capacidad de producir L-DOPA a partir de glucosa como fuente de carbono.

V.II.II Objetivos Particulares

1. Generar y caracterizar una cepa de *E. coli* productora de L-Tirosina, al eliminar el gen *tyrR* y sobreexpresar una transcetolasa (Tkt) y una versión insensible a inhibición de la DAHP sintasa (DAHPS) y de la corismato mutasa/prefenato deshidrogenasa (CM/PDH).
2. Construir un plásmido que cuente con el operón *hpaBC* (que codifica para la enzima 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilasa) y transformar una cepa silvestre para evaluar su capacidad de producir L-DOPA a partir de L-Tirosina exógena.
3. Expresar el operón *hpaBC*, bajo el control del promotor *trc*, en la cepa de *E. coli* productora de L-Tirosina para generar la cepa productora de L-DOPA.
4. Evaluar en matraz la capacidad de producción de L-DOPA a partir de glucosa.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.I Cepas y Plásmidos

VI.I.I Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se enlistan en la tabla 2. El plásmido pJLBaroG^{fbr} tktA (Balderas *et al.*, 2009) porta el gen *aroG^{fbr}* que codifica para una DAHP sintasa insensible a retroinhibición (fbr) por L-Phe, bajo el control del promotor *lacUV5* y el gen *tktA* que codifica para la transcetolasa A, bajo el control de su promotor nativo. El plásmido pTrctyrCpheA_{CM} (Chávez-Béjar *et al.*, 2008) porta el operón *tyrCpheA* que codifica para la ciclohexadienil deshidrogenasa (CDH) de *Zymomonas mobilis* y un fragmento del gen *pheA* que corresponde al dominio corismato mutasa de la enzima corismato mutasa-prefenato deshidratasa (CM/PDT), bajo el control del promotor *trc*.

Plásmidos generados en este trabajo.

El plásmido pTrchpaBC porta el operón *hpaBC* que codifica para la 4-hidroxifenilacetato (4-HPA) 3-hidroxilasa de la cepa *Escherichia coli* W bajo el control del promotor *trc* (apartado VI.VI). El plásmido pTrchpaBCTrctyrCpheA_{CM} se construyó a partir de los plásmidos pTrchpaBC y pTrctyrCpheA_{CM} (apartado VI.VII), porta el operón *hpaBC* además del operón *tyrCpheA_{CM}*, cada uno bajo el control del promotor *trc*.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en la realización de éste trabajo.

Plásmidos	Descripción	Referencia
pKD3	Replicón <i>oriRγ</i> ; resistencia a cloramfenicol (Cm ^R).	Datsenko y Wanner, 2000
pKD46	<i>oriR101</i> , <i>repA10</i> (ts), Sistema recombinasa λ <i>araBp-gam-bet-exo</i> (Red helper plasmid, Ts), Resistencia a ampicilina (Ap ^R).	Datsenko y Wanner, 2000
pCP20	λ <i>CI857</i> (ts), <i>ts-rep</i> (Recombinasa FLP, Ts)	Cheperanov y Wackernagel, 1995
pTrc99A	Vector de clonación, promotor <i>lacUV5</i> , acarrea los genes <i>bla</i> (Amp ^R) y <i>lacI^q</i> . Ori de replicación pBR322.	Amann <i>et al.</i> , 1988
pJLBaroG ^{fbr} tktA	Contiene el gen <i>aroG^{fbr}</i> bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> y el gen <i>tktA</i> bajo el control de su promotor nativo, genes <i>lacI^q</i> y <i>tet</i> . Origen de replicación pACYC184.	Balderas <i>et al.</i> , 2009
pTrctyrCpheA _{CM}	Contiene el operón <i>tyrCpheA_{CM}</i> bajo el control del promotor <i>trc</i> .	Chávez-Béjar <i>et al.</i> , 2008.
pTrchpaBC	Contiene el operón <i>hpaBC</i> bajo el control del promotor <i>trc</i> .	Este trabajo
pTrchpaBCTrctyrCpheA _{CM}	Contiene el operón <i>tyrCpheA_{CM}</i> y el operón <i>hpaBC</i> bajo el control del promotor <i>trc</i> .	Este trabajo

VI.II Cepas

Las cepas utilizadas en este trabajo se describen en la tabla 3. La cepa *E. coli* W3110 (PTS⁺) y su derivada VH33 (PTS⁻Glc⁺) se utilizaron para la construcción de las cepas sobreproductoras de L-Tyr y L-DOPA. La cepa W3110 es una cepa F⁻ λ⁻ derivada de *Escherichia coli* K-12. La cepa VH32 derivada de W3110, es una Δ*ptsI*, *ptsH*, *crr::kan* (PTS⁻) Δ*lacI*, *lacZ::loxP* a la cual se le reemplazó el promotor del gen galactosa permeasa (*galP*) por el promotor *trc* (De Anda *et al.*, 2006) dando como resultado la expresión constitutiva de *galP* (GalP⁺), con lo cual se incrementó la capacidad de transportar glucosa (genotipo PTS⁻Glc⁺). A esta cepa se le escindió el casete de resistencia a cloramfenicol (Cm) localizado en el cromosoma por los sitios FRT con ayuda del plásmido pCP20 y se le nombró VH33.

Generación de las cepas productoras

La cepa W3110Δ*tyrR* y la cepa VH33Δ*tyrR* se generaron al inactivar en cromosoma el gen *tyrR* (apartado VI.IV). Las cepas W3110, VH33, W3110Δ*tyrR* y VH33Δ*tyrR* se transformaron con el plásmido pJLBaroG^{fbt}*tktA* y posteriormente con el plásmido pTrctyrCpheA_{CM} dando lugar a las cepas W3110_TIR, VH33_TIR, W3110Δ*tyrR*_TIR y VH33Δ*tyrR*_TIR. Las cepas W3110Δ*tyrR* y VH33Δ*tyrR*, transformadas con el plásmido pJLBaroG^{fbt}*tktA*, se transformaron con el plásmido pTrchpaBCTrctyrCpheA_{CM} generando las cepas W3110Δ*tyrR*_DOPA y VH33Δ*tyrR*_DOPA.

Tabla 3. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en éste trabajo.

Cepas	Características	Referencia
W3110	F ⁻ λ ⁻ derivada de <i>Escherichia coli</i> K-12.	ATCC27325
VH33	Derivada de W3110; Δ <i>ptsI</i> , <i>ptsH</i> , <i>crr::kan</i> (PTS ⁻) Δ <i>lacI</i> , <i>lacZ::loxP</i> , P <i>galP::Ptrc</i> (GalP ⁺), a la cual se le escindió el casete de resistencia a Cm.	De Anda <i>et al.</i> , 2006
W3110Δ <i>tyrR</i>	W3110Δ <i>tyrR</i> :: <i>frt</i>	Este trabajo
VH33Δ <i>tyrR</i>	VH33Δ <i>tyrR</i> :: <i>frt</i>	Este trabajo
W3110_TIR	W3110 transformada con los plásmidos pJLBaroG ^{fbt} <i>tktA</i> y pTrctyrCpheA _{CM}	Este trabajo
VH33_TIR	VH33 transformada con los plásmidos pJLBaroG ^{fbt} <i>tktA</i> y pTrctyrCpheA _{CM}	Este trabajo
W3110Δ <i>tyrR</i> _TIR	W3110Δ <i>tyrR</i> transformada con los plásmidos pJLBaroG ^{fbt} <i>tktA</i> y pTrctyrCpheA _{CM} .	Este trabajo
VH33Δ <i>tyrR</i> _TIR	VH33Δ <i>tyrR</i> transformada con los plásmidos pJLBaroG ^{fbt} <i>tktA</i> y pTrctyrCpheA _{CM}	Este trabajo

W3110 Δ tyrR_DOPA	W3110 Δ tyrR transformada con los plásmidos pJLBaroG ^{br} tkA y pTrchpaBCTrctyrCpheA _{CM}	Este trabajo
VH33 Δ tyrR_DOPA	VH33 Δ tyrR transformada con los plásmidos pJLBaroG ^{br} tkA y pTrchpaBCTrctyrCpheA _{CM}	Este trabajo

VI.II Medios de Cultivo y antibióticos.

VI.II.I Medios de Cultivo

Se utilizaron diferentes medios de cultivo líquidos y sólidos cuya composición se detalla a continuación:

- **Medio Luria-Bertani (LB)** (Maniatis *et al.*, 1982): es un medio de cultivo líquido utilizado de forma habitual para el crecimiento bacteriano. Su composición por litro es: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl.
- **LB agar:** es el medio de cultivo sólido utilizado de forma habitual y consiste en añadir 15g de agar a 1 L de medio LB especificado antes.
- **Medio mineral M9** (Maniatis *et al.*, 1982): Es el medio mínimo que se utilizó en los cultivos de producción de L-Tir y L-DOPA. La composición del medio contiene por litro: 6 g de Na₂HPO₄, 5 g de NaCl, 3 g de KH₂HPO₄, 1 g de NH₄Cl, 246.5 mg de MgSO₄, 14.7 mg de CaCl₂, 10 µg de Vitamina B1. La glucosa se adicionó como única fuente de carbono.
- **Medio YENB:** Medio de cultivo líquido bajo en sales utilizado para la preparación de células electrocompetentes. La composición por litro es de: 7.5 g de extracto de levadura y 8 g de caldo nutritivo.
- **Medio SOB:** Medio de cultivo líquido utilizado para el crecimiento bacteriano en la inactivación de genes cromosomales utilizando fragmentos de PCR (apartado VI.IV.I). Este medio se compone, por litro, de: 20 g de peptona trípica de caseína, 5 g de extracto de levadura, 0.58 g de NaCl, 0.19 g de KCl y 20 mM de MgCl₂ + MgSO₄.
- **Medio SOC:** Medio de cultivo que se utilizó como medio de recuperación de las células después de la electroporación. Su composición por litro es de: 20 g de bactotripton, 5 g de extracto de levadura, 2.5 g de MgSO₄, 2 g de MgCl₂, 0.58 g de NaCl y 93.18 g de KCl.

VI.II.II Antibióticos

Los diferentes medios de cultivo, en caso de ser necesario, se suplementaron con antibióticos para el mantenimiento de los plásmidos.

- **Ampicilina (Ap):** se preparó una solución concentrada a 100 mg/ml.
- **Carbamicina (Cb):** se preparó a una concentración de 100 mg/ml.
- **Kanamicina (Km):** la solución concentrada se preparó a 30 mg/ml.
- **Tetraciclina (Tc):** se preparó a una concentración de 30 mg/ml.
- **Cloramfenicol (Cm):** se preparó a una concentración de 30 mg/ml.

VI.III Método de transferencia genética

VI.III.I Transformación bacteriana.

La incorporación de DNA a células de *E. coli* se llevó a cabo por electroporación.

Obtención de células competentes: Se creció un preinóculo de la cepa deseada en medio YENB y se incubó a 37°C por 12 horas. Se inoculó el medio YENB con el preinóculo y se incubó nuevamente hasta que las células alcanzaron una DO_{600} entre 0.5 y 0.9. Las células se recolectaron por centrifugación (4000 rpm, 10 min) a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla de células dos veces con agua fría. Finalmente las células se resuspendieron en glicerol al 10%.

Electroporación: Se mezclaron alícuotas de 50 μ l de células con 1-5 μ l de la suspensión con el DNA y a continuación se depositó entre los dos electrodos de la cubeta de electroporación. El electroporador utilizado en este caso fue marca Eppendorf modelo 2510, con las siguientes condiciones de electroporación: temperatura a 4°C, modo de resistencia de alto voltaje de 600 Ω , voltaje de la descarga de 2,500 V y una duración del pulso de 5 msec.

Una vez realizada la descarga eléctrica se añadió 1 ml de medio SOC y se incubó a 37°C durante una hora para permitir la expresión de los genes de resistencia a antibióticos. Las células transformadas se seleccionaron en medio sólido suplementado con el antibiótico correspondiente.

VI.IV Método de mutagénesis bacteriana.

VI.IV.I Inactivación de genes cromosomales usando productos de PCR.

Este método permitió la sustitución del gen *tyrR*, localizado en cromosoma, por un gen que codifica para un casete de resistencia al antibiótico Cm flanqueado por sitios FRT, obtenido por PCR (Datsenko y Wanner, 2000). Para amplificar el casete de resistencia a Cm se diseñaron oligonucleótidos con extremos idénticos al principio y fin del gen *tyrR*. Estos extremos permitieron la recombinación mediante el sistema de recombinasa Red, proveído antes a las cepas W3110 y VH33, en las regiones flanqueantes al gen *tyrR*. Una vez llevado a cabo el evento de recombinación, las mutantes se seleccionan por resistencia al antibiótico. Finalmente fue posible eliminar el casete de resistencia al antibiótico mediante un plásmido que expresa la recombinasa FLP, actuando sobre los sitios FRT adyacentes al gen de resistencia (Figura 8).

VI.IV.I.I Generación del fragmento de PCR

El plásmido pKD3 se utilizó como templado para amplificar, por PCR, el casete de resistencia a Cm. Para ello se diseñaron dos oligonucleótidos con una región de 22 pb idéntica al plásmido pKD3 (secuencias P1 y P2), y una región de 50 pb con identidad al gen *tyrR* (secuencias H1 y H2) (Figura 9). El tamaño final y la secuencia de los oligonucleótidos se detallan a continuación:

Nombre	Secuencia	Tamaño
TyrR_Fw	5' GTG TCA TAT CAT CAT ATT AAT TGT TCT TTT TTC AGG TGA AGG TTC CCA TGG TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG 3'	72 pb
TyrR_Rv	5' TGG TGT TGC ACC ATC AGG CAT ATT CGC GCT TAC TCT TCG TTC TTC TTC TGC ATA TGA ATA TCC TCC TTA G 3'	70 pb

Estos oligonucleótidos permitieron amplificar un producto de PCR de 1,241 pb correspondientes al casete de resistencia a Cm flanqueado por los sitios FRT (ver Resultados, apartado VII.I.I). Después de la amplificación, el producto de PCR se purificó por kit (apartado VI.V.III).

VI.IV.I.II Preparación de células competentes.

Las cepas W3110 y VH33 se transformaron con el plásmido pKD46, el cual contiene genes del sistema de recombinasa Red del fago λ bajo el control de un promotor inducible por L-arabinosa. Este plásmido es resistente a carbenicilina (Cb, 100 μ g/ml) y presenta un origen de replicación termosensible que puede ser eliminado fácilmente a 43°C. La recombinasa Red, además de favorecer la recombinación

inhibe a la exonucleasa V, permitiendo así la entrada a la célula de un fragmento de PCR sin que éste sea digerido.

Ambas cepas, previamente transformadas con el plásmido pKD46, se crecieron a 30°C en medio SOB suplementado con Cb (100 µg/ml) y 10 mM de arabinosa para la inducción. Una vez alcanzada la fase exponencial (DO₆₀₀ 0.6), se cosecharon las células por centrifugación (8,000 rpm, 10 min) y se lavaron tres veces con agua fría. Finalmente las células se concentraron en agua fría y se mantuvieron en hielo hasta el momento de la electroporación.

Se utilizaron alícuotas de 50 µl de células competentes para electroporar con 4-5 µl del producto de PCR previamente purificado. La selección de las mutantes se llevó a cabo en medio sólido LB suplementado con Cm (30µg/ml) a 37°C. El resto de las transformantes se incubaron a temperatura ambiente hasta el siguiente día. Pasado ese tiempo se sembraron en el mismo medio sólido y se incubaron por 24 hrs. Las colonias se replicaron en placas de LB suplementadas con Cm y Cb y se incubaron a 42°C para eliminar el plásmido pKD46 termosensible.

Para verificar que se llevó a cabo el evento de recombinación y que, por lo tanto, el gen *tyrR* se substituyó por el casete de resistencia a Cm, se realizaron ampliaciones por PCR con oligonucleótidos diseñados fuera de la región interrumpida y dentro del casete de resistencia a Cm (Resultados, apartado VII.I.I). A continuación se detalla la secuencia y tamaño de los oligonucleótidos:

	Nombre	Secuencia	Tamaño
Fw	TyrR5	5' GGT GCT GAC CGG ATA TCT TTA CG 3'	23 pb
Rv	TyrR3	5' GGT GTG GCA ATT GCT GAT GG 3'	20 pb
Rv	pKD3_Cm	5' GGT GGT ATA TCC AGT GAT TTT TTT CCA T 3'	28 pb

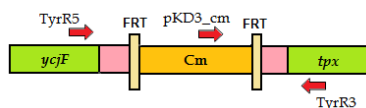


Figura 8. Representación de los oligonucleótidos diseñados para comprobar la sustitución del gen *tyrR* por el casete de Cm.

VI.IV.I.III Eliminación de la resistencia al antibiótico

Una vez comprobada la sustitución del gen *tyrR* por PCR, se eliminó el casete de resistencia a Cm al transformar con el plásmido pCP20 el cual codifica para la recombinasa FLP, resistente a ampicilina (Ap), y con origen de replicación termosensible. Las transformantes se sembraron en medio sólido con Ap y se incubaron a 30°C durante 16 horas. Las colonias recuperadas se sembraron en medio sólido no selectivo a 42°C para favorecer la pérdida del plásmido. Se hicieron sucesivas estrías a 42°C en medio sólido para asegurar la eliminación del plásmido. Finalmente se comprobó por PCR la eliminación en cromosoma del casete de resistencia a Cm (ver Resultados, apartado VII.I.I).

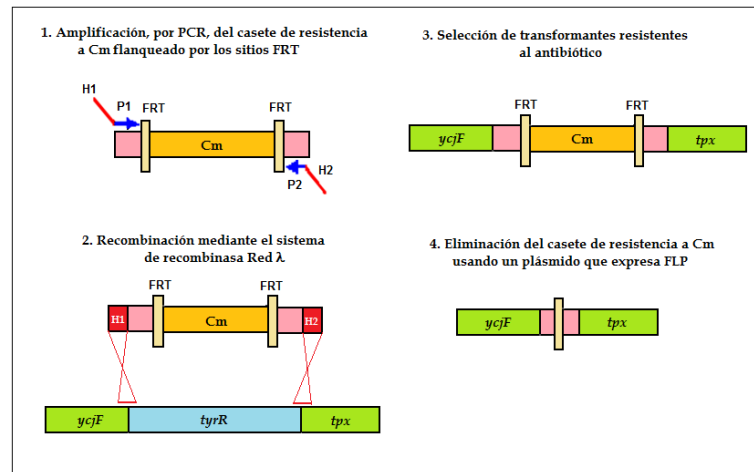


Figura 9. Representación del proceso de mutagénesis. P1 y P2: región idéntica al plásmido pkD3, H1 y H2: región idéntica al gen *tyrR*.

VI.V Técnicas de análisis de ácidos nucleicos

VI.V.I Extracción de DNA

VI.V.I.I Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo por el método de lisis alcalina (Rodríguez y Tait, 1983).

VI.V.I.II Extracción de DNA plasmídico por kit comercial

Cuando el DNA plasmídico se requería muy limpio para digestiones de restricción, aislamiento de DNA de gel o secuenciación, se utilizó el kit comercial “PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit” de Invitrogen.

VI.V.I.III Extracción de DNA cromosomal

La extracción y purificación de DNA cromosomal se llevó a cabo utilizando el kit comercial “Ultraclean Microbial Genomic DNA isolation” de MO BIO laboratorios (www.mobio.com).

VI.V.II Uso de enzimas de restricción y ligasa

Para el uso de enzimas de restricción, la ligasa T4 u otros enzimas modificantes, se utilizaron buffers suministrados con las enzimas, y se siguieron las indicaciones proporcionadas por el fabricante. Después del tratamiento con las diversas enzimas el DNA se purificó por el kit comercial “PureLink PCR purification” de Invitrogen.

VI.V.III Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de fragmentos de DNA por PCR se utilizó la “Elongase enzyme mix” de Invitrogen. El volumen de las reacciones fue generalmente de 50µl. Se utilizó como templado DNA plasmídico o cromosomal previamente purificado.

Las condiciones de amplificación variaron en la temperatura de alineamiento y el tiempo de extensión, según el tamaño del fragmento a amplificar y los oligonucleótidos utilizados: 1 ciclo de desnaturalización Pre-amplificación a 94°C por 5 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 56°C por 1 min y extensión a 68°C por 2 min; un ciclo adicional de extensión a 68°C por 8 min.

Para la amplificación se utilizó el termociclador RoboCycler Gradient 96 marca Stratagene. Los productos de PCR obtenidos se analizaron mediante electroforesis por gel de agarosa. Cuando el DNA obtenido se utilizó para restricción, ligación o modificación, se procedió a la purificación del mismo mediante el kit comercial “High Pure PCR Product Purification Kit” de ROCHE.

VI.V.IV Electroforesis de DNA

El DNA se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa a una concentración de 1% en buffer TBE 1X y una tinción con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio para su visualización (Sambroock *et al.*,1989). La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta horizontal Mini modelo MGU-200T de Scientific CO, aplicando un voltaje de 80 a 100 V. Los geles se visualizaron en un analizador de imagen Eagle eye II de Stratagene. Tanto para determinar el tamaño como para cuantificar el DNA presente en una muestra, se cargó en los geles 0.1 µg de DNA de un marcador de peso molecular conocido. En este caso se utilizó el marcador O’GeneRuler 1kb DNA Ladder que presenta los fragmentos siguientes:

Marcador	Tamaño de los fragmentos (pb)
O’GeneRuler 1kb	10,000 8,000 6,000 5,000 4,000 3,500 3,000 2,500 2,000 1,500 1,000 750 500 250

VI.V.V Aislamiento de DNA digerido a partir de geles de agarosa

Este método se utilizó cuando después de una restricción, se necesitaron fragmentos específicos de DNA y, en ocasiones, a partir de una amplificación por PCR donde existían bandas inespecíficas. Después de una electroforesis en gel de agarosa, el DNA se visualizó con la ayuda de un transiluminador a baja intensidad (Foto/Prep II de Fotodyne). Se recortó el fragmento de agarosa y se procedió a la purificación por el kit “Gel extraction systems” de Marligen Bioscience y, en algunos casos, se utilizó el kit “DNA Clean-up & Concentrator” de Zymo Research para concentrar el DNA.

VI.VI Construcción del plásmido pTrchpaBC

El plásmido pTrchpaBC se construyó al ligar un fragmento de 2,127 pb correspondiente al operón *hpaBC* con un fragmento de 4,155 pb originado de la doble digestión del plásmido pTrc99A, dejando al operón *hpaBC* bajo el control del promotor fuerte *trc*, el cual es inducible por IPTG. Para la construcción se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR del operón *hpaBC* utilizando como templado el DNA cromosomal de la cepa *E. coli* W. Los oligonucleótidos se diseñaron de tal manera que presentaran una región de 22 pb idéntica al operón *hpaBC* y una región de 7 pb cuya secuencia presentara sitios de restricción para el corte con las enzimas *EcoRI* (Fw) y *BamHI* (Rv), detallados a continuación:

Sentido	Nombre	Secuencia	Tamaño
Fw	5' <i>EcoRI</i> _HpaBC	GGA ATT CCT GTA GAG GTC GAC ATG AAA CC	29 pb
Rv	3' <i>BamHI</i> _HpaBC	CGG ATC CGA AGG GGC TGG AGC TTA AAT CG	29 pb

Después de realizar la doble digestión del producto de PCR y del vector de clonación pTrc99A, con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*, se llevó a cabo la reacción de ligación con la enzima T4 ligasa de Biolabs para generar el plásmido pTrchpaBC (Figura 10). Posteriormente se purificó para transformar la cepa *E. coli* XL1-Blue. Después de la electroporación y de la recuperación, se sembró en cajas de LB suplementadas con 100 µg/ml de Cb y se incubó a 37°C. Se estirió nuevamente para la obtención de colonias aisladas y se seleccionaron diez de éstas que presentaron resistencia al antibiótico como candidatas.

Digestiones de comprobación: De las colonias seleccionadas se extrajo DNA plasmídico y se llevó a cabo la reacción de digestión con la enzima *EcoRV* para comprobar la construcción. Todas presentaron el patrón de restricción deseado (ver Resultados, apartado VII.III).

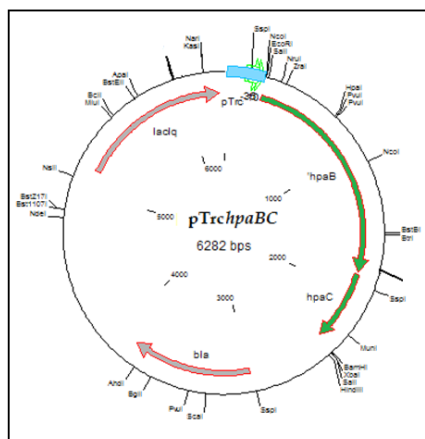


Figura 10. Representación del plásmido construido pTrchpaBC

Secuenciación de *hpaBC*: Se llevó a cabo el diseño de oligonucleótidos para amplificar y secuenciar el operón *hpaBC* del plásmido pTrch*hpaBC* extraído de tres de las colonias candidatas y comparar contra la secuencia del operón *hpaBC* del DNA cromosomal de la cepa *E. coli* W, con el fin de comprobar la identidad del operón clonado.

VI.VII Construcción del plásmido pTrch*hpaBC*Trctyr*CpheA*_{CM}

Se construyó un nuevo plásmido al ligar el operón *tyrCpheA*_{CM} con el plásmido pTrch*hpaBC* previamente construido. Se utilizaron las enzimas *PvuII* y *ScaI* para obtener, del plásmido pTrctyr*CpheA*_{CM}, el inserto *tyrCpheA*_{CM} bajo el promotor *trc*, y la enzima *PvuII* para cortar y linearizar el plásmido pTrch*hpaBC* utilizado como vector (Figura 11).

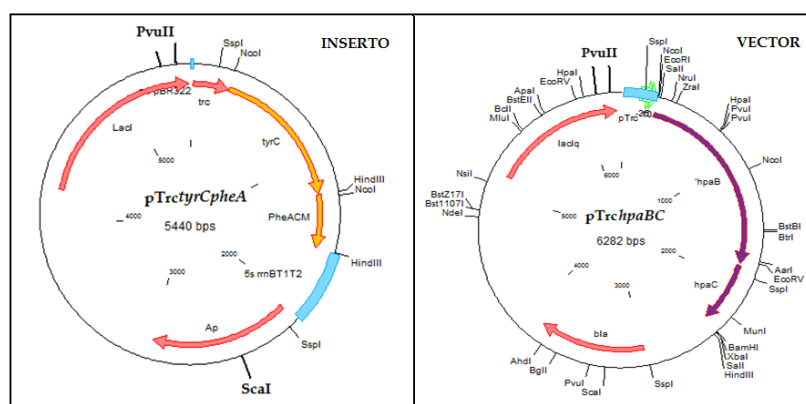


Figura 11. Plásmidos utilizados para obtener el vector e inserto en la construcción del plásmido pTrch*hpaBC*Trctyr*CpheA*.

Tanto el vector pTrch*hpaBC*, digerido con *PvuII*, como el inserto Trctyr*CpheA* obtenido por doble digestión con *PvuII* y *ScaI*, se purificaron por gel (apartado VI.V.V). Se llevó a cabo la reacción de ligación para generar el plásmido pTrch*hpaBC*Trctyr*CpheA*_{CM}, dejando cada operón bajo el control de su propio promotor *trc*. Se purificó el producto de la ligación para transformar la cepa *E. coli* XL1-Blue. Después de la electroporación y recuperación, se sembró en cajas de LB suplementadas con 100 µg/ml de Cb y se incubó a 37°C. Se estrió nuevamente en cajas de LB con Cb¹⁰⁰ para obtener colonias aisladas, de las cuales se seleccionaron veinte como candidatas al presentar resistencia al antibiótico.

Digestiones de comprobación: De las colonias seleccionadas se extrajo DNA plasmídico y se llevó a cabo la reacción de digestión con la enzima *BamHI*, *BglIII* y *NcoI* (ver Resultados, apartado VII.IV.I)

VI.VIII Condiciones de cultivo

Todas las cepas stock se almacenaron a -70°C en medio LB con 50% de glicerol.

VI.VIII.I Cultivos para comprobar la expresión del operón *hpaBC* clonado en *pTrchpaBC* en la producción de L-DOPA.

Para comprobar la adecuada expresión del operón *hpaBC* en el plásmido construido *pTrchpaBC*, se llevaron a cabo cultivos con la adición de L-Tyr exógena para la producción de L-DOPA siguiendo la metodología descrita por Lee (1998).

Preinóculo: Del stock almacenado a -70°C , se estrió la cepa XL1-Blue/*pTrchpaBC* en cajas de LB suplementado con 100 μg de Cb y se incubó a 37°C por 12 hrs. Las células se resuspendieron en 1 ml de LB para ser usadas en la preparación del inóculo.

Inóculo: Se tomó el volumen necesario del preinóculo para subcultivar 50 ml de LB suplementado con 100 μg de Cb contenido en matraces con deflectores de 250 ml, e iniciar a una DO_{600} de 0.1. Los inóculos se incubaron a 37°C y 300 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de 0.8 para la inducción con 0.1 mM de IPTG y se incubó por 3 hrs más. Las células se recolectaron por centrifugación a 5,000 rpm por 20 min y se lavaron dos veces con buffer Tris-HCl (20 mM, pH 8) para ser usadas como inóculo de los cultivos.

Cultivo: Las células obtenidas del inóculo se resuspendieron en matraces de 250 ml conteniendo 25 ml de buffer Tris-HCl (100mM, pH 8). Se adicionó L-Tyr a una concentración de 3mM y se incubó por 1 hr a 37°C con agitación de 120 rpm. La reacción se detuvo al remover las células por centrifugación a 10,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se acidificó con 5 μl de HCl 5N y se guardó a 4°C para el análisis.

VI.VIII.II Cultivos para la producción de L-Tyr o L-DOPA

En los cultivos de producción se utilizó medio mínimo M9 suplementado con glucosa como única fuente de carbono.

VI.VIII.III Cultivo para la producción de L-Tyr

Preinóculo: Las cepas W3110_TIR, VH33_TIR, W3110 ΔtyrR _TIR y VH33 ΔtyrR _TIR se crecieron en cajas de LB suplementadas con 100 μg de Cb y 30 μg de Tc. Las cajas se incubaron a 37°C por 12 hrs. Las células se resuspendieron en 1 ml de LB para ser usadas en la preparación del inóculo.

Inóculo: Las células obtenidas del preinóculo se subcultivaron en matraces con deflectores de 250 ml conteniendo 20 ml de medio M9 suplementado con 2 g/l de glucosa y se adicionó 100 µg de Cb y 30 µg de Tc para el mantenimiento de los plásmidos. Se inició a una DO_{600} de 0.1 y se incubó a 37°C y 300 rpm. Una vez que las células alcanzaron 1 DO_{600} se cosecharon por centrifugación (5,000 rpm, 5 min) y se resuspendieron en 5 ml de medio M9 para ser usadas como inóculo en los cultivos de producción.

Cultivo: El medio para los cultivos de producción fue el mismo que el utilizado en los inóculos pero en este caso la glucosa se utilizó a una concentración de 10 g/l y se adicionó IPTG a una concentración de 0.1 mM para la inducción de los genes *aroG^{fbt}tkA* y *tyrCpheA_{CM}*. De los inóculos se tomó el volumen necesario para inocular 50 ml del medio de cultivo e iniciar a una DO_{600} de 0.1. Se tomó muestra cada 2 horas por un periodo de 12 horas después de las cuales se tomó muestra cada 6 horas hasta completar un total de 50 horas. Las muestras se acidificaron con 15 µl de HCl 5N y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se recuperaron por centrifugación a 11,000 rpm por 5 min y se guardaron a 4°C para el análisis.

VI.VIII.II.II Cultivo para la producción de L-DOPA

Preinóculo: Las cepas W3110 Δ *tyrR*_DOPA y VH33 Δ *tyrR*_DOPA se crecieron en cajas de LB suplementadas con 100 µg de Cb y 30 µg de Tc. Se incubó a 37°C por 12 hrs. Las células se resuspendieron en 1 ml de LB para la preparación del inóculo.

Inóculo: Los preinóculos se subcultivaron en matraces con deflectores de 250 ml conteniendo 100 ml de medio LB con 10 g/l de glucosa; se adicionó 100 µg de Cb y 30 µg de Tc para el mantenimiento de los plásmidos. Se inició a una DO_{600} de 0.1 y se incubó a 37°C y 250 rpm. Después de 1.5 hrs, se adicionó IPTG a una concentración 0.1 mM para la inducción de los genes *aroG^{fbt}tkA* y *hpaBCtyrCpheA_{CM}*. Se dejó crecer por tres horas más después de la inducción. Las células se recolectaron por centrifugación (6,000 rpm, 20 min) a 4°C y se lavaron dos veces con M9 para ser usadas como inóculo en los cultivos de producción.

Cultivo: Las células obtenidas del inóculo se resuspendieron en 35 ml de medio M9 suplementado con 10 g/l de glucosa como única fuente de carbono y se adicionó cloramfenicol (50 µg/ml) para arrestar el crecimiento celular. Los cultivos se iniciaron a una concentración de biomasa de 1 ± 0.2 g/l y se incubó a 37°C y 120 rpm. Se tomó muestra cada 2 horas por un periodo de 10 hrs después de las cuales se tomó muestra cada 6 hrs hasta completar un total de 50 hrs. Se adicionó ácido ascórbico (0.15 g/l) a las 0, 10 y 25 hrs. Las muestras se acidificaron con 15 µl de HCl 5N y se incubaron

por 30 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se recuperaron por centrifugación a 12,000 rpm por 5 min y guardados a 4°C para el análisis.

VI.IX Métodos analíticos

De los cultivos se tomaron muestras de 1.5 ml periódicamente y se centrifugaron a 11,000 rpm por 5 min (Eppendorf 5410) para remover las células. Los sobrenadantes se colectaron y se filtraron con membranas de 0.45 μm , y se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

VI.IX.I Determinación de biomasa

La concentración de la biomasa se determinó en función de la turbidez midiendo la densidad óptica (absorbancia a 600 nm) en un espectrofotómetro marca Beckman DU-70 (Palo Alto, CA). La DO se convirtió a peso seco de células (DCW: dry cellular weight) considerando que 1 $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.37 \text{ g}_{\text{DW}}/\text{L}$ (Hernandez-Montalvo *et al.*, 2003).

VI.IX.II Cuantificación de los metabolitos excretados mediante HPLC

Se determinaron los metabolitos de los sobrenadantes utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detectores de índice de refracción y de arreglo de fotodiodos (Waters, Milford, MA). Además se utilizó un sistema de HPLC conectado a un detector de masas (ESIMCHPLC) modelo Agilent 1100.

VI.IX.III Determinación de glucosa, ácidos orgánicos e intermediarios de la vía de aromáticos.

La determinación de glucosa, ácido acético, DHS y SHIK se llevó a cabo por cromatografía isocrática empleando un equipo HPLC con una columna tipo Aminex HPX-87H (300x7.8 mm; Bio-Rad, Hercules, CA), utilizando como fase móvil H_2SO_4 5mM, a un flujo de 0.5 ml/min y a una temperatura de 50°C. Bajo estas condiciones la glucosa y el ácido acético se detectaron por índice de refracción. Los otros metabolitos se identificaron por un detector de arreglo de fotodiodos: a 235 nm para DHS y 210 nm para SHIK. Adicionalmente, la determinación de glucosa se llevó a cabo por el método de azúcares reductores del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS; Chaplin y Kennedy, 1987).

VI.IX.IV Determinación de aminoácidos aromáticos

Para la determinación de L-Tyr y L-DOPA se utilizó un sistema HPLC modelo Agilent 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipado con una columna Phenomenex Synergy Hydro C₁₈ (150x 4.6 mm; 4µm, Torrance, CA) unido a un sistema de detección de espectrometría de masas de electroespray (ESIMCHPLC). Las muestras se eluyeron con metanol 10% en ácido acético 0.1% en agua a un flujo de 0.5 ml/min. La detección se hizo por arreglo de diodos a 220 nm. Con este sistema se llevó a cabo la cuantificación.

VI.X Cálculo de parámetros cinéticos

Para la caracterización de las cepas, los parámetros que se evaluaron fueron: velocidad específica de crecimiento (μ), el rendimiento de biomasa en glucosa ($Y_{\text{Biom}/\text{Glc}}$), la velocidad específica de consumo de glucosa (q_{Glc}), la tasa específica de producción o productividad específica (q_p) y el rendimiento de producto en glucosa (Y_p/Glc). La μ y $Y_{\text{Biom}/\text{Glc}}$ fueron calculados durante la fase de crecimiento exponencial. Las productividades específicas y rendimientos de producto a partir de glucosa fueron calculadas en la fase estacionaria considerando solamente la etapa de producción, definida como el periodo de tiempo en el que se detecta el producto hasta el punto en el que se observa un decremento en la acumulación del mismo. Los cultivos se hicieron por duplicado en tres experimentos independientes. Los valores reportados representan los valores promedio y su error experimental.

VII. RESULTADOS

VII.I Generación de las cepas productoras de L-Tyr.

VII.I.I Inactivación cromosomal del gen *tyrR*

Para eliminar la regulación transcripcional de genes relevantes involucrados en la síntesis de L-Tyr, se llevó a cabo la inactivación cromosomal del gen *tyrR* en las cepas de *E. coli* W3110 y VH33 por un método basado en la utilización de productos de PCR (ver Materiales y Métodos, apartado VI.IV.I). La amplificación, por PCR, del casete de resistencia a Cm con extremos idénticos al gen *tyrR* generó un producto de 1,241 pb (Figura 12).

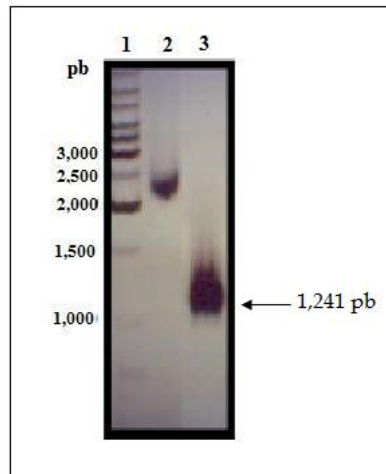


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR al amplificar el casete de resistencia a Cm. Carril 1, 1Kb DNA Ladder O'GeneRule como marcador de tamaño; Carril 2, plásmido templado pKD3; Carril 3, producto de PCR que contiene el casete de resistencia a Cm. La flecha indica el tamaño aproximado de 1, 241 pb.

Después de transformar con el producto de PCR las cepas W3110/pKD46 y VH33/pKD46 (expresando el sistema de recombinasa Red) y sembrarlas en medio selectivo, el mismo día se observó el crecimiento de pocas colonias (5 colonias por 200 μ l de cultivo). Del resto de las células que se mantuvieron a temperatura ambiente por toda la noche, y sembradas al día siguiente, se obtuvieron la mayoría de las mutantes potenciales. De las colonias seleccionadas como mutantes potenciales (Cm^R) se verificó, por PCR, la inactivación del gen *tyrR* con las parejas de oligonucleótidos TyrR5-TyrR3 y pKD3_{cm}-TyrR3 cuyos tamaños obtenidos fueron de 1,360 pb y 519 pb, respectivamente. Como control se amplificó el gen *tyrR* de la cepa silvestre W3110 con los oligonucleótidos TyrR5-TyrR3, obteniendo un producto de 1,880 pb (Figura 13, Carril 4).

A las cepas generadas, una vez que se verificó la mutación, se les nombró W3110 Δ *tyrR*::Cm y VH33 Δ *tyrR*::Cm.

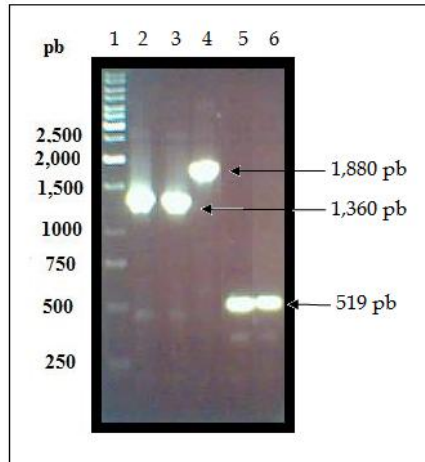


Figura 13. Electroforésis en gel de agarosa de los productos de PCR para verificar la inactivación del gen *tyrR*. Carril 1, 1Kb DNA Ladder O'GeneRule como marcador de tamaño; Carril 2, PCR de W3110 Δ *tyrR*::Cm con oligos TyrR5-TyrR3; Carril 3, PCR de VH33 Δ *tyrR*::Cm con oligos TyrR5-TyrR3; Carril 4, PCR de W3110 con oligos TyrR5-TyrR3 (control); Carril 5, PCR de W3110 Δ *tyrR*::Cm con oligos pKD3_Cm-TyrR3; Carril 6, PCR de VH33 Δ *tyrR*::Cm con oligos pKD3_Cm-TyrR3.

Finalmente, se eliminó el casete de resistencia a Cm con ayuda del plásmido pCP20, lo cual se comprobó por PCR utilizando los oligonucleótidos TyrR5-TyrR3. El tamaño obtenido del producto de PCR fue de 358 pb aproximadamente (Figura 14). Una vez eliminado el casete de resistencia, las cepas se nombraron W3110 Δ *tyrR* y VH33 Δ *tyrR*.

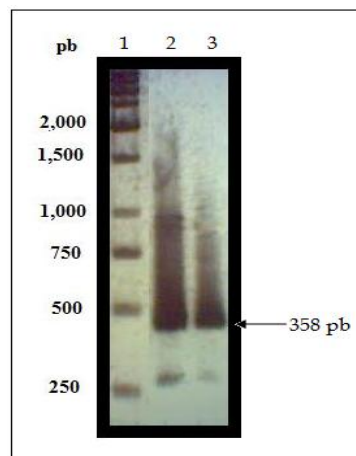


Figura 14. Electroforésis en gel de agarosa de los productos de PCR para verificar la eliminación del casete de resistencia a Cm. Carril 1, 1Kb DNA Ladder O'GeneRule como marcador de tamaño; Carril 2, PCR de W3110 Δ *tyrR* con oligos TyrR5-TyrR3; Carril 3, PCR de VH33 Δ *tyrR* con oligos TyrR5-TyrR3. La flecha indica el tamaño aproximado de 358 pb.

VII.II Expresión de una transcetolasa y una versión insensible a inhibición de la DAHPS y de la CM/PDH (*tktA*, *aroG^{fbr}*, *tyrCpheA_{CM}*).

Una vez obtenidas las cepas mutantes en el gen *tyrR* ($\Delta tyrR$), se transformaron las cepas de *E. coli* W3110, VH33, W3110 $\Delta tyrR$ y VH33 $\Delta tyrR$ con el plásmido pJLBaroG^{fbr}*tktA* que contiene el gen *aroG^{fbr}*, el cual codifica para una DAHPS insensible a retroinhibición (fbr), y el gen *tktA*, que codifica para una transcetolasa; y con el plásmido pTrctyrC*pheA_{CM}*, que contiene el gen *tyrC* que codifica para la ciclohexadienil deshidrogenasa de *Z. mobilis* y un fragmento del gen *pheA* (*pheA_{CM}*), que codifica para el dominio corismato mutasa (CM) de la enzima CM/PDT (reconstruyendo una variante insensible a inhibición por L-Tyr de la enzima CM/PDH). Con esto se generaron las cepas W3110_TIR, VH33_TIR, W3110 $\Delta tyrR$ _TIR y VH33 $\Delta tyrR$ _TIR (ver Materiales y Métodos, apartado VI.II).

VII.II Caracterización de las cepas productoras de L-Tyr

De las cepas W3110_TIR, VH33_TIR, W3110 $\Delta tyrR$ _TIR y VH33 $\Delta tyrR$ _TIR se evaluaron los parámetros cinéticos y de producción de L-Tyr realizando cultivos en matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de medio M9 suplementado con 10 g/l de glucosa e IPTG 0.1 mM para la inducción de los genes *aroG^{fbr}*, *tyrC* y *pheA_{CM}* (ver Materiales y Métodos, apartado VI.VIII.II).

En la tabla 4 se muestran: la velocidad específica de crecimiento (μ), el rendimiento de biomasa en glucosa (Y_{Biom}/Glc), la velocidad específica de consumo de glucosa (q_{Glc}), la tasa específica de producción de L-Tyr o productividad específica (q_{L-Tyr}) y el rendimiento de producción de L-Tyr a partir de glucosa (Y_{L-Tyr}/Glc), así como los valores del título (g_{L-Tyr}/L) (Apéndice).

Tabla 4. Parámetros cinéticos y de producción de L-Tyr de las cepas TIR

Cepas	μ (h ⁻¹)	Y_{Biom}/Glc	q_{Glc}	q_{L-Tyr}	Y_{L-Tyr}/Glc	g_{L-Tyr}/L
W3110_TIR (PTS)	0.53 ±0.02	0.36 ±0.01	0.37 ±0.02	0.012 ±0.002	0.0314 ±0.002	0.15 ±0.02
W3110 $\Delta tyrR$ _TIR (PTS $\Delta tyrR$)	0.40 ±0.02	0.24 ±0.02	0.47 ±0.02	0.020 ±0.002	0.041 ±0.002	0.22 ±0.03
VH33_TIR (PTS ⁻ Glc ⁺)	0.21 ±0.02	0.54 ±0.02	0.28 ±0.02	0.033 ±0.003	0.12 ±0.020	0.22 ±0.02
VH33 $\Delta tyrR$ _TIR (PTS ⁻ Glc ⁺ $\Delta tyrR$)	0.1 ±0.01	0.14 ±0.02	0.18 ±0.03	0.065 ±0.004	0.36 ±0.030	0.15 ±0.03

En los resultados se observó que las cepas con el fondo PTS⁻Glc⁺ y PTS⁻Glc⁺ $\Delta tyrR$ mostraron las menores tasas de crecimiento al comparar con las cepas PTS y PTS $\Delta tyrR$ (Tabla 4). La velocidad específica de crecimiento disminuyó de manera considerable en las cuatro cepas al ser transformadas con ambos plásmidos, siendo más drástico en las cepas con el fondo PTS⁻Glc⁺ y PTS⁻Glc⁺ $\Delta tyrR$ cuya disminución fue del 58% y 80% respectivamente, mientras que en las cepas PTS y PTS $\Delta tyrR$ la

disminución fue del 23% y 38% (Figura 15). Este decremento puede deberse al efecto de carga metabólica y/o a la presencia del gen *tyrC* como se había observado antes por Chávez-Bejar *et al.* 2008. Así también se observó una disminución en el crecimiento al comparar cada cepa con su derivada $\Delta tyrR$, siendo del 24% en la cepa W3110 $\Delta tyrR$ _TIR con respecto a la cepa W3110_TIR y del 52% en la cepa VH33 $\Delta tyrR$ _TIR con respecto a la cepa VH33_TIR. Estos resultados mostraron que, al expresar los genes que se encuentran en los plásmidos, el efecto negativo en el crecimiento es mayor en las cepas que carecen del gen *tyrR*.

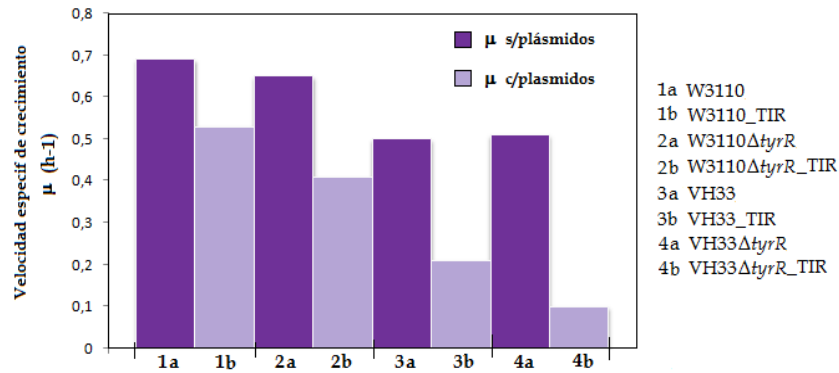


Figura 15. Velocidades específicas de crecimiento (μ) de las cepas con y sin plásmidos.

Las tasas específicas de consumo de glucosa (q_{Glc}) se calcularon de los datos de concentración de biomasa y glucosa. La q_{Glc} para las cepas W3110_TIR y W3110 $\Delta tyrR$ _TIR fue de 0.37 ± 0.02 y 0.47 ± 0.02 $g_{Glc}/gDW \cdot h$ respectivamente, mientras que en las cepas VH33_TIR y VH33 $\Delta tyrR$ _TIR la q_{Glc} disminuyó a 0.28 ± 0.02 y 0.18 ± 0.03 $g_{Glc}/gDW \cdot h$. Las cepas PTS⁻Glc⁺ y PTS⁻Glc $\Delta tyrR$ mostraron una disminución significativa en la tasa específica de consumo de glucosa correspondiendo a un decremento del 24% y 62% con respecto a las cepas PTS y PTS $\Delta tyrR$. Se ha medido la capacidad de transportar glucosa en mutantes PTS⁻Glc⁺ reportando un decremento de 42% (Báez *et al.*, 2001). Como se muestra en la figura 16B, las cepas W3110_TIR y W3110 $\Delta tyrR$ _TIR consumieron la glucosa casi por completo a las 30 hrs, lo cual no sucede para el caso de las cepas VH33_TIR y VH33 $\Delta tyrR$ _TIR, cuyo consumo de glucosa es mínimo.

Para analizar como influyó la eliminación de *tyrR* en el consumo de glucosa, se comparó cada una de las cepas con su derivada $\Delta tyrR$. Por su parte la cepa W3110 $\Delta tyrR$ _TIR presentó un aumento del 27% en la q_{Glc} con respecto a la cepa W3110_TIR; caso contrario a lo observado en la cepa VH33 $\Delta tyrR$ _TIR donde la q_{Glc} fue menor en un 36% que la cepa VH33_TIR (Figura 17A).

El único ácido orgánico que se midió fue el acético. La acumulación de acetato en las cepas PTS y $PTS\Delta tyrR$ fue significativamente mayor que en sus derivadas PTS^+Glc^+ y $PTS^+Glc^+ \Delta tyrR$ (Figura 16C). Se ha reportado que las cepas PTS^+Glc^+ excretan una menor cantidad de acetato con respecto a las cepas PTS (Sigüenza *et al.*, 1999).

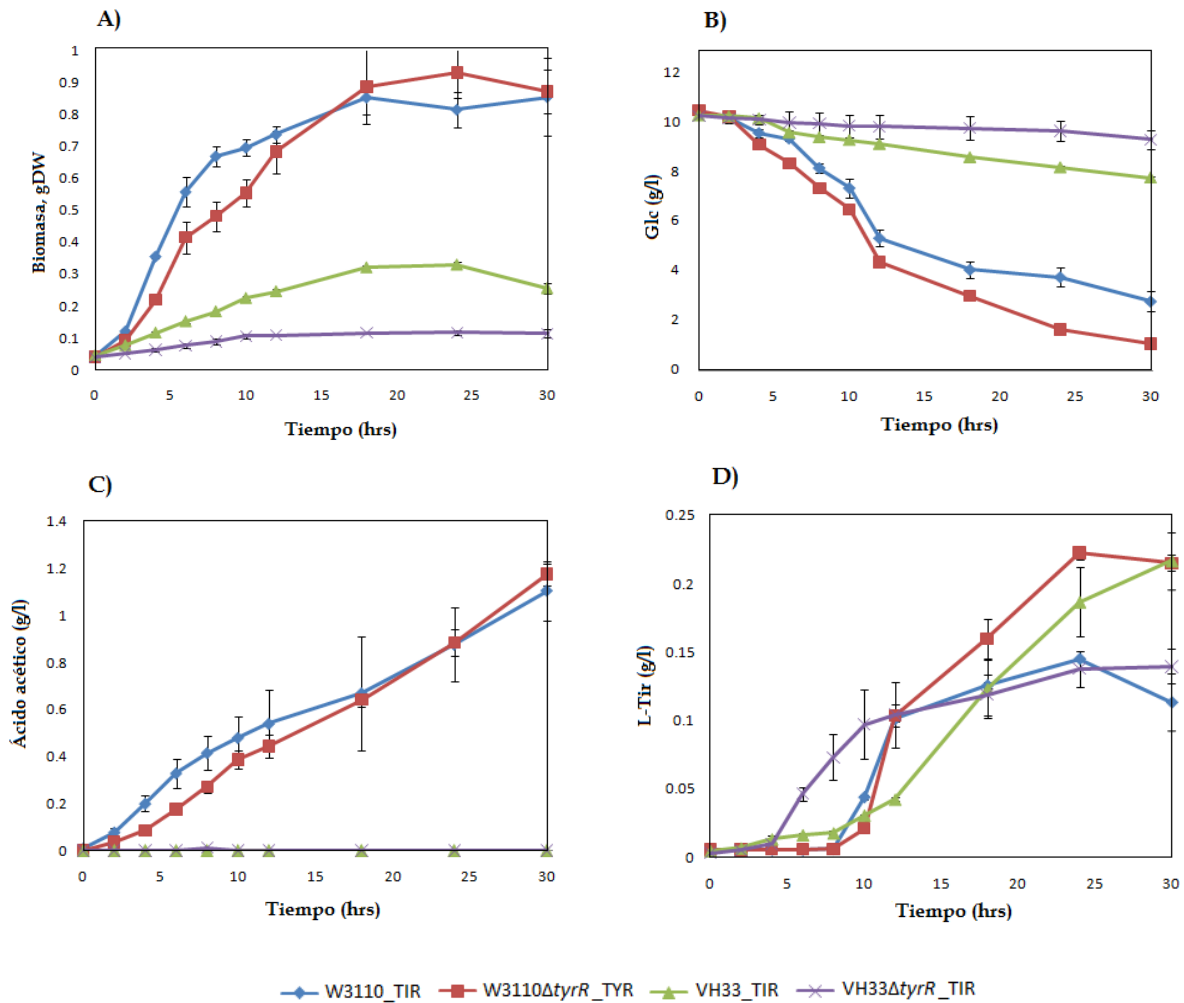


Figura 16. Biomasa (A), Consumo de glucosa (B), Acumulación de ácido acético (C) y Producción de L-Tyr (D) determinados en los experimentos de los cultivos realizados en matraz.

Las tasas de producción de L-Tyr y la concentración de biomasa se usaron para calcular la tasa específica de producción de L-Tyr (q_{L-Tyr}). Las q_{L-Tyr} más bajas fueron observadas en las cepas W3110_TIR y W3110 Δ tyrR_TIR siendo de 0.012 y 0.020 $g_{L-Tyr}/g_{DW} \cdot h$, mientras que las mayores q_{L-Tyr} se observaron en las cepas VH33_TIR y VH33 Δ tyrR_TIR siendo de 0.033 y 0.065 $g_{L-Tyr}/g_{DW} \cdot h$ respectivamente. De acuerdo a estos resultados la q_{L-Tyr} fue 1.7 y 2.2 veces mayor en las cepas PTS^+Glc^+ y $PTS^+Glc^+ \Delta tyrR$ con respecto a las cepas PTS y $PTS\Delta tyrR$.

Considerando sólo el efecto de la eliminación de *tyrR*, la cepa W3110 Δ *tyrR*_TIR presentó un incremento en la q_{L-Tyr} del 67% con respecto a la cepa W3110_TIR, mientras que en la cepa VH33 Δ *tyrR*_TIR este incremento fue del 97% con respecto a la VH33_TIR. De lo anterior se deduce que la eliminación de *tyrR* causa un efecto positivo en la productividad específica de L-Tyr (Figura 17A).

Los rendimientos absolutos de L-Tyr a partir de glucosa (Y_{L-Tyr}/Glc) se calcularon usando los datos de las tasas específicas de acuerdo a la siguiente ecuación: $Y_{L-Tyr}/Glc = q_{L-Tyr}/q_{Glc}$. Se observó que las cepas W3110_TIR y W3110 Δ *tyrR*_TIR mostraron los rendimientos más bajos, de 0.0314 y 0.041 g/g respectivamente, al comparar con las cepas VH33_TIR y VH33 Δ *tyrR*_TIR, cuyos rendimientos fueron de 0.120 y 0.360. Es evidente que el Y_{L-Tyr}/Glc incrementó significativamente en el fondo PTS⁻Glc⁺ y PTS⁻Glc⁺ Δ *tyrR* siendo 2.8 y 7.8 veces mayor que en el fondo PTS. Considerando estas observaciones, los rendimientos mejoraron con la eliminación de *tyrR*; así el Y_{L-Tyr}/Glc en la cepa W3110 Δ *tyrR*_TIR incrementó en un 31% con respecto a la cepa W3110_TIR, mientras que el Y_{L-Tyr}/Glc en la cepa VH33 Δ *tyrR*_TIR fue mayor en un 200% con respecto a la cepa VH33_TIR. El Y_{L-Tyr}/Glc para la cepa VH33 Δ *tyrR*_TIR corresponde al 65% del rendimiento máximo teórico (Y^{max} teórico= 0.553 g/g). De las cepas con el fondo PTS⁻Glc⁺ y PTS⁻Glc⁺ Δ *tyrR*, se obtuvieron los mejores rendimientos con respecto a las cepas PTS y PTS Δ *tyrR*, así mismo se observaron incrementos significativos con la eliminación de *tyrR* demostrando un efecto positivo en el rendimiento de L-Tyr (Figura 17B).

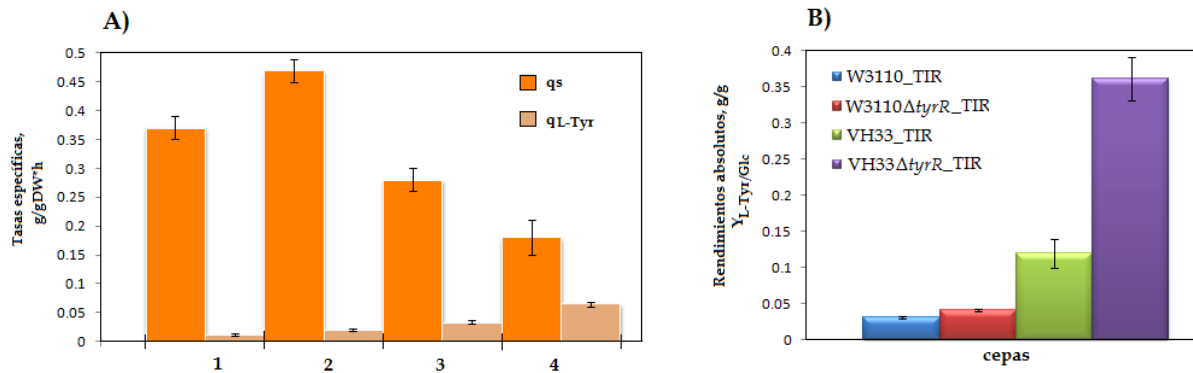


Figura 17. A) Velocidad específica de consumo de glucosa (q_{Glc}) y productividad específica de L-Tyr (q_{L-Tyr}) de las cepas 1.W3110_TIR, 2.W3110 Δ *tyrR*_TIR, 3.VH33_TIR, 4.VH33 Δ *tyrR*_TIR; **B)** Rendimientos absolutos de L-Tyr a partir de Glucosa (Y_{L-Tyr}/Glc).

La concentración final de L-Tyr por litro (título) en la cepa W3110_TIR y W3110 Δ *tyrR*_TIR fue de 0.15 g/l y 0.22 g/l respectivamente, mientras que en la cepa VH33_TIR y su derivada VH33 Δ *tyrR*_TIR el título fue de 0.22 g/l y 0.15 g/l. Como se puede observar, el título en las cepas PTS

y $PTS\Delta tyrR$ fue muy similar al obtenido en las cepas PTS^{Glc^+} y $PTS^{Glc^+}\Delta tyrR$ que presentaron las mejores productividades y rendimientos.

La acumulación de los intermediarios aromáticos DHS y SHIK se observó sólo en la cepa VH33_TIR, mientras que en su derivada $\Delta tyrR$ no fue así (Figura 18). Para evaluar el impacto causado por la acumulación de estos intermediarios aromáticos sobre el Y_{L-Tyr}/Glc , se estimó el rendimiento global de aromáticos (Y_{Arom}/Glc) considerando en el cálculo la cantidad de los intermediarios aromáticos DHS y SHIK, y el producto final L-Tyr. Se observó que, en la cepa VH33_TIR, el Y_{Arom}/Glc fue de 0.31 g/g, lo cual resultó muy similar al Y_{L-Tyr}/Glc obtenido para la cepa $VH33\Delta tyrR_TIR$ que fue de 0.36 g/g (Figura 18B). Sin embargo, la acumulación de carbono en forma de aromáticos (SHIK, DHS, L-Tyr en g/l) fue mucho mayor en la cepa VH33_TIR con respecto a la cepa $VH33\Delta tyrR_TIR$, que sólo acumuló L-Tyr (Figura 18C).

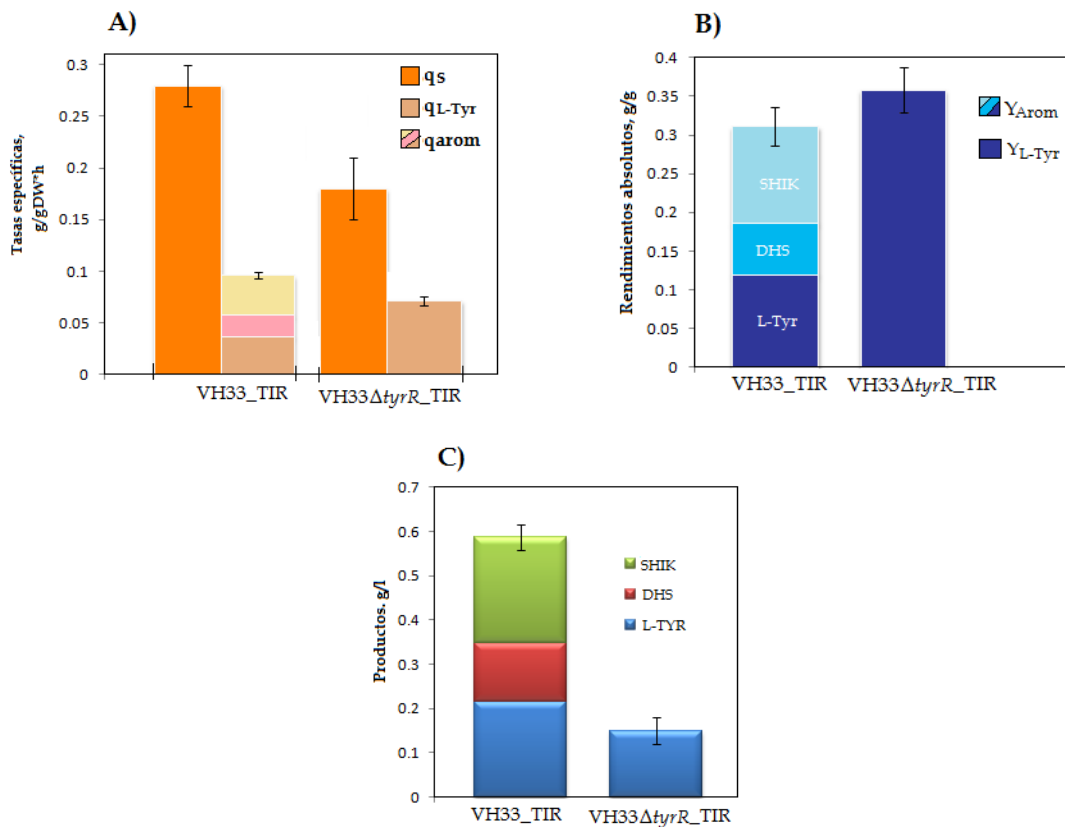


Figura 18. **A)** Tasa específica de consumo de glucosa (q_{Glc}), Tasa específica de producción de L-Tyr (q_{L-Tyr}), tasa específica de producción de DHS (q_{DHS}) y tasa específica de producción de SHIK (q_{SHIK}). **B)** Rendimientos absolutos de L-Tyr (Y_{L-Tyr}/Glc), DHS (Y_{DHS}/Glc) y SHIK (Y_{SHIK}/Glc) sintetizados a partir de glucosa. **C)** Carbono recuperado en forma de intermediarios aromáticos (DHS y SHIK) y producto (L-Tyr), reportado en g/l.

De los resultados obtenidos es claro que en adición al efecto positivo del fondo PTS⁻Glc⁺, la eliminación del gen *tyrR* resultó una estrategia exitosa para mejorar el rendimiento de L-Tyr a partir de glucosa. Sin embargo, a pesar de dichas modificaciones, no fue posible dirigir todo el carbono observado en forma de intermediarios aromáticos a la producción de L-Tyr. Por lo anterior, se podría considerar ingeniería genética adicional para reducir la acumulación de intermediarios y mejorar la producción de L-Tyr (ver Discusión, apartado VIII).

VII.III Construcción del plásmido pTrchpaBC.

Para la construcción del plásmido pTrchpaBC se amplificó, por PCR, el operón *hpaBC* utilizando como templado el DNA cromosomal de la cepa *E. coli* W. El tamaño obtenido del producto de PCR fue de 2,135 pb de los cuales 2,093 pb correspondieron al operón *hpaBC* y 42 pb a los oligonucleótidos cuya secuencia cuenta con sitios de restricción para el corte con las enzimas *EcoRI* (Fw) y *BamHI* (Rv) (Figura 19).

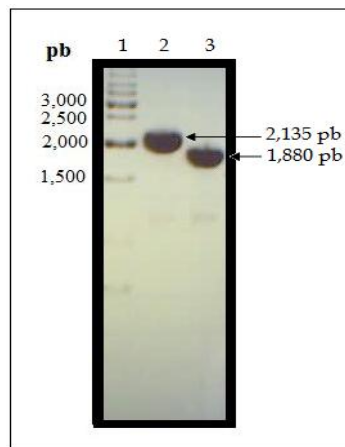


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR del operón *hpaBC*. Carril 1, 1Kb DNA Ladder O'GeneRule como marcador de tamaño; Carril 2, PCR del operón *hpaBC* con extremos diseñados para el corte con las enzimas *EcoRI* (para el sitio 5') y *BamHI* (para el sitio 3'); Carril 3, PCR del gen *tyrR* (Control).

Después de realizar la doble digestión del producto de PCR y del vector de clonación pTrc99A con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*, se llevó a cabo la reacción de ligación para generar el plásmido pTrchpaBC de 6,282 pb, correspondiente a los 4,155 pb del vector pTrc99A más 2,127 pb correspondientes al operón *hpaBC*. En las cajas donde se sembró la cepa *E. coli* XL1-Blue transformada con el producto de ligación, después de 20 hrs de incubación a 37°C, se observó una coloración café indicando la posible oxidación de L-DOPA (Figura 20). Estas observaciones fueron la primera evidencia de la ligación exitosa del operón *hpaBC* con el vector, bajo el control del promotor *trc*.

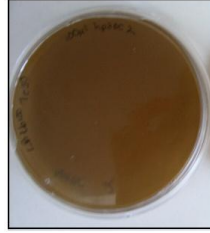


Figura 20. Foto de una caja de LB con la cepa XL1-Blue/pTrchpaBC después de 20 hrs de incubación.

De las diez colonias seleccionadas como candidatas, se extrajo DNA plasmídico y se llevó a cabo la reacción de digestión con la enzima *EcoRV*, cuyos sitios de corte se encuentran tanto dentro del vector de clonación como del operón *hpaBC* (Figura 21A). De los diez plásmidos se obtuvieron dos fragmentos: uno de 4,139 pb y uno de 2,143 pb, correspondientes a los tamaños esperados (Figura 21B).

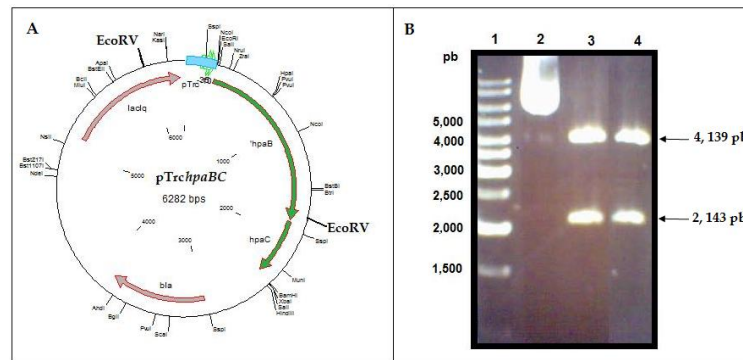


Figura 21. A) Sitios de restricción para el corte con la enzima *EcoRV* en el plásmido pTrchpaBC. B) Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos al cortar el plásmido pTrchpaBC, de dos colonias candidatas, con la enzima *EcoRV*. Carril 1, 1Kb DNA Ladder O'GeneRule como marcador de tamaño; Carril 2, DNA plasmídico de pTrchpaBC; Carril 3, Candidata 1 del plásmido pTrchpaBC cortado con *EcoRV*; Carril 4, candidata 2 del plásmido pTrchpaBC cortado con *EcoRV*.

VII.III.I Cultivos para comprobar la expresión del operón *hpaBC*, clonado en pTrchpaBC, con la producción de L-DOPA.

Para comprobar la expresión adecuada del operón *hpaBC* en el plásmido construido pTrchpaBC, se llevaron a cabo cultivos en buffer Tris-HCl (100mM) con la adición de 3mM de L-Tyr exógena para la producción de L-DOPA (ver Materiales y Métodos, apartado VI.VIII.I). Para los cultivos se seleccionaron cuatro de las diez colonias candidatas que, al estriar en caja y crecer en medio líquido, mostraron distintos grados de obscurecimiento. Con esta metodología además de comprobar la expresión del operón *hpaBC* bajo el control del promotor *trc*, se evaluó si la distinta coloración observada en caja se relacionaba a la producción de L-DOPA (Figura 22). En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos al analizar los sobrenadantes por HPLC.



Figura 22. Caja de LB/Cb¹⁰⁰ utilizada para la selección de candidatas.

Tabla 5. Producción de L-DOPA a partir de L-Tyr. Prueba 1

Candidata	Coloración Observada en caja	L-Tyr (mM)	L-DOPA (mM)	
		T0	T0	T1
pTrchpaBC 1	++++	2.53	0	0.78
pTrchpaBC 2	+++	2.50	0	0.68
pTrchpaBC 3	++	2.51	0	0.33
pTrchpaBC 4	+	2.53	0	0.19

Las muestras para el análisis se tomaron 1 hora después de haber iniciado el cultivo, ya que pasado ese tiempo la L-DOPA se comenzó a oxidar. Como se muestra en la tabla 5, las cuatro colonias seleccionadas como candidatas produjeron L-DOPA a partir de L-Tyr; se observó además que la coloración café en las cajas estaba relacionada a la cantidad de L-DOPA producida, ya que aquellas colonias candidatas que en caja mostraron poca coloración fueron las que produjeron menor cantidad de L-DOPA.

Se realizaron nuevamente los cultivos pero en este caso con las 5 colonias candidatas que, en caja, se presentaron más oscuras. Como control se incluyó una muestra a la que no se le adicionó L-Tyr para comprobar que la producción de L-DOPA se debía exclusivamente a la L-Tyr adicionada. De los sobrenadantes que se colectaron para el análisis por HPLC se obtuvieron los resultados de la tabla 6.

Tabla 6. Producción de L-DOPA a partir de L-Tyr. Prueba 2

Candidata	L-Tyr (mM)		L-DOPA (mM)		Y
	T0	T1	T0	T1	L-DOPA/L-Tyr
pTrchpaBC 1	2.53	1.93	0	0.78	1.30
pTrchpaBC 5	2.48	1.98	0	0.74	1.48
pTrchpaBC 6	2.48	1.76	0	0.86	1.19
pTrchpaBC 7	2.42	1.71	0	0.86	1.21
pTrchpaBC 8	2.53	1.82	0	0.83	1.16
Control	0	0	0	0	0

Todas las cepas produjeron cantidades similares de L-DOPA excepto aquella a la que no se le adicionó L-Tyr. El $Y_{L-DOPA}/L-Tyr$ fue calculado de la siguiente manera: $Y_{L-DOPA}/L-Tyr = L-DOPA_{T1} - L-DOPA_{T0} / L-Tyr_{T0} - L-Tyr_{T1}$. La candidata pTrchpaBC 5, cuyo rendimiento de L-DOPA a partir de L-Tyr fue mayor, se seleccionó para los experimentos subsiguientes.

Se amplificó y se secuenció el operón *hpaBC* del plásmido pTrchpaBC 5, pTrchpaBC 1, pTrchpaBC 7 y se comparó contra la secuencia del operón *hpaBC* del DNA cromosomal de la cepa *E. coli* W, lo que dio como resultado un 100% de identidad en todos los casos.

VII.IV Generación de las cepas productoras de L-DOPA

VII.IV.I Construcción del plásmido pTrchpaBCTrctyrCpheA_{CM}

El plásmido pTrchpaBCTrctyrCpheA_{CM} se construyó al ligar el operón *tyrCpheA_{CM}* con el plásmido pTrchpaBC (Materiales y Métodos, apartado VI.VII). El inserto se obtuvo al digerir el plásmido pTrctyrCpheA_{CM} con la enzima *PvuII* y *ScaI* obteniendo un fragmento de 2,494pb, mientras que el plásmido pTrchpaBC, utilizado como vector, se linearizó al cortar con la enzima *PvuII* generando un fragmento de 6,189 pb (Figura 23).

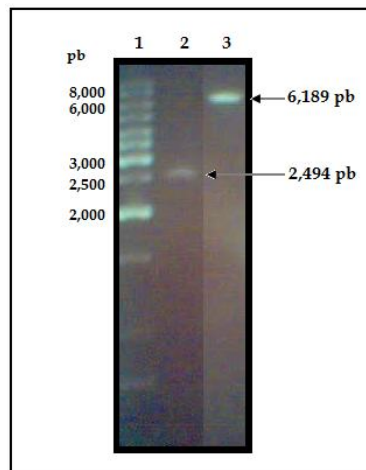


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos generados al linearizar el vector y obtener el inserto para la construcción del plásmido pTrchpaBCTrctyrCpheA_{CM}. Carril 1, 1Kb DNA Ladder O'GeneRule como marcador de tamaño; Carril 2, Fragmento correspondiente al inserto obtenido al cortar el plásmido pTrctyrCpheA_{CM} con las enzimas *PvuII* y *ScaI*; Carril 3, Vector linearizado al cortar el plásmido pTrchpaBC con la enzima *PvuII*.

Después de llevar a cabo la reacción de ligación y transformar la cepa XL1-Blue, se seleccionaron veinte colonias como candidatas (Cb^R), de las cuales sólo una mostró los fragmentos esperados al realizar las digestiones de comprobación: un fragmento de 8,683 pb al linearizar el plásmido con la enzima *Bam*HI (Figura 24B), dos fragmentos (uno de 6,845 y otro de 1,838 pb) al cortar con la enzima *Bgl*III y cuatro fragmentos (de 5342, 1509, 985 y 847 pb) al cortar con la enzima *Nco*I (Figura 24C).

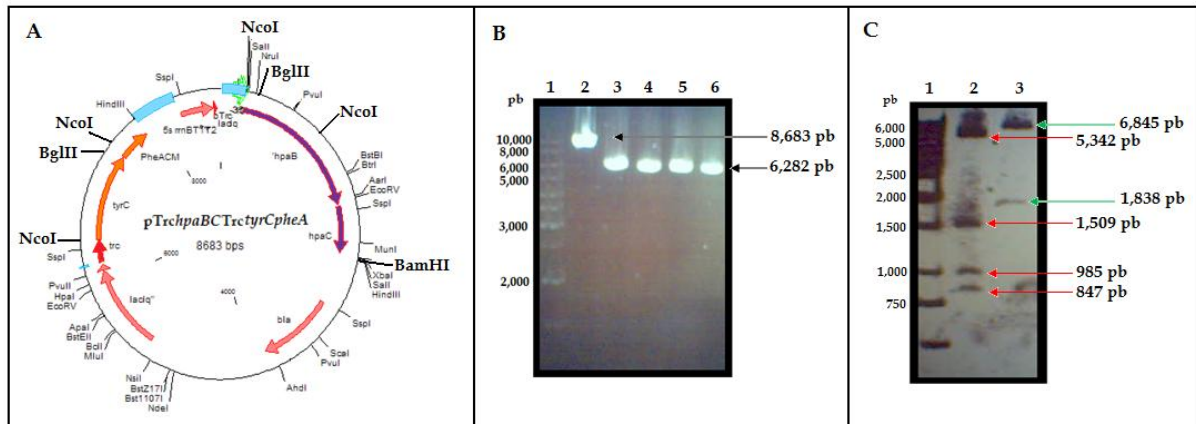


Figura 24. A) Sitios de restricción para el corte con las enzimas *Bam*HI, *Bgl*III y *Nco*I en el plásmido pTrchpaBCTrctyrCpheA_{CM}. B) Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos al cortar el plásmido pTrchpaBCTrctyrCpheA_{CM}, de cinco candidatas, con la enzima *Bam*HI. Carril 1, 1Kb DNA Ladder O'GeneRule como marcador de tamaño; Carril 2-6, Candidatas 1-6 del plásmido pTrchpaBCTrctyrCpheA_{CM} cortado con *Bam*HI; C) Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos al cortar el plásmido pTrchpaBCTrctyrCpheA_{CM}, de la candidata 1, con la enzima *Bgl*III y *Nco*I. Carril 1, 1Kb DNA Ladder O'GeneRule como marcador de tamaño; Carril 2, Candidata 1 del plásmido pTrchpaBCTrctyrCpheA_{CM} cortado con *Nco*I; Carril 3, Candidata 1 del plásmido pTrchpaBCTrctyrCpheA_{CM} cortado con *Bgl*III.

VII.IV.II Expresión del operón *hpaBC* (4-HPA 3-hidroxilasa) en las cepas productoras de L-Tir.

Una vez construido el plásmido pTrchpaBCTrctyrCpheA, se transformaron las cepas W3110 Δ tyrR/pJLBaroG^{ibr}iktA y VH33 Δ tyrR/pJLBaroG^{ibr}iktA, generando las cepas W3110 Δ tyrR_DOPA y VH33 Δ tyrR_DOPA (ver Materiales y Métodos, apartado VI.I.II).

VII.V Caracterización de las cepas productoras de L-DOPA

Con las cepas W3110 Δ tyrR_DOPA y VH33 Δ tyrR_DOPA se evaluó la capacidad de producir L-DOPA a partir de glucosa bajo condiciones de células en reposo (resting cells). En primer lugar se cultivaron las cepas en medio LB suplementado con 10g/l de glucosa e IPTG para la inducción, con el fin de favorecer el crecimiento (el cual se vio afectado en los cultivos de producción de L-Tyr). Una vez

que las células alcanzaron fase exponencial tardía, se subcultivaron en medio mínimo M9 suplementado con 10g/l de glucosa y Cm (eliminando el consumo de glucosa para generar biomasa) para evaluar la producción de L-DOPA. Los cultivos en medio M9 se iniciaron a una concentración de biomasa de 1 ± 0.2 gDW/l y se mantuvieron así durante todo el cultivo. Adicionalmente se realizaron cultivos con la adición de ácido ascórbico con el fin de prevenir la oxidación de L-DOPA (ver Materiales y Métodos, apartado VII.VIII.II.II). Se tomó muestra cada 2 horas por un periodo de 10 hrs después de las cuales se tomó muestra cada 6 hrs hasta completar un total de 50 hrs.

En la tabla 7 se muestra la velocidad específica de consumo de glucosa (q_{Glc}), la tasa específica de producción de L-DOPA o productividad específica (q_{L-DOPA}) y el rendimiento de producción de L-DOPA a partir de glucosa ($Y_{L-DOPA/Glc}$), así como los valores del título (g_{L-DOPA}/L).

Tabla 7. Parámetros estequiométricos determinados de los cultivos de producción de L-DOPA

Cepas	Ac. ascorb (g/l)	q_{Glc}	q_{L-DOPA}	$Y_{L-DOPA/Glc}$	Título g_{L-DOPA}/L
W3110 Δ tyrR_DOPA	0	0.344	0.0117	0.0368	0.235
W3110 Δ tyrR_DOPAasc	0.45	0.274	0.0112	0.0408	0.269
VH33 Δ tyrR_DOPA	0	0.259	0.0136	0.0517	0.313
VH33 Δ tyrR_DOPAasc	0.45	0.227	0.0124	0.0547	0.320

Como se muestra en la Figura 25A, las cepas comenzaron a consumir glucosa desde el inicio del cultivo, agotándose casi por completo a las 40 hrs. La q_{Glc} de la cepa W3110_DOPA fue de 0.344 $g_{Glc}/gDW*h$, mientras que con la cepa VH33 Δ tyrR_DOPA la q_{Glc} disminuyó a 0.259 $g_{Glc}/gDW*h$. Con la adición de ácido ascórbico (asc) la q_{Glc} disminuyó ligeramente en ambas cepas, correspondiendo a un decremento del 20% para la cepa W3110_DOPAasc y del 12% para la cepa VH33 Δ tyrR_DOPAasc (Figura 26A).

Se determinó la acumulación de ácido acético, el cual sólo fue producido por la cepa W3110_DOPA en presencia y ausencia de ácido ascórbico (Figura 25B).

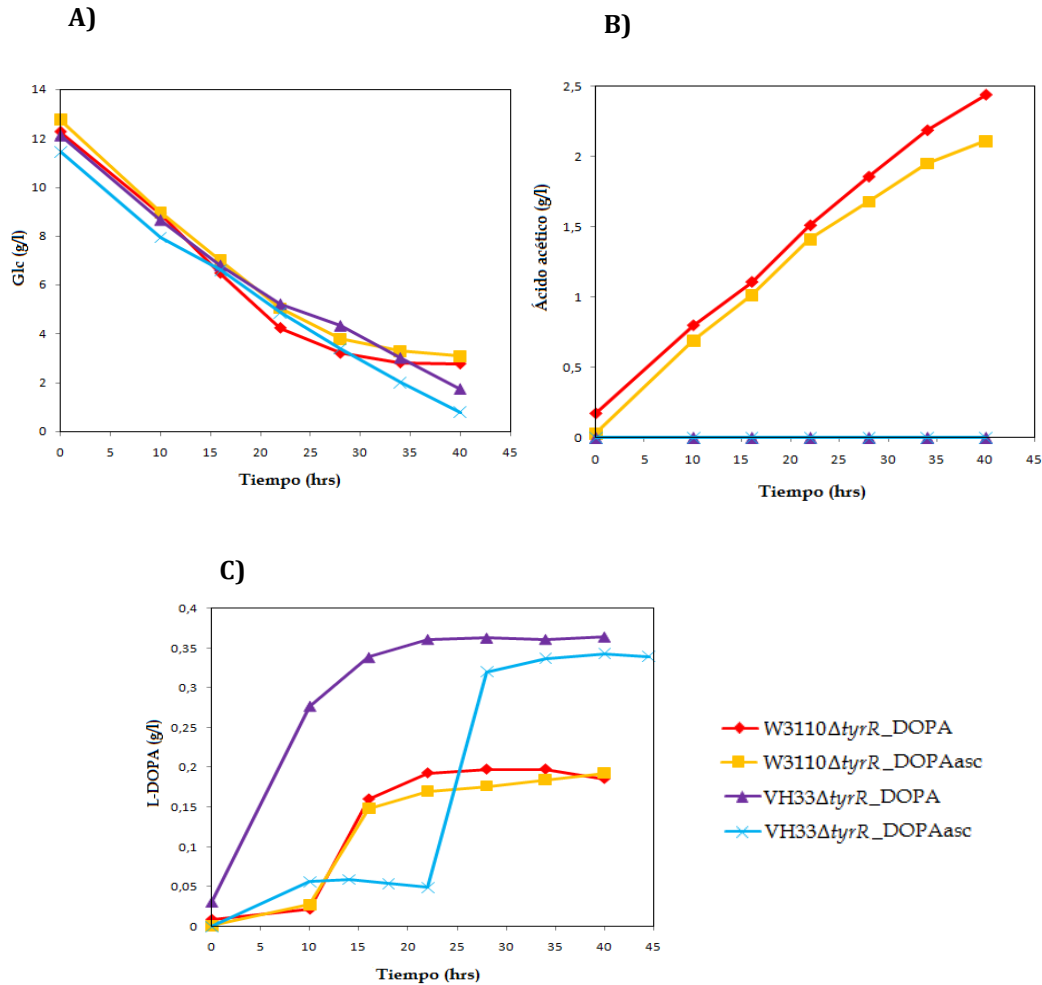


Figura 25. Consumo de glucosa (A), Acumulación de ácido acético (B) y Producción de L-DOPA (C) determinados en los experimentos de los cultivos realizados en matraz.

La L-DOPA se detectó desde las 0 hrs y hasta las 27 hrs, periodo en el cual se determinaron las productividades específicas (q_{L-DOPA}) y los rendimientos absolutos (Y_{L-DOPA}/Glc) (Figura 25C). La cepa W3110 Δ tyrR_DOPA presentó una q_{L-DOPA} de 0.0117 $g_{L-DOPA}/g_{DW} \cdot h$ y un Y_{L-DOPA}/Glc de 0.0368 g/g, mientras que la cepa VH33 Δ tyrR_DOPA presentó un incremento del 16% en la q_{L-DOPA} siendo de 0.0136 $g_{L-DOPA}/g_{DW} \cdot h$ y del 40% en el Y_{L-DOPA}/Glc siendo de 0.0517 g/g. Así mismo, el título alcanzado por la cepa VH33 Δ tyrR_DOPA fue de 0.313 g_{L-DOPA}/L , superior al de la cepa W3110 Δ tyrR_DOPA que fue de 0.235 g_{L-DOPA}/L . Comparando las concentraciones finales de L-DOPA, las productividades y rendimientos, la cepa VH33 Δ tyrR_DOPA resultó ser mejor productora de L-DOPA que la cepa W3110 Δ tyrR_DOPA.

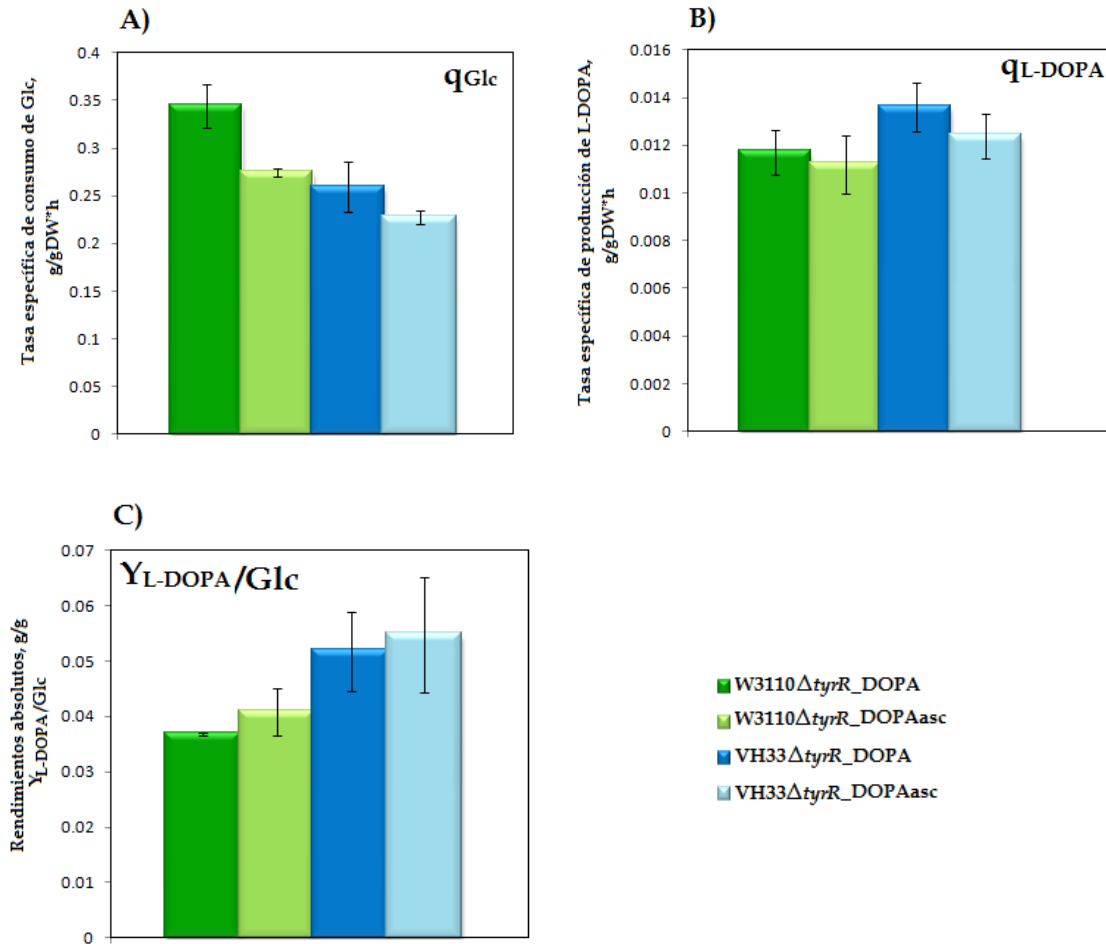


Figura 26. A) Velocidad específica de consumo de glucosa (q_{Glc}); B) productividad específica de L-DOPA (q_{L-DOPA}) y C) Rendimiento absoluto de L-DOPA a partir de Glucosa ($Y_{L-DOPA/Glc}$) de las cepas W3110 Δ tyrR_DOPA y VH33 Δ tyrR_DOPA con y sin ácido ascórbico (asc).

Al analizar como influyó la adición de ácido ascórbico en la producción de L-DOPA, no se observaron cambios significativos en la productividad y en el rendimiento (Figura 26). A pesar de que los cultivos suplementados con ácido ascórbico se mantuvieron claros a diferencia de los cultivos libres de ácido (Figura 27), no se observaron incrementos significativos en la producción final de L-DOPA (Figura 28A), resultando en concentraciones de $0.269 \text{ g}_{L-DOPA}/L$ para la cepa W3110 Δ tyrR_DOPAasc y de $0.320 \text{ g}_{L-DOPA}/L$ para la cepa VH33 Δ tyrR_DOPAasc. De lo anterior, es posible que la coloración café en el medio se debió a la oxidación de una pequeña proporción de la L-DOPA producida o que el ácido ascórbico provocó un efecto negativo sobre la enzima.



Figura 27. Fotografía de los cultivos realizados para la producción de L-DOPA con y sin la adición de ácido ascórbico.

Se midió la acumulación de los intermediarios DHS, SHIK y L-Tyr (Figura 28A). Se observó que la cepa *W3110ΔtyrR_DOPA* acumuló principalmente SHIK (0.248g/l) y una pequeña proporción de L-Tyr (0.060 g/l), mientras que la cepa *VH33ΔtyrR_DOPA* acumuló tanto DHS como SHIK a una concentración de 0.303 y 0.226 g/l respectivamente, así como una pequeña proporción de L-Tyr (0.05g/l). Con la adición de ácido ascórbico no se observaron cambios en la acumulación de intermediarios por la cepa *W3110ΔtyrR_DOPAasc*, mientras que en la cepa *VH33ΔtyrR_DOPA* la acumulación de DHS y SHIK incrementó en un 36 y 20%, respectivamente, y no se detectó la acumulación de L-Tyr. Al estimar el rendimiento global de aromáticos (Y_{Arom}/Glc) considerando la cantidad de los intermediarios DHS, SHIK y L-Tyr, así como del producto final L-DOPA, se observaron incrementos significativos en los rendimientos tanto para la cepa *W3110ΔtyrR_DOPA* como para la cepa *VH33ΔtyrR_DOPA* (Figura 28B).

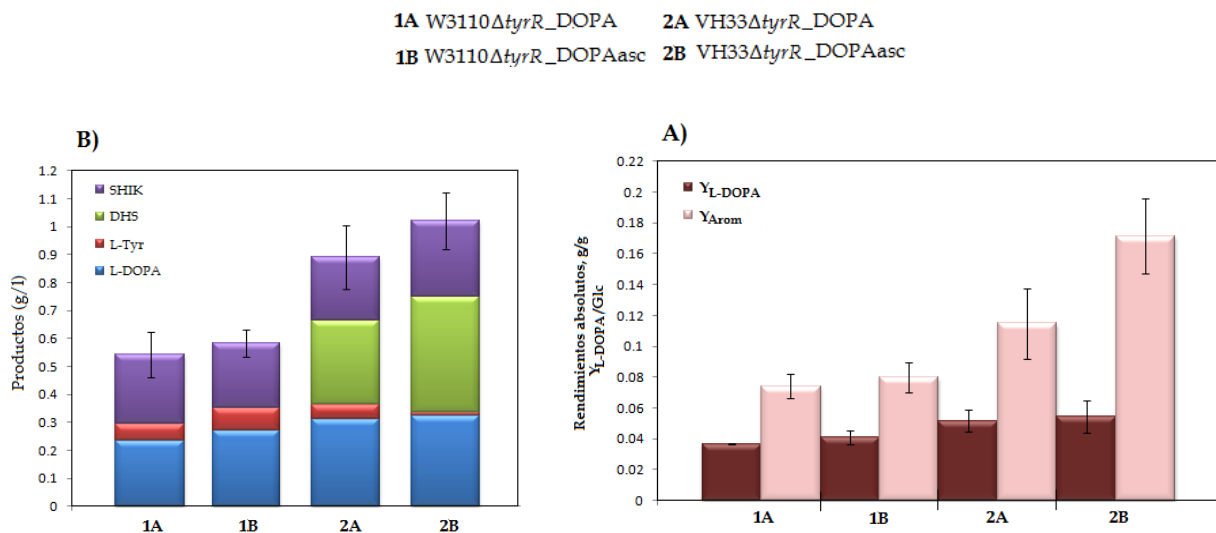


Figura 28. A) Carbono recuperado en forma de intermediarios aromáticos (DHS, SHIK y L-Tyr) y producto (L-DOPA), reportado en g/l; B) Rendimientos absolutos de L-DOPA (Y_{L-DOPA}/Glc) y de aromáticos (Y_{arom}/Glc) sintetizados a partir de glucosa.

VIII. DISCUSIÓN

Con el fin de generar una cepa de *E. coli* productora de L-DOPA, a partir de glucosa como sustrato, en primer lugar se aplicaron diversas estrategias de IVM para dirigir el flujo de carbono hacia la síntesis de L-Tyr al superar los controles alostéricos y transcripcionales que se ejercen sobre las enzimas clave de la vía de síntesis de L-Tyr y en los genes que las codifican.

Para eliminar la inhibición alostérica que la L-Tyr ejerce sobre la vía del SHIK así como sobre su vía terminal de síntesis, en este trabajo se expresaron los genes *aroG^{fbr}* y *tyrCpheA_{CM}*, que codifican para proteínas insensibles a la inhibición por retroalimentación (fbr) de la DAHPS y la CM/PDH. Estos genes se encuentran bajo el control del promotor fuerte *trc*, el cual se induce por IPTG. Adicionalmente, y para incrementar la disponibilidad de los precursores E4P y PEP, se expresó el gen *tktA* y se utilizó una cepa con el fondo PTS⁻Glc⁺, la cual carece del sistema PTS y expresa el gen *galP* (galactosa permeasa) bajo el control del promotor *trc* (De Anda *et al.*, 2006). En trabajos previos se ha demostrado la importancia de la estrategia de inactivación de PTS para mejorar el rendimiento de compuestos aromáticos (Flores *et al.*, 1996; Gosset *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Báez *et al.*, 2001; Yi *et al.*, 2003).

Se utilizaron las cepas W3110 y VH33 (PTS⁻Glc⁺) como hospederas para la expresión de los genes *aroG^{fbr}*, *tyrCpheA_{CM}* y *tktA*, generando las cepas denominadas W3110_TIR y VH33_TIR. Al evaluar los cultivos realizados en medio M9, se observó una importante disminución en la velocidad de crecimiento, siendo más drástica en el fondo PTS⁻Glc⁺, lo cual se debió posiblemente al efecto tóxico de la expresión del gen *tyrC* de *Z. mobilis* y/o a un efecto de carga metabólica debida a los plásmidos. Sin embargo, fue la cepa PTS⁻Glc⁺ la que presentó el mejor Y_{L-Tyr}/Glc y q_{L-Tyr} siendo 282 y 175% mayores que los de la cepa PTS. El título alcanzado por la cepa PTS⁻Glc⁺ bajo estas condiciones fue de 0.22 g/l de L-Tyr en 50 ml de cultivo, lo cual resultó 47% mayor que el observado en la cepa PTS.

A pesar de que la cepa VH33_TIR mejoró en la producción de L-Tyr, se detectó la acumulación de los intermediarios aromáticos DHS y SHIK en los cultivos. Esto se puede explicar como resultado de la mayor disponibilidad de PEP en esta cepa, lo cual se refleja como un incremento en el flujo de carbono canalizado hacia la vía del SHIK.

La acumulación y excreción de los intermediarios aromáticos en el medio de cultivo indican la presencia de pasos limitantes en la vía común de aminoácidos aromáticos. En este caso, la acumulación de SHIK se puede atribuir a la tasa limitante de las isoenzimas shikimato cinasa (*aroL*, *aroK*). Además, se ha reportado que la enzima SHIK deshidrogenasa (*aroE*) puede ser inhibida por SHIK (Dell y Frost, 1993) lo cual, en consecuencia, puede provocar la acumulación de DHS (Baez *et al.*, 2004).

Ya que la proteína TyrR de *E. coli* regula la transcripción de genes como: *aroF*, *aroG*, *aroL*, *tyrB*, *aroP* y *tyrP*, cuyos productos están involucrados en la biosíntesis o transporte de los aminoácidos aromáticos, se llevó a cabo la inactivación cromosomal del gen *tyrR* en las cepas de *E. coli* W3110 y VH33 con el fin de eliminar la regulación transcripcional de genes relevantes involucrados en la síntesis de L-Tir.

Al eliminar el gen *tyrR* y expresar los genes *aroG^{fbr}*, *tyrCpheA_{CM}* y *tktA* se generaron las cepas derivadas W3110 Δ *tyrR*_TIR y VH33 Δ *tyrR*_TIR, las cuales presentaron las mejores productividades y rendimientos de L-Tyr. El incremento en la q_{L-Tyr} y Y_{L-Tyr}/Glc fue de 67% y 31% en el fondo PTS Δ *tyrR* y de 97% y 200% en el fondo PTS Δ *Glc⁺* Δ *tyrR*. El rendimiento final de L-Tyr a partir de glucosa de la cepa PTS Δ *Glc⁺* Δ *tyrR* fue de 0.36 g/g, cerca del 60% del rendimiento máximo teórico (Y^{max} teorico) de 0.553 g/g (determinado al asumir la utilización de PTS para la toma de glucosa y un flujo ilimitado a través de *ppsA*). Basado en los resultados, es claro que una cepa bajo el fondo genético PTS Δ *Glc⁺* y que carece de la regulación mediada por *tyrR* es una mejor productora de L-Tyr. A pesar de ello, la cepa VH33 Δ *tyrR*_TIR presentó una disminución importante en el crecimiento bajo las condiciones probadas, por lo que sería posible optimizar las condiciones de cultivo para permitir un crecimiento óptimo y una mayor producción de L-Tyr, la cual se observa al final de la fase de crecimiento exponencial.

No se detectó la acumulación de los intermediarios aromáticos DHS y SHIK en el medio de cultivo por la cepa VH33 Δ *tyrR*_TIR. Estos intermediarios se encuentran río arriba de la reacción catalizada por la enzima shikimato cinasa codificada por el gen *aroL*, el cual está sujeto a la regulación transcripcional por TyrR. Al inactivar este regulador, se libera la represión transcripcional ejercida sobre *aroL*, con lo cual se incrementan los niveles de expresión de la shikimato cinasa y se elimina la acumulación de SHIK. Se ha reportado que la desrepresión de la transcripción de *aroL* mediada por TyrR resulta en un incremento de 40 a 50 veces en las actividades específicas de shikimato cinasa (Pittard *et al.*, 2005). Con la reducción en las concentraciones de SHIK se previene la inhibición fbr de la shikimato dehidrogenasa (*aroE*), la cual en turno, evita la acumulación de DHS.

A pesar de no haber acumulación de los intermediarios DHS y SHIK por la cepa VH33 Δ *tyrR*_TIR, no se observó un incremento en el título final de L-Tyr. La cantidad de L-Tyr producida por esta cepa representa el 25% de la suma de los metabolitos medidos (DHS, SHIK y L-Tyr) en la cepa VH33_TIR (ver Resultados, apartado VII.II). Esto puede deberse a que el flujo de carbono excede la capacidad metabólica de algunas enzimas en la vía del SHIK, siendo pasos limitantes en la vía y/o que otros intermediarios aromáticos, distintos a DHS y SHIK, se pudieran estar acumulando y causar un efecto de inhibición por retroalimentación en la enzima que lo sintetiza.

Por lo anterior, las cepas generadas en este trabajo, pueden ser mejoradas con modificaciones genéticas adicionales que permitan eliminar los pasos limitantes que aun existen en la vía del SHIK para incrementar la producción de L-Tyr. Algunas de las modificaciones pueden ser la sobreexpresión de los genes *ydiB*, *aroK* y *tyrB*, los cuales se han identificado como los primeros blancos para mejorar la producción de L-Tyr (Lütke-Eversloh y Stephanopoulos, 2007). La sobreexpresión de *ydiB*, ha mostrado incrementos en la producción de L-Tyr ya que, en contraste a la shikimato deshidrogenasa codificada por *aroE*, no se inhibe por retroalimentación (fbr) por shikimato (Dell y Frost, 1993). Por su parte, a pesar de que la sobreexpresión de *aroK* y *aroL* elevan la producción de L-Tyr, la shikimato cinasa II (codificada por *aroL*) se inhibe a altas concentraciones de sustrato, mientras que la shikimato cinasa I (codificada por *aroK*) no está inhibida bajo estas condiciones (DeFeyter, 1987), por lo que puede catalizar eficientemente la conversión de shikimato. Finalmente *tyrB*, codifica para una transaminasa que participa en la vía terminal de síntesis de L-Tyr. En este trabajo al inactivar el gen *tyrR* se liberó la regulación transcripcional ejercida sobre *tyrB* lo cual, aunado a la sobreexpresión de este gen, puede mejorar la producción de L-Tyr.

Además de las estrategias mencionadas antes, la manipulación de los procesos de transporte de aromáticos puede tener un impacto positivo en la eficiencia de producción de L-Tyr. Se ha reportado que la reducción en el transporte de aminoácidos aromáticos al interior de la célula resulta en una mejora en la producción (Pittard 1996; Burkovski and Krämer 2002; Ikeda 2006). TyrR, además de inhibir la transcripción de genes involucrados en la vía del SHIK, activa genes involucrados en el transporte como *aroP*, que codifica para un transportador general de AA y *tyrP*, que codifica para un transportador específico de L-Tyr. Estos transportadores participan en la internalización de AA al medio intracelular. Sin embargo, se ha reportado que al eliminar *tyrR*, se da un incremento en la expresión de estos genes (Pittard, 2005) haciendo posible que aumente el transporte de los aminoácidos aromáticos al interior de la célula. Por lo anterior, como una estrategia adicional, se puede considerar la inactivación de AroP, para provocar una reducción en la internalización de aminoácidos aromáticos y probablemente un incremento en la producción de L-Tyr, como se ha visto en *C. glutamicum* (Ikeda y Katsumata 1994).

En cuanto a los mecanismos de excreción de aminoácidos aromáticos, es poco lo que se conoce hasta ahora y se ha considerado que la excreción de L-Phe y L-Tyr ocurre principalmente por difusión simple (Krämer 1994; Burkovski and Krämer 2002). Recientemente se han investigado supuestos exportadores de aminoácidos aromáticos y se encontró que la proteína de membrana interna YddG promueve la excreción de aminoácidos aromáticos en *E. coli* (Doroshenko et al. 2007), siendo la sobreexpresión de *yddG* una estrategia a considerar para incrementar la excreción de L-Tyr y mejorar la producción de este aminoácido.

En la primera parte del proyecto se construyeron exitosamente cepas de *E. coli* productoras de L-Tyr basadas en la sobreexpresión y eliminación de genes específicos involucrados en la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos. Para incrementar la disponibilidad de los precursores de la vía del SHIK: PEP y E4P, se empleó una cepa con el fondo PTS^{Glc^+} y la sobreexpresión del gen *tktA*. Se demostró el impacto positivo en el $Y_{L\text{-Tyr}}$ y la $q_{L\text{-Tyr}}$ al inactivar el regulador transcripcional TyrR (gen *tyrR*), en combinación con la sobreexpresión simultánea de *aroG^{fbr}* y *tyrCpheA_{CM}*, que codifican para una DAHP sintasa y CM/PDH insensibles a retroinhibición, respectivamente.

Una vez generadas las cepas cuyo flujo de carbono se dirige a la síntesis de L-Tyr, se expresó el operón *hpaBC*, el cual codifica para la enzima 4-HPA 3-hidroxilasa, capaz de convertir L-Tyr a L-DOPA. La enzima 4-HPA 3-hidroxilasa cataliza la oxidación efectiva del sustrato, en la presencia de NADH y FAD, al introducir un grupo hidroxilo en la posición orto al grupo hidroxilo existente en el núcleo benzeno. Ésta enzima puede reconocer un amplio rango de sustratos, ya que le basta reconocer un grupo hidroxilo unido al anillo aromático y, por tanto, puede reconocer y oxidar la L-Tyr convirtiéndola a su derivado dihidroxilado, L-DOPA.

Para caracterizar a la 4-HPA 3-hidroxilasa en la producción de L-DOPA a partir de L-Tyr, se expresó el operón *hpaBC* bajo el control del promotor *trc* (inducible por IPTG) en la cepa silvestre XL1-Blue. En las pruebas iniciales se observó una producción de 0.74 mM de L-DOPA a partir de 2.48 mM de L-Tyr agregada al medio. Cabe señalar que los sobrenadantes, al momento de ser analizados, presentaron una coloración ligeramente rosa la cual, después de varios días, torno a café oscuro. La coloración café oscuro a negro, observada tanto en cajas con medio LB como en los cultivos realizados en buffer + L-Tyr al sembrar la cepa XL1-Blue/pTrchpaBC, es característica de la oxidación del catecol y sus derivados como la L-DOPA (Figura 29).

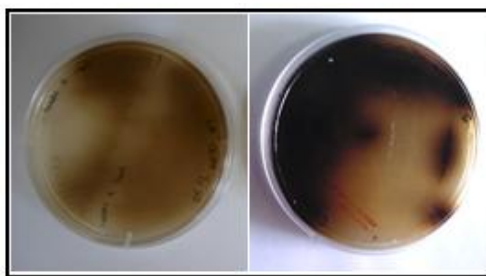


Figura 29. Caja de LB con la cepa XL1-Blue/pTrchpaBC (izquierda) y con una cepa productora de melanina (derecha).

En la literatura se ha reportado la producción de un polímero similar a la melanina por acción de la enzima 4-hidroxifenilacetato hidroxilasa de *Klebsiela pneumoniae* cuyos genes se clonaron en *E. coli*. En el genoma de *K. pneumoniae* se han identificado los genes *hpaA* y *hpaH*, que, al igual que el operón *hpaBC* de *E. coli* W, forman parte de la misma unidad transcripcional. La comparación de la secuencia de aminoácidos de los productos de los genes *hpaA* y *hpaH* reveló un alto grado de identidad de 93% y 80%, respectivamente, con respecto a los genes homólogos *hpaB* y *hpaC* de *E. coli* que codifican para la 4-HPA 3-Hidroxilasa. Después de diferentes análisis químicos, cromatográficos y de microscopia electrónica se concluyó que esta enzima se asocia a la producción de un pigmento como melanina ya que se ha visto que es capaz de oxidar algunos compuestos dihidroxilados (catecol, resorcinol, 3,4-dihidroxibenzoato, 3,4-DHPA, L-dihidroxifenilalanina) a quinonas seguido de la subsecuente polimerización (Gibello, 1995).

Considerando los antecedentes en *K. pneumoniae*, resulta de gran interés explorar el papel de la 4-HPA 3-hidroxilasa de *E. coli* W en la síntesis de un polímero como melanina. En la generación de cepas productoras de melanina la enzima tirosinasa se ha utilizado ampliamente para este fin. Sin embargo, el ion cobre en la tirosinasa juega un papel relevante en la unión del grupo fenol del sustrato y la temperatura óptima para su actividad es de 30°C, mientras que la enzima 4-HPA 3-hidroxilasa de *E. coli* W no contiene cobre en su estructura, por lo que la unión del sustrato involucra un mecanismo diferente, y actúa de manera eficiente a 37°C lo cual pudiera favorecer la velocidad de producción.

Una vez que se evaluó la producción de L-DOPA a partir de L-Tyr por la enzima 4-HPA 3-hidroxilasa, se generaron las cepas para la producción de L-DOPA a partir de glucosa. Para ello se expresaron los genes *hpaBC*, *tyrCpheA_{CM}*, *aroG^{fb}*, (cada uno bajo el control del promotor fuerte *trc*) y *tktA* (bajo el control de su promotor nativo) en las cepas con el fondo PTS Δ *tyrR* y PTS^{Glc⁺} Δ *tyrR*, dando lugar a las cepas denominadas W3110_DOPA y VH33_DOPA.

Debido al crecimiento deficiente de las cepas en los cultivos realizados para la producción de L-Tyr, se decidió crecer las cepas primero en medio LB hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial tardía, y después se siguió una estrategia de cultivo de células en reposo al subcultivar las células en medio M9 con 10 g/l de glucosa y Cm para evaluar la producción de L-DOPA.

Se observó que tanto la cepa W3110_DOPA como la cepa VH33_DOPA lograron producir L-DOPA a partir de glucosa durante las primeras 20 a 30 horas de cultivo. Como era de esperarse, la cepa VH33_DOPA resultó ser mejor productora de L-DOPA que la cepa W3110 Δ *tyrR*_DOPA, presentando un incremento del 16% en la q_{L-DOPA} y del 40% en el Y_{L-DOPA}/Glc . Así mismo, el título alcanzado por la cepa VH33_DOPA fue de 0.313 g_{L-DOPA}/L en 35 ml de cultivo, lo cual resultó 75% mayor que el de la cepa W3110 Δ *tyrR*_DOPA.

La acumulación de los intermediarios SHIK y DHS en los cultivos hizo evidente la existencia de pasos limitantes en la vía. Mientras que la cepa W3110_DOPA acumuló principalmente SHIK, la cepa VH33_DOPA acumuló tanto SHIK como DHS lo cual se explica por el mayor flujo dirigido hacia la vía del SHIK. Sólo una pequeña proporción de L-Tyr (0.050 - 0.060g/l) no se convirtió a L-DOPA, lo que sugiere que la reacción catalizada por la 4-HPA 3-hidroxilasa no fue limitante en la producción de L-DOPA.

Se observó que los cultivos comenzaron a oscurecerse a partir de las 10 hrs hasta adquirir una coloración café oscuro al final de la fermentación. Para evitar las pérdidas de L-DOPA por oxidación se adicionó ácido ascórbico como antioxidante. A pesar de que los cultivos con ácido ascórbico se mantuvieron claros, no hubo mejoras significativas en la producción de L-DOPA, ya que se obtuvieron títulos de 0.269 g_{L-DOPA}/L por la cepa W3110_DOPAasc y de 0.320 g_{L-DOPA}/L por la cepa VH33_DOPAasc, mayores en un 14% y 2% respectivamente, con respecto a los cultivos sin la adición de ácido ascórbico. Estos resultados sugieren que las pérdidas de L-DOPA por oxidación fueron mínimas o que la enzima se vea afectada por la presencia de ácido ascórbico en el medio de cultivo.

En cuanto a la acumulación de intermediarios, no se observaron cambios con la adición de ácido ascórbico por la cepa W3110 Δ tyrR_DOPAasc, mientras que en la cepa VH33 Δ tyrR_DOPA la acumulación de DHS y SHIK incrementó en un 36 y 20%, respectivamente. Comparando los Y_{L-DOPA}/Glc con los Y_{arom}/Glc obtenidos, es posible mejorar significativamente los Y_{L-DOPA}/Glc en ambas cepas por el alto carbono recuperado en forma de intermediarios aromáticos. Aplicando estrategias genéticas apropiadas, como las mencionadas antes para incrementar el flujo hacia la síntesis de L-Tyr, sería posible mejorar la producción de L-DOPA. Algunas de estas modificaciones, como la sobreexpresión de genes, podrían llevarse a cabo directamente en cromosoma, con el fin de disminuir posibles efectos de carga metabólica por el mantenimiento de los plásmidos.

Adicionalmente a las modificaciones genéticas, sería posible optimizar la composición del medio y las condiciones de cultivo para incrementar la producción final de L-DOPA. Se observó que las cepas comenzaron a consumir la glucosa desde el inicio del cultivo agotándose casi por completo a las 40 hrs. Sin embargo, de los 10 g/l de glucosa disponibles inicialmente, sólo 2.5 g/l se detectaron en forma de ácido acético para el caso de la cepa W3110 Δ tyrR_DOPA, y menos de 1 g/l se detectó en forma de intermediarios aromáticos y productos (L-Tyr y L-DOPA) en ambas cepas. Es posible que una pequeña parte se convirtiera en otros intermediarios o productos no evaluados en este trabajo, y que gran parte de la glucosa consumida fuera utilizada por las células para el mantenimiento celular (recambio de RNA, recambio de enzimas, proteínas, componentes de pared celular, transporte de iones, mantenimiento de gradientes de concentración -pH o presión osmótica-, movilidad, etc).

Para mejorar la composición del medio, se podrían evaluar factores como: pH (el pH ácido favorece la disolución de tirosina en solución acuosa, también como la estabilización de la L-DOPA formada, sin embargo la 4-HPA 3-hidroxilasa muestra actividad óptima a valores de pH de entre 6.5 y 8), la concentración de sustrato (en este caso glucosa), la concentración de sales y la adición de metales como CuSO_4 o FeCl_3 (se ha visto que, en la producción del polímero como melanina por la 4-HPA 3-hidroxilasa de *K. pneumoniae*, incrementa la pigmentación café cuando el CuSO_4 o FeCl_3 fueron incorporados al medio). En cuanto a las condiciones de cultivo se podrían controlar parámetros como: temperatura, agitación, O_2 , periodo de incubación y exposición a la luz.

Ya que la presencia de pasos limitantes en la vía, y no la oxidación, fue la principal limitante en la producción de L-DOPA, sería conveniente evaluar la adición de ácido ascórbico al medio de cultivo, considerando la posible ventaja de obtener un producto más puro al adicionar ácido ascórbico, sobre la separación y purificación de la L-DOPA producida en presencia del polímero generado por oxidación. Se sabe que la purificación de L-DOPA se lleva a cabo fácilmente por precipitación de cristales cuando su concentración está sobre 80 mM (Enei y Yamada, 1986).

En el presente trabajo se aplicaron estrategias exitosas para lograr producir L-DOPA a partir de glucosa, que consistieron en dirigir el flujo de carbono hacia la producción de L-Tyr y expresar los genes que codifican para una hidroxilasa de compuestos aromáticos, que convierte la L-Tyr a L-DOPA. A diferencia de los sustratos utilizados actualmente en los procesos de producción de L-DOPA, como son L-Tyr, piruvato, amonio y catecol, la glucosa es más barata. Se ha visto además que al utilizar L-Tyr y catecol como sustratos, éstos se mezclan fácilmente con la L-DOPA haciendo necesaria la subsecuente separación y complicando el proceso de purificación, lo cual implican un alto costo.

Las cepas generadas en este trabajo, así como el proceso fermentativo pueden ser mejorados para lograr la producción de L-DOPA con un mayor rendimiento y una mayor productividad, que incremente su potencial para ser explotado comercialmente como una alternativa a los métodos de producción actuales.

IX. CONCLUSIONES

- La sobreexpresión de los genes *aroG^{fbr}*, *tyrCpheA_{CM}* y *tktA* en las cepas W3110 y VH33 (PTS⁻Glc⁺), permitió incrementar el flujo de carbono hacia la biosíntesis de L-Tyr, dando lugar a las cepas W3110_TIR y VH33_TIR.
- La cepa VH33_TIR (PTS⁻Glc⁺) comparada con la cepa W3110_TIR (PTS⁺) presentó un Y_{L-Tyr} y q_{L-Tyr} 2.8 y 1.7 veces mayores, respectivamente.
- La eliminación de la regulación transcripcional mediada por TyrR ($\Delta tyrR$) fue una estrategia exitosa que permitió incrementar el Y_{L-Tyr} y la q_{L-Tyr} en un 200% y 97%, respectivamente, en la cepa VH33 $\Delta tyrR$ _TIR.
- Se observó una disminución importante en la velocidad de crecimiento de las cepas de producción debido, posiblemente, al efecto tóxico de TyrC de *Z. mobilis* y/o a un efecto de carga metabólica. Este efecto negativo fue mayor en las cepas con el fondo PTS⁻Glc⁺ y se incrementó al eliminar el gen *tyrR*.
- La acumulación de los intermediarios SHIK y DHS por la cepa VH33_TIR (cuyo flujo de carbono hacia la vía del SHIK es mayor) sugiere la presencia de pasos limitantes en la vía del SHIK.
- Al expresar el operón *hpaBC*, que codifica para la enzima 4-HPA 3-hidroxilasa, en la cepa silvestre XL1-Blue, se produjeron 0.74 mM de L-DOPA a partir de 2.48 mM de L-Tyr adicionada al medio de cultivo.
- Es posible producir L-DOPA a partir de glucosa al expresar el operón *hpaBC* en una cepa de *E. coli* cuyo flujo de carbono se dirija a la síntesis de L-Tyr.
- Bajo las condiciones seleccionadas en este trabajo, la cepa VH33 $\Delta tyrR$ _DOPA fue la mejor productora de L-DOPA alcanzando un título de 0.313 g_{L-DOPA}/L en 35 ml de cultivo.
- La adición de ácido ascórbico al medio de cultivo (para evitar la oxidación de la L-DOPA) no mejora significativamente la producción final de L-DOPA.
- La presencia de pasos limitantes en la vía del SHIK, y no la actividad de la 4-HPA 3-hidroxilasa, es probablemente el principal factor que limita el título final de L-DOPA.

- La alta cantidad de carbono recuperado en forma de intermediarios aromáticos por las cepas generadas en este trabajo (0.308 g/l por W3110 Δ tyrR_DOPA y 0.579 g/l por VH33 Δ tyrR_DOPA), indica que éstas pueden ser mejoradas con modificaciones genéticas adicionales que permitan superar los pasos limitantes existentes en la vía del SHIK, incrementando el flujo de carbono hacia la síntesis de L-Tyr y por tanto, la producción de L-DOPA.

X. PERSPECTIVAS

- Optimizar la composición del medio (pH, concentración de sustrato, sales, adición de metales) y las condiciones de cultivo (temperatura, agitación, O₂, periodo de incubación, exposición a la luz) para favorecer la biosíntesis y estabilidad de L-DOPA.
- Realizar cultivos en fermentador.
- Evaluar la acumulación de otros intermediarios aromáticos, además de DHS y SHIK, para identificar posibles pasos limitantes en la vía del SHIK.
- Sobreexpresar genes directamente en cromosoma para evitar posibles efectos de carga metabólica.
- Manipular procesos de transporte de aromáticos como la inactivación de AroP (para reducir la internalización de aminoácidos aromáticos) y/o la sobreexpresión de *yddG* (para promover la excreción de aminoácidos aromáticos) para mejorar la producción de L-Tyr y en consecuencia la producción de L-DOPA.
- Debido a la capacidad de reconocer algunos compuestos dihidroxilados por la 4HPA 3-Hidroxilasa de *K. pneumoniae*, se podría explorar el papel de la 4-HPA 3-hidroxilasa de *E. coli* en la formación de un polímero como melanina.

XI. APÉNDICE

XI.I Evaluación de parámetros

Los parámetros evaluados fueron: velocidad específica de crecimiento (μ), el rendimiento de biomasa en glucosa ($Y_{\text{Biom}/\text{Glc}}$), la velocidad específica de consumo de glucosa (q_{Glc}), la tasa específica de producción o productividad específica (q_p) y el rendimiento de producto en glucosa (Y_p/Glc). La μ y $Y_{\text{Biom}/\text{Glc}}$ fueron calculados durante la fase de crecimiento exponencial. Las productividades específicas y rendimientos de producto a partir de glucosa fueron calculadas en la fase estacionaria considerando solamente la etapa de producción.

XI.I.I Cálculo de la velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento fue calculada de la siguiente manera:

$$\mu = \frac{\ln(X_f - X_i)}{\Delta T}$$

XI.I.II Cálculo de rendimientos.

El rendimiento $Y_{\text{Biom}/\text{Glc}}$ (determinado en la fase de crecimiento exponencial) y Y_p/Glc (determinado durante la fase de producción) fueron calculados de la siguiente manera:

$$Y_{\text{Biom}/\text{Glc}} = \frac{\text{g de biomasa producida}}{\text{g de glucosa consumida}}$$

$$Y_p/\text{Glc} = \frac{q_s}{q_p}$$

XI.I.III Cálculo de la velocidad específica de consumo de glucosa y de formación de productos.

Las velocidades específicas de consumo de glucosa y de formación de productos fueron calculadas para la fase estacionaria en la etapa de producción, definida como el periodo de tiempo en el que se detecta el producto hasta el punto en el que se observa un agudo decremento en la acumulación del mismo. Se calculó la concentración de biomasa promedio (X_{prom}) así como el consumo de azúcar o la producción en dicho intervalo (T). Con los datos obtenidos, la q_s y q_p se calculó de la siguiente manera:

$$q_{\text{Glc}} = \frac{\text{azúcar consumida}}{T(\text{h}) * X_{\text{prom}}}$$

$$q_p = \frac{\text{producto}}{T(\text{h}) * X_{\text{prom}}}$$

XI.II Determinación de azúcares reductores por el método del DNS

Se utilizó ácido dinitrosalísílico al 1% (DNS) y stock de glucosa de 1 mg/ml. La curva patrón se preparó bajo las siguientes condiciones:

Glu (mg/ml)	Volúmen de estándar (ml)	Volúmen de H ₂ O destilada (ml)	Volúmen total (ml)
0	0.0	1.0	1.0
0.2	0.2	0.8	1.0
0.4	0.4	0.6	1.0
0.6	0.6	0.4	1.0
0.8	0.8	0.2	1.0
1.0	1.0	0.0	1.0

- Preparar en cada tubo (soluciones de curva patrón, las muestras problema diluidas si es necesario y agua como blanco) 0.5 ml de solución en total.
- Adicionar 0.5 ml del reactivo DNS a cada tubo.
- Agitar todos los tubos en vortex
- Llevar a ebullición por 5 min en baño maria
- Enfriar hasta temperatura ambiente
- Adicionar a cada tubo 5 ml de agua destilada y agitar en vortex
- Dejar en reposo 15 min y leer a 540 nm
- Realizar la curva absorbancia vs concentración

XII. REFERENCIAS

- Báez, J. L., *et al* (2004) Metabolic Engineering and Protein Directed Evolution Increase the Yield of L-Phenylalanine Synthesized From Glucose in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 87(4):516-524.
- Berry, A. (1996) Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Trends Biotechnol.* 14:250-256
- Bongaerts, J. *et al* (2001) Metabolic Engineering for Microbial Production of Aromatic Aminoacids and Derived Compounds. *Metabolic Engineering.* 3:289-300.
- Chávez, MI, Lara, A., López, H., Hernández, G., Martínez, A., Ramírez, O., Bolivar, F. y Gosset, G. (2008) Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for L-Tyrosine Production by Expression of Genes Coding for the Chorismate Mutase Domain of the Native Chorismate Mutase-Prephenate Dehydratase and a Cyclohexadienyl Dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (10): 3284-3290.
- Chen, S., Vincent, S., Wilson, D., Ganem, B. (2003) Mapping of chorismate mutase and prephenate deshydrogenase domains in the *Escherichia coli* T-protein. *Eur J Biochem.* 270:757-763.
- Cui J., and Somerville R. L. (1993) Mutational Uncoupling of the Transcriptional Activation Function of the TyrR Protein of *Escherichia coli* K-12 from the Repression Function. *Journal of Bacteriology.* 175:303-306.
- Datsenko A. Kirill and Wanner L. Barry (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS.* 97: 6640-6645.
- De Anda R., Lara A. R., Hernández V., Hernández-Montalvo V., Gosset G., Bolivar F., and Ramírez T. (2006) Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metabolic Engineering.* 8:281-290.
- Dixon M. P., Paul R. N., Howlett G. J., Dunstan D. E., Sawyer W. H., and Davidson B. E. (2002) The Central Domain of *Escherichia coli* TyrR Is Responsible for Hexamerization Associated with Tyrosine-mediated Repression of Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry.* 277: 23186-23192.
- Doroshenko V., *et al* (2007) YddG from *Escherichia coli* promotes export of aromatic acids. *FEMS Microbiol lett.* 275: 312-318.
- Draths, K.M. *et al* (1992) Biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: the role of transketolase. *J. Am. Chem. Soc.* 114:3956-3962.

- Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolívar, F., Valle, F. (1996) Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotech.* 14:620-623.
- Galán, B., Díaz, E., Prieto, Maria A. and García, José L. (2000) Functional Analysis of the Small Component of the 4-Hydroxyphenylacetate 3-Monooxygenase of *Escherichia coli* W: a Prototype of a New Flavin:NAD(P)H Reductase Subfamily. *Journal of Bacteriology.* 182:627-636.
- Gibello, A. *et al* (1995) Polymer Production by *Klebsiella pneumoniae* 4-Hydroxyphenylacetic Acid Hydroxylase Genes Cloned in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4167-4171.
- Gibello, A., Suárez, M., Allende, J. L., and Martín, M. (1997) Molecular cloning and analysis of the genes encoding the 4-hydroxyphenylacetate hydroxylase from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* 167:160-166.
- Gosset, G., Yong-Xiao, J., Berry, A. (1996) A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* 17:47-52.
- Haavik, Jan (1997) L-DOPA is a substrate for Tyrosine Hydroxylase. *Journal of Neurochemistry.* 69:1720-1728.
- Haneda, K., Watanabe, S., and Takeda, I. (1971) Synthesis of L-3,4-Dihydroxyphenylalanine from L-Tyrosine by Microorganisms. *Applies Microbiology.* 22:721-722.
- Hernández-Montalvo, V., Martínez, A., Hernández-Chávez, G., Bolívar, F., Valle, F., and Gosset, G. (2003) Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* PTS Mutant Restores Glucose Transport and Increases Glycolytic Flux to Fermentation Products. *Biotechnology and Bioengineering.* 83: 687-694.
- Huffnagle GB, Chen GH, Curtis JL, McDonald RA, Strieter RM, Toews GB (1995) Down-regulation of the afferent phase of T cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol.* 155: 3507–3516.
- Huizing, H.J.; Wijnsma, R.; Batterman, S.; Malingre, Th.M.; Wifhers, H.J (1985) Production of L-DOPA by cell suspension cultures of *Mucuna pruriens*. *Plant Cell Tissue Organ Culture.* 4:61-74.
- Ikeda, M., Katsumata, R. (1992) Metabolic Engineering to produce tyrosine or phenylalanine in a tryptophan-producing *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:781-785.
- Ikeda, M (2006) Toward bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Appl Microbial Biotechnology.* 69:615-626.
- Ikram-Ul-Haq, Ali Sikander (2002) Biosynthesis of L-DOPA by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology.* 85:25-29.

- Ikram-Ul-Haq, Ali Sikander (2002) Microbiological Transformation of L-Tyrosine to 3,4-Dihydroxyphenyl L-Alanine (L-Dopa) by a Mutant Strain of *Aspergillus oryzae* UV-7. *Current Microbiology*. 45:88-93.
- Katayama, T., Suzuki, H., Koyanagi, T., and Kumagai, H. (2000) Cloning and Random Mutagenesis of the *Erwinia herbicola tyrR* Gene for High-Level Expression of Tyrosine Phenol-Lyase. *Applies and Environmental Microbiology*. 66:4764-4771.
- Kaufman S. (1995) Tyrosine hydroxylase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, Vol. 70* (Meister A., cd). 103-220.
- Kern, A., Tilley, E., Hunter, I. S., Legisa, M., and Glieder, A. (2007) Engineering primary metabolic pathways of industrial micro-organisms. *Journal of Biotechnology*. 129:6-29.
- Knowles WS (2003) Asymmetric hydrogenations. *Adv Synth Catal*. 345:3-13.
- Koyanagi, T., Katayama, T., Suzuki, H., Nakazawa, H., Yokozeki, K., and Kumagai, H. (2005) Effective production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR. *Journal of Biotechnology*. 115:303-306.
- Krishnaveni, R., and Rathod, V. (2009) Transformation of L-Tyrosine to L-Dopa by a Novel Fungus *Acremonium rutilum* Under Submerged Fermentation. *Curr Microbiol*. 58:122-128.
- Kumagai, L.S., Fling, M.S., Sarin, A.N. (1969) Mushroom tyrosinases. *J.Biol.Chem*. 68:178-185.
- Lee, Jang-Young, Xun, Luying (1998) Novel biological process for L-DOPA production from L-tyrosine by p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase. *Biotechnology letters*. 20:479-482.
- Lütke-Eversloh, Tina, Stephanopoulos, Gregory (2005) Feedback inhibition of chorismate mutase/prephenate dehydrogenase (TyrA) of *Escherichia coli*: generation and characterization of tyrosine-insensitive mutants. *Appl Environ Microbiol*. 71(11):7224-7228.
- Lütke-Eversloh, Tina, Stephanopoulos, Gregory (2007) L-Tyrosine production by deregulated strains of *Escherichia coli*. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 75:103-110.
- Lütke-Eversloh, Tina, Stephanopoulos, Gregory (2007) Combinatorial pathway analysis for improved L-tyrosine production in *Escherichia coli*: Identification of enzymatic bottlenecks by systematic gene overexpression. *Metabolic Engineering*. 10:69-77.
- Lütke-Eversloh, Tina, S. Santos, Christine, Nicole and Stephanopoulos, Gregory (2007) Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 77:751-762.
- Miller, J. E., Backman, K. C., O'Connor, M. J., and Hatch, R.T. (1987) Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol*. 2:143-149.

- Olson, Monica, Dyk Van TinaK *et al.* (2007) Production of tyrosine from sucrose or glucose achieved by rapid genetic changes to phenylalanine-producing *Escherichia coli* strains. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*.74:1031-1040.
- Park, Hee-Sung, Lee, J., and Kim, H. S. (1998) Production of L-DOPA (3,4-Dihydroxyphenyl-L-alanine) from Benzene by Using A Hybrid Pathway. *Biotechnology and Bioengineering*.58: 339-343.
- Patnaik, R., Spitzer, R., Liao, J. (1995) Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli*: confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of *aroG*, *tktA*, and *pps* activities. *Biotech. Bioeng.* 46:361-370
- Patnaik, R., Zolandz, R., Green, D., and Krayne D. (2007) L-Tyrosine Production by Recombinant *Escherichia coli*: Fermentation Optimization and Recovery. *Biotechnology and Bioengineering*. 99: 741-752.
- Pittard, James, Camakaris, Helen and Yang, Ji. (2005) The TyrR regulon. *Molecular Microbiology*. 55:16-26.
- Plonka, Przemyslaw, and Grabacka, Maja (2006) Melanin synthesis in microorganisms. *Biotechnological and medical aspects. Acta Biochimica Polonica*. 53:429-443.
- Polen, T., Kramer, M., Bongaerts, J., Wubbolts. M., and Wendisch. V. F. (2005) The global gene expression response of *Escherichia coli* to L-phenylalanine. *Journal of Biotechnology*. 115:221-237.
- Pras N. (1993) *Mucuna pruriens*: improvement of the biotechnological production of the anti-parkinson drug l-DOPA by plant cell selection. *Pharm World Sci*. 15(6):263–8.
- Prieto, M. A., Díaz, E., and García, José L. (1996) Molecular Characterization of the 4-Hydroxyphenylacetate Catabolic Pathway of *Escherichia coli* W: Engineering a Mobile Aromatic Degradative Cluster. *Journal of Bacteriology*. 178:111-120.
- Prieto, M. A., Perez-Aranda A., and García, José L. (1993) Characterization of an *Escherichia coli* Aromatic Hydroxylase with a Broad Substrate Range. *Journal of Bacteriology*. 175:2162-2167.
- Seo, S., Sharma, V., Sharma, N (2003) Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food. Chem*. 51:2837-2853.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Rueda-Benítez, P., Porta, H., and Rocha-Sosa, M. (2005) A red beet (*Beta vulgaris*) UDP-glucosyltransferase gene induced by wounding, bacterial infiltration and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*. 58:605-611.
- Sigüenza, R., Flores, N., Hernández, G., Martínez, A., Bolivar, F., and Valle, F. (1999) Kinetic characterization in batch and continuous culture of *Escherichia coli* mutants affected in

- phosphoenolpyruvate metabolism: differences in acetic acid production. *W J Microbiol Biotech.* 15:587-592.
- Sikander, Ali, Ikram-ul-Haq (2006) Innovative Effect of Illite on Improved Microbiological Conversion of L-Tyrosine to 3,4 Dihydroxy Phenyl L-Alanine (L-DOPA) by *Aspergillus oryzae* ME₂ Under Acidic Reaction Conditions. *Current Microbiology.* 53:351-357.
 - Sima, F. (2007) Development of a Combined Biological and Chemical Process for Production of Industrial Aromatics from Renewable Resources. *Annual Review of Microbiology.* 61:51-69.
 - Snell, K. D., Draths, K. M., and Frost, J. W. (1996) Synthetic Modification of the *Escherichia coli* Chromosome: Enhancing the Biocatalytic Conversion of Glucose into Aromatic Chemicals. *J. Am. Chem. Soc.* 118:5605-5614.
 - Sprenger, G. (2007) From scratch to value: engineering *Escherichia coli* wild type cells to the production of L-phenylalanine and other fine chemicals derived from chorismate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 75:739-749.
 - Stephanopoulos, G (1998) Metabolic engineering. *Biotech.Bioeng.* 58:119-120.
 - Sukumaram, C. (1979) An actinomycete producing L-3,4-dihydroxyphenylalanine from L-tyrosine. *J. Biosci.* 1:235-239.
 - Turnbull, J., Morrison, J. (1990) Chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli*. 2. Evidence for two different active sites. *Biochemistry.* 29:10255- 10261.
 - Xun, L. and Sandvik, E. R. (2000) Characterization of 4-Hydroxyphenylacetate 3-Hydroxylase (HpaB) of *Escherichia coli* as a Reduced Flavin Adenine Dinucleotide-Utilizing Monooxygenase. 66: 481-486.
 - Yang, Ji, Camakaris, Helen, and Pittard, James (2004) Mode of action of the TyrR protein: repression and activation of the promoter *tyrP* of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology.* 52:243-256.
 - Yang, Ji, Camakaris, Helen and Pittard, James (2002) Molecular analysis of tyrosine- and phenylalanine- mediated repression of the *tyrB* promoter by the TyrR protein of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology.* 45(5):1407-1419.
 - Yang, Ji, Genesan, J., and Pittard, James (1993) A Genetic Analysis of Various Functions of the TyrR Protein of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* 175(6):1767-1776.
 - Zhang, S., Wilson, D. B., and Ganem, B. (2003) An engineered chorismate mutase with allosteric regulation. *Bioorg Med Chem.* 11:3109-3114.
 - Zhao, G., Xia, T., Ingram, L. O., and Jensen, R. A. (1993) An allosterically insensitive class of cyclohexadienyl dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Eur J Biochem.* 212:157-165.