



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Producción de ácidos cinámico y
p-hidroxicinámico en cepas de *Escherichia coli* PTS⁺ y PTS⁻Glc⁺,
empleando azúcares simples y una mezcla de éstas**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en I. Ana Alejandra Vargas Tah

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Guillermo Gosset Lagarda
Instituto de Biotecnología - UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. María Brenda Valderrama Blanco
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Dr. Víctor Manuel González Zúñiga
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MÉXICO, D. F. Noviembre, 2015



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.



Este trabajo fue realizado 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 de sus estudios de Doctorado, Ana Alejandra Vargas Tah contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Becario 103361.

El presente trabajo de investigación fue financiado por los fondos:

CONACyT 177568

UNAM PAPIIT IN202611.





Dedicada con infinito amor y profundo agradecimiento,

A mis padres,
Azarmabet y Juan.

A mis hermanas, Isabel y Gaby.

A mis cuatro pequeños sobrinos.

Por todo el apoyo, cariño y comprensión
que me brindaron en ésta etapa.

Gracias a todos, los amo.

A la memoria de mi abuelita Juanita, quien fue para mí,
un ejemplo de amor y sabiduría.

Angélica, Iktan, Axel e Itzae, deseo que lleguen más lejos que yo.





Agradecimientos

A mi tutor: Dr. Guillermo Gosset Lagarda (IBT-UNAM)

A mi comité tutor:

Dra. Ma. Brenda Valderrama Blanco (SICyT del Estado de Morelos; IBT-UNAM)

Dr. Víctor Manuel González Zúñiga (CCG-UNAM)

A los miembros del jurado:

Dr. Agustín López-Munguía Canales (IBT-UNAM)

Dr. Lorenzo Segovia Forcella (IBT-UNAM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (CEIB-UAEM)

Dr. José Utrilla Carreri (CCG-UNAM)

Dr. Daniel Segura González (IBT-UNAM)

Al personal Académico y Técnico del Laboratorio.

Dr. Alfredo Martínez Jiménez (Por sus aportaciones al desarrollo del proyecto)

Q. I. Luz María Martínez Mejía (Clonación y secuenciación de los genes PAL/TAL)

M. en C. Georgina Hernández Chávez (HPLC)

C.D. Mercedes Enzaldo Cruz (Apoyo técnico)

A.L. Aurelia González Guzman (Apoyo en el laboratorio)

En forma especial a:

Dr. Mario Rocha Sosa († septiembre de 2013), por su contribución con ideas y con el material genómico para la clonación de la enzima PAL de *A. thaliana*.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación (IBT-UNAM):

M. en C. Jorge Yáñez Ponce de León

Dr. Paul Gaytán Colín


M. en C. Eugenio López Bustos


Q.I. Santiago Becerra

A la unidad de Biblioteca (IBT-UNAM)

B.A. Dip. Lib. A.L.A. Shirley Ainsworth

Sr. Omar Arriaga





A todos aquellos que contribuyeron al desarrollo de mi proyecto, aportando ideas en seminarios y/o apoyo técnico.

Dr. Adelfo Escalante Lozada
L. Antonio Bolaños Guillen
Dr. Francisco Bolívar Zapata
Dr. Iván Gutiérrez
Dra. Noemí Flores

Dra. Andrea Sabido
Dr. Cesar Aguilar
Dr. Gerardo Huerta
Dra. Ma Inés Chávez
MC. Ramón de Anda

MC. Andrés Martínez
Sra. Delia Caro C.
Sra. Gloria Villa
Dr. Marco T. Fernández
Dra. Sara Centeno

A todos mis compañeros de laboratorio Gosset-Bolivar-Martínez-Escalante, que me acompañaron y contribuyeron a mi desarrollo profesional y personal. Caheri, Man, Juanito, Ale Mejía, Fabian, Susy, Karina, los Davids, Diego, Mau y los que faltan.

Finalmente, un agradecimiento muy especial a:

Montserrat Orencio, Noemí Sirena, Natividad Cabrera, Karla Martínez, Rocío Calderón, Martha López G (Mars), Víctor Balderas, Merite Mendoza, Estefanía Sierra, Viviana López, Alberto Rodríguez, Lilí Gallo, Adolfo Pérez, Antonio Luis, Héctor Martínez, Joel Ramírez, Familia Martínez Rodríguez (incluyendo a Sky), Ángela Ávila y Joel Hernández S.

Por su amistad, enseñanzas (dentro y fuera del campo de la ciencia), apoyo, sonrisas, aventuras, complicidad y momentos que compartimos juntos, durante mis estudios de doctorado y hasta ahora. Algunos de ustedes, a pesar de la distancia. Sus palabras de apoyo y aliento, fueron y seguirán siendo, invaluable para mí.

Es un honor contar con su amistad.



INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS	ii
INDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	2
2.1 Estrategias para incrementar la disponibilidad de L-Fen y L-Tir	3
2.2 Producción recombinante de CA y pHCA	6
2.2.1 Enzimas PAL / TAL	6
2.2.2 Microorganismos empleados	7
3 HIPÓTESIS	10
4 OBJETIVOS	10
4.1 Objetivo General	10
4.2 Objetivos particulares	10
5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	11
5.1 Cepas	11
5.2 Plásmidos	11
5.2.1 Clonación del gen PAL de R. glutinis	11
5.2.2 Clonación del gen PAL de A. Thaliana	13
5.3 Medios de Cultivo	13
5.4 Condiciones de cultivo	14
5.4.1 Pre Inóculo	14
5.4.2 Inóculo	14
5.4.3 Cinética de Producción	15
5.5 Métodos Analíticos	15
5.5.1 Densidad óptica	15
5.5.2 Cuantificación de las fuentes de carbono	15
5.5.3 Cuantificación de los AAA, CA y pHCA	16
5.6 Parámetros Cinéticos y Estequiométricos	16
6 RESULTADOS y DISCUSIÓN	17
6.1 Fenotipos	17
6.1.1 Producción de los precursores L-Tir y L-Fen	17
6.2 Producción de CA y pHCA en medio M9 suplementado con fuentes de carbono individuales: Glucosa, xilosa y arabinosa	21
6.3 Producción de CA y PHCA en cultivos con medio M9 suplementado con una mezcla de azúcares: Hidrolizado simulado	26
6.4 Efecto inhibitorio del pHCA y el CA en E. coli	31
6.5 Estrategias para incrementar la producción de pHCA	33
6.5.1 Producción de pHCA y CA a 30 °C	33
6.5.2 Inducción de los genes involucrados en la producción de CA y pHCA, a las 7 h del inicio del cultivo a 30 °C	36
6.5.3 Efecto de la inactivación del gen pheA en la síntesis de CA y pHCA	40
6.6 Consideraciones finales	42
7 CONCLUSIONES	46
8 PERSPECTIVAS	47
9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
10 Anexo I. Figuras	53
11 Anexo II. Artículos publicados	56

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Afinidades de algunas enzimas con actividad PAL y TAL caracterizadas.	7
Tabla 2. Cepas y plásmidos empleados en el presente trabajo.	12
Tabla 3. Parámetros cinéticos y rendimientos de las cepas WPJ y VPJ que expresan el plásmido pJLBaroGfbrktA, evaluadas en medio mineral M9 suplementado con glucosa, xilosa o arabinosa (10 g/L) como fuentes de carbono. Condiciones de cultivo: 37 °C y 300 rpm.	21
Tabla 4. Parámetros cinéticos y rendimientos de las cuatro cepas evaluadas para la producción de pHCA y CA, en medio mineral M9 suplementado con glucosa 55.5 mM (10 g/L) como fuente de carbono. Condiciones de cultivo: 37 °C y 300 rpm.	22
Tabla 5. Parámetros cinéticos y rendimientos de las cuatro cepas evaluadas en medio M9 suplementado con xilosa 66.6 mM (10 g/L) como fuente de carbono. Condiciones de cultivo: 37 °C y 300 rpm.	23
Tabla 6. Parámetros cinéticos y rendimientos de las cuatro cepas evaluadas en medio M9 suplementado con arabinosa 66.6 mM (10 g/L) como fuente de carbono. Condiciones de cultivo: 37 °C y 300 rpm.	24
Tabla 7. Parámetros cinéticos de los cultivos en medio mineral con hidrolizado simulado. Glucosa 6.66 mM (1.2 g/L), xilosa 53.3 mM (8 g/L), arabinosa 5.33 mM (0.8 g/L) y acetato 6.09 mM (0.5 g/L). Azúcares totales 62.29 mM (10 g/L). Condiciones de cultivo de las cepas WPJRg, WPJAt, VPJRg y VPJAt: 300 rpm a 37 y 30 °C. Cepas W(<i>pheA</i> ⁻)Rg y W(<i>pheA</i> ⁻)At: 300 rpm y 37 °C.	27
Tabla 8. Datos comparativos de producción de los resultados obtenidos en éste trabajo con los reportados en la literatura.	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 . Vía metabólica para la síntesis de aminoácidos aromáticos.	5
Figura 2. Producción de L-Tir y L-Fen en las cepas WPJ y VPJ, las cuales expresan en plásmido los genes <i>aroG^{fb}</i> y <i>tktA</i> . Evaluación realizada en medio mineral M9 con 10 g/L de azúcares totales en matraces con mamparas a 37 °C y 300 rpm.	18
Figura 3. Cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de L-Tir y L-Fen, de las cepas WPJ y VPJ. Evaluación realizada en medio mineral M9 suplementado con 10 g/L del azúcar. Las condiciones de cultivo fueron 37 °C y 300 rpm.	19
Figura 4. Rendimiento de CA y pHCA por fuente de carbono para las cepas crecidas en medio mineral suplementadas con glucosa, xilosa, arabinosa o hidrolizado simulado.	28
Figura 5. Velocidades específicas de producción de CA y pHCA de las cepas de producción caracterizadas en medio mineral suplementadas con glucosa, xilosa, arabinosa o hidrolizado simulado.....	28
Figura 6. Cinéticas de crecimiento y producción de las cepas WPJRg, VPJRg, WPJAt y VPJAt evaluadas en Hidrolizado Simulado. Glucosa 6.66 mM (1.2 g/L), xilosa 53.3 mM (8 g/L), arabinosa 5.33 mM (0.8 g/L) y acetato 6.09 mM (0.5 g/L). Azúcares totales 62.29 mM (10 g/L). Condiciones de cultivo: 300 rpm, 37 °C.....	30
Figura 7. Velocidad relativa de crecimiento de la cepa W3110 en medio mineral suplementado con CA y pHCA.	32
Figura 8. Cinéticas de crecimiento y producción de las cepas WPJRg, VPJRg, WPJAt y VPJAt evaluadas en hidrolizado simulado. Condiciones de cultivo: 300 rpm, 30 °C.....	35
Figura 9. Cinéticas de crecimiento y producción de las cepas WPJRg, VPJRg, WPJAt y VPJAt evaluadas en hidrolizado simulado a 30 °C, induciendo a las 0 y 7 h del cultivo. Condiciones de cultivo: 300 rpm, 30 °C.....	37
Figura 10. Bioconversión de a) L-Tir y b) L-Fen a pHCA y CA respectivamente, con células completas expresando las enzimas PALRg y PALAt en la cepa de <i>E. coli</i> W3110. Medio mineral M9 sin fuente de carbono, 30 °C.	38
Figura 11. Cinéticas de crecimiento y producción de las cepas W(pheA ⁻)Rg y W(pheA ⁻)At, evaluadas en hidrolizado simulado. Condiciones de cultivo: 300 rpm, 37 °C.....	41

RESUMEN

Los ácidos cinámico (CA) y *p*-hidroxicinámico (pHCA) son dos compuestos de gran interés biotecnológico, pues son precursores de saborizantes, antioxidantes, fármacos que ayudan en el tratamiento del cáncer y también en la producción de *p*-hidroxiestireno. Actualmente, éstos compuestos se extraen de plantas, por ello, diversos grupos de investigación están interesados en obtenerlos mediante procesos de fermentación, empleando microorganismos modificados por Ingeniería de Vías Metabólicas (IVM). En la mayoría de los estudios, se ha empleado glucosa como fuente de carbono. En el presente proyecto de investigación, cepas de *Escherichia coli* con el sistema PTS activo (W3110) e inactivo (PTS⁻Glc⁺), fueron transformadas con dos plásmidos. El primero contenía los genes que codifican para la transcetolasa (TktA) y una versión de la enzima DAHP sintasa (AroG^{fbr}, insensible a inhibición por L-Fenilalanina). La expresión de estos genes dirigió el flujo de carbono a la vía de los aminoácidos aromáticos. El segundo plásmido se utilizó para expresar el gen PAL/TAL de *Rhodotorula glutinis* o el gen PAL de *Arabidopsis thaliana*. La expresión de estos genes dirigió el flujo de carbono de precursores aromáticos a pHCA y CA, respectivamente. Las cuatro cepas generadas de la combinación de plásmidos y fenotipos, fueron evaluadas en medio mineral suplementado con glucosa, xilosa ó arabinosa y una mezcla de éstas.

El CA fue detectado en cepas que expresaron la enzima PAL de *A. thaliana* (PALAt), mientras que el CA y el pHCA fueron acumulados en cepas que expresaron la enzima de *R. glutinis* (PALRg). El mejor título de CA en azúcares individuales fue de 1,022 µM con el fondo PTS⁺ evaluado en glucosa; sin embargo, el mayor título de pHCA fue de 107.2 µM, obtenido con la cepa VPJRg (PTS⁻Glc⁺). En mezclas de azúcares los títulos de ambos ácidos disminuyeron. La relación molar de producción pHCA/CA de la enzima PALRg fue de 0.93 obtenido con la cepa WPJRg (fondo PTS⁺ que expresa la enzima PAL de *R. glutinis*). Para incrementar la producción de pHCA en la mezcla de azúcares, se disminuyó la temperatura de cultivo a 30°C; sin embargo la relación pHCA/CA disminuyó a

0.48. Considerando un posible efecto de carga metabólica, la expresión de los plásmidos fue inducida a las 7 horas del inicio del cultivo, observando una mayor reducción en el título de pHCA. Sin embargo, bajo estas condiciones, la cepa WPJAt (fondo PTS⁺ que expresa la enzima PAL de *A. thaliana*), produjo el mayor título de CA (1,373 μ M). La última estrategia empleada para incrementar la producción de pHCA fue limitar la producción de L-Fen, mediante la eliminación del gen *pheA* en la cepa WPJRg. Esta estrategia incrementó la relación molar pHCA/CA a 5.1, con una producción de 322 μ M de pHCA.

El estudio realizado mostró que la producción del CA en mezcla de azúcares se vio favorecida, empleando la cepa WPJAt, crecida a 30 °C e induciendo los genes de producción, a las 7 horas del inicio del cultivo.

La relación molar pHCA/CA de 0.93 mostrada por la cepa WPJRg crecida en mezcla de azúcares a 37 °C, se incrementó a 5.1 limitando la disponibilidad de L-Fen, mediante la eliminación del gen *pheA*, favoreciendo la producción de pHCA.

A la fecha, este es el primer estudio que reporta el uso de mezclas de azúcares para la producción de CA y pHCA.

ABSTRACT

Cinnamic acid (CA) and *p*-hydroxycinnamic acid (pHCA) are two compounds of great biotechnological interest; they are precursors of flavorings, and antioxidants compounds, as well as for the production of *p*-hydroxystyrene and drugs that help in the treatment of cancer. Currently, these compounds are extracted from plants, therefore, several research groups are interested in the production of these aromatic acids using fermentation processes and metabolic engineered microorganisms. In most of studies, glucose has been used as the carbon source. In this work, two strains of *Escherichia coli*, with active PTS (W3110) and inactive (PTS⁻Glc⁺) system, were transformed with two plasmids. The first plasmid contains the genes coding for the enzymes transketolase (TktA) and an insensitive version to inhibition by L-Phenylalanine of DAHP synthase (AroG^{fbr}). The expression of these genes modifies the flow of carbon to the aromatic amino acid pathway. The second plasmid was used to express the PAL/TAL gene from *Rhodotorula glutinis* or the PAL gene from *Arabidopsis thaliana*. All four strains generated from the combination of plasmids and phenotypes were evaluated in mineral medium supplemented with glucose, xylose and arabinose or a mixture of these sugars. The CA was detected in strains expressing the PAL enzyme from *A. thaliana* (PALAt), while CA and pHCA were accumulated in strains expressing the enzyme *R. glutinis* (PALRg). The best title of CA in individual sugars was 1,022 μM with active PTS⁺ system and using glucose; however, the highest title of pHCA (107.2 μM) was obtained also with glucose but with the VPJRg (PTS⁻Glc⁺) strain. When the mixture of sugars was used, the titles of both acids decreased. The production molar ratio of pHCA/CA, was 0.93 with WPJRg strain that express PALRg enzyme. As an attempt to increase pHCA production, the cultivation temperature was decreased to 30 °C; however, the pHCA/CA ratio decreased to 0.48. Considering a possible metabolic burden effect, the plasmids expression was induced 7 hours after inoculation: but a reduction in the pHCA title was also observed. Nevertheless, using these conditions the strain WPJAt produced the highest title of CA (1,373 μM). The last strategy employed to increase the pHCA production was

limiting the L-Fen production deleting the *pheA* gene in the strain WPJRg. This strategy increased the molar pHCA/CA ratio to 5.1, with a production of 322 μ M of pHCA.

This study showed that the CA production, in sugar mixtures, was increased using the strain with the active PTS system and expressing the PAL enzyme from *A. thaliana* (WPJA_t) at 30 °C and inducing the gene expression 7 hours after inoculation.

The molar pHCA/CA ratio of 0.93, obtained with the strain WPJRg (PTS⁺ expressing the *R. glutinis* PAL enzyme) and in sugar mixtures at 37 °C, was increased to 5.1 by limiting the L-Fen pool, deleting the *pheA* gene and improving the production of pHCA.

This is the first study reporting the use of sugar mixtures for the production of CA and pHCA.

1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la población en general ha incrementado su interés en mejorar su salud y calidad de vida, por ello la industria ha ampliado el mercado de compuestos que satisfagan éstas necesidades. Algunos fenilpropanoides, conocidos también como antioxidantes, en los últimos años han cobrado gran interés industrial, debido a sus propiedades benéficas.

Entre sus propiedades se encuentran: inhibir el crecimiento de las células cancerosas, reducir el riesgo de enfermedades cardíacas, mejorar la circulación impidiendo la formación de trombos, disminuir la concentración de colesterol y de triglicéridos, proteger la mucosa gástrica y como antiinflamatorios y analgésicos (Harborne and Williams, 2000). Por sus propiedades, se recomienda ingerir dietas ricas en flavonoides, los cuales pueden encontrarse en frutas y verduras, en la soya, el té verde y negro, café, vino o ingiriendo suplementos nutricionales que contengan dichos compuestos.

Debido al gran mercado que representan los fenilpropanoides, diversos grupos de investigación han dirigido sus estudios a la producción de éstos compuestos a través de la Ingeniería de Vías Metabólicas (IVM) de microorganismos fácilmente manipulables en laboratorio, como *Escherichia coli* (Kaneko et al., 2003; Hwang et al., 2003; Miyahisa et al., 2005; Watts et al., 2004) y *Saccharomyces cerevisiae* (Jiang et al., 2005).

Los fenilpropanoides son una serie de metabolitos secundarios de plantas, como el resveratrol, la pinosilvina, la naringenina, etc., cuya estructura base es un esqueleto C₆-C₃-C₆, que puede sufrir muchas modificaciones, así como la adición de grupos funcionales dando origen a una familia muy diversa de compuestos (Aoki et al., 2000). La vía de síntesis de los fenilpropanoides, es una continuación de la vía común de síntesis de los aminoácidos aromáticos (AAA). En plantas, ésta ruta biosintética inicia con dos metabolitos clave, el ácido *p*-hidroxicinámico (pHCA) y el ácido cinámico (CA). El pHCA se produce por dos vías; la primera y la más frecuente es la des-aminación de la L-fenilalanina (L-Fen), por las enzimas

fenilalanina amonio liasa (PAL por sus siglas en inglés) para dar origen al ácido cinámico (CA), el cual es hidroxilado por la cinamato 4 hidroxilasa (C4H) para producir pHCA. La segunda es por la des-aminación de la L-tirosina (L-Tir) mediante la enzima tirosina amonio liasa (TAL). El CA es producido únicamente por la desaminación de la L-Fen (Fig 1).

El pHCA además de ser uno de los precursores de los flavonoides, es un compuesto de gran interés industrial pues es un precursor de una amplia variedad de químicos de valor comercial, como saborizantes (ej.), fragancias (ej.), fármacos (resveratrol) y biocosméticos. Adicionalmente, mediante su decarboxilación no oxidativa genera *p*-hidroxiestireno o 4-vinil fenol, el cual es empleado en la fabricación de semiconductores (Qi et al., 2007). Por su parte, en años recientes, el CA ha cobrado gran interés, pues se ha observado que pacientes que han ingerido extracto de *Cinnamomi ramulus*, rico en CA, reestablecen su mucosa gástrica, debido a la inhibición en el crecimiento de *Helicobacter pylori*; por lo que actualmente se estudia como un precursor de medicamentos para el tratamiento y/o prevención de la gastritis (Jung et al., 2011).

2 ANTECEDENTES

La principal forma de obtener el CA y el pHCA es a través de la extracción de plantas, cuyos rendimientos son bajos, o mediante las reacciones de condensación de Perkin (anhídrido de ácido y aldehído aromático) o Doebner (ácido malónico y benzaldehído) (Vogel & Furniss, 1989; Kolb et al., 1990; Mitra et al., 1999), cuyo proceso de recuperación requiere de elevados gastos energéticos y produce una elevada cantidad de desechos químicos que se consideran contaminantes ambientales. Por lo anterior, actualmente se utiliza la IVM de microorganismos para obtenerlos en forma recombinante.

El primer paso para la producción de CA y pHCA en forma recombinante es incrementar el flujo de carbono hacia la vía de los AAA. De esta forma se aumenta la disponibilidad de L-Fen y L-Tir, aminoácidos que en un paso posterior

emplearán las enzimas heterólogas PAL y TAL, expresadas en el microorganismo para producir CA y pHCA.

2.1 Estrategias para incrementar la disponibilidad de L-Fen y L-Tir

Para obtener una mayor disponibilidad de AAA, es necesario manipular el metabolismo central del organismo de interés, con el fin de incrementar el flujo de carbono hacia la vía de los AAA. En el presente estudio empleamos como microorganismo de estudio a la bacteria *E. coli*.

Las estrategias empleadas para incrementar el flujo carbono disponible hacia ésta vía, se han enfocado en aumentar la disponibilidad de dos metabolitos clave en la ruta de los AAA, la eritrosa 4 fosfato (E4P), proveniente de la ruta de las pentosas fosfato y el fosfoenolpiruvato (PEP), que proviene de la ruta glicolítica (Fig 1) (Chávez-Béjar et al., 2012). La condensación de estos dos compuestos genera el primer metabolito de la vía de los AAA, el 3-deoxy-D-arabino-heptuloso 7-fosfato (DAHP) (Fig 1). Seis reacciones enzimáticas posteriores conducen a la síntesis del corismato (CHA), precursor de los aminoácidos L-Tir y L-Fen. Debido a que los organismos sólo producen los aminoácidos que requieren para la síntesis de sus proteínas, la vía de producción de los aminoácidos aromáticos se encuentra altamente regulada. La regulación en la producción de DAHP está dada por las tres enzimas DAHP sintasa AroF, AroG y AroH. Cada una de ellas se encuentra regulada por producto, es decir, por los aminoácidos que finalizan la vía, L-Tirosina, L-Fenilalanina y Triptofano respectivamente (Yang and Pittard, 2013). La desregulación de la vía a través de la eliminación de la inhibición por producto de las enzimas DAHP sintasa es otra forma de incrementar el flujo de carbono a la vía de los AAA. AroG aporta aproximadamente el 70 % de la actividad DAHP sintasa (Hu et al., 2003), por lo tanto, diversos grupos han empleado enzimas AroG resistentes a inhibición por producto (AroG^{fbr} por sus siglas en Inglés) para desregular la vía (Flores et al., 1996). Se ha demostrado que la sobre-expresión de AroG^{fbr} junto con TktA incrementa al doble la disponibilidad

de DAHP para la producción de los aminoácidos aromáticos (Flores et al., 1996; Gosset et al., 1996; Berry, 1996; Chávez-Béjar et al., 2008).

En otros estudios se ha observado que la sobre expresión del gen *ppsA*, que codifica para la PEP sintasa, y *tktA* incrementan la síntesis de L-Tir (Lütke-Eversloh and Stephanopoulos, 2008). Una estrategia alterna es incrementar la disponibilidad de PEP empleando cepas carentes del sistema PTS, dejando disponible el PEP que se emplea en la internalización de la glucosa, para la síntesis de AAA (Flores et al., 1996) –Fig 1. Por otra parte, se sabe que en cepas carentes del sistema PTS, el transporte de la glucosa es dependiente de la permeasa GalP y la fosforilación es dependiente de la glucocinasa (Glc) (Flores et al., 1996). Por lo tanto, cepas que sobre-expresan ambas proteínas restauran el transporte de glucosa al interior de las células, y en un 89% restauran la velocidad de crecimiento de una cepa carente del sistema PTS (Hernández-Montalvo et al., 2003; De Anda et al., 2006), permitiendo que las dos moles de PEP generadas en la glucólisis queden disponibles para la síntesis de los AAA. También se sabe que la represión catabólica se ve reducida en éste tipo de cepas, por lo que éstas pueden asimilar mezclas de azúcares más rápido que las cepas con fenotipo PTS⁺ (Hernández-Montalvo et al., 2001). Esto se debe a que la enzima EIIA^{glc} que se encarga de transferir el grupo fosfato de la PEP a la glucosa se encuentra fosforilada debido a que está inactivo el sistema PTS y por lo tanto al no estar unida a las permeasas no PTS, permite el transporte de otras fuentes de carbono no PTS. Ésta enzima en su versión no fosforilada, es decir cuando está activo el sistema PTS, se une a las permeasas no PTS, inhibiendo el transporte de otras fuentes de carbono (Postma and Roseman, 1976; Postma et al., 1993).

Como se ha mencionado, la sobre-expresión de los genes *tktA* y *aroG^{fbr}*, así como el empleo de cepas carentes del sistema PTS, permiten aumentar el flujo de carbono hacia la vía de los AAA, incrementando la producción de L-Tir y L-Fen, precursores de los ácidos aromáticos de interés.

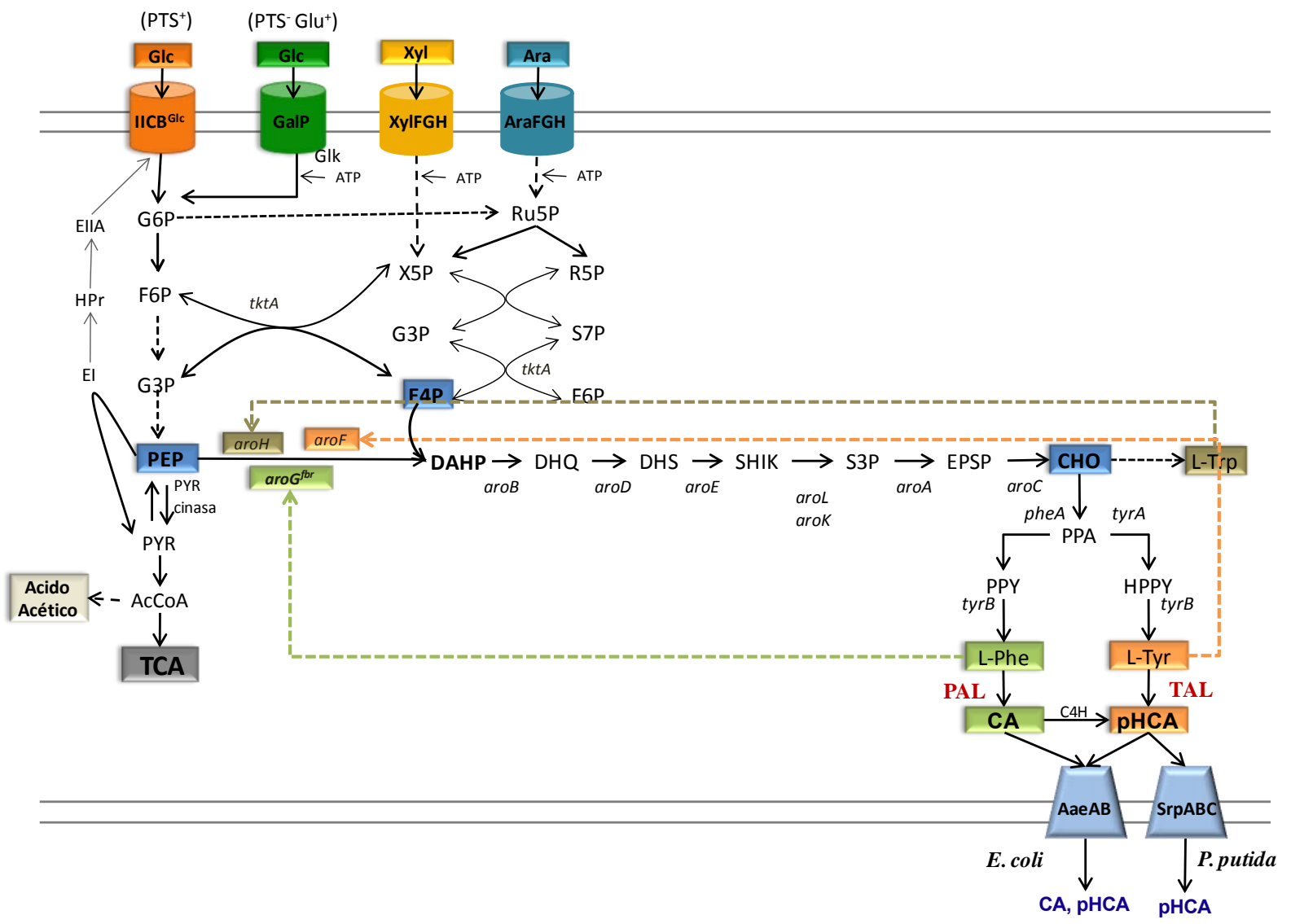


Figura 1 . Via metabólica para la síntesis de aminoácidos aromáticos.

2.2 Producción recombinante de CA y pHCA.

2.2.1 Enzimas PAL / TAL

Como se mencionó anteriormente, la síntesis de CA y pHCA se realiza por la desaminación de la L-Fen y la L-Tir a través de las enzimas fenilalanina amonio liasa y tirosina amonio liasa, conocidas por sus siglas en inglés como PAL y TAL. De las enzimas conocidas hasta el momento, las que presentan actividad TAL también muestran actividad PAL; sin embargo, hay enzimas que únicamente muestran actividad PAL (MacDonald and D’Cunha, 2007)- Tabla 1. A la fecha no hay ningún reporte de enzimas que sólo desplieguen actividad TAL. Por lo tanto, aquellas enzimas que despliegan actividad PAL/TAL producen una mezcla de CA y pHCA, cuando *in vitro* o *in vivo*, estén presentes la L-Fen y la L-Tir. Por su parte las enzimas que sólo muestran actividad PAL, sólo producirán CA aún en presencia de ambos aminoácidos. Como se muestra en la Tabla 1, diversas enzimas han sido expresadas en forma recombinante para producir pHCA y CA. En el presente trabajo fueron empleadas la enzima PAL de *Rhodotorula glutinis* (PALRg) y la isoenzima PAL2 de *Arabidopsis thaliana* (PALAt) como enzimas modelo para la producción recombinante de pHCA y CA.

La enzima PAL de *R. glutinis* ha sido empleada para la producción recombinante de éstos ácidos aromáticos, principalmente pHCA (Vannelli et al., 2007a; Vannelli et al., 2007b; Watts et al., 2006). Su característica principal es que muestra tanto actividad TAL como PAL, siendo mayor su afinidad a L-Tir que a L-Fen (Tabla 1). Sin embargo, su eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) para L-Tir ($0.52 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) es un orden de magnitud menor que para L-Fen ($1.9 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Zhu et al., 2013).

Por otra parte, han sido descrito cuatro isoformas de la enzima PAL en *A. thaliana* (Cochrane et al., 2004). La enzima PAL1 ha sido empleada para sintetizar CA como intermediario en la producción de naringenina (Watts et al., 2004); sin embargo, para explorar la producción de CA se decidió emplear la PAL2 que no ha sido empleada para la producción de dicho ácido aromático y muestra mayor afinidad a L-Fen respecto a las enzima PAL3 y PAL4, también de *A. thaliana*. La

eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) que ha sido reportada para ésta enzima es de $5.12 \times 10^7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Tabla 1. Afinidades de algunas enzimas con actividad PAL y TAL caracterizadas.

Organismo	K_m L-Fen (μM)	K_m L-Tir (μM)	Referencia
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	1277	15.6	(Kyndt et al., 2002)
<i>Zea maíz</i>	270	19	(Rosler, 1997)
<i>Petroselinum crispum</i>	24.5	7.8	(Appert et al., 1994)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	560	60	(Xue et al., 2007b)a
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	161	44	(Xue et al., 2007a)
<i>Thichosporum cutaneum</i>	2330	432	(Vannelli et al., 2007b)
<i>Rhodotorula minuta</i>	584	212	(Vannelli et al., 2007b)
<i>Rhodotorula graminis</i>	448	154	(Vannelli et al., 2007b)
<i>Streptomyces maritimus</i> (encP)	23	---	(Xiang and Moore, 2005)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1340	560	(Zhu et al., 20013)
<i>Arabidopsis thaliana</i> (PAL1)	68	---	(Cochrane et al., 2004)
<i>Arabidopsis thaliana</i> (PAL2)	64	---	(Cochrane et al., 2004)
<i>Arabidopsis thaliana</i> (PAL3)	256	---	(Cochrane et al., 2004)
<i>Arabidopsis thaliana</i> (PAL4)	71	---	(Cochrane et al., 2004)
<i>Saccharothrix espanaensis</i>	2860	15.5	(Berner et al., 2006)

2.2.2 Microorganismos empleados

Entre los microorganismos que han sido empleados para la producción de CA y pHCA se encuentran *Pseudomonas putida* (Nijkamp et al., 2005; Nijkamp et al., 2007), *Escherichia coli* (Vannelli et al., 2007a; 2007b; Kang et al., 2012; Xue et al., 2007a; Qi et al., 2007), *Saccharomyces cerevisiae* (Vannelli et al., 2007a) y *Streptomyces lividans* (Kawai et al., 2013; Noda et al., 2011; Noda et al., 2012). De éstas cepas, las dos primeras han sido modificadas genéticamente para incrementar la producción de los aminoácidos precursores de los ácidos aromáticos y todas ellas han expresado en forma heteróloga diferentes enzimas con actividad PAL/TAL. Una búsqueda de la actividad PAL/TAL de diferentes organismos mostró que la enzima de *R. glutinis* presenta la mayor actividad TAL. La expresión de esta enzima en una cepa de *E. coli* sobre-productora de L-Fen produjo ambos ácidos aromáticos en concentraciones de $380 \mu\text{M}$ de CA y $150 \mu\text{M}$ de pHCA (Vannelli et al., 2007a). La producción de pHCA también fue demostrada en una cepa de *E. coli*, que dirigía su flujo de carbono hacia la producción de L-Tir

expresando, en plásmido, una DAHP sintasa ($aroG^{fbr}$) y una enzima corismato mutasa preferato dehidrogenasa ($TyrA^{fbr}$) resistentes a inhibición por producto, además de una enzima PAL/TAL de *Saccharotrix espanaensis* con el uso de codones optimizados. La combinación de éstas modificaciones produjo 5933 μM de pHCA (Kang et al., 2012). *Pseudomonas putida* a través de mutagénesis y la expresión de la enzima PAL/TAL de *R. glutinis* ha logrado producir pHCA y CA en forma recombinante, con títulos de 10,600 y 5,400 μM en un reactor alimentado (Nijkamp et al., 2005 y 2007).

La producción de los ácidos aromáticos ha sido obtenida principalmente de azúcares simples o utilizando medio ricos; sin embargo, la tendencia actual es emplear fuentes de carbono provenientes de materiales de origen renovable, como lo son los polímeros de azúcares o la mezcla de azúcares provenientes de la hidrólisis de lignocelulosa (hidrolizados). Actualmente existe sólo un reporte de la producción de pHCA empleando una cepa de *S. lividans* que expresa la enzima PAL/TAL de *R. sphaeroides* y una endoglucanasa, obteniendo títulos de 4,526 y 3.045 μM de pHCA en 7 días, usando como sustrato celobiosa y celulosa tratada con ácido fosfórico respectivamente (Kawai et al., 2013). Por otra parte una cepa de *S. lividans* que expresa el gen de la enzima PAL de *S. maritimus* (EncP), empleando celulosa produjo 1,079 μM de CA y 3.307 μM con celo-oligosacáridos (Noda et al., 2012). Esta cepa empleando xilano y almidón produjo 877 y 3,104 μM de CA (Noda et al., 2011). Cabe mencionar que los medios empleados para producir los ácidos aromáticos, a través de azúcares derivados de la biomasa, en todos los casos han sido medios ricos y los títulos antes mencionados fueron alcanzados entre 3 y 7 días de cultivo.

En el presente proyecto se propone producir CA y pHCA empleando como modelo de estudio cepas de *E. coli* modificadas para dirigir el flujo de carbono hacia la vía de los AAA, mediante la sobre-expresión en plásmido, de los genes de una DAHP sintasa resistente a inhibición por producto ($aroG^{fbr}$) y de la transcetolasa (*tktA*) (Balderas-Hernández 2009). Las cepas empleadas fueron una cepa silvestre que tiene el sistema PTS activo (PTS^+) y una cepa derivada de ésta, carente del sistema PTS, que sobre-expresa *galP* en cromosoma para internalizar

glucosa y cuyo genotipo es PTS⁻Glc⁺ (VH33) (De Anda et. al., 2006). Las enzimas PAL/TAL que se evaluarán en éste estudio son las enzimas de *R. glutinis* y *A. thaliana*. Las enzimas fueron expresadas individualmente en los fondos genéticos antes mencionados. Las cepas generadas fueron caracterizadas en medio mineral con fuentes de carbono individuales (glucosa, xilosa y arabinosa) y en una mezcla de éstas (hidrolizado simulado, HS), a fin de identificar la combinación fenotipo-medio de cultivo que conduzca a los mejores parámetros de producción de CA y pHCA.

3 HIPÓTESIS

El estudio de la expresión de las enzimas PAL/TAL de *R. glutinis* y *A. thaliana* en cepas de *E. coli* PTS⁺ y PTS⁻Glc⁺, en medio mineral con glucosa, arabinosa, xilosa o la mezcla de estos azúcares, permitirá identificar la mejor combinación entre, el fenotipo, la enzima y la fuente de carbono, que producirá el mayor título de CA y/o pHCA.

4 OBJETIVOS

4.1 *Objetivo General.*

- Estudiar la producción de CA y pHCA, expresando las enzimas PAL/TAL de *R. glutinis* y *A. thaliana* en cepas de *E. coli* modificada mediante Ingeniería de Vías Metabólicas, para dirigir el flujo de carbono hacia la síntesis de L-Fen y L-Tir, con fondos genéticos PTS⁺ y PTS⁻Glc⁺, empleando azúcares simples y una mezcla de éstas. Identificar los mejores títulos y parámetros de producción de ambos ácidos.

4.2 *Objetivos particulares.*

- Dirigir el flujo de carbono hacia la vía de los AAA, mediante la expresión del plásmido pJLBaroG^{fbr}tktA en las cepas W3110 (PTS⁺) y VH33 (PTS⁻Glc⁺).
- Producir CA y pHCA con las cepas que dirigen el flujo de carbono hacia la vía de los AAA, mediante la expresión en plásmido de los genes PAL/TAL de *R. glutinis* y *A. thaliana* en forma individual.
- Caracterizar las cepas generadas en medio mineral con glucosa, xilosa y arabinosa como fuentes de carbono individuales. Calcular sus parámetros cinéticos y de producción.
- Caracterizar las cepas generadas, en medio mineral suplementado con una mezcla de glucosa, xilosa, arabinosa y acetato en proporciones similares a las de un hidrolizado hemicelulósico. Calcular sus parámetros cinéticos y de producción.
- Con base en los resultados anteriores, determinar cuál es el mejor fenotipo para tener la mayor producción de CA y pHCA, en términos de título.

5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1 Cepas.

Las cepas empleadas en éste trabajo y sus características se describen en la tabla 2. La cepa de *E. coli* W3110 es una cepa derivada de la cepa de *E. coli* K-12 (Bachman, 1972). La cepa VH33 es una cepa derivada de la cepa W3110, a la que le fue eliminado el sistema PTS que internaliza la glucosa. Para recuperar el crecimiento de esta cepa en glucosa, el promotor de la galactosa permeasa (GalP) fue sustituido por el promotor *trc*, el cual es un promotor fuerte de *E. coli* (De Anda et al., 2006).

La cepas W(*pheA*⁻) fue generada por transducción con el fago P1, empleando como cepa donadora la cepa mutante en *pheA* de la colección de mutantes de Keio (Baba et al., 2006). La selección de mutantes se hizo en cajas de medio LB con Km (30 µg/ml). La eliminación del gen *pheA* fue confirmada por PCR con los oligos *pheAFwdC*: GACGCCACAATCAATACACC y *pheARevC*: CGTCGAGCACGATCAGAATA.

5.2 Plásmidos

Para dirigir el flujo de carbono hacia la vía de los AAA se empleó el plásmido pJLBaroG^{fbr}tkTA (Balderas-Hernández et al., 2009). El vector para la clonación y expresión de los genes PAL de *R. glutinis* y *A. thaliana* fue el plásmido pTrc99A.

5.2.1 Clonación del gen PAL de *R. glutinis*.

El RNA total fue obtenido a partir de un cultivo de *R. glutinis* (ATCC 10788) en medio complex-sima (10 g de extracto de malta y 1 g de extracto de levadura por litro) suplementado con 1 g/L de L-Fen como inductor de la expresión de la PALRg. La extracción se realizó por el método de extracción TES-Fenol caliente (Current Protocols in Molecular Biology, Vol.3 13.12.1, 2006). Para la síntesis del cDNA se utilizó la transcriptasa reversa M-MuLV del Kit RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit Cat. No. K1632 de Fermentas, Life Sciences. Para la reacción de síntesis de cDNA se emplearon 5µg de RNA total y el oligo reverso

PALKpnRv (5'AGAGGGTACCCCAAGAAGCGAGTCCTAAGAG 3'). El DNA de doble cadena se amplificó a partir de 10 ng de cDNA con los oligos PALEcoFw (5'ATAGTAGAATTCCACAGGAAACAGACCATGGCACCCCTCGCTCGACTCGA) y PALKpnRv usando la polimerasa Long PCR EnzymeMix de ThermoScientific) Cat. No.K0182. El cDNA fue adenilado con la enzima Taq DNA polimerasa recombinante (ThermoScientific) y el producto de PCR fue clonado en el plásmido pCR[®]2.1-TOPO[®] del kit de Invitrogen TOPO-TA Cloning. El plásmido fue transformado en células de *E. coli* DH5 alfaTM-t1^R. La secuencia del gen PALRg se verificó por secuenciación sin observarse cambios, posteriormente fue subclonando en los sitios *EcoRI* y *KpnI* del vector de expresión pTrc99A, la cual fue nombrado como pTrcPALRg.

Tabla 2. Cepas y plásmidos empleados en el presente trabajo.

	Características	Referencias
Cepas		
W3110	<i>Escherichia coli</i> F ⁻ , λ ⁻ , INV(rrnD- rrnE)1	ATCC 27325
WPJ	W3110 / <i>pJLBaroG^{fbr}tktA</i>	Este trabajo
WPJRg	WPJ / <i>pTrcPALRg</i>	Este trabajo
WPJAt	WPJ / <i>pTrcPALAt</i>	Este trabajo
W(pheA ⁻)Rg	W3110 (<i>pheA::Km</i>) / <i>pJLBaroG^{fbr}tktA</i> y <i>pTrcPALRg</i>	Este trabajo
W(pheA ⁻)At	W3110 (<i>pheA::Km</i>) / <i>pJLBaroG^{fbr}tktA</i> y <i>pTrcPALAt</i>	Este trabajo
VH33	Derivada de la cepa W3110 (Δ <i>ptsH</i> , <i>ptsI</i> , <i>crr::Km</i> , Δ <i>lacI</i> , <i>lacZ::loxP</i> , <i>trc-galP</i>)	De Anda R., et al., 2006
VPJ	VH33 / <i>pJLBaroG^{fbr}tktA</i>	Este trabajo
VPJRg	VPJ / <i>pTrcPALRg</i>	Este trabajo
VPJAt	VPJ / <i>pTrcPALAt</i>	Este trabajo
Plásmidos		
<i>pJLBaroG^{fbr}tktA</i>	<i>aroG^{fbr}</i> bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> y <i>tktA</i> bajo su promotor nativo, contiene los genes <i>lacI^f</i> y <i>tet</i> .	Balderas- (Balderas- Hernández et al., 2009)
pTrc99A	Vector de clonación que contiene los genes <i>bla</i> y <i>lacI^f</i> genes y el promotor <i>trc</i> .	Pharmacia Biotech
pTrcPALRg	Gen PAL de <i>R. glutinis</i> clonado en el vector pTrc99A	Este trabajo
pTrcPALAt	Gen PAL de <i>A. thaliana</i> clonado en el vector pTrc99A	Este trabajo

5.2.2 Clonación del gen PAL de *A. Thaliana*

El RNA total (donado por el Dr. Mario Rocha Sosa, IBT-UNAM) fue aislado del tejido aéreo de la planta mediante una modificación del método reportado por Logemann et al., 1987. El RNA fue tratado con DNAsa usando DNA-free kit de Ambion. Con 2 mg de RNA total se hizo la reacción de transcriptasa reversa usando SuperScript III first-strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen). El gen PALAt fue amplificado del cDNA con la polimerasa de alta fidelidad Expand High Fidelity de Roche y los oligos pal2-5b (5' AAC CCA TGG ATC AAA TCG AAG CAA TG 3') que contiene un sitio NcoI en su extremo 5' y el oligo Atpal 2-3 (5'GTT CTA GAG GAA TGC TCT CTT AGC A 3') que contiene un sitio XbaI en su extremo 5'. El producto de PCR fue clonado en el vector pCR 2.1-TOPO y se transformó en células electrocompetentes DH5 α TM -T1^R. La clonación del gen PAL2 de *A. thaliana* se confirmó por secuenciación, sin observarse ningún cambio en su secuencia. El gen PAL2 fue clonado en los sitios NcoI y XbaI del vector de expresión *pTrc99A* y fue nombrado *pTrcPALAt*.

5.3 Medios de Cultivo.

El medio de cultivo empleado para recuperar las células después de la transformación de plásmidos por electroporación fue el medio SOC. El medio LB fue empleado para seleccionar colonias y para crecer pre-inóculos.

El medio empleado en la evaluación cinética de los cultivos de producción del CA y pHCA fue el medio mineral M9, la composición de éste medio por cada litro fue: Na₂HPO₄ (6 g), KH₂PO₄ (3 g), NaCl (0.5 g), NH₄Cl (1 g), MgSO₄ (2 mM); CaCl₂ (0.1 mM), Vitamina B1 (0.01 g).

Para evaluar las fuentes de carbono simples, el medio mineral M9 fue suplementado con 10 g/L de glucosa, xilosa o arabinosa; éstos valores corresponden a 55.5 mM de glucosa y 66.6 mM de xilosa o arabinosa.

El hidrolizado simulado se preparó suplementando el medio M9 con una mezcla de azúcares (10 g/L), en proporciones equivalentes a las de un hidrolizado hemicelulósico de bagazo de agave y 0.5 g/L (6.09 mM) de acetato de sodio

(Caspeta et al., 2014). Para un litro de medio se emplearon: 8 g de xilosa, 1.2 g de glucosa, y 0.8 g de arabinosa; cuya concentración fue equivalente a 53.28, 6.66 y 5.33 mM respectivamente.

El medio de cultivo para la cepa mutante en el gen *pheA* fue adicionalmente suplementado con 0.5 mg/L de L-Fen.

Para evitar contaminaciones y como medio de selección, los medios de cultivo fueron suplementados con los siguientes antibióticos, dependiendo de la resistencia en cromosoma o en plásmido de cada cepa en particular. Kanamicina (Km) 30 µg/mL, tetraciclina (Tc) 30 µg/mL, carbenicilina (Cb) 100 µg/mL.

5.4 Condiciones de cultivo.

5.4.1 Pre Inóculo.

Se inoculó una asada de la cepa a evaluar (WPJ, WPJRg, WPJAt, VPJ, VPJRg, VPJAt, W(pheA⁻)Rg o W(pheA⁻)At) conservada en glicerol, en un tubo de ensaye que contenían 3 mL de medio LB con los antibióticos correspondientes para cada uno de los plásmidos y fondos genéticos. Dichos tubos fueron incubados a 37 °C y 300 rpm por alrededor de 8 h. Posteriormente se determinó la densidad óptica (DO) del cultivo y se calculó el volumen necesario para iniciar la adaptación de la cepa en medio mineral en 0.1 D.O.

5.4.2 Inóculo.

El inóculo utilizado para evaluar la producción en matraces fue primero adaptado en medio mineral M9, la cual se realizó en matraces de 125 mL con 25 mL de medio M9 con 10 g/L de azúcares totales y los antibióticos correspondientes. El medio fue inoculado con el volumen requerido de células provenientes del medio rico para iniciar en 0.1 DO. El inóculo fue incubado a 37 °C y 300 rpm entre 10 y 12 h, transcurrido ese tiempo se determinó la DO y se calculó el volumen requerido de células para inocular los matraces con 0.3 DO.

5.4.3 *Cinética de Producción.*

La evaluación de las cepas se realizó en matraces de 250 mL con mamparas, empleando 50 mL de medio M9, suplementado con 10 g/L de la fuente de carbono, los antibióticos correspondientes y 0.1 mM de IPTG.

El volumen de inóculo requerido para iniciar el cultivo a 0.3 DO fue centrifugado en tubos cónicos de 50 mL por 4 min a 6000 rpm y 4 °C. El medio fue decantado y las células fueron resuspendidas con el medio fresco de la cinética de producción. Los cultivos fueron incubados a 37 °C y 300 rpm.

Los tiempos de muestreo de biomasa fueron 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 31, 36, 48, 60 y 72 h; la DO fue determinada en un espectrofotómetro a 600 nm. Adicionalmente, se tomó una muestra de 1 mL de cultivo a los tiempos 0, 4, 8, 12, 16, 24, 31, 36, 48, 60 y 72 h. La muestra fue centrifugada a máxima velocidad por 5 min. El medio libre de células fue recuperado y conservado a -4 °C.

5.5 *Métodos Analíticos.*

5.5.1 *Densidad óptica.*

La densidad óptica fue determinada en un espectrofotómetro a 600 nm de absorbancia. La densidad óptica fue convertida a peso seco usando la relación $DO_{600} = 0.37$ g/L de biomasa seca.

5.5.2 *Cuantificación de las fuentes de carbono.*

Las concentraciones de las fuentes de carbono y ácido acético fueron determinados por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en un sistema de HPLC (Waters), empleando una columna Aminex HPX-87H (300 X 7.8 mm; 9 μ M), de Bio Rad, acoplada a un detector de índice de refracción (Waters 410) y a un detector de arreglo de diodos (Waters 996). La fase móvil empleada fue H₂SO₄ 5 mM a 0.5 mL/min y 50°C. Bajo éstas condiciones fueron determinadas los tiempos de retención de la glucosa, arabinosa, xilosa y el ácido acético, los cuales fueron detectados por índice de refracción. Las muestras fueron filtradas con membranas de 0.45 μ m. La cuantificación de las muestras se realizó por interpolación de una curva estándar construida con estándares de los compuestos a determinar.

5.5.3 Cuantificación de los AAA, CA y pHCA.

Para cuantificar la concentración de L-Fen, L-Tir, CA y pHCA, se empleó un HPLC Agilent 1100 System con un detector de arreglo de diodos y una columna Phenomenex Synergi Hydro RP C18, 150 X 4.6mm, 4 μ m. Las condiciones de análisis de las muestras fueron: Fase móvil A, 0.1 % TFA en metanol, fase móvil B, 0.1 % TFA en agua. El flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min y la temperatura de la columna fue de 45 °C. El gradiente de la fase móvil inició con 95% de fase A y 5% de fase B, incrementándose a 20% de fase A y 80% de fase B en 8 min; ésta relación fue mantenida de los 8 a los 10 min. De 10 a 12 min, la relación fue 95% de fase A y 5% de fase B.

Las muestras analizadas fueron centrifugadas y los sobrenadantes filtrados con membranas de nylon de 0.45 μ m.

5.6 Parámetros Cinéticos y Estequiométricos.

Con una curva estándar de OD vs peso seco se determinó que 1 $OD_{600nm}=0.37$ g/L. Este valor se utilizó para calcular la biomasa presente en los cultivos. La velocidad específica de crecimiento (μ) se calculó mediante una regresión exponencial de biomasa vs tiempo. El rendimiento de biomasa ($Y_{X/S}$) se determinó por una regresión lineal de la biomasa vs consumo de sustrato, en el punto de máxima biomasa. La velocidad específica de consumo de sustrato (q_S) se calculó con la siguiente ecuación $q_S=\mu/Y_{X/S}$. El rendimiento producto sustrato ($Y_{P/S}$) fue determinado en el punto de máxima producción. La velocidad específica de producción (q_P) fue calculada con la ecuación de Luedeking-Piret (Luedeking and Piret, 1959), ecuación que considera la producción en fase exponencial de crecimiento y en fase estacionaria.

6 RESULTADOS y DISCUSIÓN.

En el presente proyecto se evaluó la producción de CA y pHCA, expresando las enzimas PAL/TAL de *R. glutinis* y *A. thaliana* en cepas de *E. coli* con fondos genético PTS⁺ y PTS⁻Glc⁺, que dirigen el flujo de carbono a la vía de los AAA mediante la sobre-expresión de los genes *aroG^{fbr}* y *tktA*, empleando glucosa, xilosa, arabinosa, como fuentes de carbono simples y una mezcla de éstas en concentraciones que simulan la composición de un hidrolizado hemicelulósico (Caspeta et al., 2014).

6.1 Fenotipos.

Como se mencionó anteriormente, las cepas empleadas en la producción de los ácidos aromáticos fueron cepas con fondos genéticos PTS⁺ (W3110) y fondo PTS⁻Glc⁺ (VH33); éstas fueron transformadas con el plásmido pJLBaroG^{fbr}tktA, para dirigir el flujo de carbono hacia la vía de los AAA, generándose las cepas WPJ y VPJ (Tabla 2).

6.1.1 Producción de los precursores L-Tir y L-Fen.

El primer paso para producir los ácidos aromáticos en *E. coli*, fue confirmar que se dirigió el flujo de carbono a la vía de los AAA mediante el incremento en la producción de L-Tir y L-Fen, precursores intermediarios del pHCA y CA respectivamente. Para ello, las cepas WPJ y VPJ fueron evaluadas en matraces con 50 mL de medio M9 suplementado con glucosa, xilosa, arabinosa o el hidrolizado simulado a 37 °C y 300 rpm.

La evaluación de las cepas WPJ y VPJ en glucosa, xilosa y arabinosa (Fig 2 y 3) mostró la presencia de L-Tir y L-Fen en el medio de cultivo, indicando que la vía de los AAA fue desregulada por la sobre-expresión de *aroG^{fbr}* y *tktA*, ocasionando un incremento en la producción de ambos aminoácidos. En los sobrenadantes de mismos fondos genéticos (W3110 y VH33), sin el plásmido que sobre-exprese los genes que dirijan el carbono a la vía de los AAA, no se detectó

la presencia de ambos aminoácidos. Reportes en la literatura han mostrado que *aroG* aporta entre el 70 y el 90% de la actividad DAHP sintetasa (Hu et al., 2003; Xu et al., 2004) y que al sobre expresar el gen *tktA*, junto con una versión de *aroG* insensible a inhibición por producto, se incrementa 2.5 veces la concentración de DAHP en el medio respecto a la sobre expresión de únicamente *aroG^{fbr}* (Flores et al., 1996). Por lo tanto, la vía de los AAA fue desregulada incrementándose la producción de los precursores de interés, L-Tir y L-Fen.

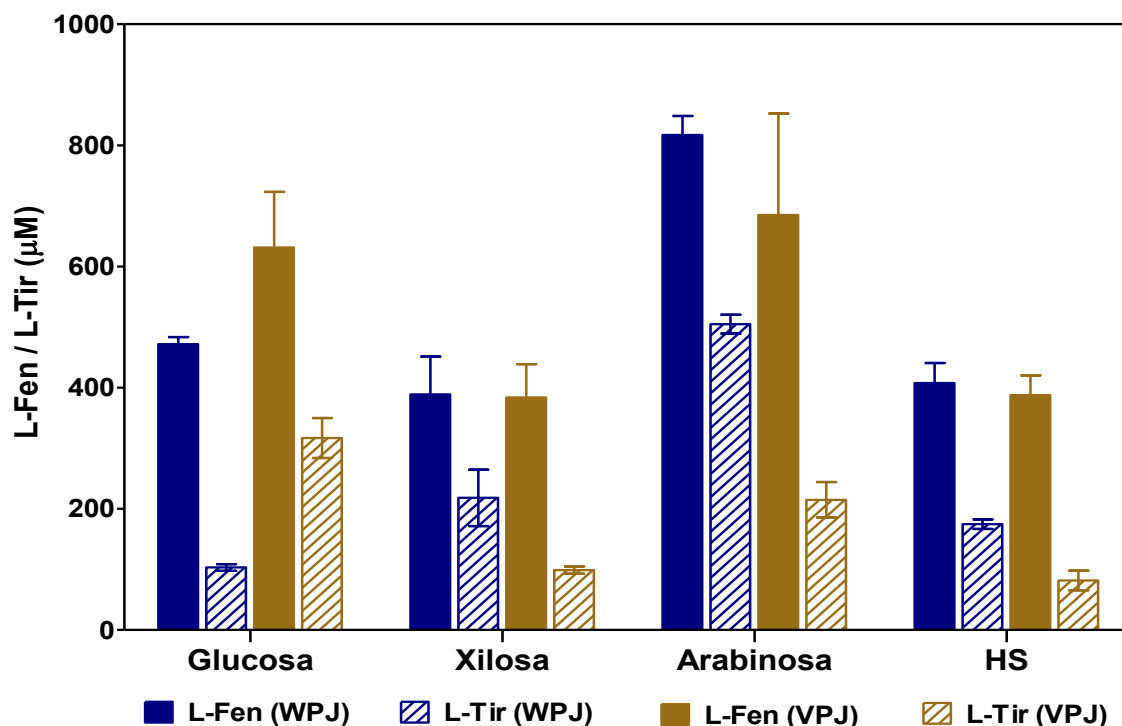


Figura 2. Producción de L-Tir y L-Fen en las cepas WPJ y VPJ, las cuales expresan en plásmido los genes *aroG^{fbr}* y *tktA*. Evaluación realizada en medio mineral M9 con 10 g/L de azúcares totales en matraces con mamparas a 37 °C y 300 rpm.

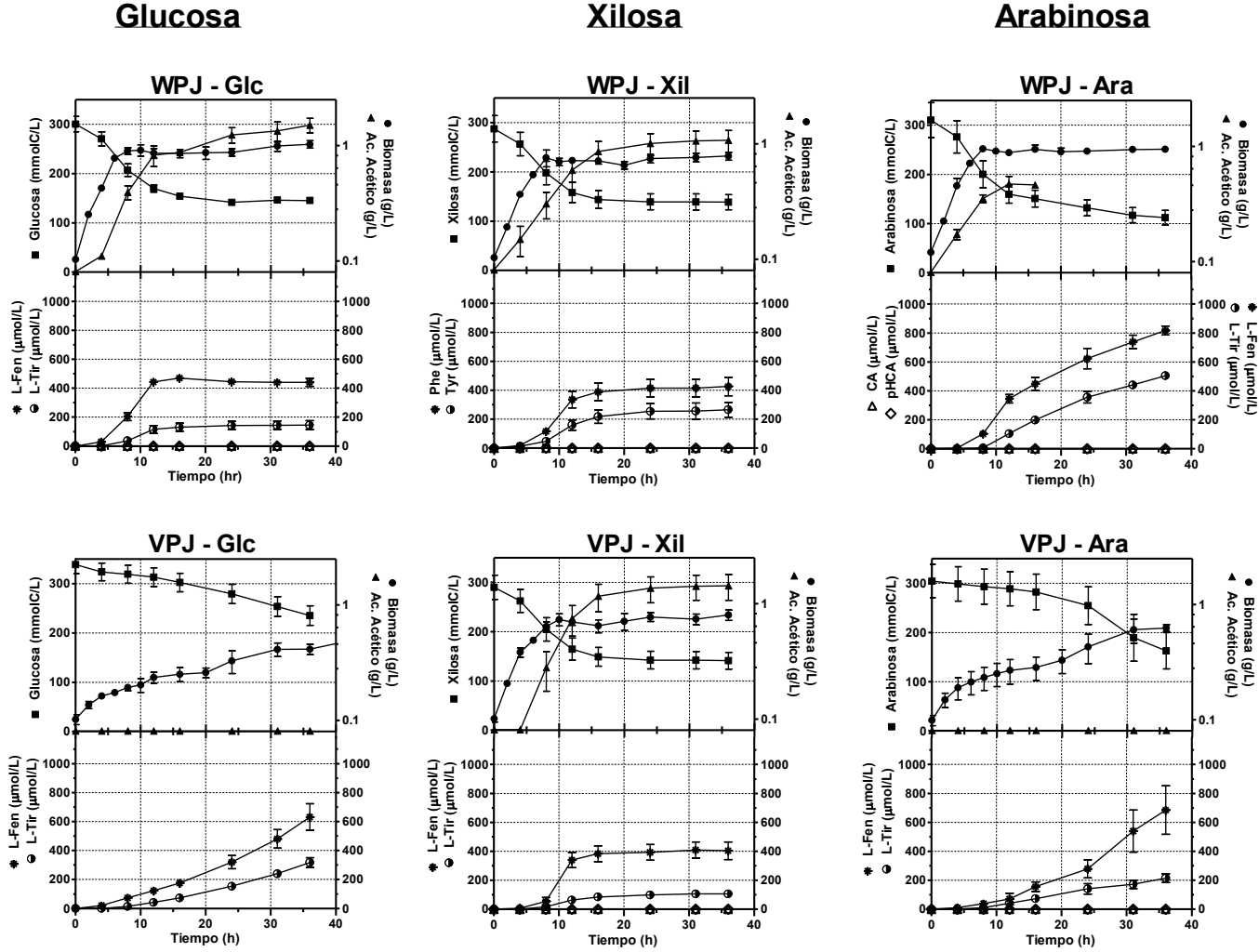


Figura 3. Cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de L-Tir y L-Fen, de las cepas WPJ y VPJ. Evaluación realizada en medio mineral M9 suplementado con 10 g/L del azúcar. Las condiciones de cultivo fueron 37 °C y 300 rpm.

En la evaluación de las cepas WPJ y VPJ, con glucosa como fuente de carbono, el fondo genético $\text{PTS}^- \text{Glc}^+$ (VPJ) mostró mayor rendimiento de L-Fen y L-Tir respecto a el fondo genético PTS^+ (WPJ) (Tabla 3). Éste era un resultado esperado, debido a que la ausencia del sistema PTS en la cepa VH33 deja disponibles las dos moléculas de PEP generadas en la glucólisis para la producción de AAA.

La xilosa y la arabinosa son azúcares de cinco carbonos, que se incorporan al metabolismo de *E. coli* a través de la vía de las pentosas (Fig 1). En estas fuentes de carbono, ninguno de los dos fondos genéticos tiene ventaja en la internalización de los azúcares, pues sus sistemas de transporte no son dependientes del sistema PTS. Por lo tanto, se esperaba que los parámetros cinéticos y de producción fueran similares en ambos casos. Sin embargo, se observó que en xilosa, el $Y_{\text{L-Tir}/\text{Xyl}}$ para la cepa WPJ fue 2.9 veces superior al de la cepa VPJS. Éste mismo efecto se observó al evaluar las cepas en arabinosa, siendo en éste caso, 1.6 veces superior (Tabla 3). La ventaja que muestra el fondo genético PTS^+ en pentosas se debe posiblemente a que la inactivación del sistema PTS causa una deficiencia en la capacidad de sintetizar AMPc, una molécula que es requerida junto al regulador global CRP para inducir la expresión de operones que codifican transportadores y enzimas involucrados en el catabolismo de la xilosa y arabinosa (Notley-McRobb, et al., 1997; Sigala et al., 2008).

La evaluación con pentosas mostró que los títulos de producción de L-Fen y L-Tir fueron menores en xilosa respecto a arabinosa (Figs 2 y 3). Al analizar los parámetros cinéticos se observó que para la cepa WPJ (PTS^+), la velocidad específica de consumo (q_s) de xilosa ($46.2 \text{ mmolC/g}_{\text{DCW}} \text{ h}$) es mayor respecto a la de arabinosa ($39.2 \text{ mmolC/g}_{\text{DCW}} \text{ h}$). Esta diferencia fue aún mayor en el caso de la cepa VPJ ($\text{PTS}^- \text{Glc}^+$), donde la diferencia entre los consumos de xilosa ($51.01 \text{ mmolC/g}_{\text{DCW}} \text{ h}$) y arabinosa ($11.71 \text{ mmolC/g}_{\text{DCW}} \text{ h}$) es cercana al 80% (Tabla 3). La elevada q_s mostrada por las cepas WPJ y VPJ crecidas en xilosa, se vio reflejada en títulos de acetato de 1.07 y 1.43 g/L para las cepas WPJ y VPJ

respectivamente (Fig 3), indicando que las pentosas fueron internalizadas y consumidas rápidamente, el cual al no poder ser utilizado por las enzimas de la vía de los AAA, ocasionó un incremento en la poza de piruvato y por lo tanto una fuga del carbono en forma de acetato. Este fenómeno no se observó en arabinosa, en donde la producción de acetato fue aproximadamente 0.4 g/L para la cepa WPJ y 0 g/L para la cepa VPJ. Lo anterior indica que los bajos títulos de producción y rendimientos de L-Tir y L-Fen en las cepas WPJ y VPJ evaluadas en xilosa, se debió a la elevada velocidad específica de consumo xilosa, lo que incrementó la pérdida de carbono en forma de acetato.

Tabla 3. Parámetros cinéticos y rendimientos de las cepas WPJ y VPJ que expresan el plásmido pJLBaroGfbrtktA, evaluadas en medio mineral M9 suplementado con glucosa, xilosa o arabinosa (10 g/L) como fuentes de carbono. Condiciones de cultivo: 37 °C y 300 rpm.

	μ (h ⁻¹)		Q_s (mmolC/g _{DCW} h)		WPJ		VPJ	
	WPJ	VPJ	WPJ	VPJ	$Y_{L-Tir/S}$ (μmol_{L-Tir} / mmolC)	$Y_{L-Fen/S}$ (μmol_{L-Fen} / mmolC)	$Y_{L-Tir/S}$ (μmol_{L-Tir} / mmolC)	$Y_{L-Fen/S}$ (μmol_{L-Fen} / mmolC)
Glucosa	0.32 ± 0.016	0.032 ± 0.004	35.37 ± 2.6	10.73 ± 1.8	0.726 ± 0.056	3.66 ± 0.26	3.029 ± 0.83	6.05 ± 1.14
Xilosa	0.315 ± 0.016	0.315 ± 0.012	46.28 ± 15.18	51.01 ± 9.50	1.488 ± 0.4	2.77 ± 1.07	0.509 ± 0.07	2.71 ± 0.77
Arabinosa	0.296 ± 0.015	0.135 ± 0.025	39.21 ± 4.6	11.71 ± 2.2	2.62 ± 0.63	4.22 ± 0.82	1.64 ± 0.48	4.82 ± 1.02

6.2 Producción de CA y pHCA en medio M9 suplementado con fuentes de carbono individuales: Glucosa, xilosa y arabinosa..

La conversión de L-Fen y L-Tir a CA y pHCA depende de las actividades PAL y TAL, respectivamente. *E. coli* carece de estas enzimas, por lo tanto, los genes que codifican para las enzimas con estas actividades de *R. glutinis* (PALRg) y *A. thaliana* (PALAt) fueron clonados en un vector de expresión para generar los plásmidos pTrcPALRg y pTrcPALAt, respectivamente. Las cepas WPJ y VPJ, que expresan el plásmido pJLBaroG^{fbr}tktA, fueron transformadas con los plásmidos pTrcPALRg o pTrcPALAt para generar las cepas de producción WPJRg, WPJAt, VPJRg y VPJAt (Tabla 2).

Al evaluar las cepas en glucosa, como única fuente de carbono, se observó que las cepas que expresan la enzima PAL/TAL de *R. glutinis* (WPJRg y VPJRg)

producen CA y pHCA. Este fue un resultado esperado, debido a que las cepas sobre-producen L-Fen y L-Tir y la enzima PALRg despliega ambas actividades (Zhu et al., 2013). Por otra parte, las cepas que expresan la enzima PAL de *A. thaliana* (WPJAt y VPJAt) sólo producen CA, aunque se encuentran presentes tanto L-Tir como L-Fen, esto se debe a que la enzima PAL de *A. thaliana* muestra únicamente actividad PAL (Cochrane et al., 2004).

En cuanto a la producción de los ácidos aromáticos, la cepa VPJRg, carente del sistema PTS, produjo 107 μM de pHCA con un $Y_{\text{pHCA/Glc}}$ de 1,03 $\mu\text{mol}_{\text{pHCA}}/\text{mmolC}$; valores 20 veces superiores a los de la cepa WPJRg (Tabla 4). Éste resultado se esperaba debido a que, al no estar presente el sistema PTS, quedan disponibles las dos moléculas de PEP producidas en la glicólisis para ser empleadas en la vía de los AAA, incrementando el rendimiento, lo cual ya ha sido reportado con anterioridad (Chávez Béjar et al., 2008). Por otra parte, como se mencionó, el CA fue producido por las cuatro cepas evaluadas (Tabla 4 y Anexo I); sin embargo, los títulos más altos ($\sim 530 \mu\text{M}$) fueron producidos por las cepas WPJAt y VPJAt, que expresan la enzima de *A. thaliana*. Aunque las cepas que expresan ésta enzima muestran títulos similares, el rendimiento $Y_{\text{CA/Glu}}$ y la velocidad específica de producción en glucosa fueron, 3.6 y 1.5 veces superiores para la cepa VPJAt respecto a WPJAt.

Tabla 4. Parámetros cinéticos y rendimientos de las cuatro cepas evaluadas para la producción de pHCA y CA, en medio mineral M9 suplementado con glucosa 55.5 mM (10 g/L) como fuente de carbono. Condiciones de cultivo: 37 °C y 300 rpm.

Cepa	μ (h^{-1})	q_{Glc} ($\text{mmolC}/\text{g}_{\text{DCW}} \text{ h}$)	pHCA (μM)	$Y_{\text{pHCA/Glc}}$ ($\mu\text{mol}_{\text{pHCA}}/\text{mmolC}$)	q_{pHCA} ($\mu\text{mol}_{\text{pHCA}}/\text{g}_{\text{DCW}} \text{ h}$)	CA (μM)	$Y_{\text{CA/Glc}}$ ($\mu\text{mol}_{\text{CA}}/\text{mmolC}$)	q_{CA} ($\mu\text{mol}_{\text{CA}}/\text{g}_{\text{DCW}} \text{ h}$)	Ácido acético (mM)
WPJRg	0.39 \pm 0.05	62.04 \pm 27.46	5.2 \pm 0.65	0.05 \pm 0.02	2.48 \pm 0.88	13.2 \pm 3.39	0.07 \pm 0.03	4.40 \pm 1.13	35.9 \pm 11
WPJAt	0.28 \pm 0.01	35.14 \pm 2.89	---	---	---	527.68 \pm 24.63	4.75 \pm 0.17	197.09 \pm 11.74	25.77 \pm 12.42
VPJRg	0.15 \pm 0.03	15.29 \pm 4.44	107.21 \pm 14.43	1.03 \pm 0.56	27.62 \pm 7.23	248.34 \pm 56.25	1.08 \pm 0.15	47.5 \pm 2.6	11.9 \pm 2.70
VPJAt	0.05 \pm 0.01	11.10 \pm 1.94	---	---	---	529.94 \pm 33.25	17.01 \pm 2.70	288.3 \pm 47.9	---

Al comparar los fenotipos PTS^-Glc^+ y PTS^+ , se observó una clara mejora en la productividad y el rendimiento específico de CA y pHCA en las cepas carentes

del sistema PTS, debido a que el transporte de la glucosa se da a través del transportador GalP (transportador tipo simporte) y la fosforilación dependiente de ATP por la glucocinasa (*glk*), sin consumo de PEP. El mayor rendimiento en cepas PTS⁻Glc⁺, empleando glucosa ya ha sido demostrado anteriormente, y éste depende del tipo de compuesto y de las condiciones de cultivo (Báez-Viveros et al., 2007; Balderas-Hernández et al., 2009).

El desempeño de las cepas también fue evaluado en azúcares no PTS, xilosa y arabinosa (Tablas 5 y 6, Anexo I). El pHCA producido por las cepas VPJRg y WPJRg cultivadas en xilosa, alcanzó títulos de 15 y 25 mM de pHCA respectivamente. El título de pHCA producido por VPJRg en xilosa se redujo 6.9 veces respecto a su título observado en glucosa. Por su parte la cepa WPJRg mostró una producción de pHCA 5 veces superior en xilosa respecto al valor obtenido en glucosa. En cuanto a la producción de CA en xilosa, la cepa WPJAt (736.8 μM) mejoró su título 1.4 veces respecto al obtenido en glucosa. Los resultados descritos anteriormente muestran que en xilosa, la producción de CA y pHCA se incrementó en las cepas con fondo PTS⁺ respecto a las cepas con fondo PTS⁻Glc⁺.

Tabla 5. Parámetros cinéticos y rendimientos de las cuatro cepas evaluadas en medio M9 suplementado con xilosa 66.6 mM (10 g/L) como fuente de carbono. Condiciones de cultivo: 37 °C y 300 rpm.

Cepa	μ (h ⁻¹)	q_{Xil} (mmolC/ g _{DCW} h)	pHCA (μM)	$Y_{pHCA/Xil}$ (μmol _{pHCA} / mmolC)	q_{pHCA} (μmol _{pHCA} / g _{DCW} h)	CA (μM)	$Y_{CA/Xil}$ (μmol _{CA} / mmolC)	q_{CA} (μmol _{CA} /g DCW h)	Ácido acético (mM)
WPJRg	0.41 ± 0.02	78.43 ± 14.38	25.4 ± 7.56	0.23 ± 0.12	16.02 ± 7.48	48.81 ± 5.53	0.42 ± 0.03	24.50 ± 2.27	21.87 ± 5.37
	0.28 ± 0.02	28.10 ± 2.33	---	---	---	736.85 ± 52.11	6.03 ± 1.26	165.61 ± 3.86	11.01 ± 3.96
VPJRg	0.40 ± 0.02	59.13 ± 7.67	15.5 ± 12.24	0.14 ± 0.04	8.37 ± 3.50	24.35 ± 4.01	0.21 ± 0.05	12.18 ± 1.71	28.29 ± 7.83
	0.24 ± 0.01	25.53 ± 3.13	---	---	---	315.98 ± 62.97	3.57 ± 0.61	139.0 ± 17.4	10.81 ± 5.73

En arabinosa como única fuente de carbono, al igual que en xilosa, las cepas con fondo PTS⁺ mostraron los mejores parámetros de producción respecto a su evaluación en glucosa. La cepa WPJRg mostró un título de 76.7 μM de pHCA

y un $Y_{\text{pHCA/Ara}}$ de $0.437 \mu\text{mol}_{\text{pHCA}}/\text{mmolC}$, valores 15.4 y 8.8 veces superiores en comparación con los cultivos en glucosa. El CA fue producido por todas las cepas; sin embargo, el título más alto fue obtenido por la cepa WPJAt, que como en las otras fuentes de carbono, es la cepa que expresa la PAL de *A. thaliana*; esta cepa mostró un $Y_{\text{CA/Ara}}$ 1.6 veces mayor en comparación con los resultados con glucosa y una $q_{\text{CA-Ara}}$ de $368.9 \mu\text{mol}_{\text{CA}}/\text{g}_{\text{DCW}}\text{h}$. El título de CA producido por WPJAt fue de $1022 \mu\text{M}$, el más alto observado en éste estudio.

Tabla 6. Parámetros cinéticos y rendimientos de las cuatro cepas evaluadas en medio M9 suplementado con arabinosa 66.6 mM (10 g/L) como fuente de carbono. Condiciones de cultivo: 37 °C y 300 rpm.

Cepa	μ (h^{-1})	q_{Ara} ($\text{mmolC}/\text{g}_{\text{DCW}}\text{h}$)	pHCA (μM)	$Y_{\text{pHCA/Ara}}$ ($\mu\text{mol}_{\text{pHCA}}/\text{mmolC}$)	q_{pHCA} ($\mu\text{mol}_{\text{pHCA}}/\text{g}_{\text{DCW}}\text{h}$)	CA (μM)	$Y_{\text{CA/Ara}}$ ($\mu\text{mol}_{\text{CA}}/\text{mmolC}$)	q_{CA} ($\mu\text{mol}_{\text{CA}}/\text{g}_{\text{DCW}}\text{h}$)	Ácido acético (mM)
WPJRg	0.42 ± 0.02	65.85 ± 9.48	76.75 ± 20.16	0.437 ± 0.11	14.39 ± 2.84	100.21 ± 15.72	0.5 ± 0.08	29.08 ± 3.82	3.55 ± 0
WPJAt	0.23 ± 0.003	38.33 ± 1.58	---	---	---	1022.36 ± 56.8	7.91 ± 1.62	368.91 ± 45.74	5.48 ± 1.4
VPJRg	0.39 ± 0.06	65.33 ± 23.59	27.01 ± 5.2	0.20 ± 0.06	7.18 ± 3.45	40.08 ± 5.89	0.29 ± 0.06	18.08 ± 4.40	19.75 ± 5.01
VPJAt	0.08 ± 0.01	26.95 ± 5.0	---	---	---	329.31 ± 23.28	15.67 ± 8.06	282.58 ± 82.53	20.38 ± 3.02

La evaluación de las cepas de producción de CA y pHCA en azúcares simples, mostró que, en glucosa el fondo genético $\text{PTS}^{-}\text{Glc}^{+}$ presentó los mayores títulos, $Y_{\text{pHCA o CA/Glc}}$ y $q_{\text{pHCA o CA}}$ de producción para ambos ácidos aromáticos. Sin embargo, en la evaluación de las pentosas (xilosa y arabinosa), el fondo PTS^{+} mostró los mejores parámetros de producción. Ésta ventaja se debió posiblemente a que la inactivación del sistema PTS causa una deficiencia en la capacidad de sintetizar AMPc, una molécula esencial en la expresión de genes involucrados en el transporte y catabolismo de la xilosa y arabinosa (Sigala et al., 2009).

En cuanto a la capacidad de producción de CA y pHCA, expresando las enzimas PAL/TAL de *R. glutinis* (PALRg) y *A. thaliana* (PALAt) se observó que sólo las cepas que expresan la enzima PALRg desaminan la L-Tir para producir pHCA; sin embargo, al estar presentes los dos aminoácidos, ésta enzima desaminó también la L-Fen produciendo CA con títulos al menos dos veces superiores que los títulos de pHCA. Se ha reportado que la enzima de *R. glutinis*

tiene mayor afinidad hacia L-Tir; sin embargo, la k_{cat}/K_m para L-Fen ($1.9 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) es mayor en un orden de magnitud respecto a L-Tir ($0.52 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Zhu et al., 2013), lo que explica una mayor producción de CA. Por otra parte, es importante mencionar que las cepas WPJ y VPJ producen dos veces más L-Fen respecto a L-Tir (Fig 2. Tabla 3), habiendo mayor disponibilidad de L-Fen, precursor de CA. Estos datos sugieren que las cepas que expresan la enzima PAL/TAL de *R. glutinis*, producen una mayor concentración de CA respecto al pHCA, debido probablemente a la mayor disponibilidad de L-Fen y a la mayor eficiencia catalítica a éste aminoácido de la enzima PALRg.

Analizando los parámetros cinéticos y de producción, se observó que las cepas que expresaron la enzima de *A. thaliana*, mostraron los mayores títulos de CA, las más bajas velocidades de crecimiento (μ) y las menores concentraciones de biomasa respecto a las cepas que expresan la enzima de *R. glutinis*. Reportes en la literatura muestran que la k_{cat}/K_m de *A. thaliana* para L-Fen es mayor ($5.12 \times 10^7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) respecto a la de *R. glutinis* ($1.9 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Cochrane et al., 2004 y Zhu et al., 2013), indicando una mayor eficiencia catalítica de *A. thaliana* respecto a *R. glutinis*. Ya que la expresión de las enzimas heterólogas colocadas en los plásmidos fueron inducidas desde el inicio del cultivo, se piensa que debido a la elevada afinidad y eficiencia catalítica de la PAL de *A. thaliana*, ésta emplea la L-Fen producida por la cepa para transformarla en CA, dejando a la cepa limitada en éste aminoácido para su crecimiento, razón por la cual se observa una baja concentración de biomasa y los mayores títulos de producción de CA. Los resultados anteriores sugieren que la mayor disponibilidad de L-Fen y la elevada eficiencia catalítica de las enzimas hacia L-Fen, contribuyen a una mayor producción de CA respecto a pHCA en las cepas que expresan la PALRg.

En resumen, la evaluación de las cepas WPJRg, VPJRg, WPJAt y VPJAt en las fuentes de carbono simples, mostró que la enzima PAL de *R. glutinis* produce pHCA y CA, siendo mayor la producción de CA respecto al otro ácido. Mientras que la enzima PAL de *A. thaliana* produce únicamente CA, el cual es producido por las dos enzimas empleadas en éste estudio. Sin embargo, la mayor

producción de CA en cualquiera de los fondos genéticos empleados fue obtenida con la enzima de *A. thaliana* (PALAt), debido a que su eficiencia catalítica es mayor respecto a la de la enzima PALRg. Por otra parte se observó que el mayor título de pHCA (107.21 μM) lo presentó la cepa VPJRg (PTS⁻Glc⁺) empleando glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, el mayor título de CA se obtuvo en arabinosa (1022.3 μM) con la cepa WPJAt (PTS⁺).

6.3 Producción de CA y PHCA en cultivos con medio M9 suplementado con una mezcla de azúcares: Hidrolizado simulado.

Los hidrolizados hemicelulósicos son una fuente de azúcares fermentables que contienen principalmente pentosas, hexosas y acetato. Para determinar la capacidad de producción de CA y pHCA en un medio que contiene una mezcla de azúcares similares a las obtenidas en un hidrolizado, las cepas fueron cultivadas en medio mineral M9 suplementado con éstos azúcares y acetato, en proporciones similares a las obtenidas en la hidrólisis termoquímica de bagazo de agave (Caspeta et al., 2014). El hidrolizado simulado contenía: xilosa (53.28 mM), glucosa (6.66 mM), arabinosa (5.33 mM) y ácido acético (6.09 mM). Los resultados de la caracterización de las cuatro cepas en hidrolizado simulado mostraron similitud con los cultivos crecidos en xilosa como única fuente de carbono. Esto se esperaba debido a que la xilosa se encuentra en mayor proporción en la mezcla de azúcares; sin embargo, se observaron ciertas diferencias. Las cepas WPJRg y VPJRg aumentaron un 26 y 42% en $Y_{\text{pHCA/HS}}$, respectivamente en comparación con los resultados de los cultivos con xilosa (Fig 4). Adicionalmente, se observó un aumento de 12 y 44% en $q_{\text{pHCA-HS}}$ cuando se realizó la misma comparación (Fig 5). En cuanto a la producción de CA, la cepa WPJAt mostró un título de CA similar al cultivo con xilosa, pero incrementó 30% su velocidad específica de producción al ser evaluada en hidrolizado simulado respecto a xilosa.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de los cultivos en medio mineral con hidrolizado simulado. Glucosa 6.66 mM (1.2 g/L), xilosa 53.3 mM (8 g/L), arabinosa 5.33 mM (0.8 g/L) y acetato 6.09 mM (0.5 g/L). Azúcares totales 62.29 mM (10 g/L). Condiciones de cultivo de las cepas WPJRg, WPJA_t, VPJRg y VPJA_t: 300 rpm a 37 y 30 °C. Cepas W(*pheA*)Rg y W(*pheA*)A_t: 300 rpm y 37 °C

Cepa	μ (h ⁻¹)	q _{SH} (mmolC /g _{DCW} h)	pHCA (μ M)	Y _{pHCA/SH} (μ mol _{pHCA} / mmolC)	q _{pHCA} (μ mol _{pHCA} / g _{DCW} h)	CA (μ M)	Y _{CA/SH} (μ mol _{CA} / mmolC)	q _{CA} (μ mol _{CA} /g DCW h)	Ácido acético (mM)
37 °C									
WPJRg	0.41 ± 0.05	64.46 ± 16.54	39.16 ± 1.65	0.29 ± 0.06	18.17 ± 2.53	43.06 ± 7.13	0.31 ± 0.08	19.81 ± 5.20	38.48 ± 7.7
WPJA _t	0.18 ± 0.06	30.50 ± 15.80	---	---	---	398.36 ± 74.16	4.73 ± 1.54	184.52 ± 82.9	21.51 ± 4.67
VPJRg	0.40 ± 0.03	59.79 ± 10.84	26.44 ± 9.4	0.20 ± 0.06	12.10 ± 4.20	44.27 ± 6.9	0.41 ± 0.09	24.03 ± 0.86	45.07 ± 9.95
VPJA _t	0.17 ± 0.03	29.63 ± 6.59	---	---	---	260.49 ± 8.11	4.39 ± 2.00	180.52 ± 37.92	21.79 ± 4.7
30 °C									
WPJRg	0.276 ± 0.008	27.22 ± 2.48	22.68 ± 5.05	0.113 ± 0.03	0.814 ± 0.18	47.49 ± 6.4	0.237 ± 0.045	1.67 ± 0.19	16.77 ± 0.18
WPJA _t	0.067 ± 0.027	12.34 ± 4.0	---	---	---	741.49 ± 167	11.21 ± 0.96	89.5 ± 14.1	3.8 ± 0.15
VPJRg	0.27 ± 0.009	26.66 ± 2.39	66.82 ± 16.08	0.324 ± 0.086	2.38 ± 0.57	176.25 ± 49.4	0.837 ± 0.15	8.06 ± 0.83	2.58 ± 0.25
VPJA _t	0.078 ± 0.014	9.04 ± 1.76	---	---	---	843.6 ± 145.16	12.94 ± 1.12	154.43 ± 20.4	4.20 ± 0.51
Mutantes en <i>pheA</i>, 37 °C									
W(<i>pheA</i>)Rg	0.14 ± 0.01	22.18 ± 3.51	322.9 ± 18.32	2.37 ± 0.13	52.57 ± 6.84	111.52 ± 7.9	0.460 ± 0.02	22.87 ± 1.61	25.18 ± 3.98
W(<i>pheA</i>)A _t	0.024 ± 0.003	14.17 ± 1.70	---	---	---	338.65 ± 33.08	3.65 ± 0.16	69.62 ± 7.43	13.99 ± 0.51

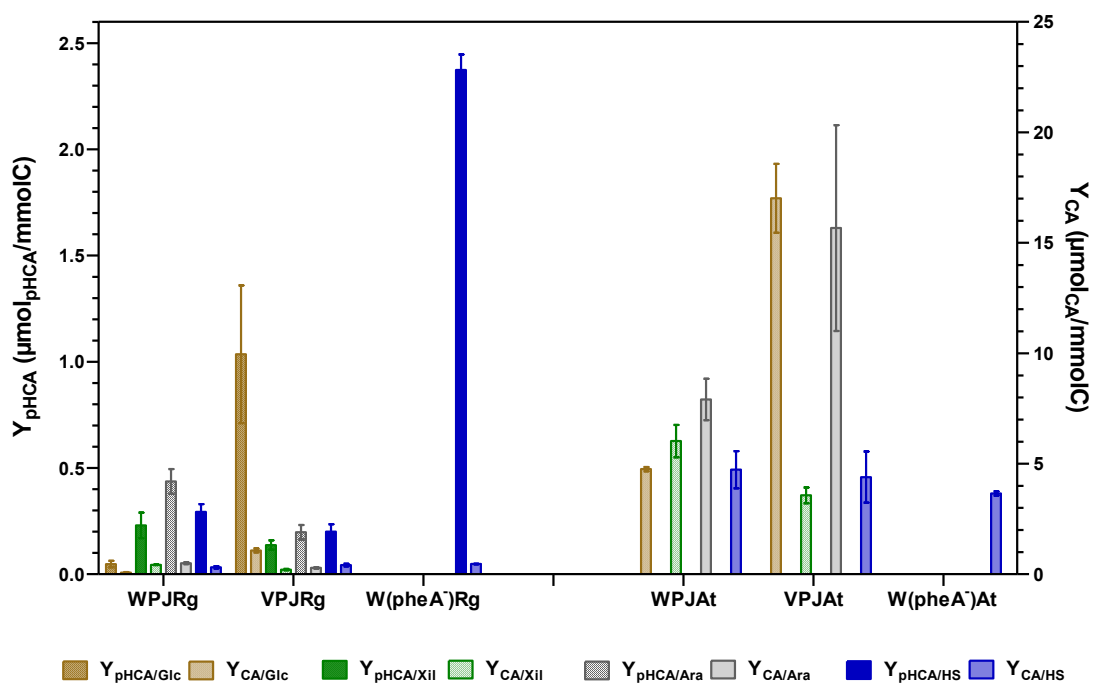


Figura 4. Rendimiento de CA y pHCA por fuente de carbono para las cepas crecidas en medio mineral suplementadas con glucosa, xilosa, arabinosa o hidrolizado simulado.

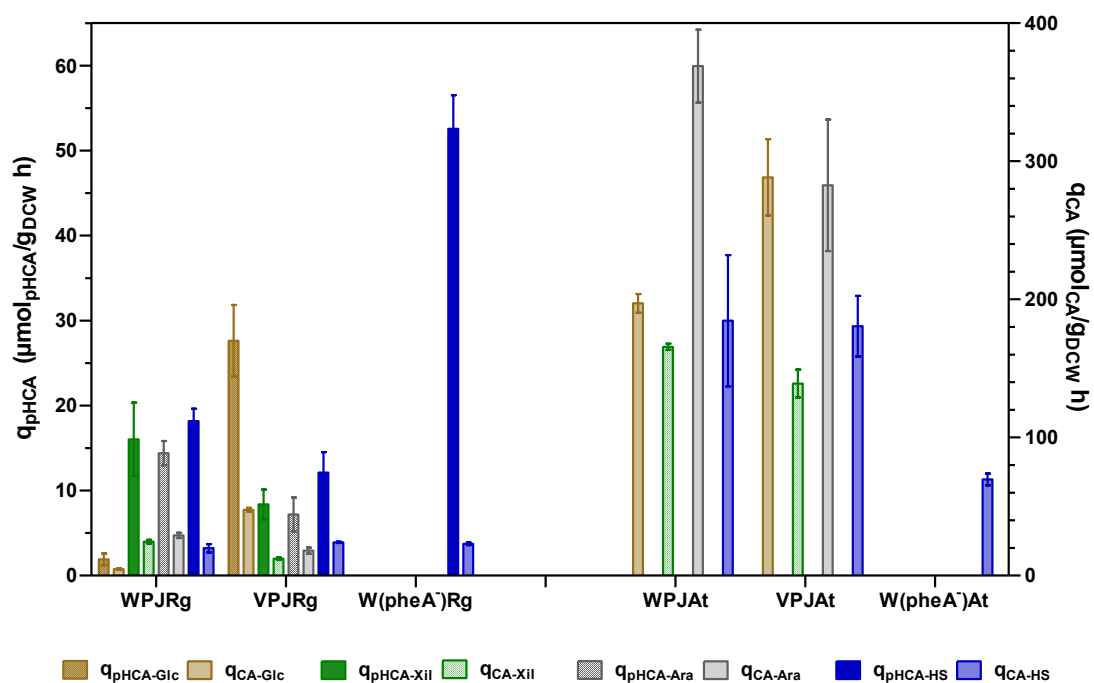


Figura 5. Velocidades específicas de producción de CA y pHCA de las cepas de producción caracterizadas en medio mineral suplementadas con glucosa, xilosa, arabinosa o hidrolizado simulado.

Los cultivos con hidrolizado simulado muestran un patrón de consumo de azúcares diferente para cada uno de los fondos genéticos empleados. La cepa WPJRg consumió primero la glucosa y posteriormente la xilosa y arabinosa (Fig 6), mostrando represión catabólica. Por el contrario, se observa que la cepa VPJRg, con fondo PTS⁻Glc⁺, utiliza en forma simultánea las tres fuentes de carbono; éste comportamiento ya ha sido reportado con anterioridad en mezclas de 2 o 3 azúcares (Hernández-Montalvo et al., 2001). Sin embargo, aunque las cepas con el sistema PTS activo (WPJRg y WPJAt) consumieron en forma secuencial los azúcares del hidrolizado simulado, mostraron mejores parámetros de producción comparadas con las cepas PTS⁻Glc⁺ (Fig 4 y 5, Tabla 7); éste fenómeno se debe posiblemente a que el azúcar en mayor proporción en el hidrolizado simulado es la xilosa, azúcar en la cual el fondo PTS⁺ presenta mayor ventaja de producción respecto al fondo PTS⁻Glc⁺.

Los resultados anteriores indican que sólo en mezclas de azúcares con una mayor proporción de glucosa, las cepas con fondo PTS⁻Glc⁺ podrían tener mayor ventaja en términos de producción y rendimiento. Como se observa, se tiene un conjunto de cepas que se pueden emplear en forma versátil para producir ambos ácidos aromáticos en mezclas de azúcares tanto ricas en glucosa, como ricas en pentosas.

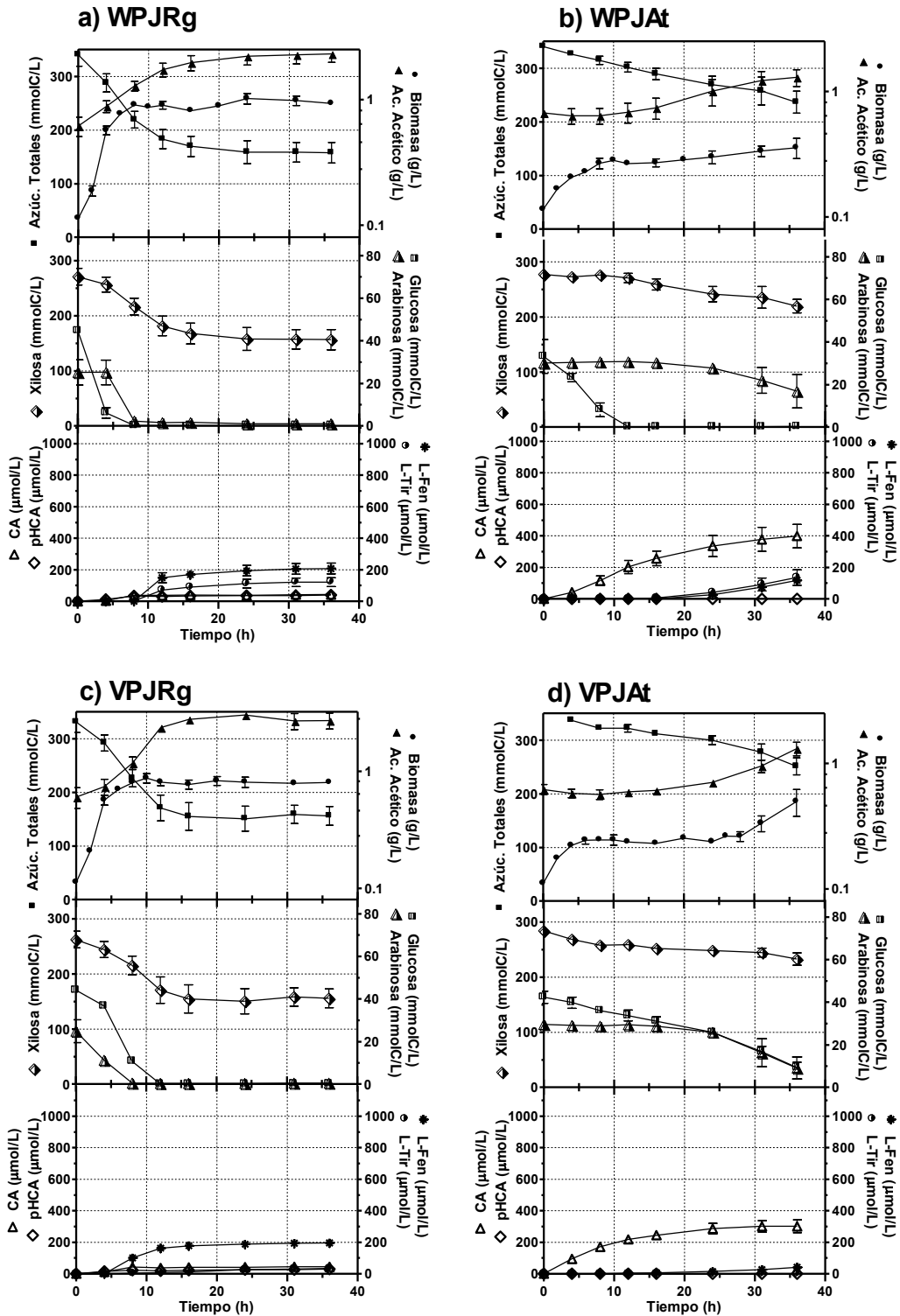


Figura 6. Cinéticas de crecimiento y producción de las cepas WPJRg, VPJRg, WPJAt y VPJAt evaluadas en Hidrolizado Simulado. Glucosa 6.66 mM (1.2 g/L), xilosa 53.3 mM (8 g/L), arabinosa 5.33 mM (0.8 g/L) y acetato 6.09 mM (0.5 g/L). Azúcares totales 62.29 mM (10 g/L). Condiciones de cultivo: 300 rpm, 37 °C.

A partir del estudio realizado en azúcares simples y en una mezcla de éstas, observamos que el título más alto de CA fue de 1022.3 μM en el fondo genético PTS^+ , sobre expresando la enzima PALAt y evaluada en arabinosa, valor superior a los reportados en la literatura para cepas de *E. coli* en medio mineral (Vanelli et al., 2007a). Mientras que el mayor título de pHCA fue de 107.21 μM con el fondo genético PTS^-Glc^+ , empleando la PALRg evaluada en glucosa, inferior a los 150 μM reportados para una cepa de *E. coli* expresando la misma enzima y cultivada a 30 °C (Vanelli et al., 2007a).

Los resultados anteriores mostraron que los mayores títulos de CA se obtienen con la enzima PAL de *A. thaliana* y el pHCA únicamente se obtiene con la enzima PALRg. Por otra parte se observó que, la concentración de CA fue un orden de magnitud superior a la de pHCA. En mezclas de azúcares los títulos máximos de CA y pHCA fueron obtenidos empleando el fondo genético PTS^+ con las enzimas PALAt (398.3 μM) y PALRg (39.16 μM) respectivamente.

Debido a que el título máximo de pHCA alcanzado en mezcla de azúcares fue 10 órdenes de magnitud inferior al título máximo de CA logrado también en mezcla de azúcares, nos preguntamos si había un efecto adicional que impidiera una mayor producción de pHCA, como el efecto inhibitorio que ocasionan éstos ácidos aromáticos a *E. coli* (Van Dyk et al., 2004). Y si era posible incrementar la producción de pHCA, a pesar de la eficiencia catalítica la enzima PALRg. Estas preguntas fueron respondidas en las secciones posteriores.

6.4 Efecto inhibitorio del pHCA y el CA en *E. coli*.

Se pensó, que la baja producción y productividad de pHCA, se debían a un posible efecto tóxico causado por CA y pHCA, pues se sabe que éstos ácidos aromáticos son compuestos tóxicos para *E. coli* (Sariaslani, 2007; Van Dyk, 2008; Van Dyk et al., 2004). Para determinar el efecto tóxico de ambos ácidos aromáticos, se efectuaron cultivos en medio mineral M9 con glucosa y suplementado con diferentes concentraciones de CA y pHCA. La disminución en

la velocidad de crecimiento de la cepa W3110 con 10 mM de CA o pHCA fue de 6 y 10 % respectivamente (Fig 7). Estas concentraciones son al menos 3 órdenes de magnitud superiores a los títulos máximos producidos por las cepas, por lo tanto, la concentración de ácidos aromáticos producida no causó un efecto inhibitorio en su crecimiento ni en su viabilidad. En condiciones de optimización de proceso, como cultivos en lote alimentados, posiblemente el efecto tóxico se haga presente en *E. coli*; sin embargo, en dichos casos es factible sobre-expresar un sistema de transporte específico para éstos ácidos aromáticos, el cual ya ha sido evaluado (Sariaslani et al., 2007; Van Dyk et al., 2004).

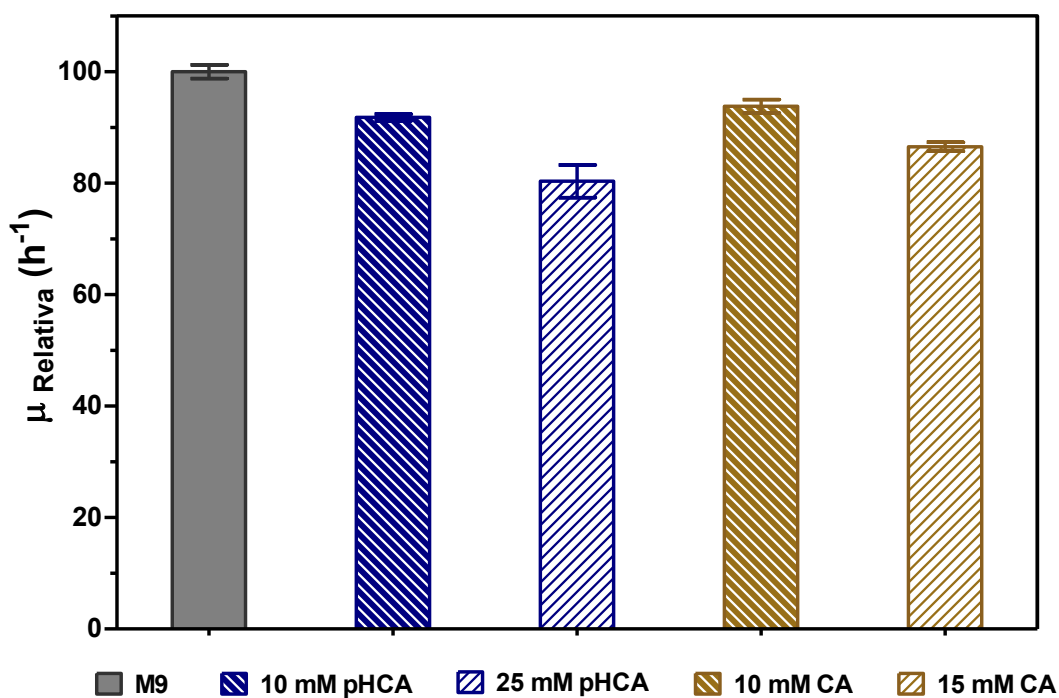


Figura 7. Velocidad relativa de crecimiento de la cepa W3110 en medio mineral suplementado con CA y pHCA.

6.5 Estrategias para incrementar la producción de pHCA.

Al confirmar que no hubo un efecto inhibitorio en la producción de los ácidos, ocasionado por la concentración de los ácidos producidos, decidimos responder nuestro segundo cuestionamiento. ¿Será posible incrementar la producción de pHCA? Esta pregunta fue respondida mediante una estrategias de cultivo y limitando la disponibilidad de L-Fen mediante la mutación del gen *pheA* en la cepa de mayor producción de pHCA en hidrolizado simulado (fondo genético PTS⁻Glc⁺).

6.5.1 Producción de pHCA y CA a 30 °C

Al analizar los resultados en la mezcla de azúcares se observó que los títulos más altos de producción de ambos ácidos, fueron obtenidos en aquellas cepas que mostraron las menores velocidades específicas de consumo (q_{HS}). También se observó que, la producción de pHCA se detenía unas horas después de que las cepas que expresaban la PAL de *R. glutinis* (WPJRg y VPJRg) llegaban a fase estacionaria, por lo que se pensó que la producción de pHCA aumentaría, si se alargaba la fase exponencial de crecimiento. Una forma de reducir la velocidad específica de consumo es disminuyendo la temperatura de crecimiento, por ello, se decidió realizar los cultivos a 30 °C. De ésta forma esperábamos reducir la velocidad específica de consumo (q_S) y alargar la fase exponencial de crecimiento para aumentar la producción de pHCA.

La producción de los dos ácidos aromáticos se evaluó a 30 °C con hidrolizado simulado en las cepas WPJRg, VPJRg, WPJAt y VPJAt. Las cinéticas de crecimiento, consumo de azúcares y producción se muestran en la figura 8 y los parámetros cinéticos en la tabla 7. Como se esperaba, la velocidad específica de consumo de azúcares totales en las cepas disminuyó entre un 58 y 70 %.

En cuanto a su efecto en la producción de pHCA, se esperaba que la producción de éste ácido se incrementara; sin embargo, se observó que el título de la cepa WPJRg (39.16 μ M a 37 °C), disminuyó a 22.68 μ M y su relación de

producción molar pHCA/CA disminuyó de 0.93 a 0.48 cuando fue evaluada a 30 °C. Sin embargo, la cepa VPJRg incrementó su título 2.52 veces, llegando a 66.82 μM de pHCA, a pesar de haber disminuido también su relación molar pHCA/CA. Éste resultado mostró que la disminución en la temperatura de cultivo favoreció la producción de pHCA en la cepa con fondo $\text{PTS}^- \text{Glc}^+$, incrementando 2.5 veces el título de pHCA; sin embargo, el CA producido por ésta misma enzima (PALRg), se vio aún más favorecida la producción de CA en los dos fondos genéticos evaluados (Cepas WPJRg y VPJRg).

De igual forma, la producción de CA con la enzima PAL de *A. thaliana* se vio favorecida en ambos fondos genéticos. Como se observa en la Tabla 7, los títulos y rendimientos de las cepas que expresan ésta enzima (WPJAt y VPJAt) fueron muy similares. Sin embargo, la velocidad específica de producción de la cepa VPJAt ($154.4 \mu\text{mol}_{\text{CA}}/\text{g}_{\text{DCW}} \text{ h}$) fue mayor respecto a la cepa WPJAt ($89.5 \mu\text{mol}_{\text{CA}}/\text{g}_{\text{DCW}} \text{ h}$). Esto se debió a que, la biomasa de la cepa VPJAt fue aproximadamente la mitad respecto a la cepa con fondo PTS^+ , lo que le dio cierta ventaja en cuanto a velocidad específica de producción. El título de CA fue de $843.6 \mu\text{M}$, 3.24 veces mayor que el obtenido a 37 °C.

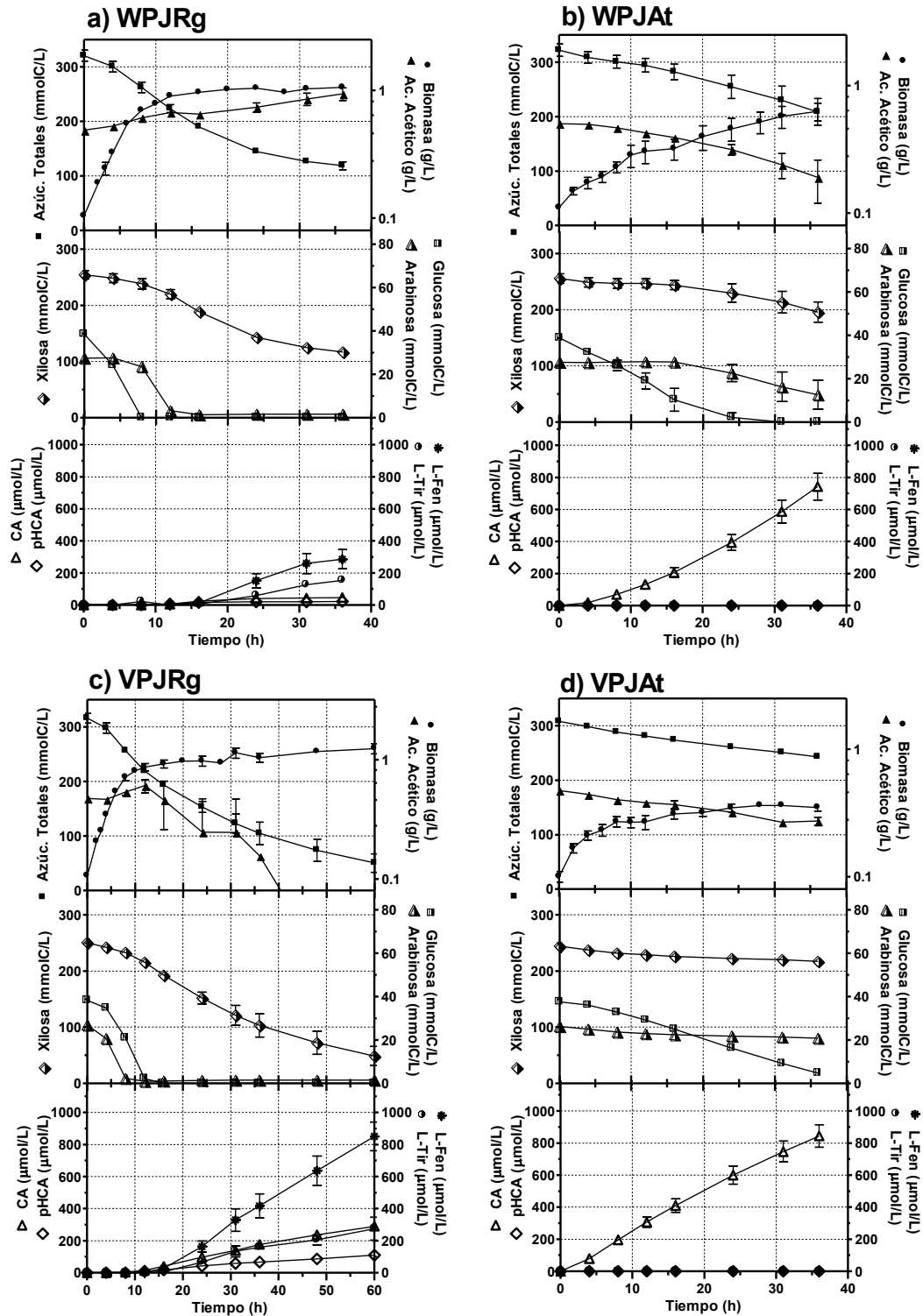


Figura 8. Cinéticas de crecimiento y producción de las cepas WPJRg, VPJRg, WPJAt y VPJAt evaluadas en hidrolizado simulado. Condiciones de cultivo: 300 rpm, 30 °C.

6.5.2 Inducción de los genes involucrados en la producción de CA y pHCA, a las 7 h del inicio del cultivo a 30 °C.

Debido a que sólo se logró incrementar 2.5 veces la producción de pHCA en el fondo genético PTS⁻Glc⁺, se pensó que posiblemente se había generando cierta carga metabólica en las cepas, ocasionada por la inducción de los genes desde el inicio de los cultivos, evitando que se lograra alcanzar una mayor biomasa. Por lo tanto, con el fin de incrementar la cantidad de biomasa, la inducción de los genes involucrados en la producción de CA y pHCA se realizó a dos tercios de la fase exponencial, es decir a las 7 h de haberse iniciado el cultivo a 30 °C (Fig 9).

Los resultados de la producción de pHCA de las cepas WPJRg y VPJRg, inducidas a las 7 h de cultivo, mostró una disminución en el título de pHCA, respecto a las mismas cepas inducidas al inicio del cultivo. En el caso de la cepa VPJRg, el título de pHCA se redujo un 40% respecto al título obtenido cuando se indujo al inicio del cultivo; ésta misma proporción se redujo en el caso de la cepa WPJRg (Fig 9). Como se observa en los paneles a y b (Fig 9), la velocidad de crecimiento y la biomasa alcanzada en ambas cepas fueron similares entre los cultivos inducidos a las 0 y 7 h. Dichos resultados permitieron confirmar que la replicación de los plásmidos no ocasionó carga metabólica en las cepas que expresan la enzima PALRg, y que la baja producción de pHCA respecto al CA se debe principalmente a las propiedades catalíticas de la enzima.

La inducción de los plásmidos a las 7 horas de haber iniciado el cultivo también favoreció la producción de CA (Fig 9 c y d), pues al producirse mayor biomasa, la cantidad de enzima expresada también fue mayor, logrando un título de 1373 µM con la cepa WPJAt (36 h de cultivo). Éste valor fue 85 % superior que el título obtenido al inducir al inicio del cultivo a ésta temperatura (741.49 µM), y 344 % más que el obtenido a 37 °C también en la mezcla de azúcares. El título logrado a 30 °C, e induciendo los plásmidos a las 7 h del inicio del cultivo, permitió alcanzar el título más alto de producción de CA en éste estudio, el cual es superior a los 415 µM logrados por una *P putida* (Nijkamp et al., 2005), a todos los valores

reportados para *E. coli* hasta éste momento (Vannelli et al., 2007a, 2007b) y competitivo con los 1417 μM producidos por una *S. lividans* (Noda et al., 2011).

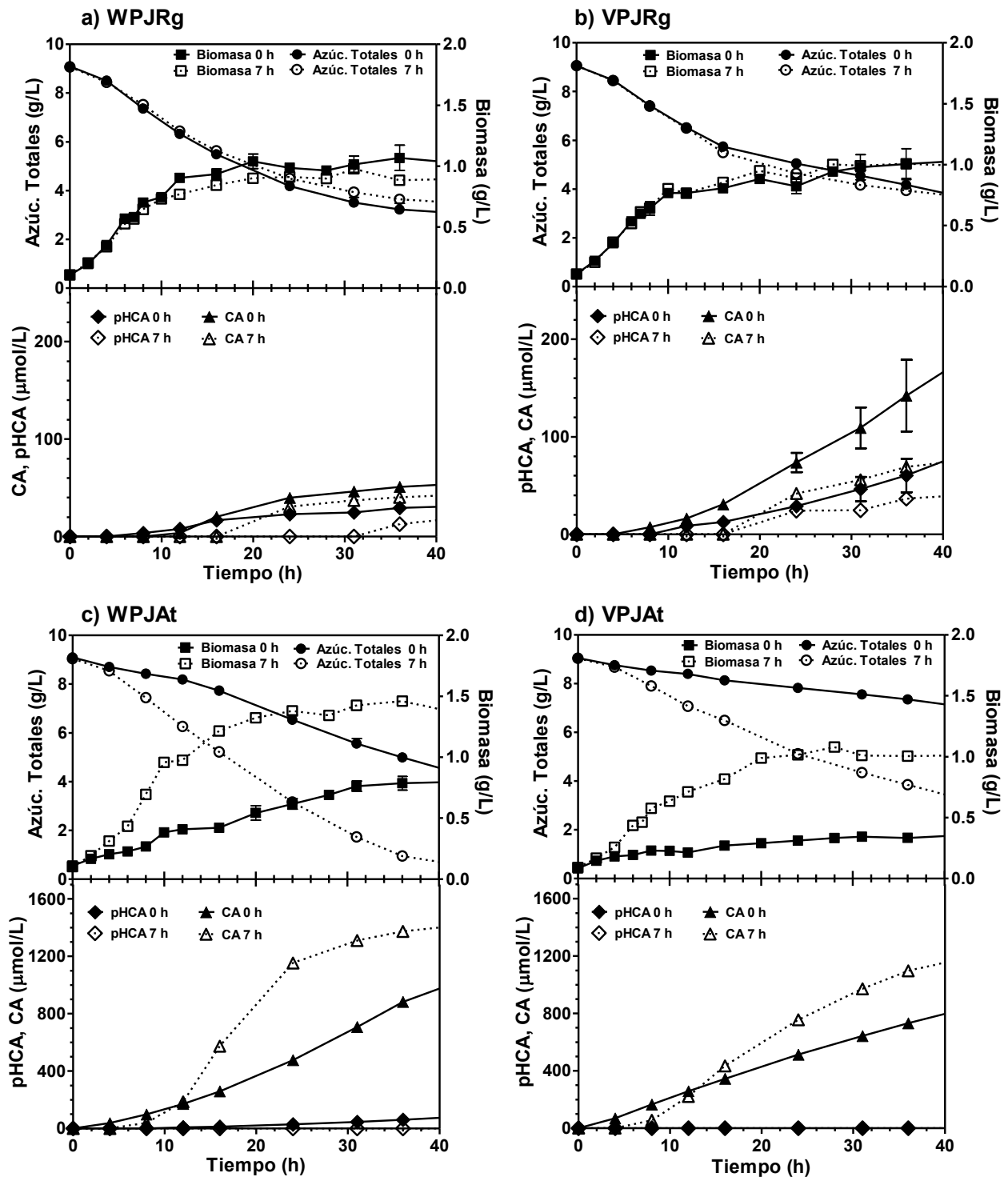


Figura 9. Cinéticas de crecimiento y producción de las cepas WPJRg, VPJRg, WPJAt y VPJAt evaluadas en hidrolizado simulado a 30 °C, induciendo a las 0 y 7 h del cultivo. Condiciones de cultivo: 300 rpm, 30 °C.

Al observar que el crecimiento y consumo de las fuentes de carbono en los cultivos inducidos a las 0 y 7 h fueron muy similares, y que la producción de los ácidos aromáticos fue menor, se decidió hacer un experimento de bioconversión de L-Tir y L-Fen a sus respectivos ácidos aromáticos, pues se observó, que en todos los cultivos realizados, la producción de pHCA se detenía al llegar a fase estacionaria y se incrementaba la concentración de L-Tir en el medio, datos que nos sugirieron una posible inactivación de la enzima PALRg.

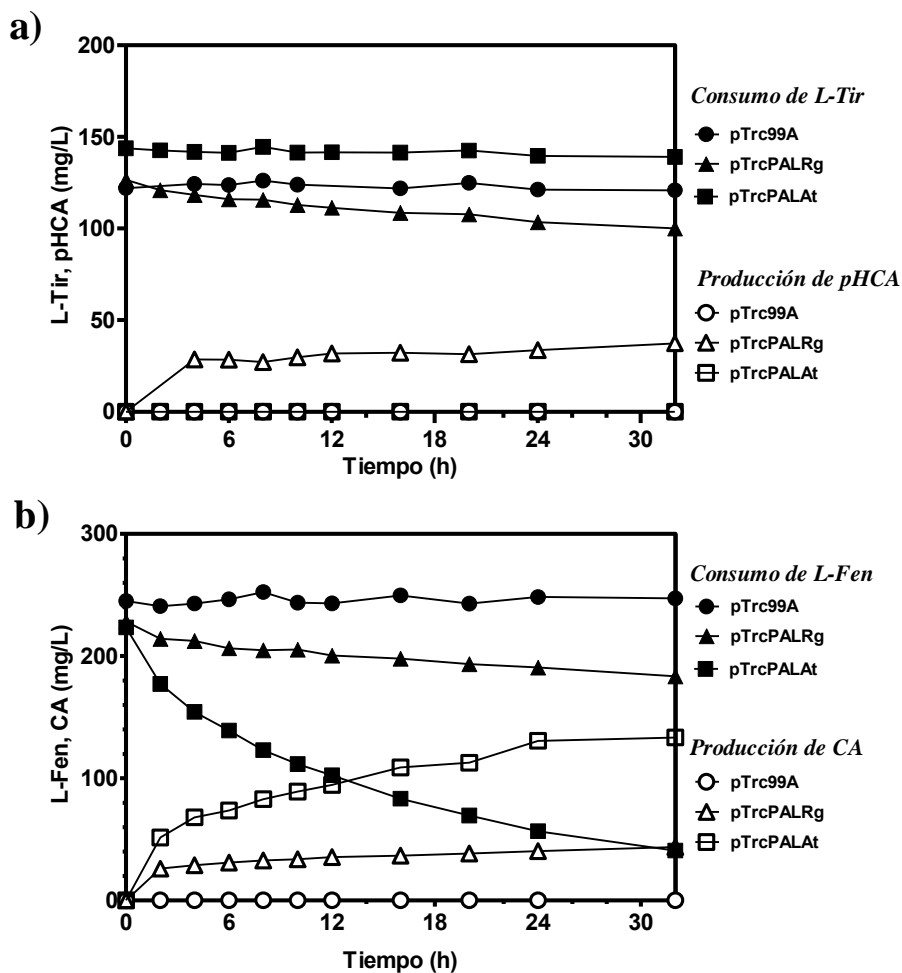


Figura 10. Bioconversión de a) L-Tir y b) L-Fen a pHCA y CA respectivamente, con células completas expresando las enzimas PALRg y PALAt en la cepa de *E. coli* W3110. Medio mineral M9 sin fuente de carbono, 30 °C.

En el experimento de bioconversión, las células fueron inducidas al inicio del cultivo, crecidas y cosechadas a dos tercios de la fase exponencial, lavadas y re-suspendidas en medio M9, suplementado con L-Tir o L-Fen, sin fuente de carbono. La conversión de L-Tir y L-Fen a sus correspondientes ácidos aromáticos se muestra en la figura 10. Como se observa, la bioconversión con células viables muestra que la enzima PALRg sólo tiene actividad en las primeras cuatro horas del experimento, posteriormente no hay conversión de la L-Tir a pHCA, y tampoco de L-Fen a CA, indicando una posible degradación o inactivación de la enzima PALRg. De acuerdo con Zhu et al. (2013), a 40 °C, 3 °C más de lo que empleamos en nuestros experimentos, la actividad relativa de la enzima PAL de *R. glutinis*, disminuye 20 % en 60 min, indicando cierta inestabilidad de la enzima con el tiempo, lo cual explicaría la casi nula bioconversión de la L-Tir después de 4 horas de incubación.

Los resultados de bioconversión también mostraron que la enzima PAL de *A. thaliana* es estable, manteniendo su actividad continúa durante las 30 horas del experimento, observando una conversión continua de L-Fen a CA (Fig 10). La estabilidad mostrada por ésta enzima, junto con su elevada eficiencia catalítica, permiten una mayor producción de CA con cualquiera de los fondos genéticos empleados.

En la literatura también se menciona que, la actividad enzimática de la enzima PAL de *R. glutinis* decrece rápidamente cuando la levadura llega a fase estacionaria. Este efecto se lo atribuyen a las proteasas que se expresan en ésta fase del crecimiento del microorganismo (Fritz et al., 1976; Gilbert and Tully, 1982). Éstos datos podrían explicar por qué después de llegar a fase estacionaria, la producción de pHCA se detiene e inicia la acumulación de su precursor, L-Tir.

Por otra parte, Zhu et al. (2013) también mencionan, que la actividad de la enzima de *R. glutinis* se incrementa después de los 30 °C, siendo 50 °C la temperatura de máxima actividad *in vitro*. Por ello, a pesar de obtener un mayor título de pHCA a 30 °C en el fondo PTS⁻Glc⁺(WPJRg), la relación de producción molar pHCA/CA fue menor a 30°C (0.477) que a 37 °C (0.93), indicando que 37 °C

es una temperatura adecuada para realizar los cultivos de producción de pHCA, pues a ésta temperatura se favorece la relación pHCA/CA.

Los resultados anteriores podrían indicar que debido a las propiedades catalíticas de la enzima PALRg, no es posible lograr una mayor producción de pHCA. Por lo tanto, se decidió emplear otra estrategia para incrementar la producción de pHCA, la cual consistió en limitar la producción de L-Fen en el fondo genético de mayor producción de pHCA empleando la mezcla de azúcares (fondo genético PTS⁺), con el fin de aumentar la disponibilidad de L-Tir y por lo tanto, aumentar la producción de éste ácido.

6.5.3 Efecto de la inactivación del gen *pheA* en la síntesis de CA y pHCA.

Como se observa en los resultados anteriores, la producción de pHCA fue menor respecto a la producción de CA en las cepas que expresan la PALRg. Para mejorar la relación pHCA/CA, se limitó la disponibilidad de L-Fen, mediante la inactivación del gen *pheA*, que codifica la enzima CM-PDH de la ruta biosintética de la L-Fen (Fig 1). Debido a que la cepa W3110 (fondo PTS⁺) fue la que mostró los mejores parámetros de producción en hidrolizado simulado, la inactivación del gen *pheA* se realizó en éste fondo. La cepa mutante fue transformada con los plásmidos PJLBaroG^{fbr}tktA y pTrcPALRg o pTrcPALAt para generar cepas W(pheA⁻)Rg y W(pheA⁻)At (Tabla 2) y las cepas fueron evaluadas en hidrolizado simulado a 37 °C, temperatura a la cual la relación de producción pHCA/CA es mayor (0.93).

Los resultados mostraron que la cepa W(pheA⁻)Rg incrementó su rendimiento $Y_{pHCA/SH}$ 8 veces y 2.9 veces su $q_{pHCA-SH}$, cuando se comparó con su parental WPJRg. A las 12 horas de cultivo la cepa W(pheA⁻)Rg produjo 322 μ M pHCA (Tabla 7, Fig 11). Esto representa un incremento de 10 veces la concentración del mismo ácido producido por la cepa WPJRg (39 μ M). Cabe hacer notar, que el título de CA no fue menor para la cepa W(pheA⁻)Rg; sin embargo, la relación pHCA/CA incrementó de 0.93 para WPJRg a 5.1 para la cepa W(pheA⁻)Rg.

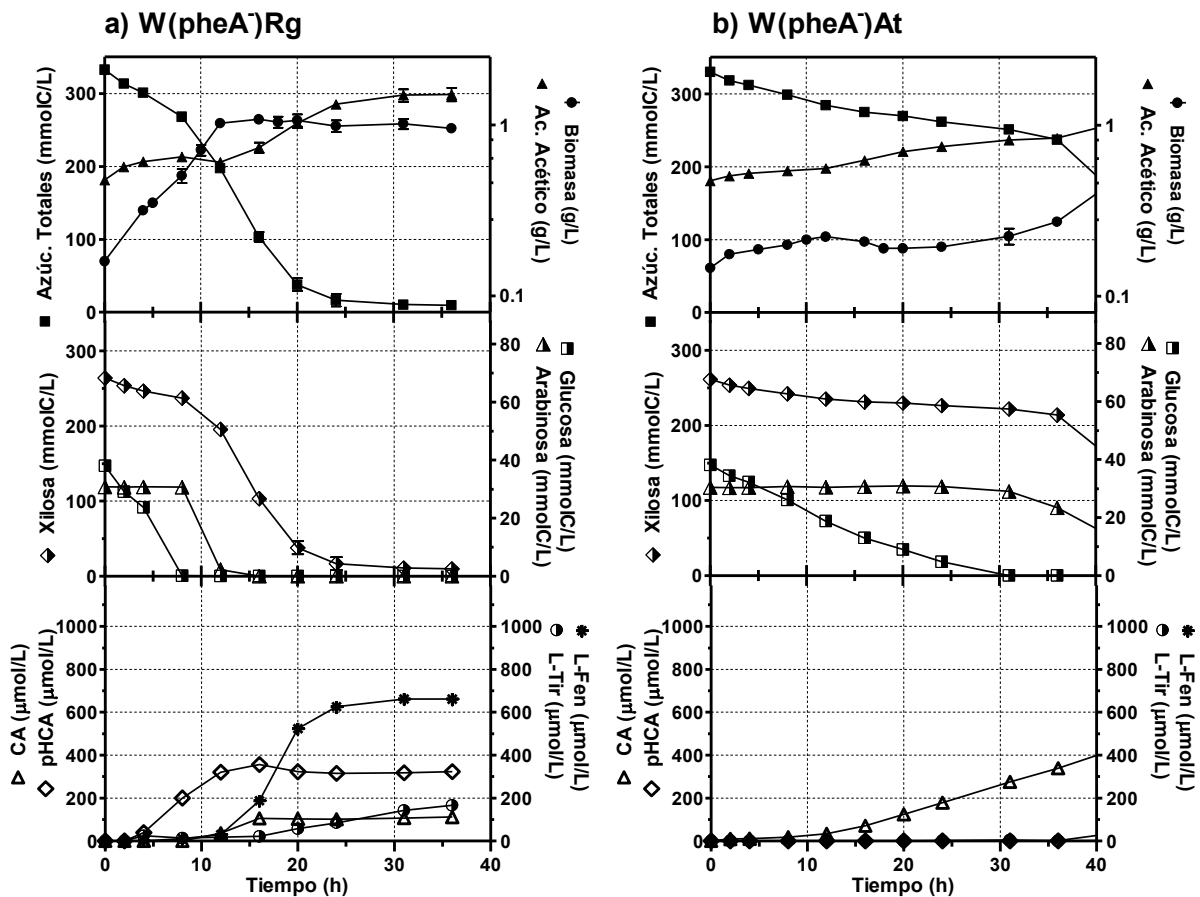


Figura 11. Cinéticas de crecimiento y producción de las cepas W(pheA)Rg y W(pheA)At, evaluadas en hidrolizado simulado. Condiciones de cultivo: 300 rpm, 37 °C.

Los datos anteriores indican que los parámetros de producción de pHCA se vieron favorecidos por la inactivación de la vía de biosíntesis de L-Fen, incrementándose el carbono disponible para la producción de L-Tir y por lo tanto pHCA. Han sido reportados resultados similares para una cepa de *P. putida* que fue sometida a mutagénesis al azar para incrementar su producción de L-Fen. Posteriormente ésta cepa fue sometida a otra ronda de mutagénesis para hacerla auxótrofa a L-Fen. El título de pHCA logrado por ésta cepa a 30 °C, en matraz y medio rico fue de 860 μM (Nijkamp et al., 2007). Sin embargo, las mutaciones que causaron el fenotipo aún no han sido reportadas

Por otra parte, la cepa $W(pheA^-)At$ produjo CA, a pesar de estar limitada en L-Fen, reduciendo su q_{CA-HS} 2.6 veces respecto a la cepa WPJAt. Esto puede explicarse considerando que la conversión de pefenato (PPA) a fenilpiruvato (PPY) puede llevarse a cabo en ausencia de la enzima CM-PDH que la catalice (Kleeb et al., 2007). Puede asumirse por lo tanto, que la enzima PALAt a través del consumo de L-Fen incrementa el flujo de carbono de corismato a CA en ausencia del gen *pheA*.

6.6 Consideraciones finales.

Existen tres factores que le dan viabilidad a los procesos biotecnológicos, éstos son, el título de producción, el rendimiento y la velocidad específica de producción. Por ello, a través de éste estudio fue posible identificar los factores que intervienen directamente en la producción de los ácidos aromáticos y cuáles fueron las condiciones con las que se obtienen los mejores parámetros de producción. En el caso particular de la producción de pHCA, observamos que la cepa $W(pheA^-)Rg$ mostró la mejor q_{pHCA} ($53 \mu\text{mol/h}\cdot\text{g}_{CDW}$) y el mejor $Y_{pHCA/HS}$, cuando fue crecida en hidrolizado simulado, logrando un título de $322.9 \mu\text{M}$. Mientras que para el CA, la cepa WPJAt mostró la mayor q_{CA} ($368.9 \mu\text{mol/h}\cdot\text{g}_{CDW}$) y un título de $1022 \mu\text{M}$ en arabinosa como fuente de carbono simple; en la mezcla que simulaba un hidrolizado rico en pentosas, ésta cepa logró un título ligeramente mayor ($1373 \mu\text{M}$) a 30°C e induciendo la expresión de los plásmidos a las 7 horas del inicio del cultivo.

En el estudio observamos que los parámetros de producción del fondo genético PTS^-Glc^+ se ven favorecidos empleando glucosa como fuente de carbono, lo que nos indica que en un hidrolizado con alta concentración de glucosa, la producción de los ácidos aromáticos se favorecería en las cepas derivadas de la cepa VH33. Sin embargo, en medios ricos en xilosa, arabinosa o empleando mezclas con una mayor concentración de pentosas, los parámetros de producción se verán favorecidos con cepas derivadas del fondo PTS^+ (W3110).

Otro factor importante en la producción de los ácidos aromáticos es la enzima empleada para desaminar los aminoácidos a sus correspondientes ácidos

aromáticos. Como se mostró, la enzima PAL de *A. thaliana* sólo muestra actividad fenilalanina amonio liasa con una elevada afinidad y alta actividad catalítica hacia L-Fen (Cochrane et al., 2004). Sin embargo, la enzima de *R. glutinis* a pesar de que muestra elevada afinidad hacia L-Tir, su K_{cat}/K_m es un orden de magnitud mayor para L-Fen, haciendo que la relación en la producción de pHCA/CA sea de 0.93, por otra parte, sabemos que la producción de pHCA con ésta enzima sólo se puede realizar en la fase de crecimiento y en las primeras 3 o 4 horas después de alcanzar la fase estacionaria, por lo tanto, la estrategia que se empleó para mejorar la baja producción de pHCA, fue generar una cepa con la vía de biosíntesis de L-Fen interrumpida, limitando la producción de L-Fen y dejando mayor carbono disponible para la biosíntesis de L-Tir. Dicha estrategia permitió incrementar los parámetros de producción y cambió la relación pHCA/CA a 5.1. Los datos proporcionados por la cepa W(pheA⁻)At, indicaron que aunque ésta cepa tiene interrumpida la biosíntesis de L-Fen, la conversión no enzimática de PPA a PPY se ve favorecida debido a la elevada afinidad de la enzima PALRg, que emplea la L-Fen para producir CA. Es factible incrementar aún más el flujo de carbono a la biosíntesis de L-Tir a través de la inactivación del represor *tyrR*, como ha sido reportado con anterioridad (Pittard et al., 2005, Kang et al., 2012). Sin embargo, la eficiencia catalítica es un factor que deberá tomarse en cuenta para incrementar la producción de pHCA. Como se muestra en la Tabla 1, diferentes enzimas han sido empleadas para la producción de pHCA, pero ninguna de ellas tiene sólo afinidad hacia L-Tir, por lo que sería deseable encontrar otra enzima que además de tener mayor afinidad a L-Tir, tenga mayor eficiencia catalítica hacia éste aminoácido. Otra alternativa, sería cambiar la afinidad de L-Fen a L-Tir en una enzima que sólo muestre actividad PAL. Esto sería posible a través de la mutación de la Phe89 característica de las enzimas con actividad PAL por una His que se conserva en las enzimas con actividad TAL. Un estudio demostró que al mutar la His89 de la enzima TAL de *Rhodobacter sphaeroides* por una Fen (H89F) fue posible cambiar la afinidad de la enzima L-Fen (Louie et al., 2006).

Tabla 8. Datos comparativos de producción de los resultados obtenidos en éste trabajo con los reportados en la literatura.

Organism	PAL/TAL	Carbon Source	Culture Medium	Conditions	pHCA (μM)	Q _{pHCA} ($\mu\text{mol/Lh}$)	CA (μM)	Q _{CA} ($\mu\text{mol/Lh}$)	Reference
<i>E. Coli</i> (W3110)	<i>R. glutinis</i>	Glucose	Mineral	30 °C 24 h Shakeflask	42.4	1.76	32.9	1.37	Vannelli, et al., 2007a
<i>E. Coli</i> (DH10B)	<i>R. glutinis</i>	Glucose	Mineral	30 °C 18 h Shakeflask	280	15.5	280	15.5	Vannelli, et al., 2007a
<i>E. coli</i> L-Phe overproducing	<i>R. glutinis</i>	Glucose	Mineral	30 °C 18 h Shakeflask	150	8.33	380	21.1	Vannelli, et al., 2007a
<i>E. Coli</i> (BL21*AI)	<i>T. cutaneum</i>		LB	30 °C 16 h	432	27	843	52.68	Vannelli, et al., 2007b
<i>E. coli</i> L-Tyr overproducing	<i>R. sphaeroides</i>	Glucose	Mineral	26 °C 36 h Shakeflask	5933	-			Kang et al., 2012
VPJRg	<i>E. coli</i>	Glucose	M9	37 °C, 16 h	91.45	5.72			Vargas-Tah et al., 2015
VPJAt	<i>E. coli</i>	Glucose	M9	37 °C, 36 h			529.9	14.72	Vargas-Tah et al., 2015
WPJAt	<i>E. coli</i>	Arabinose	M9	37 °C, 31 h			1022.35	33.5	Vargas-Tah et al., 2015
W(pheA ⁻)Rg	<i>E. coli</i>	SH	M9	37 °C, 16	355.87	22.24			Vargas-Tah et al., 2015
WPJAt	<i>E. coli</i>	SH	M9	37 °C, 31			377.8	12.19	Vargas-Tah et al., 2015
<i>S. cerevisiae</i>	<i>R. glutinis</i>	Glucose	Mineral	30 °C 48 h Shakeflask	14.3	0.298			Vanelli, et al., 2007a
<i>S. cerevisiae</i>	<i>R. glutinis</i>	Raffinose	Mineral	30 °C 48 h Shakeflask	193.7	4.03			Vanelli, et al., 2007a
<i>P. aeruginosa</i>	<i>R. glutinis</i>	Glucose			207.5		109.5		Patent US 7,303, 900
<i>P. putida</i> S12 mutagenesis, Δfcs	<i>R. toruloides</i>	Glucose	Mineral	30 °C Shakeflask	224	84 ($\mu\text{mol/h} \cdot \text{g}_{\text{CDW}}$)	350	-	Nijkamp, et al., 2007
<i>P. putida</i> S12 Δfcs and 2nd mutagenesis, L-phe auxotrophic	<i>R. toruloides</i>	Glucose	Mineral	30 °C Shakeflask	860	84 ($\mu\text{mol/h} \cdot \text{g}_{\text{CDW}}$)	70	-	Nijkamp, et al., 2007
<i>P. putida</i> S12 Δfcs and 2nd mutagenesis, L-phe auxotrophic	<i>R. toruloides</i>	Glucose	Mineral	30 °C Fed-batch	10,600	24 ($\mu\text{mol/h} \cdot \text{g}_{\text{CDW}}$)	150	-	Nijkamp, et al., 2007
<i>P. putida</i> S12 Random mutagenesis Overproducer of L-Phe	<i>R. toruloides</i>	Glucose	Mineral	30 °C, Over Night Shakeflask			415	12	Nijkamp, et al., 2005
<i>P. putida</i> S12 Random mutagenesis Overproducer of L-Phe	<i>R. toruloides</i>	Glucose	Mineral	30 °C, 30h Fed-batch N ₂ limitation			5,000	166	Nijkamp, et al., 2005
<i>P. putida</i> S12 Random mutagenesis Overproducer of L-Phe	<i>R. toruloides</i>	Glycerol	Mineral	30 °C, 50 h Fed-batch N ₂ limitation			5,400	108	Nijkamp, et al., 2005
<i>Streptomyces lividans</i>	<i>S. maritimus</i>	Glucose	TSB	28 °C, 96 h Shake flask			540	5.62	Noda et al., 2011
<i>S. lividans</i>	<i>S. maritimus</i>	Glucose	TSB, Trp 50 g/l	28 °C, 120 h Shake flask			1417	11.8	Noda et al., 2011
<i>S. lividans</i>	<i>S. maritimus</i>	Xylose	TSB Trp	28 °C, 144 h Shake flask			2024	14.05	Noda et al., 2011
<i>S. Lividans</i>	<i>R. sphaeroides</i>	Glucose	3% TSB, 5% Trp	28 °C, 168 h	4755	28.5			Kawai, et al., 2013

Es difícil hacer una comparación de nuestros resultados con la información disponible en la literatura, debido al tipo de medios empleados, los microorganismos, las enzimas empleadas y los tiempos de cultivo (Tabla 8). Sin embargo, las estrategias empleadas por nosotros son similares y en el mismo sentido que las reportadas por otros grupos de investigación, consistiendo principalmente en dirigir el flujo de carbono hacia el precursor de interés y empleando estrategias de cultivo para incrementar la producción de los ácidos aromáticos. La optimización de la producción dependerá de cada caso en particular; sin embargo, se pueden seguir haciendo modificaciones a nuestras cepas y emplear estrategias de cultivo para aumentar la producción. Ahora sabemos, que es factible la producción biotecnológica de éstos compuestos propios de plantas en *E. coli*, y que éstos podrán ser empleados como sustrato para la producción de otros compuestos de interés industrial, mediante más modificaciones genéticas a las cepas ya generadas.

El estudio de la producción de CA y pHCA en azúcares simples y una mezcla de éstas, fue publicado en la revista *Microbial Cell Factories* con el título "Production of cinnamic and *p*-hydroxycinnamic acid from sugar mixtures with engineered *Escherichia coli*" (DOI 10.1186/s12934-014-0185-1). El artículo publicado se anexa en éste documento.

En coautoría con mi tutor el Dr. Guillermo Gosset se realizó una revisión bibliográfica de la producción de ambos ácidos aromáticos en microorganismos. La revisión fue publicada en la revista *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* con el título " Production of cinnamic and *p*-hydroxycinnamic acids in engineered microbes" (doi: 10.3389/fbioe.2015.00116), la cual se anexa en el presente documento.

7 CONCLUSIONES.

- El fondo genético PTS⁻Glc⁺ (VH33) sólo mostró rendimientos y títulos elevados en glucosa como azúcar simple, por lo que se recomienda emplear éste fondo genético en medios que solo contengan glucosa o mezclas con concentración predominante de este azúcar.
- El fondo genético PTS⁺ (W3110), mostró los mejores parámetros de producción en pentosas y en la mezcla de azúcares (hexosas y pentosas), siendo un fondo genético adecuado para producir CA y pHCA de estos compuestos aromáticos en mezclas de azúcares ricas en pentosas.
- La eficiencia catalítica de la enzima PAL/TAL de *R. glutinis* limitó lograr un mayor título de pHCA.
- La producción de pHCA se incrementó sólo en el fondo genético PTS⁻Glc⁺Al a 30 °C.
- La relación de producción pHCA/CA de la cepa WPJRg, se redujo de 0.93 a 0.47, al disminuir la temperatura de cultivo a 30 °C, por lo que la temperatura más adecuada para producir pHCA es 37 °C.
- Limitando la disponibilidad de L-Fenilalanina, la relación pHCA/CA incrementó de 0.93 a 5.1.
- Los mejores parámetros de producción de CA se obtuvieron con la cepa WPJAt que expresó la enzima PAL de *A. thaliana* a 30 °C, cultivada en la mezcla de azúcares e induciendo la expresión de los genes de producción a las 7 horas del inicio del cultivo (dos tercios de la fase exponencial de crecimiento).
- Las concentraciones de pHCA y CA producidas no ocasionan un efecto inhibitorio en las cepas productoras.

8 PERSPECTIVAS.

El CA y pHCA tienen una amplia aplicación biotecnológica, por lo que en años recientes se ha estudiado la forma de obtenerlos en forma recombinante. Sin embargo, el pHCA tiene más aplicaciones biotecnológicas respecto al CA, y cómo se mostró en éste estudio, la producción de éste compuesto tiene mayores retos, debido a la menor eficiencia catalítica hacia L-Tir respecto a L-Fen de la enzima de *R. glutinis*, además de que son muy pocas las enzimas reportadas con actividad TAL. De aquí, que uno de los retos más importantes es encontrar o mejorar enzimas con actividad TAL, que tengan elevada afinidad a L-Tir y mejorar la eficiencia catalítica para transformar L-Tir a pHCA. Otra posibilidad para incrementar la afinidad y eficiencia catalítica es cambiar, mediante ingeniería de proteínas, la especificidad por su sustrato.

En cuanto al metabolismo de *E. coli*, se mostró que la limitación de L-Fen incrementó 5.1 veces la relación de producción pHCA/CA. Éste dato indica que es posible que mediante la desregulación de la vía de los AAA y dirigiendo el flujo de carbono a la producción de L-Tir, se pueda incrementar aún más la producción de pHCA. La desregulación de la vía, podría efectuarse, mediante la eliminación del regulador TyrR o generando una enzima TyrA insensible a inhibición por L-Tir.

Finalmente, un paso obligado sería realizar técnicas de cultivo para incrementar la producción de CA y pHCA. Usando biorreactores, se sugiere realizar cultivos en lote para la producción de CA, a 30°C e induciendo los genes de producción a dos tercios de la fase exponencial de crecimiento, para incrementar la biomasa, ya que el título y rendimiento se ven favorecidos en éstas condiciones. La producción de pHCA se recomienda realizar en cultivo en lote alimentado, de forma tal, que la biomasa y la producción de pHCA incrementen al mismo tiempo, pues como se observó en los resultados obtenidos, éste ácido sólo se produce en la fase exponencial de crecimiento.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aoki, T., Akashi, T., Ayabe, S., 2000. Flavonoids of Leguminous Plants: Structure, Biological Activity, and Biosynthesis. *J. Plant Res.* 113, 475–488.
- Appert, C., Logemann, E., Hahlbrock, K., Schmid, J., Amrhein, N., 1994. Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from parsley (*Petroselinum crispum* Nym.). *Eur. J. Biochem.* 225, 491–498.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. a, Tomita, M., Wanner, B.L., Mori, H., 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2, 1–11.
- Bachman, B.J., 1972. Pedigrees of Some Mutant Strains of *Escherichia coli* K12. *Bacteriol. Rev.* 36, 525–557.
- Báez-Viveros, J.L., Flores, N., Juárez, K., Castillo-España, P., Bolivar, F., Gosset, G., 2007. Metabolic transcription analysis of engineered *Escherichia coli* strains that overproduce L-phenylalanine. *Microb. Cell Fact.* 6, 30.
- Balderas-Hernández, V.E., Sabido-Ramos, A., Silva, P., Cabrera-Valladares, N., Hernández-Chávez, G., Báez-Viveros, J.L., Martínez, A., Bolívar, F., Gosset, G., 2009. Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 8, 19.
- Berner, M., Krug, D., Bihlmaier, C., Vente, A., Müller, R., Bechthold, A., 2006. Genes and enzymes involved in caffeic acid biosynthesis in the actinomycete *Saccharothrix espanaensis*. *J. Bacteriol.* 188, 2666–2673.
- Berry, a, 1996. Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Trends Biotechnol.* 14, 250–6.
- Caspeta, L., Caro-Bermúdez, M. a., Ponce-Noyola, T., Martínez, A., 2014. Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Appl. Energy* 113, 277–286.
- Chávez-Béjar, M.I., Báez-Viveros, J.L., Martínez, A., Bolívar, F., Gosset, G., 2012. Biotechnological production of l-tyrosine and derived compounds. *Process Biochem.* 47, 1017–1026.
- Chávez-Béjar, M.I., Lara, A.R., López, H., Hernández-Chávez, G., Martínez, A., Ramírez, O.T., Bolívar, F., Gosset, G., 2008. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-tyrosine production by expression of genes coding for the chorismate mutase domain

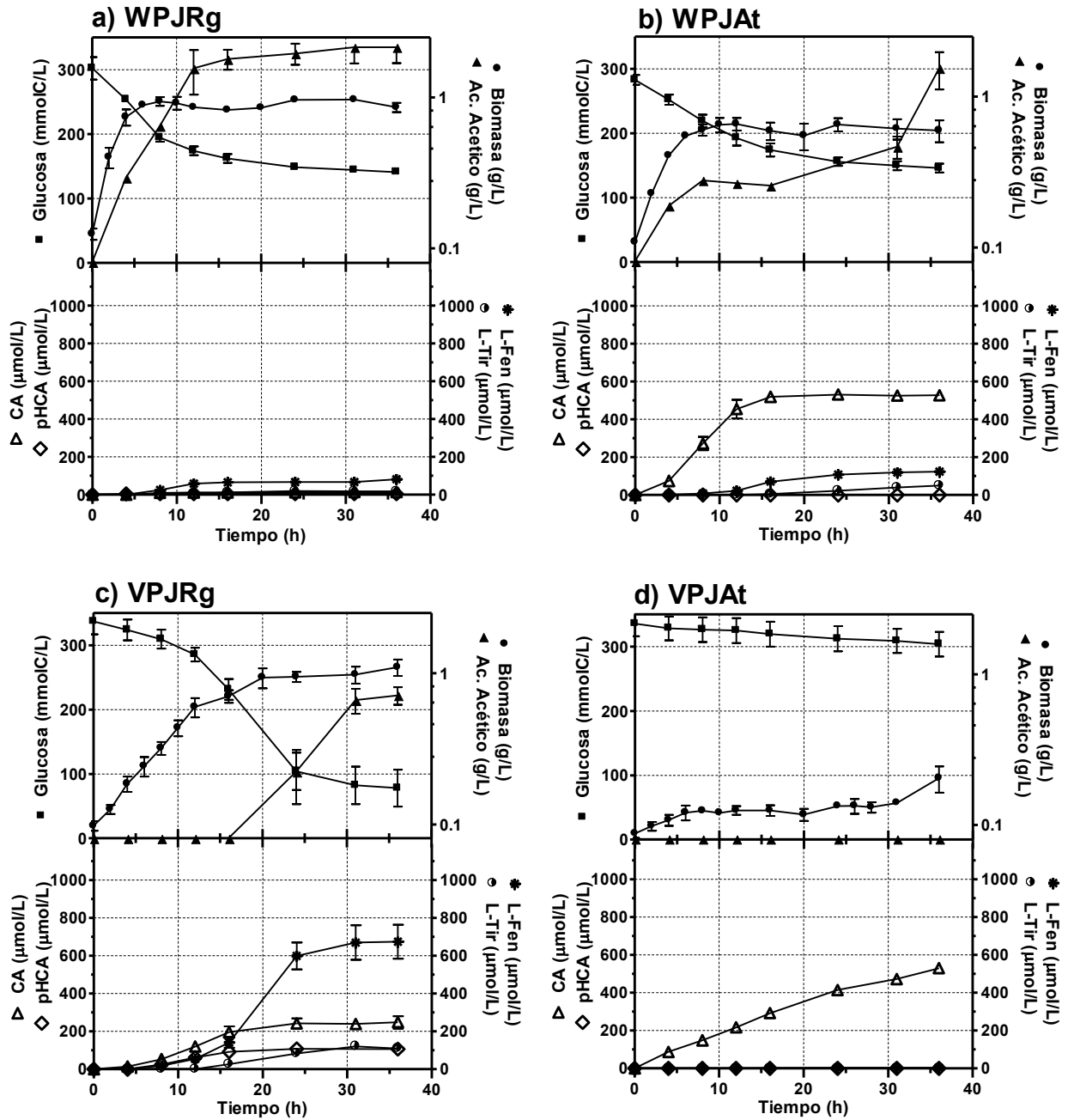
-
- of the native chorismate mutase-prephenate dehydratase and a cyclohexadienyl dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3284–90.
- Cochrane, F.C., Davin, L.B., Lewis, N.G., 2004. The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: Kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry* 65, 1557–1564.
- De Anda, R., Lara, A.R., Hernández, V., Hernández-Montalvo, V., Gosset, G., Bolívar, F., Ramírez, O.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. *Metab. Eng.* 8, 281–90.
- Flores, N., Xiao, J., Berry, a, Bolivar, F., Valle, F., 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 14, 620–623.
- Fritz, R.R., Hodgins, D.S., Abell, C.W., 1976. Phenylalanine Ammonia-lyase. Induction and purification from yeast and clearance in mammals. *J. Biol. Chem.* 251, 4646–4650.
- Gilbert, H.J., Tully, M., 1982. Synthesis and degradation of phenylalanine ammonia-lyase of Synthesis and Degradation of Phenylalanine Ammonia-Lyase of *Rhodospiridium toruloides* 150, 498–505.
- 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.
- Harborne, J.B., Williams, C. a, 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504.
- Hernández-Montalvo, V., Martínez, A., Hernández-Chavez, G., Bolivar, F., Valle, F., Gosset, G., 2003. Expression of galP and glk in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnol. Bioeng.* 83, 687–94.
- Hu, C., Jiang, P., Xu, J., Wu, Y., Huang, W., 2003. Mutation analysis of the feedback inhibition site of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *J. Basic Microbiol.* 43, 399–406.
- Hwang, E. Il, Kaneko, M., Ohnishi, Y., Horinouchi, S., 2003. Production of Plant-Specific Flavanones by *Escherichia coli* Containing an Artificial Gene Cluster 69, 2699–2706.
- Jiang, H., Wood, K. V, Morgan, J.A., 2005. Metabolic Engineering of the Phenylpropanoid Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. 71, 2962–2969.
-

-
- Jung, J., Lee, J.-H., Bae, K.H., Jeong, C.-S., 2011. Anti-gastric actions of eugenol and cinnamic acid isolated from *Cinnamomi Ramulus*. *Yakugaku Zasshi* 131, 1103–10.
- Kaneko, M., Hwang, E. Il, Ohnishi, Y., Horinouchi, S., 2003. Heterologous production of flavanones in *Escherichia coli*: potential for combinatorial biosynthesis of flavonoids in bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 456–61.
- Kang, S.-Y., Choi, O., Lee, J.K., Hwang, B.Y., Uhm, T.-B., Hong, Y.-S., 2012. Artificial biosynthesis of phenylpropanoic acids in a tyrosine overproducing *Escherichia coli* strain. *Microb. Cell Fact.* 11, 153.
- Kawai, Y., Noda, S., Ogino, C., Takeshima, Y., Okai, N., Tanaka, T., Kondo, A., 2013. *p*-Hydroxycinnamic acid production directly from cellulose using endoglucanase- and tyrosine ammonia lyase-expressing *Streptomyces lividans*. *Microb. Cell Fact.* 12, 45.
- Kleeb, A.C., Edalat, M.H., Gamper, M., Haugstetter, J., Giger, L., Neuenschwander, M., Kast, P., Hilvert, D., 2007. Metabolic engineering of a genetic selection system with tunable stringency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13907–12.
- Kyndt, J. a, Meyer, T.E., Cusanovich, M. a, Van Beeumen, J.J., 2002. Characterization of a bacterial tyrosine ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein. *FEBS Lett.* 512, 240–4.
- Logemann, J., Schell, J., Willmitzer, L., 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* 163, 16–20.
- Luedeking, R., Piret, E.L., 1959. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* 1, 393–412.
- Lütke-Eversloh, T., Stephanopoulos, G., 2008. Combinatorial pathway analysis for improved L-tyrosine production in *Escherichia coli*: identification of enzymatic bottlenecks by systematic gene overexpression. *Metab. Eng.* 10, 69–77.
- MacDonald, M.J., D’Cunha, G.B., 2007. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochem. Cell Biol.* 85, 273–282.
- Mitra, A.K., De, A., Karchaudhuri, N., 1999. Application of Microwave Irradiation Techniques for the Syntheses of Cinnamic Acids by Doebner Condensation. *Synth. Commun.* 29, 573–581.
- Miyahisa, I., Kaneko, M., Funai, N., Kawasaki, H., Kojima, H., Ohnishi, Y., Horinouchi, S., 2005. Efficient production of (2S)-flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial biosynthetic gene cluster. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 498–504.
- Nijkamp, K., van Luijk, N., de Bont, J. a M., Wery, J., 2005. The solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 as host for the production of cinnamic acid from glucose.

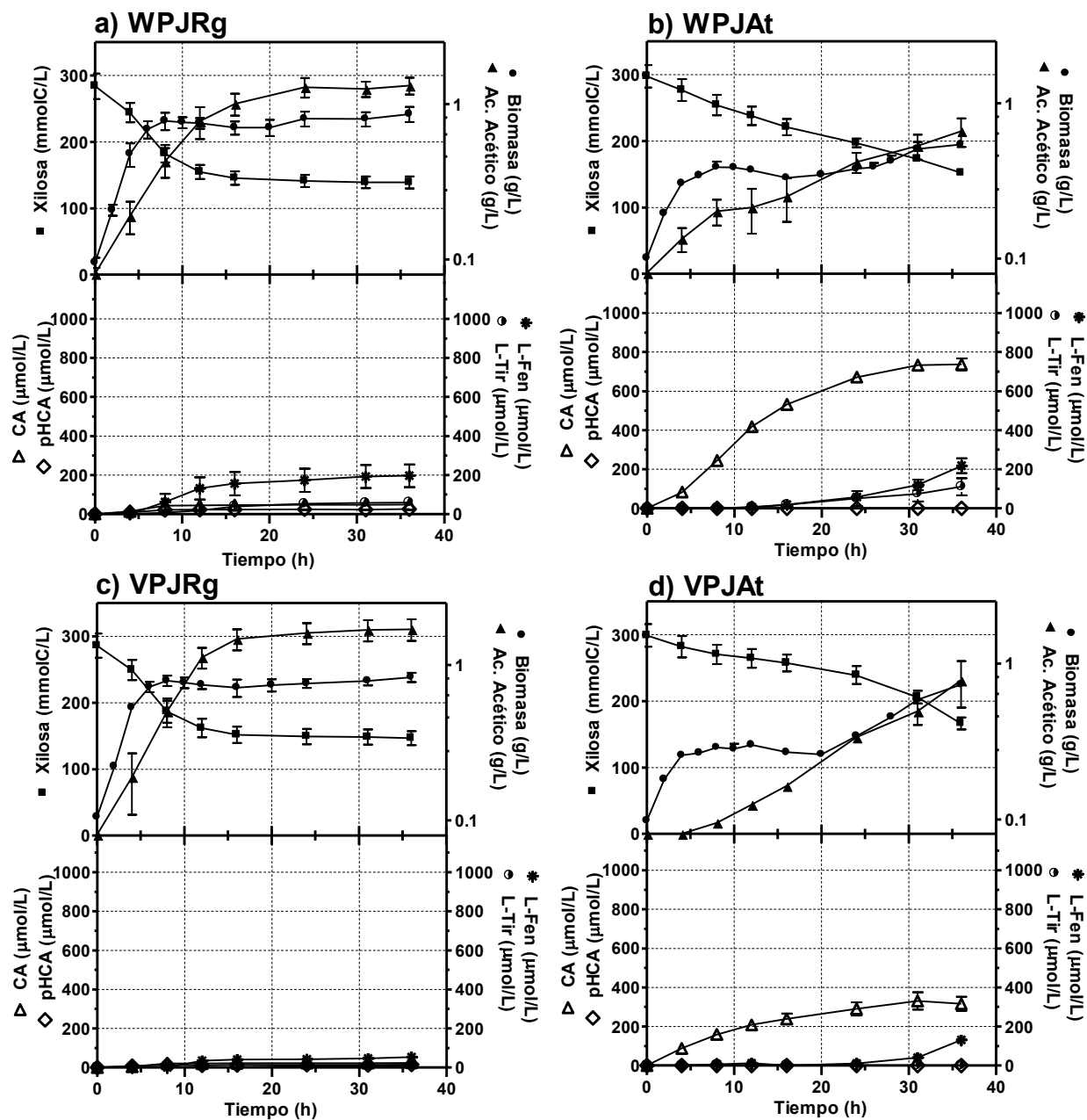
-
- Appl. Microbiol. Biotechnol. 69, 170–7.
- Nijkamp, K., Westerhof, R.G.M., Ballerstedt, H., de Bont, J. a M., Wery, J., 2007. Optimization of the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 as host for the production of *p*-coumarate from glucose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74, 617–24.
- Noda, S., Miyazaki, T., Miyoshi, T., Miyake, M., Okai, N., Tanaka, T., Ogino, C., Kondo, A., 2011. Cinnamic acid production using *Streptomyces lividans* expressing phenylalanine ammonia lyase. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 38, 643–8.
- Noda, S., Miyazaki, T., Tanaka, T., Ogino, C., Kondo, A., 2012. Production of Streptovercillium cinnamoneum transglutaminase and cinnamic acid by recombinant *Streptomyces lividans* cultured on biomass-derived carbon sources. Bioresour. Technol. 104, 648–51.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W., Jacobson, G.R., 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. Microbiol. Rev. 57, 543–594.
- Postma, P.W., Roseman, S., 1976. The Bacterial Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System. Biochim. Biophys. Acta 457, 213–257.
- Qi, W.W., Vannelli, T., Breinig, S., Ben-Bassat, A., Gatenby, A. a, Haynie, S.L., Sariaslani, F.S., 2007. Functional expression of prokaryotic and eukaryotic genes in *Escherichia coli* for conversion of glucose to *p*-hydroxystyrene. Metab. Eng. 9, 268–76.
- Rosler, J., 1997. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. PLANT Physiol. 113, 175–179.
- Sariaslani, F.S., 2007. Development of a combined biological and chemical process for production of industrial aromatics from renewable resources. Annu. Rev. Microbiol. 61, 51–69.
- Sigala, J.C., Flores, S., Flores, N., Aguilar, C., de Anda, R., Gosset, G., Bolívar, F., 2009. Acetate metabolism in *Escherichia coli* strains lacking phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system; evidence of carbon recycling strategies and futile cycles. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 16, 224–35.
- Van Dyk, T.K., 2008. Bacterial efflux transport in biotechnology. Adv. Appl. Microbiol. 63, 231–47.
- Van Dyk, T.K., Templeton, L.J., Cantera, K.A., Sharpe, P.L., Sariaslani, F.S., 2004. Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve? J. Bacteriol. 186, 7196–204.
- Vannelli, T., Wei Qi, W., Sweigard, J., Gatenby, A.A., Sariaslani, F.S., 2007a. Production

-
- of *p*-hydroxycinnamic acid from glucose in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* by expression of heterologous genes from plants and fungi. *Metab. Eng.* 9, 142–151.
- Vannelli, T., Xue, Z., Breinig, S., Qi, W.W., Sariaslani, F.S., 2007b. Functional expression in *Escherichia coli* of the tyrosine-inducible tyrosine ammonia-lyase enzyme from yeast *Trichosporon cutaneum* for production of *p*-hydroxycinnamic acid. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 413–422.
- Watts, K.T., Lee, P.C., Schmidt-Dannert, C., 2006. Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.* 6, 22.
- Watts, K.T., Lee, P.C., Schmidt-Dannert, C., 2004. Exploring recombinant flavonoid biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Chembiochem* 5, 500–7.
- Xiang, L., Moore, B.S., 2005. Biochemical characterization of a prokaryotic phenylalanine ammonia lyase. *J. Bacteriol.* 187, 4286–9.
- Xu, J., Hu, C., Shen, S., Wang, W., Jiang, P., Huang, W., 2004. Requirement of the N-terminus for dimer formation of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate synthase AroG of *Escherichia coli*. *J. Basic Microbiol.* 44, 400–6.
- Xue, Z., McCluskey, M., Cantera, K., Ben-Bassat, A., Sariaslani, F.S., Huang, L., 2007a. Improved production of *p*-hydroxycinnamic acid from tyrosine using a novel thermostable phenylalanine/tyrosine ammonia lyase enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 58–64.
- Xue, Z., McCluskey, M., Cantera, K., Sariaslani, F.S., Huang, L., 2007b. Identification, characterization and functional expression of a tyrosine ammonia-lyase and its mutants from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 599–604.
- Yang, J., Pittard, J., 2013. Biosynthesis of the Aromatic Amino Acids. *EcoSal Plus* 1, 1-39.
- Zhu, L., Cui, W., Fang, Y., Liu, Y., Gao, X., Zhou, Z., 2013. Cloning, expression and characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnol. Lett.* 35, 751–6.

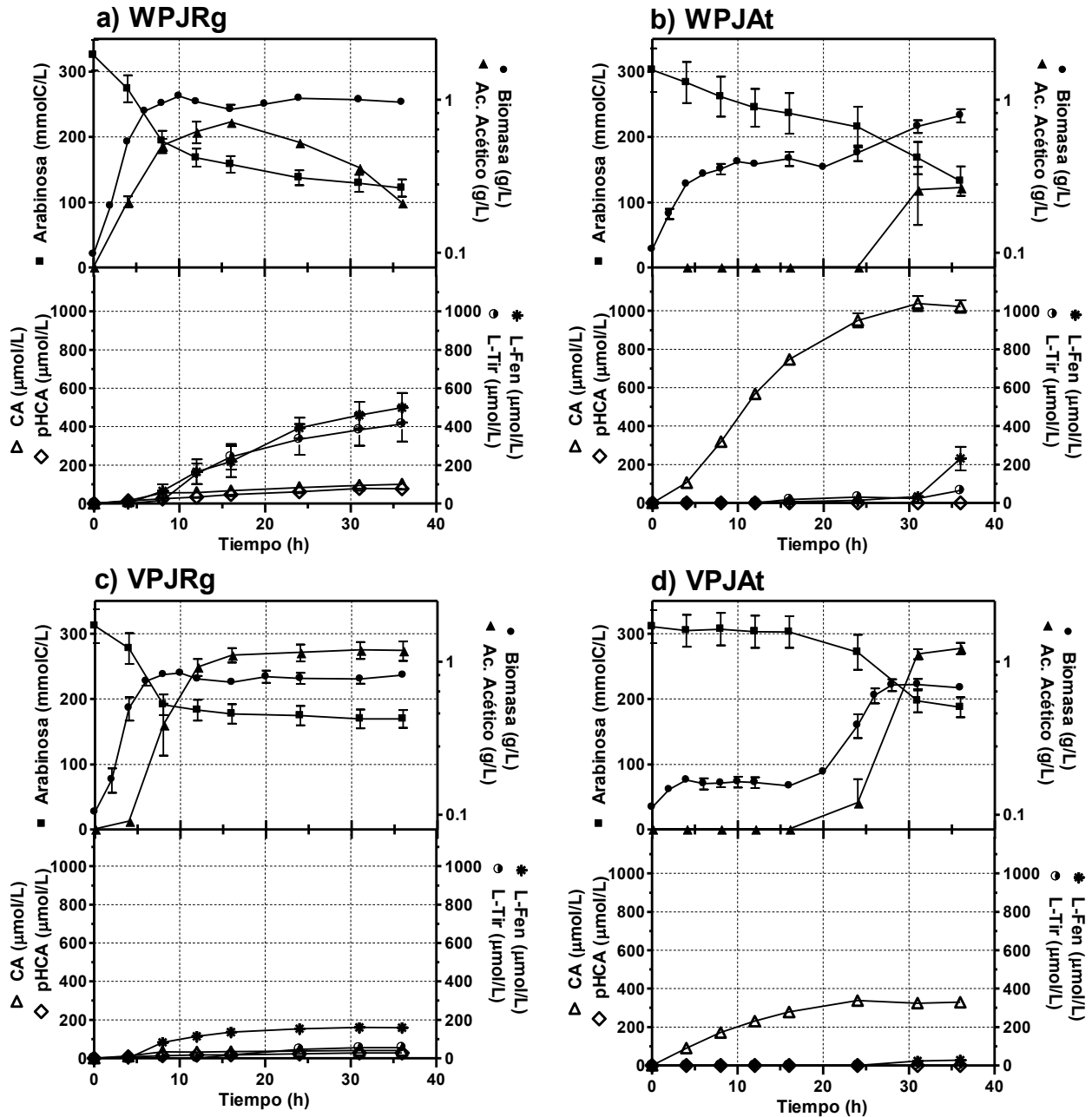
10 Anexo I. Figuras



AF1. Cinéticas de crecimiento y producción de las cepas WPJRg, VPJRg, WPJRg Y VPJAt, evaluadas en glucosa (10 g/L). Condiciones de cultivo: 300 rpm, 37 °C.



AF2. Cinéticas de crecimiento y producción de las cepas WPJRG, VPJRG, WPJRG Y VPJAt, evaluadas en xilosa (10 g/L). Condiciones de cultivo: 300 rpm, 37 °C.



AF3. Cinéticas de crecimiento y producción de las cepas WPJRG, VPJRG, WPJRG Y VPJAT, evaluadas en arabinosa (10 g/L). Condiciones de cultivo: 300 rpm, 37 °C.

Artículos Publicados

RESEARCH

Open Access

Production of cinnamic and *p*-hydroxycinnamic acid from sugar mixtures with engineered *Escherichia coli*

Alejandra Vargas-Tah¹, Luz María Martínez¹, Georgina Hernández-Chávez¹, Mario Rocha², Alfredo Martínez¹, Francisco Bolívar¹ and Guillermo Gosset^{1*}

Abstract

Background: The aromatic compounds cinnamic acid (CA) and *p*-hydroxycinnamic acid (pHCA) are used as flavoring agents as well as precursors of chemicals. These compounds are present in plants at low concentrations, therefore, complex purification processes are usually required to extract the product. An alternative production method for these aromatic acids is based on the use of microbial strains modified by metabolic engineering. These biotechnological processes are usually based on the use of simple sugars like glucose as a raw material. However, sustainable production processes should preferably be based on the use of waste material such as lignocellulosic hydrolysates.

Results: In this study, *E. coli* strains with active (W3110) and inactive phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system (PTS) (VH33) were engineered for CA and pHCA production by transforming them with plasmids expressing genes encoding phenylalanine/tyrosine ammonia lyase (PAL/TAL) enzymes from *Rhodotorula glutinis* or *Arabidopsis thaliana* as well as genes *aroG^{fb}* and *tktA*, encoding a feedback inhibition resistant version of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase and transketolase, respectively. The generated strains were evaluated in cultures with glucose, xylose or arabinose, as well as a simulated lignocellulosic hydrolysate containing a mixture of these three sugars plus acetate. Production of CA was detected in strains expressing PAL/TAL from *A. thaliana*, whereas both CA and pHCA accumulated in strains expressing the enzyme from *R. glutinis*. These experiments identified arabinose and W3110 expressing PAL/TAL from *A. thaliana*, *aroG^{fb}* and *tktA* as the carbon source/strain combination resulting in the best CA specific productivity and titer. To improve pHCA production, a mutant with inactive *pheA* gene was generated, causing an 8-fold increase in the yield of this aromatic acid from the sugars in a simulated hydrolysate.

Conclusions: In this study the quantitative contribution of active or inactive PTS as well as expression of PAL/TAL from *R. glutinis* or *A. thaliana* were determined for production performance of CA and pHCA when growing on carbon sources derived from lignocellulosic hydrolysates. These data will be a useful resource in efforts towards the development of sustainable technologies for the production of aromatic acids.

Keywords: *Escherichia coli*, Aromatics, *P*-hydroxycinnamic acid, Cinnamic acid, Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system, Sugar mixtures, Metabolic engineering

* Correspondence: gosset@ibt.unam.mx

¹Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62210, México

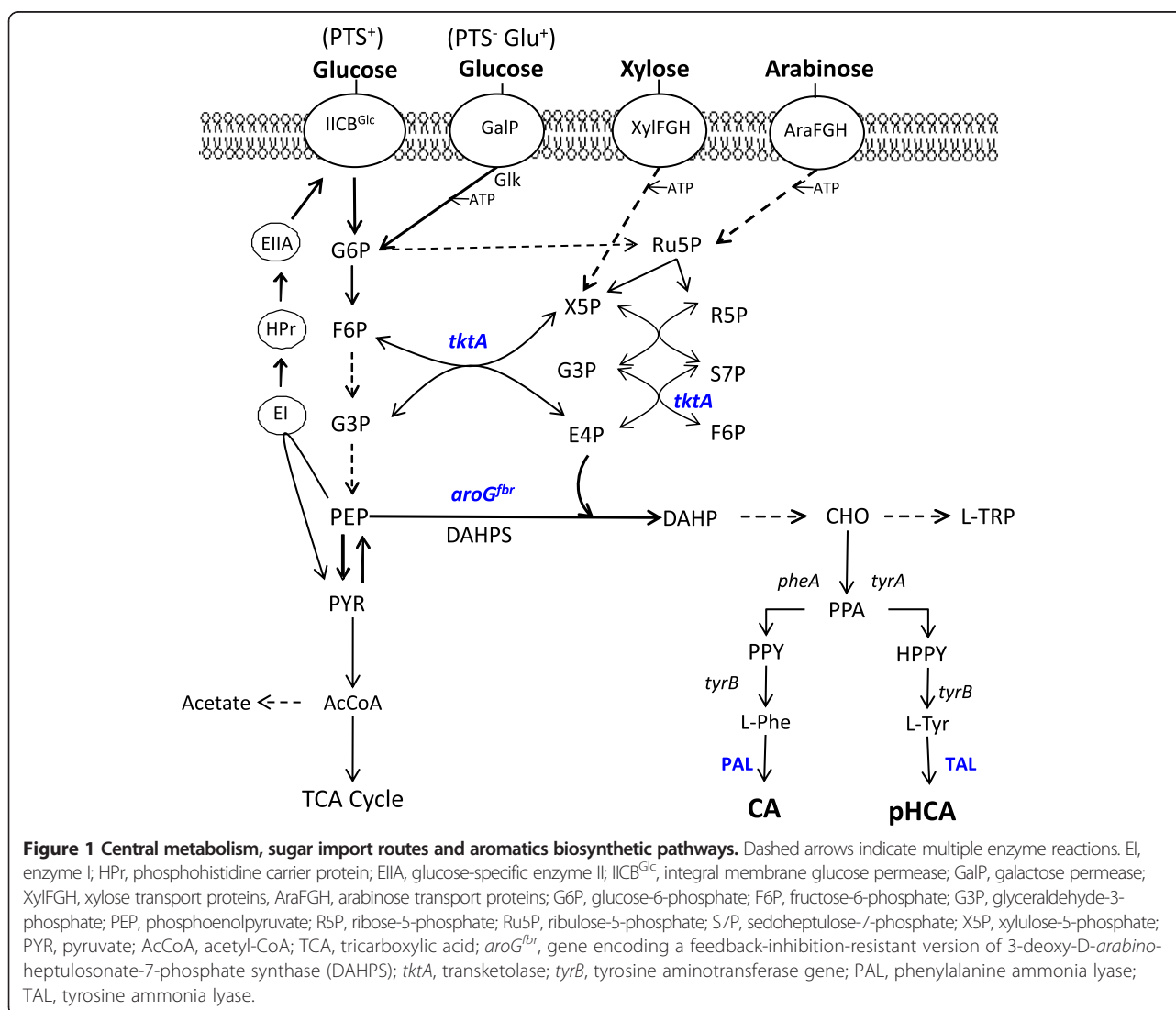
Full list of author information is available at the end of the article

Introduction

The phenylpropanoid pathway is a natural source for a diverse group of secondary metabolites having applications as nutraceutical and pharmaceutical agents as well as chemical precursors [1]. Two examples of valuable phenylpropanoids are cinnamic acid (CA) and *p*-hydroxycinnamic acid (pHCA). Applications of CA include its use as flavoring agent and as an anti-bacterial compound, whereas pHCA is a precursor for chemicals employed in the generation of thermoplastics, health, cosmetic and flavoring products [2,3]. Both aromatic acids can be obtained from plant extracts, however, these compounds are found at low concentrations in plant tissues, resulting in low yields and/or low purity of the final products. To circumvent this limitation, alternative production methods are being evaluated. The biotechnological production of phenylpropanoids is now possible as a result of the application of metabolic engineering to suitable microbial hosts

[4-6]. This development has enabled the possibility of large-scale industrial production of CA, pHCA and derived compounds from simple carbon sources [3].

The general strategy followed for the generation of microbial strains with the capacity to synthesize CA or pHCA from a simple carbon source involves performing genetic modifications that result in increased carbon flow to the L-Phe or L-Tyr biosynthetic pathways, respectively. In most bacteria and plants, the common aromatic pathway starts with the condensation of phosphoenolpyruvate (PEP) and erythrose-4-phosphate (E4P) to yield 3-deoxy-D-arabinoheptulose-7-phosphate (DAHP) (Figure 1). After seven enzymatic reactions, chorismate (CHO), a common precursor for L-Phe, L-Tyr and L-tryptophan biosynthesis, is synthesized. A frequent strategy employed to increase carbon flow from central metabolism to the common aromatic pathway involves the expression of a feedback-inhibition-resistant (*fbr*) mutant version of enzyme DAHP



synthase (DAHPS) [7]. This modification causes an increased rate of CHO synthesis. Increasing carbon flow from CHO to L-Phe biosynthesis involves the expression of a feedback-inhibition-resistant version of enzyme CHO mutase-prephenate dehydratase (CM-PDT), whereas a similar approach is followed for increasing L-Tyr synthesis by expressing a feedback-inhibition-resistant version of CHO mutase-prephenate dehydrogenase (CM-PDH) (Figure 1) [8-10]. Further improvement of L-Phe and L-Tyr production strains can be achieved by increasing availability of precursors PEP and erythrose-4-phosphate (E4P). The overexpression of genes *ppsA* encoding PEP synthetase (Pps) and *tktA* encoding transketolase, and enzyme involved in E4P synthesis, has resulted in increased L-Tyr synthesis capacity [11]. An alternate strategy to increase PEP availability for aromatics synthesis involves the generation of *E. coli* strains lacking the PEP:sugar phosphotransferase system (PTS) activity, and further modified to display a high growth rate on glucose (PTS⁻ glucose⁺ phenotype). Growth of this type of mutant strains on glucose is dependent on transport by galactose permease (GalP) and ATP-dependent phosphorylation by glucokinase [12]. Since PEP is not consumed during glucose import, these PTS⁻ glucose⁺ strains display a higher aromatics yield from glucose when compared to a wild type PTS⁺ strain [13].

The biological synthesis of CA and pHCA proceeds by deamination of L-phenylalanine (L-Phe) and L-tyrosine (L-Tyr), respectively. These reactions are catalyzed by enzymes having phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and tyrosine ammonia-lyase (TAL) activities [14-16]. It should be noted that enzymes having TAL activity also display activity with L-Phe as substrate, at present, no enzyme having only TAL activity has been reported [5]. The affinity for L-Phe or L-Tyr varies among different TAL enzymes [15,16]. For the above reasons, these proteins are usually designated as PAL/TAL enzymes to indicate specificity towards both substrates. In this study, the enzyme PAL/TAL from *R. glutinis* was used for pHCA production since this enzyme shows more affinity towards L-Tyr than L-Phe [16,17]. In addition, the PAL2 isoform from *A. thaliana* was also selected as model enzyme for production of CA. Four PAL isoforms have been described for *A. thaliana*, the PAL1 isoform has been used to synthesize CA as intermediate in naringenin production [17,18]. In our study, PAL2 was selected because the K_m (64 μ M) for L-Phe is lower when compared to the other three isoforms [19].

Several microbial species have been engineered for the production of CA and pHCA from simple carbon sources. *E. coli* strains modified for L-Phe or L-Tyr overproduction have been further engineered for the production of CA or pHCA by the heterologous expression of enzymes having PAL/TAL activities. A screening for

enzymes having PAL/TAL activity identified an enzyme from the yeast *R. glutinis* as having a high level of TAL activity. The gene coding for this enzyme was cloned and expressed in *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae* strains with other metabolic modifications, resulting in the synthesis of pHCA from glucose [5]. Expression of the *PAL* gene from the yeast *R. glutinis* in an *E. coli* strain that overproduces L-Phe resulted in the production of both CA (~380 μ M) and pHCA (~150 μ M) from glucose [5]. An *E. coli* strain for pHCA production was generated by expression of *fbr* versions of DAHP synthase, CM-PDH as well as a codon-optimized version of the *tal* gene coding for a TAL from the actinomycete *Saccharothrix espanaensis*. The engineered *E. coli* strain produced 974 mg/L pHCA from glucose in 36 h [20]. The solvent-tolerant bacterium *Pseudomonas putida* S12 has been engineered by expression of the *pal* gene from the yeast *Rhodospiridium toruloides* and other metabolic engineering modifications to produce CA and pHCA from glucose with titers of 5 and 10.6 mM, respectively [6,21].

Previous examples illustrate the feasibility of producing CA and pHCA from a simple carbon source such as glucose. This is an important step towards replacing current chemical synthesis for the production of these aromatic acids. However, improvement of biotechnological production processes is still feasible. The utilization as raw material of carbon sources directly derived from biomass, such as sugar polymers or sugar mixtures constitute a step forward towards production process sustainability. Production of CA from biomass-derived carbon sources such as starch or cellulose has been reported with *Streptomyces lividans*. The expression of a gene coding for an enzyme with PAL activity from *Streptomyces maritimus* in *S. lividans* resulted in a strain with the capacity to synthesize CA from starch and xylan at titers of 460 and 130 mg/L, respectively [16]. Likewise, a recombinant strain of *S. lividans* produced CA at a titer of 490 mg/L from cellooligosaccharide in complex medium [22].

In this report, a combinatorial study was performed with the purpose of exploring the capacity of various *E. coli* phenotypes for producing CA and pHCA with different carbon sources, including sugar mixtures similar to lignocellulosic hydrolysates. This study explores novel phenotype/carbon source combinations not previously reported. Isogenic strains employed in this study included W3110 having an active PTS and derived strain VH33 that lacks PTS activity and overexpresses *galP*, thus displaying a PTS⁻ glucose⁺ phenotype [23]. These strains were engineered by the introduction of plasmids bearing genes encoding two different PAL/TAL enzymes as well as *aroG^{fbr}* and *tktA* genes encoding a feedback inhibition resistant version of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase and transketolase, respectively. Characterization

of the resulting strains in minimal medium supplemented with single or multiple carbon sources enabled the identification of the phenotype/culture medium combination leading to best CA and pHCA production parameters.

Materials and methods

Strains and plasmids

The strains used in this work are described in Table 1. Strain W3110 is a derivative of *E. coli* K-12 [24]. A derivative of W3110 with inactive gene *pheA* was constructed by P1 transduction employing as a donor a mutant from the Keio collection [25]. Mutant selection was performed in Luria broth (LB) with Km 10 µg/mL and by PCR employing primers pheAFwdC GACGCCA CAATCAATACACC and pheARevC CGTCGAGCAC GATCAGAATA. Plasmid pJLBaroG^{fbr}tktA carries the *aroG^{fbr}* and *tktA* genes encoding a feedback inhibition resistant version of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase and transketolase, respectively [26].

Cloning of gene PALRg encoding PAL/TAL from *R. glutinis*

Total RNA was extracted from a culture of *R. glutinis* (ATCC 10788) in complex medium supplemented with 1% L-phenylalanine (L-Phe). RNA was extracted following the TES hot phenol method. Residual DNA was eliminated by treatment with DNase (DNA-free kit, Ambion). Synthesis of single strand cDNA was performed employing reverse transcriptase M-MuLV with 5 µg of total RNA and primer PALKpnRv (5' AGAGGG TACCCCAAGAAGCGAGTCCTAAGAG) 3' (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit Cat. No. K1632, Fermentas Life Sciences). Double strand cDNA was synthesized from 10 ng of single stranded cDNA

employing primers PALEcoFw (5' ATAGTAGAATTCCA CAGGAAACAGACCATGGCACCCCTCGCTCGACTC GA) and PALKpnRv with Long PCR EnzymeMix (ThermoScientific Cat. No.K0182). The PCR product was ligated to plasmid pCR^{2.1}-TOPO[®] (Invitrogen TOPO-TA Cloning) and ligation mixture electroporated to electrocompetent *E. coli* DH5 α ™-t1^R. The DNA sequence of gen PALRg was verified and then it was subcloned into the expression vector pTrc99A employing sites *EcoRI* and *KpnI* to generate plasmid pTrcPALRg [27].

Cloning of gene PALAt encoding PAL from *A. thaliana*

Total RNA was isolated from *A. thaliana* aerial tissue following a modification of a method reported by Logemann et al. [28]. Residual DNA was eliminated by treatment with DNase (DNA-free kit, Ambion). First-strand synthesis was performed employing 2 µg of total RNA with reverse transcriptase from SuperScript III (Invitrogen). For second-strand synthesis of gene PALAt, the high fidelity polymerase from Expand High Fidelity (Roche) and primers pal2-5b (5' AAC CCA TGG ATC AAA TCG AAG CAA TG 3') and Atpal 2-3 (5' GTT CTA GAG GAA TGC TCT CTT AGC A 3') were employed. The PCR product was ligated to plasmid pCR^{2.1}-TOPO[®] (Invitrogen TOPO-TA Cloning) and ligation mixture electroporated to electrocompetent *E. coli* DH5 α ™-t1^R. The DNA sequence of gen PALAt was verified and then it was subcloned into expression vector pTrc99A employing sites *NcoI* and *XbaI* to generate plasmid pTrcPALAt.

Culture media

Liquid and solid media used during mutant strain construction and inoculum preparation was Luria-Bertani

Table 1 *E. coli* strains and plasmids used in this study

Strain	Characteristics	Reference
W3110	<i>Escherichia coli</i> F ⁻ , λ ⁻ , INV(rrnD ⁻ rrnE)1	ATCC 27325
WPJ	W3110 transformed with plasmid pJLBaroG ^{fbr} tktA	This work
WPJRg	W3110 transformed with plasmid pJLBaroG ^{fbr} tktA and pTrcPALRg	This work
WPJAt	W3110 transformed with plasmid pJLBaroG ^{fbr} tktA and pTrcPALAt	This work
W(pheA ⁻)Rg	W3110 (<i>pheA::Km</i>) transformed with plasmid pJLBaroG ^{fbr} tktA and pTrcPALRg	This work
W(pheA ⁻)At	W3110 (<i>pheA::Km</i>) transformed with plasmid pJLBaroG ^{fbr} tktA and pTrcPALAt	This work
VH33	Derivative of W3110 (Δ <i>ptsH</i> , <i>ptsI</i> , <i>crr::Km</i> , Δ <i>lacI</i> , <i>lacZ::loxP</i> , <i>PgalP::Ptrc</i>)	[23]
VPJ	VH33 transformed with plasmid pJLBaroG ^{fbr} tktA	This work
VPJRg	VH33 transformed with plasmid pJLBaroG ^{fbr} tktA and pTrcPALRg	This work
VPJAt	VH33 transformed with plasmid pJLBaroG ^{fbr} tktA and pTrcPALAt	This work
Plasmids		
pJLBaroG ^{fbr} tktA	<i>aroG^{fbr}</i> under control of the <i>lacUV5</i> promoter; and <i>tktA</i> under its native promoter, carries <i>lacIq</i> and <i>tet</i> genes	[26]
pTrc99A	Cloning vector, carries <i>bla</i> and <i>lacIq</i> genes and <i>trc</i> promoter	[27]
pTrcPALRg	PAL gene from <i>R. glutinis</i> gene cloned in pTrc99A	This work
pTrcPALAt	PAL gene from <i>A. thaliana</i> cloned in pTrc99A	This work

(LB) with antibiotic Km 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tetracycline (Tc) 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and carbenicilin (Cb) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ when required for mutant strain or plasmid selection. Media employed for strains characterization was M9: Na_2HPO_4 42.26 mM; KH_2PO_4 22.04 mM; NaCl 8.55 mM; NH_4Cl 18.69 mM; MgSO_4 2 mM; CaCl_2 , 0.1 mM; thiamine 29.68 μM , and glucose (55.5 mM), xylose (66.6 mM) or arabinose (66.6 mM). Medium employed to simulate agave lignocellulosic hydrolysate was based on M9 with additional NaCH_3COO 6.09 mM, and supplemented with 10 g/L of total sugars mixture: glucose (66.6 mM); xylose (58.28 mM); arabinose (5.33 mM) [29]. Medium for cultures with the *pheA*⁻ mutant derivative contained 3.02 μM of L-Phe and Km 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Experiments for determining the toxic effect of various concentrations of CA and pHCA were performed in shake flask cultures in M9 medium supplemented with glucose 55.5 mM.

Culture conditions

Experiments for determining aromatics acids production were started with an aliquot of an overnight culture in LB medium, inoculating 125 mL shake flasks with 25 mL of M9 medium at a starting OD_{600} of 0.1. The culture was incubated in a horizontal shaking incubator at 37°C, 300 rpm for 10 h. Cells were harvested and used to seed at a starting OD_{600} of 0.1, 250 mL baffled shake flasks containing 50 mL of M9 mineral medium supplemented with 10 g/L of a carbon source. Shake flasks were incubated at 37°C with 300 rpm shaking. All experiments were performed at least in triplicate.

Analytical methods

Cell concentration was measured as optical density at 600 nm ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) with Spectrophotometer Beckman DU-70. Metabolite concentrations were determined with an HPLC system (600E quaternary bomb, 717 automatic injector, 2410 refraction index, Waters, Milford, MA). For determination of glucose (Glu), xylose (Xyl), arabinose (Ara) and acetic acid, an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad, Hercules, CA) was used. Running conditions were: mobile phase, 5 mM H_2SO_4 ; flow, 0.5 ml/min at 50°C. Under these conditions sugars and acetic acid were detected by refraction index. For analysis of L-Phe, L-Tyr, CA and pHCA, HPLC was performed using an Agilent 1100 System (Agilent technologies, Palo Alto, CA) with photodiode array detection. The column used was a Phenomenex Synergi Hydro RP C18, 150 \times 4.6 mm, 4 μm (Phenomenex, CA, USA). Running conditions were: mobile phase B, 0.1% TFA in methanol; mobile phase A, 0.1% TFA in water. Flow was set to 1 mL/min and column temperature of 45°C. Mobile phase gradient started with 5% solvent B increasing at 80% in 8 min; this ratio was maintained for 2 min and returned to 5% solvent B in 2 min. From 10 to 12 min reduce solvent B

at 5%. Samples were centrifuged and supernatants were filtered with nylon syringe filters

Kinetic and stoichiometric parameters calculations

Dry cell weight (DCW) concentration was determined considering that 1 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ is equivalent to 0.37 $\text{g}_{\text{DCW}}/\text{L}$ [30]. The specific growth rate (μ) was calculated by an exponential regression of DCW vs time. The biomass yield from substrate ($Y_{X/S}$) was determined by linear regression of DCW vs substrate consumption at the point of maximum DCW. The specific substrate uptake rate (q_S) was calculated by equation $q_S = \mu/Y_{X/S}$. The product yield from substrate ($Y_{P/S}$) was determined at the point of maximum product concentration. Kinetic characterization of the production strains showed distinct μ and aromatic acids production rates; this is caused by differences between PTS^+ and PTS^- glucose⁺ phenotypes, expression of two different PAL/TAL enzymes and growth on three different carbon sources. Therefore, the specific production rate (q_P) was calculated using the Luedeking-Piret equation [31], which considers production during both exponential and stationary phases. Kinetic and stoichiometric parameters shown in Additional file 2 were calculated at 36 h.

Results

The aims of this work were to study the effects on CA and pHCA production of expressing in *E. coli* the genes encoding enzymes having PAL/TAL activities from *A. thaliana* and *R. glutinis*, as well as an assessment on the effects on strain production performance of the PTS^+ (W3110) and PTS^- glucose⁺ (VH33) phenotypes when utilizing various carbon sources, including mixtures in a simulated lignocellulosic hydrolysate (SH). To generate *E. coli* strains with the capacity to synthesize CA and pHCA from a simple carbon source, the first step was to increase carbon flow from central metabolism to the common aromatic pathway, thus enhancing the capacity for the synthesis of L-Phe and L-Tyr, the direct precursors of CA and pHCA. This modification was implemented by transforming *E. coli* W3110 and VH33 with plasmid pJLBaroG^{fbr} *tktA*, resulting in strains WPJ and VPJ, respectively. These strains were grown in shake flask cultures with minimal medium supplemented with 55.5 mM glucose, 66.6 mM xylose or 66.6 mM arabinose. As expected, accumulation of L-Phe and L-Tyr was detected in the medium (Additional file 1: Figure S1). The final extracellular concentration of these amino acids differed among cultures with the various carbon sources employed, with the highest level detected in culture medium supplemented with arabinose. It should be noted that no L-Phe or L-Tyr were detected in the supernatant of cultures with strains W3110 or VH33.

The conversion of L-Phe and L-Tyr to CA and pHCA is dependent on PAL and TAL activities, respectively. *E.*

coli lacks these enzymes, therefore, genes PALRg and PALAt encoding enzymes with PAL/TAL activities from *R. glutinis* and *A. thaliana*, respectively, were cloned in an expression vector to generate plasmids pTrcPALRg and pTrcPALAt. To generate CA and pHCA production strains, *E. coli* WPJ and VPJ were transformed with pTrcPALRg or pTrcPALAt, resulting in strains WPJRg, WPJAt, VPJRg and VPJAt.

Production of CA and pHCA in cultures with minimal medium supplemented with glucose, xylose or arabinose as carbon source

Shake flask cultures with strains WPJRg, WPJAt, VPJRg and VPJAt were performed in minimal salts medium supplemented with glucose, xylose or arabinose. For cultures with glucose as the carbon source, it can be observed that pHCA was produced only by strains WPJRg and VPJRg that express *R. glutinis* PAL/TAL. Strain VPJRg produced 107 μM pHCA with an $Y_{\text{pHCA}/\text{Glc}}$ of 1.03 $\mu\text{mol}_{\text{pHCA}}/\text{mmolC}$; these values are 20 fold higher when compared to results from strain WPJRg (Additional file 2: Table S1, Additional file 1: Figure S2). The compound CA was produced by the four characterized strains, however, the higher titers were observed in cultures with strains WPJAt and VPJAt ($\sim 530 \mu\text{M}$). Although both strains displayed similar titer values, the yield from glucose ($Y_{\text{CA}/\text{Glu}}$) and the specific rate of production observed for strain VPJAt were 3.6 and 1.5 fold higher when compared to strain WPJAt.

Strain performance for production of CA and pHCA was also evaluated with xylose and arabinose as carbon sources. These sugars are internalized by non-PTS transport proteins and are metabolized via the pentose phosphate pathway (Figure 1, Additional file 2: Tables S1, S2 and S3). When grown with xylose, strains WPJRg and VPJRg produced pHCA titers of 25 and 15 μM , respectively (Additional file 1: Figure S3). The pHCA titer produced by strain WPJRg from xylose was 5 fold higher when compared to cultures with glucose. In contrast, a 6.9 fold reduction in pHCA titer was observed for strain VPJRg when comparing cultures with xylose to cultures with glucose. Production of CA was improved in strains derived from W3110 when comparing xylose to glucose as a carbon source, with strain WPJAt displaying the highest observed titer (736.8 $\mu\text{mol/L}$), corresponding to a 1.4 fold improvement over glucose.

In cultures with arabinose as sole carbon source, strain WPJRg displayed a pHCA titer of 76.7 μM with an $Y_{\text{pHCA}/\text{Ara}}$ of 0.437 $\mu\text{mol}_{\text{pHCA}}/\text{mmolC}$. These values are 8.8 and 15.4 fold higher when compared to cultures with glucose. In these cultures, CA was produced by all strains, however, as it was observed in cultures with other sugars, the higher titers were produced by strains expressing PAL

from *A. thaliana*. Strain WPJAt displayed an $Y_{\text{CA}/\text{Ara}}$ 1.6 fold higher when compared to results with glucose and a $q_{\text{CA}-\text{Ara}}$ of 368.9 $\mu\text{molCA}/\text{g}_{\text{DCW}}\text{hr}$. The CA titer produced by WPJAt was 1022 μM , the highest observed in this study (Additional file 2: Table S3, Additional file 1: Figure S4).

Production of CA and pHCA in cultures with minimal medium supplemented with a SH

Lignocellulose hydrolysates are a source of fermentable sugars containing mainly pentoses, hexoses and acetate. To determine CA and pHCA production capacity on medium containing a mixture of carbon sources similar to that obtained from a hydrolysate, cultures were performed in minimal medium supplemented with sugars and acetate in a similar proportion as that found after thermochemical hydrolysis of agave bagasse [29]. The SH contained xylose (53.28 mM), glucose (6.66 mM), arabinose (5.33) and acetic acid (6.09 mM). Results from cultures of the four strains with SH showed similarity to cultures with xylose as a sole carbon source. This is expected considering that xylose is the main component in the SH sugar mixture. However, some differences were detected when comparing data from cultures in the SH to those from cultures with xylose. Strains WPJRg and VPJRg, displayed a 26 and 42% increase in $Y_{\text{pHCA}/\text{SH}}$, respectively, when compared to results of cultures with xylose. In addition, a 12 and 44% increase in $q_{\text{pHCA}-\text{SH}}$ was detected when performing the same comparison. Cultures with strain VPJAt displayed a similar CA titer and a 30% increase in $q_{\text{CA}-\text{SH}}$ when compared to cultures with xylose (Additional file 2: Table S4).

In these cultures, differences in the pattern of carbon source utilization are evident (Additional file 1: Figure S5). It can be observed in the culture with strain WPJRg that glucose exerts total and partial repression in the consumption of xylose and arabinose, respectively. In contrast, in the culture with VPJRg, the simultaneous utilization of the three sugars is evident. It should be noted that acetate in the SH was not consumed by any of the four strains, on the contrary, this organic acid was produced and its concentration increased in the culture medium.

Effects on CA and pHCA synthesis of inactivating gene *pheA* from the L-Phe biosynthetic pathway

The above results showed, as it has been previously reported, that PAL/TAL from *R. glutinis* can employ L-Phe or L-Tyr as substrates and thus produce both CA and pHCA [5]. In the strains that expressed PAL/TAL from *R. glutinis*, the amount of produced pHCA was always lower than CA. To improve the pHCA/CA ratio, a strategy was followed to reduce availability of substrate L-Phe by inactivating gene *pheA*, encoding enzyme CM-

PDT (Figure 1). This approach was tested on strain W3110 since it displayed the best pHCA production parameters with SH. Gene *pheA* was inactivated in W3110 and resulting mutant was transformed with plasmids PJLBaroG^{fb}r*tk*tA and pTrcPALRg or pTrcPALAt to generate strains W(pheA⁻)Rg and W(pheA⁻)At (Table 1). These strains were characterized in shake flask cultures with a SH as carbon source (Additional file 2: Table S4, Additional file 1: Figure S6). Strain W(pheA⁻)Rg displayed an 8-fold increase in $Y_{\text{pHCA/SH}}$ as well as a 2.9 fold increase in $q_{\text{pHCA-SH}}$ when compared to values from strain WPJRg when growing in SH. At 12 h of culture time, a titer of approximately 322 μM pHCA was produced by W(pheA⁻)Rg, this represents a near 10-fold increase over the amount of pHCA produced by WPJRg (39 μM). It is noteworthy that the CA titer was not lower for W(pheA⁻)Rg when compared to cultures with strain WPJRg, however, the pHCA/CA ratio increased from 0.93 for WPJRg to 5.1 for strain W(pheA⁻)Rg. When compared to results from W(pheA⁻)At cultures, the $Y_{\text{CA/SH}}$ and q_{CA} of WPJAt were 22.8 and 49.3% lower.

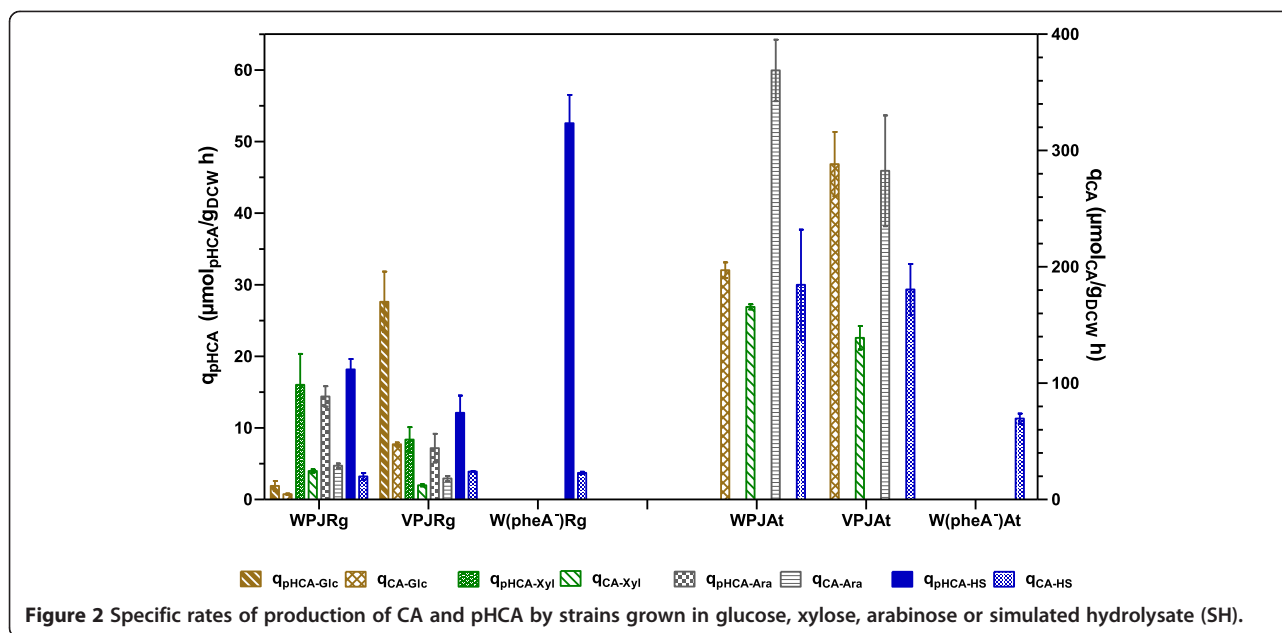
Discussion

The current trends in the development of biotechnological production processes for chemical compounds follows the use of minimal media supplemented with sustainable raw materials, such as lignocellulosic hydrolysates. This type of raw material contains a mixture of pentoses and hexoses; mainly xylose, arabinose and glucose. One of the mayor challenges in developing a biotechnological process based on the use of lignocellulosic hydrolysates is the isolation or development of production organisms capable of efficiently utilizing all the different sugars in the mixture. Most studies related to microbial CA and pHCA production are based on the use of culture media containing glucose as raw material and in some cases also tryptone, peptone or other complex nutrients [3,5,6,14-16]. However, there are some reports where xylose, raffinose, glycerol, cellobiose, avicel and cellulose are also employed as carbon sources [22,32]. The bacterium *E. coli* has the natural capacity for consuming the main sugar components in a typical lignocellulosic hydrolysate. For this reason, in this study, *E. coli* W3110 was chosen as the parent host for developing CA and pHCA production strains. An isogenic derivative of W3110 having a PTS⁻ glucose⁺ phenotype (VH33) was also employed, since it has been demonstrated that PTS inactivation can lead to improved capacity for consuming sugar mixtures [33]. The capacity for synthesizing the aromatic acids CA and pHCA was engineered in these strains by transforming them with plasmids carrying genes encoding for enzymes with PAL/TAL activities. The PAL/TAL enzyme from *R. glutinis* has

been shown to have a higher affinity for L-Tyr than L-Phe [15,18]. Whereas the PAL1 isozyme from *A. thaliana*, has been expressed in *E. coli* for the synthesis of CA as a precursor in heterologous pathways for the production of flavonoids or styrene [17,34].

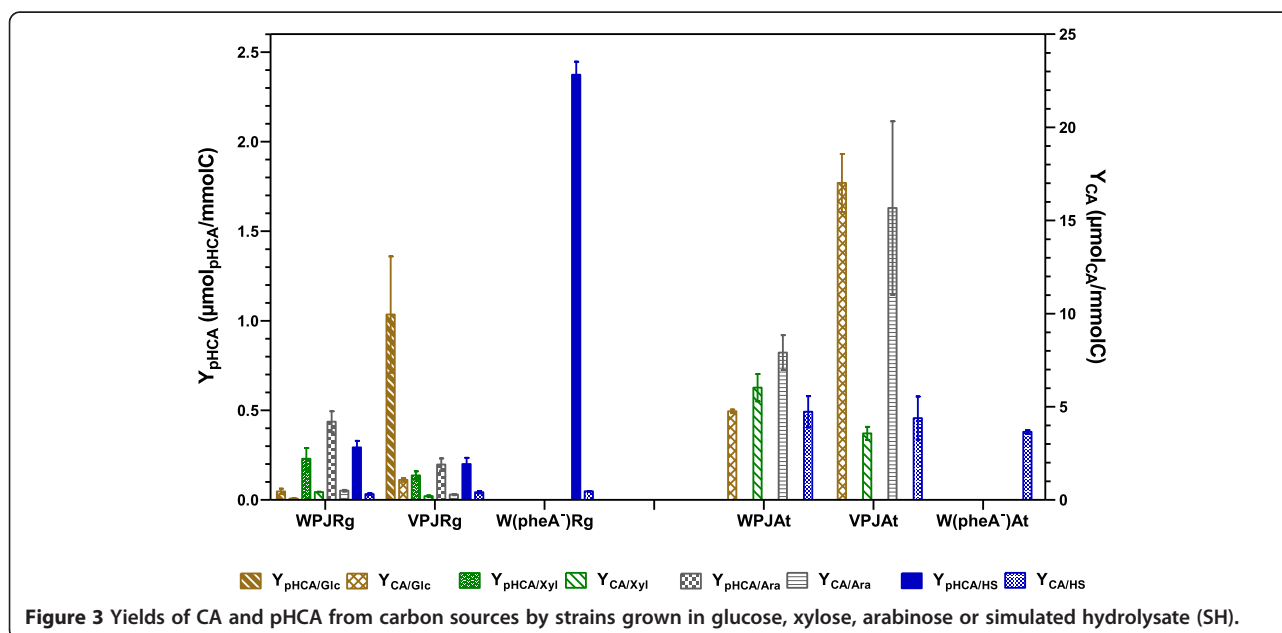
In cultures employing glucose as the carbon source, strains WPJRg and VPJRg produced both CA and pHCA, whereas strains WPJAt and VPJAt produced only CA (Figures 2 and 3). This is the result of the distinct affinities for substrates displayed by the two expressed PAL/TAL enzymes, as it will be discussed below. Under these growth conditions, a clear improvement in specific productivity and yield from glucose for CA and pHCA was observed when comparing strains with the PTS⁻ glucose⁺ and PTS⁺ phenotypes. The positive effect of PTS inactivation results from avoiding phosphoenolpyruvate consumption during glucose import. In strain VH33, PTS activity is replaced by glucose transport dependent on the GalP glucose/galactose symporter and ATP-dependent phosphorylation by glucokinase. The improved performance on aromatics production when employing glucose as carbon source has been reported for other PTS⁻ glucose⁺ strains and the particular level of improvement is dependent on specific product and culture conditions [13,26].

In cultures employing xylose or arabinose as carbon sources, strain WPJRg displayed higher specific productivity and $Y_{\text{pHCA/substrate}}$ values when compared to VPJRg. When strain WPJRg was cultured with arabinose, it displayed a 3 fold higher pHCA titer and 2 fold higher $Y_{\text{pHCA/Ara}}$ when compared to results with xylose as carbon source. However, when growing with xylose, strain WPJAt displayed $Y_{\text{CA/Xyl}}$ and a CA titer about 2-fold higher than that observed for VPJAt (Figures 2 and 3). When growing on arabinose, strain WPJAt produced the highest observed CA titer of all studied strains and growth conditions (1022 μM). This is in part explained by the higher biomass concentration of WPJAt when compared to VPJAt. This is the result of a q_{Ara} which is 30% higher when compared to VPJAt. These data show a clear aromatics acids production performance advantage with xylose or arabinose of a strain with a functional PTS when compared to a mutant having a PTS⁻ glucose⁺ phenotype. The internalization of xylose or arabinose is not dependent on PTS activity, therefore, no difference in production capacity was expected when comparing strains with the PTS⁺ or the PTS⁻ glucose⁺ phenotypes. A possible explanation for these results can be provided considering that inactivation of PTS causes an impairment on the capacity to synthesize cAMP, a molecule that is required together with the global regulator CRP, for inducing expression of the operons encoding transporters and enzymes involved in xylose and arabinose catabolism [35,36].



Cultures performed with single carbon sources enabled an overview and a comparison of production performance for CA and pHCA among isogenic strains with PTS⁺ or PTS⁻glucose⁺ phenotypes. However, the biotechnological sustainable production of these and other chemicals would preferably be dependent on the use of lignocellulosic hydrolysates as raw material. To determine the production parameters for CA and pHCA with a culture medium containing sugars frequently found lignocellulosic hydrolysate, a culture medium was formulated containing a mixture of xylose, arabinose, glucose and acetate. Results from experiments under these conditions showed

a similar production performance for CA and pHCA among the PTS⁺ or the PTS⁻ glucose⁺ phenotypes. When considering the pattern of sugar consumption, catabolic repression by glucose was observed in cultures with WPJAt. In contrast, simultaneous consumption of carbon sources was evident in strain VPJAt (PTS⁻ glucose⁺). This response has been previously reported for other PTS⁻ glucose⁺ strains growing with two or three different sugars [33]. However, even though strains WPJAt and WPJRg displayed sequential consumption of sugars in the SH, they showed slightly better production parameters when compared to PTS⁻ glucose⁺ strains (Figures 2 and 3). This



can be explained by the relatively high proportion of xylose in the SH sugar mixture. When considering results of experiments with single sugars, it is clear that PTS⁻ glucose⁺ strains could be advantageous when employing hydrolysates from lignocellulosic sources that yield a higher proportion of glucose when compared to the SH employed here.

The experiments performed here with *E. coli* strains expressing PAL/TAL from *A. thaliana* and *R. glutinis* showed that only the latter deaminated L-Tyr to produce pHCA. The PAL/TAL from *R. glutinis* could also employ L-Phe as substrate, producing CA at a titer at least 2 fold higher than pHCA. It has been reported that PALRg has higher affinity towards L-Tyr, however the k_{cat}/K_m for L-Phe ($1.9 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) is higher than for L-Tyr ($0.52 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [36]; it should also be noted that strains WPJ and VPJ produced at least two fold more L-Phe than L-Tyr with most carbon sources employed here (Additional file 1: Figure S1). These data explain why strains expressing *R. glutinis* PAL/TAL produce more CA than pHCA. The enzyme from *A. thaliana* expressed in strains WPJAt and VPJAt generated the highest levels of CA under all studied conditions. Comparison of kinetic parameters among strains and different culture conditions showed lower μ and final biomass concentrations in strains expressing PAL/TAL from *A. thaliana* when compared to expression of PAL/TAL from *R. glutinis*. This could be explained considering that PAL from *A. thaliana* is consuming intracellular L-Phe as a substrate for CA production, therefore limiting this amino acid for growth requirements. In agreement with this hypothesis, the k_{cat}/K_m for L-Phe is higher for the enzyme from *A. thaliana* ($5.12 \times 10^7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [19] when compared to *R. glutinis* ($1.9 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [37].

To increase production of pHCA in a strain expressing PALRg, a strategy was followed wherein L-Phe availability would be reduced. This strategy was implemented by inactivating in strain W3110 the gene *pheA* that encodes enzyme CM-PDH from the L-Phe biosynthetic pathway. Cultures with strain W(*pheA*-)At showed that this strain still produced CA, but with a 2.6-fold lower q_{CA-HS} when compared to strain WPJAt. This result can be explained considering that conversion of prephenate to phenylpyruvate can proceed in absence of enzyme catalysis [38]. Therefore, it can be assumed that consumption of L-Phe by PAL from *A. thaliana* drives flux from chorismate to CA in the absence of CM-PDT activity. The inactivation of *pheA* caused an increase in the pHCA/CA ratio produced by strain W(*pheA*⁻)Rg (5.15) when compared to WPJRg (0.93). It was also observed that the $Y_{pHCA/HS}$ and q_{pHCA} improved as a consequence of *pheA* inactivation. Similar results have been reported for a *Pseudomonas putida* strain that was subjected to random

mutagenesis to increase L-Phe production and again randomly mutagenized to generate an L-Phe auxotroph [6]. However, the mutations causing such phenotype have not been determined.

Both CA and pHCA are toxic compounds for *E. coli* and other microorganisms [3,39]. To determine the toxic effect of these two aromatic acids under our experimental conditions, cultures were performed in M9 medium with glucose supplemented with various amounts of CA and pHCA. When compared to cultures in M9 medium, a 10 and 6% reduction in growth rate was observed in M9 with 10 mM pHCA or CA, respectively (Additional file 1: Figure S7). It should be noted that these concentrations of aromatic acids are at least three orders of magnitude higher than the titers observed in our production experiments. Therefore, it is unlikely that toxic effects of pHCA or CA could have a negative effect on production capacity. However, under growth conditions designed to maximize productivity, such as fed-batch cultures, the titers of these compounds could reach a toxic level. Under such conditions, strategies like the overexpression of efflux proteins or the use of naturally-resistant organisms such as a solvent-tolerant *P. putida* strain, should enable the development of processes for the high-titer production of CA and pHCA [3,6].

The characterization of several *E. coli* strains growing with various carbon sources enabled the identification of particular combinations yielding the best production performances. Product titer is dependent on biomass concentration and this parameter varies among the different carbon sources employed. Therefore, the yield from carbon source and the specific productivity can be considered better parameters for evaluating strains performance. For the case of pHCA, strain W(*pheA*⁻)Rg displayed the best q_{pHCA} ($52.57 \mu\text{mol}/\text{h}^*\text{g}_{CDW}$) and $Y_{pHCA/HS}$ values when growing on SH. Whereas for CA, strain WPJAt displayed the highest q_{CA} ($368.9 \mu\text{mol}/\text{h}^*\text{g}_{CDW}$) and Y_{CA} values with arabinose (Figures 2 and 3). However, when considering carbon source cost and availability, other strain/carbon source combinations could be attractive from a biotechnological standpoint. Considering the diversity regarding strain phenotypes, culture media and growth conditions, it is not feasible to perform a direct comparison on the performance of the strains studied here with other published works. Nevertheless, some reported data will be discussed to provide a framework for our results. Table 2 provides a list of production parameters and culture conditions from publications related to microbial CA and pHCA production, the utilized microorganisms include *E. coli*, *S. cerevisiae*, *P. putida* and *Streptomyces lividans*. A wide variety of genetic modification strategies were applied to generate these production strains. However, the heterologous expression of genes encoding enzymes with PAL/TAL

Table 2 Comparison of microbial CA and pHCA production parameters and culture conditions

Organism	PAL/TAL	Carbon source	Culture medium	Culture conditions	pHCA (μM)	Q_{pHCA} ($\mu\text{mol/Lh}$)	CA (μM)	Q_{CA} ($\mu\text{mol/Lh}$)	Reference
<i>E. coli</i> (W3110)	<i>R. glutinis</i>	Glucose	Mineral	30°C 24 h Baffled Flask	42.4	1.76	32.9	1.37	[5]
<i>E. coli</i> (DH10B)	<i>R. glutinis</i>	Glucose	Mineral	30°C 18 h Baffled Flask	280	15.5	280	15.5	[5]
<i>E. coli</i> (ATCC 31884)	<i>R. glutinis</i>	Glucose	Mineral	30°C 18 h Baffled Flask	150	8.33	380	21.1	[5]
<i>S. cerevisiae</i>	<i>R. glutinis</i>	Glucose	Mineral	30°C 48 h Baffled Flask	14.3	0.29	-	-	[5]
<i>E. coli</i> (BL21*A)	<i>Trichosporon cutaneum</i>		LB	30°C 16 h	432	27	843	52.68	[16]
<i>P. putida</i> S12 C1	<i>Rhodospiridium. toruloides</i>	Glucose	Mineral	30°C Shake flask	224	84 ($\mu\text{mol/h} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}$)	350	-	[6]
<i>P. putida</i> S12 C3	<i>R. toruloides</i>	Glucose	Mineral	30°C Shake flask	860	84 ($\mu\text{mol/h} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}$)	70	-	[6]
<i>P. putida</i> S12 C3	<i>R. toruloides</i>	Glucose	Mineral	30°C Fed-batch	10,600	24 ($\mu\text{mol/h} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}$)	150	-	[6]
<i>S. lividans</i>	<i>R. sphaeroides</i>	Glucose	3% TSB 5% Triptone	28°C 168 h	4755	28.5	-	-	[31]
<i>P. putida</i> S12	<i>R. toruloides</i>	Glucose	Mineral	30°C Shake flask ON	-	-	415	12	[21]
<i>P. putida</i> S12	<i>R. toruloides</i>	Glucose	Mineral	30°C Fed-batch 30 h N_2 limitation	-	-	5,000	166	[21]
<i>P. putida</i> S12	<i>R. toruloides</i>	Glycerol	Mineral	30°C Fed-batch 50 h N_2 limitation	-	-	5,400	108 ($60 \mu\text{mol/h} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}$)	[21]
<i>S. lividans</i>	<i>S. maritimus</i>	Glucose	TSB	28°C Shake flask 96 h	-	-	540	5.62	[22]
<i>S. lividans</i>	<i>S. maritimus</i>	Glucose	TSB Triptone	28°C Shake flask 120 h	-	-	1417	11.8	[22]
<i>S. lividans</i>	<i>S. maritimus</i>	Xylose	TSB Triptone	28°C Shake flask 144 h	-	-	2,024	14.05	[22]
VPJRg	<i>R. glutinis</i>	Glucose	M9	16 h	91.45	5.72	196.15	12.26	This work
VPJAt	<i>A. thaliana</i>	Glucose	M9	36 h	-	-	529.94	14.72	This work
WPJAt	<i>A. thaliana</i>	Arabinose	M9	31 h	-	-	1,022.36	28.4	This work
W(pheA ⁻)Rg	<i>R. glutinis</i>	SH	M9	16 h	355.87	22.24	105.45	6.59	This work
WPJAt	<i>A. thaliana</i>	SH	M9	31 h	-	-	377.87	12.19	This work

activities was always employed. What follows is a comparison of strain performance among those studies providing data that can be related to our study. Similar or higher CA titers to those observed for *E. coli* strain WPJAt with arabinose have been reported with *S. lividans* expressing the PAL from *Streptomyces maritimus* and employing culture medium containing tryptone and carbon sources such as xylose, glycerol or xylooligosaccharides [16]. However, these titers were reached after 6 to 8 days of culture time. In contrast, the *E. coli* strain reported here produced similar CA titers in 36 h and employing minimal salts medium. A study employing a strain derived from solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 reports a q_{pHCA} of 84 $\mu\text{mol/h} \cdot \text{g}_{CDW}$ from glucose [6]. With another strain derived from this bacterium, a q_{CA} of 60 $\mu\text{mol/h} \cdot \text{g}_{CDW}$ from glycerol in a fed-batch process was reported [21]. These data show that *P. putida* S12 is currently the microorganism displaying the best production parameters for CA and pHCA, likely as a consequence of its solvent-tolerant capacity. It remains to be determined if the *E. coli* production strains developed in this study could be improved by increasing their resistance to aromatic acids toxicity by following a strategy based on overexpressing native or heterologous efflux proteins [3].

By employing PAL/TAL enzymes from two different sources, it was possible to generate *E. coli* strains for the production of CA and pHCA from simple carbon sources in a minimal medium. A comparison of PTS^+ and PTS^- glucose⁺ strains enabled the identification of the specific phenotype showing the best production performance with various carbon sources. This combinatorial study provides useful parameters to be considered for the future design of strains for the production of this type of aromatic compounds. In the case of pHCA production, a challenge is to generate a strain that synthesizes this compound in the absence of CA. Among potential improvements to the pHCA production system, it can be considered the use of a PAL/TAL enzyme that only employs L-Tyr as substrate. So far, an enzyme with such characteristic has not been reported. It remains to be determined if a PAL/TAL enzyme that is selective for L-Tyr could be found in the natural diversity. Alternatively, protein engineering could be employed to increase substrate specificity towards L-Tyr of an existing PAL/TAL enzyme. The strains developed here can be considered as production platforms for the synthesis of compounds derived from CA and pHCA such as p-hydroxystyrene and phenylpropanoids [20,39].

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Production of L-Phe and L-Tyr by strains WPJ and VPJ grown in M9 medium supplemented with glucose, xylose, arabinose or simulated hydrolysate (SH). **Figure S2.** Growth and production profiles of

W3110 and VH33 derivatives in shake flask cultures with glucose as carbon source. **Figure S3.** Growth and production profiles of W3110 and VH33 derivatives in shake flask cultures with xylose as carbon source. **Figure S4.** Growth and production profiles of W3110 and VH33 derivatives in shake flask cultures with arabinose as carbon source. **Figure S5.** Growth and production profiles of W3110 and VH33 derivatives in shake flask cultures with a simulated hydrolysate (SH) as carbon source. **Figure S6.** Growth and production profiles of W(pheA⁻)Rg y W(pheA⁻)At in shake flask cultures with a simulated hydrolysate (SH) as carbon source. **Figure S7.** Relative growth rate of *E. coli* W3110 in M9 medium supplemented with glucose and various concentrations of CA and pHCA.

Additional file 2: Table S1. Kinetic parameters of growth strains in minimal medium with glucose 55.5 mM (10 g/L). **Table S2.** Kinetic parameters of growth strains in minimal medium with xylose 66.6 mM (10 g/L). **Table S3.** Kinetic parameters of growth strains in minimal medium with arabinose 66.6 mM (10 g/L). **Table S4.** Kinetic parameters of cultures with engineered strains grown in a minimal medium with simulated hydrolysate (SH). Glucose 6.66 mM (1.2 g/L), xylose 53.3 mM (8 g/L), arabinose 5.33 mM (0.8 g/L) and acetate 6.09 mM (0.5 g/L). Total sugars 62.29 mM (10 g/L). Kinetic and stoichiometric parameters shown in supplementary tables were calculated at 36 h.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AVT participated in recombinant strain construction and carried out the shake flask experiments. LMM carried out gene cloning experiments. GHC and AVT performed the quantification of substrate and microbial culture products. AVT, AM and FB participated in analysis of the data. GG and AVT coordinated the study and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This article is dedicated to the memory of our friend and colleague Dr. Mario Rocha-Sosa who made a significant contribution to this project before he passed away on September, 2013. This work was supported by CONACyT grant 177568 and UNAM PAPIIT grant IN202611. AVT was supported by a fellowship from CONACyT. We thank Mercedes Enzaldo for technical assistance, Paul Gaytán, Jorge Yáñez, Eugenio López and Santiago Becerra for the synthesis of oligonucleotides and DNA sequencing.

Author details

¹Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62210, México. ²Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62210, México.

Received: 8 August 2014 Accepted: 20 December 2014

Published online: 16 January 2015

References

- Chemler J, Koffas MG. Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19:597–605.
- Kaneko T, Thi TH, Shi DJ, Akashi M. Environmentally degradable, high-performance thermoplastics from phenolic phytomonomers. *Nat Mater.* 2006;5:966–70.
- Sariaslani FS. Development of a combined biological and chemical process for production of industrial aromatics from renewable resources. *Annu Rev Microbiol.* 2007;61:51–69.
- Limem I, Guedon E, Hehn A, Ghedira LC, Engasser J, Ghoul M. Production of phenylpropanoid compounds by recombinant microorganisms expressing plant-specific biosynthesis genes. *Process Biochem.* 2008;43:463–79.
- Vannelli T, Wei Qi W, Sweigard J, Gatenby A, Sariaslani FS. Production of p-hydroxycinnamic acid from glucose in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* by expression of heterologous genes from plants and fungi. *Metab Eng.* 2007;9:142–51.

Production of cinnamic and *p*-hydroxycinnamic acids in engineered microbes

Alejandra Vargas-Tah and Guillermo Gosset*

Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Alvaro R. Lara,
Universidad Autónoma
Metropolitana-Cuajimalpa, Mexico

Reviewed by:

Akihiko Kondo,
Kobe University, Japan
Judith Becker,
Saarland University, Germany

*Correspondence:

Guillermo Gosset,
Departamento de Ingeniería
Celular y Biotecnología,
Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma
de México, Apdo. Postal 510-3,
Cuernavaca, Morelos 62210, México
gosset@ibt.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to Systems
Biology, a section of the journal
Frontiers in Bioengineering and
Biotechnology

Received: 22 May 2015

Accepted: 30 July 2015

Published: 20 August 2015

Citation:

Vargas-Tah A and Gosset G (2015)
Production of cinnamic and
p-hydroxycinnamic acids in
engineered microbes.
Front. Bioeng. Biotechnol. 3:116.
doi: 10.3389/fbioe.2015.00116

The aromatic compounds cinnamic and *p*-hydroxycinnamic acids (pHCAs) are phenylpropanoids having applications as precursors for the synthesis of thermoplastics, flavoring, cosmetic, and health products. These two aromatic acids can be obtained by chemical synthesis or extraction from plant tissues. However, both manufacturing processes have shortcomings, such as the generation of toxic subproducts or a low concentration in plant material. Alternative production methods are being developed to enable the biotechnological production of cinnamic and (pHCAs) by genetically engineering various microbial hosts, including *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida*, and *Streptomyces lividans*. The natural capacity to synthesize these aromatic acids is not existent in these microbial species. Therefore, genetic modification have been performed that include the heterologous expression of genes encoding phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities, which catalyze the conversion of L-phenylalanine (L-Phe) and L-tyrosine (L-Tyr) to cinnamic acid and (pHCA), respectively. Additional host modifications include the metabolic engineering to increase carbon flow from central metabolism to the L-Phe or L-Tyr biosynthetic pathways. These strategies include the expression of feedback insensitive mutant versions of enzymes from the aromatic pathways, as well as genetic modifications to central carbon metabolism to increase biosynthetic availability of precursors phosphoenolpyruvate and erythrose-4-phosphate. These efforts have been complemented with strain optimization for the utilization of raw material, including various simple carbon sources, as well as sugar polymers and sugar mixtures derived from plant biomass. A systems biology approach to production strains characterization has been limited so far and should yield important data for future strain improvement.

Keywords: cinnamic acid, *p*-hydroxycinnamic acid, aromatics, metabolic engineering, phenylpropanoids, natural products, biotechnology

Introduction

Bacteria and plants have the natural capacity for synthesizing a large number of aromatic compounds from simple carbon sources. The shikimate or common aromatic pathway is the main central metabolic branch leading to several biosynthetic pathways that produce various aromatic metabolites (**Figure 1**). The aromatic amino acids L-phenylalanine (L-Phe), L-tyrosine (L-Tyr), and L-tryptophan (L-Trp) are primary metabolites synthesized from simple carbon sources by

plants and bacteria. Secondary metabolites, such as phenylpropanoids, are derived from L-Phe and L-Tyr and are produced mainly by plants. The phenylpropanoid acids cinnamic acid (CA) and *p*-hydroxycinnamic acid (pHCA), also known as coumaric acid, are two metabolites having nutraceutical and pharmaceutical properties (Chemler and Koffas, 2008). They also have applications as precursors of chemical compounds and materials, such as high-performance thermoplastics (Kaneko et al., 2006; Sariaslani, 2007).

Both CA and pHCA are present in plant tissues at a low concentration. Therefore, complex procedures must be employed for their extraction and the yields are usually low. For these reasons, alternative production schemes are being explored. Several microbial species currently employed in biotechnological processes, possess part of the pathways required for CA and pHCA synthesis from simple carbon sources. Thus, by applying genetic engineering techniques to various microbial species, it has been possible to develop production strains with the novel capacity for synthesizing phenylpropanoid acids (Nijkamp et al., 2007; Vannelli et al., 2007a; Limem et al., 2008).

In this review, we focus on recent studies related to the application of genetic engineering strategies for the development of strains derived from *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Streptomyces lividans*, and *Saccharomyces cerevisiae* for the production of the phenylpropanoid acids CA and pHCA. Production process development issues, such as product toxicity and carbon source utilization, are also discussed.

The Shikimate Pathway and Derived Aromatic Biosynthetic Pathways

The common aromatic pathway or shikimate pathway includes common reactions leading to the specific biosynthetic pathways for L-Phe, L-Tyr, and L-Trp. Most of the reactions of the shikimate aromatic pathway are conserved among bacteria and plants; however, they can differ in terms of specific pathway regulation. The first reaction in the shikimate pathways is the condensation of central carbon metabolism intermediates phosphoenolpyruvate (PEP) and erythrose-4-phosphate (E4P) to yield 3-deoxy-D-*arabino*-heptulosonate-7-phosphate synthase (DAHP) (Figure 1). This reaction is catalyzed by the enzyme DAHP synthase. In bacteria, this step is usually regulated at the enzyme activity level by a feedback-inhibition allosteric mechanism on DAHP synthase. After six enzyme reactions, DAHP is converted to the intermediate chorismate (CHO). This compound is the metabolic branching point where pathways specific for the synthesis of L-Phe, L-Tyr, and L-Trp originate (Maeda and Dudareva, 2012).

The biosynthetic pathway for L-Tyr biosynthesis starts with the conversion of CHO to prephenate (PPA) by the enzyme chorismate mutase (CM). The intermediate PPA is converted to 4-hydroxyphenylpyruvate (HPP) in a reaction catalyzed by prephenate dehydrogenase (PDH). Finally, HPP is transformed to L-Tyr by transamination. Biosynthesis of L-Phe also starts with the conversion of CHO to PPA followed by a reaction yielding phenylpyruvate (PPY) in a reaction catalyzed by the enzyme

prephenate dehydratase (PDT). It is common in bacteria to find bifunctional enzymes where the CM domain is fused to either the PDH or the PDT domain (Patel et al., 1977).

In most bacteria, L-Phe, L-Tyr, and L-Trp are the final products of their biosynthetic pathways. However, in plants and some bacteria, these amino acids are intermediates in pathways for the synthesis of secondary metabolites. The phenylpropanoids are a class of secondary metabolites produced by plants mainly as protection against biotic stress. These compounds also have medicinal use, such as antioxidants, UV screens, anticancer, antiviral, anti-inflammatory, anti-nitric oxide production, and antibacterial agents (Korkina et al., 2011). The first step in the phenylpropanoid pathway is the deamination of L-Phe to generate CA in a reaction catalyzed by the enzyme phenylalanine ammonia lyase (PAL). This compound is then transformed to pHCA by enzyme cinnamate 4-hydroxylase (C4H) (Achnine et al., 2004). pHCA is a precursor for a large number of metabolites including flavonoids and lignans. These compounds have important structural and protective functions in plants (Emiliani et al., 2009). Several of the characterized PAL enzymes can also employ L-Tyr as a substrate, thus displaying tyrosine ammonia lyase (TAL) activity and producing pHCA directly from L-Tyr (Cochrane et al., 2004; Cui et al., 2014). Therefore, the term PAL/TAL is usually employed in naming this type of enzymes. At present, known TAL enzymes have substrate specificity toward both L-Phe and L-Tyr. The specificity to L-Tyr of the TAL from *Rhodobacter sphaeroides* has been modified to L-Phe by changing amino acid residue His89 that is conserved in enzymes with TAL activity to Phe. This result suggests that it might be possible to modify the substrate specificity of enzymes that display PAL activity by employing protein engineering approaches (Louie et al., 2006).

Engineering of Microbes for Production of Phenylpropanoid Acids

Microbial species traditionally employed in biotechnological processes do not have the natural capacity for synthesizing phenylpropanoid acids. Therefore, genetic modifications are required to generate CA or pHCA production strains. Since enzymes having PAL/TAL activities are not present in industrial microbial strains, a key modification to generate phenylpropanoid acids production strains is the heterologous expression of genes encoding these proteins. These strains are usually further engineered by modifying carbon flow distribution in central and biosynthetic pathways with the aim of increasing L-Phe and L-Tyr synthesis capacity. Such strategies can be complemented with the engineering of substrate utilization and product tolerance. These strategies are presented and discussed in the following sections.

Engineering of Key Pathways/Targets for the Production of CA and pHCA

PAL/TAL Enzymes as Key Reactions

The heterologous expression of genes encoding PAL/TAL activities is an essential modification to generate CA and pHCA production strains. Genes encoding PAL/TAL enzymes have been

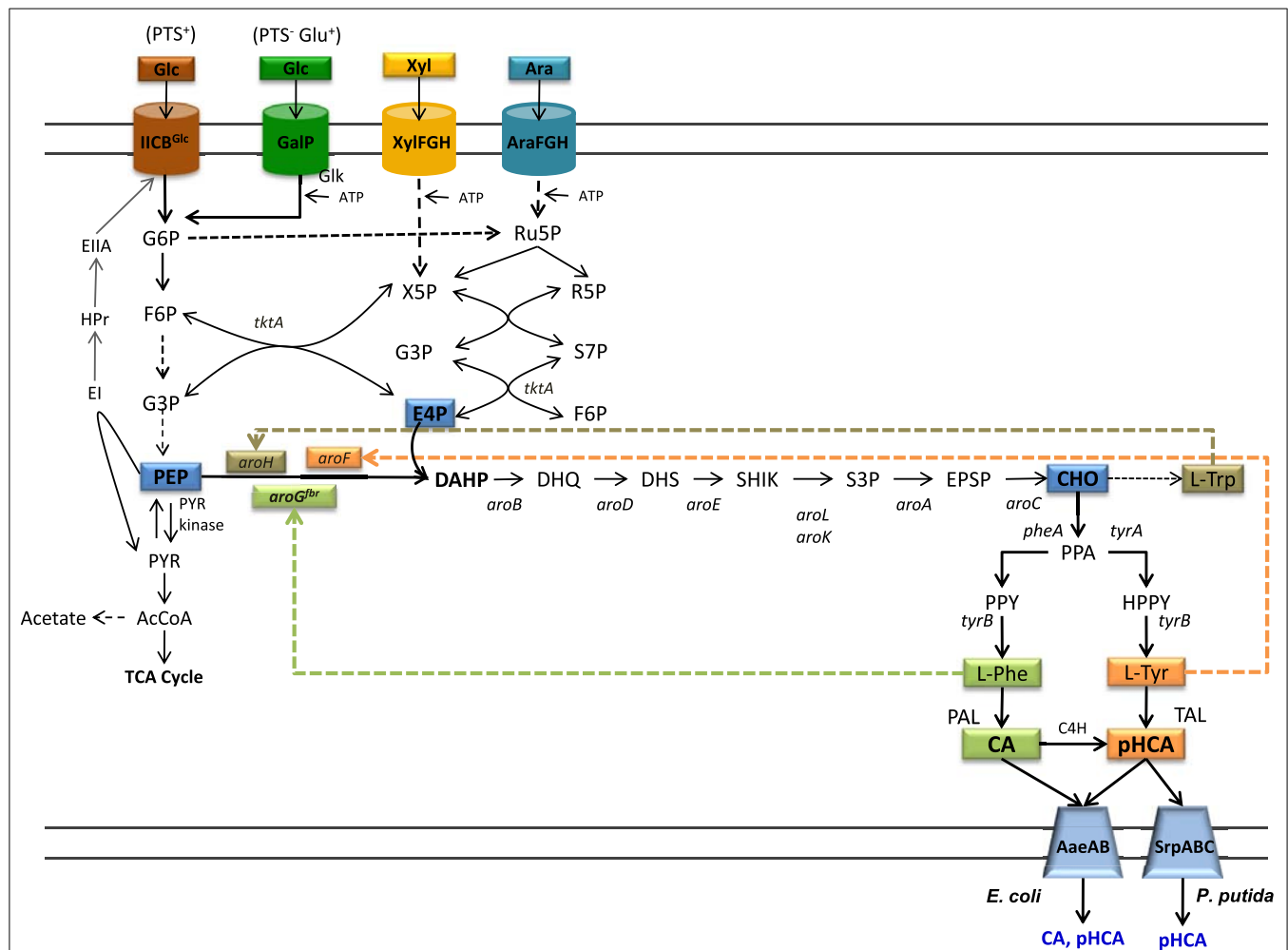


FIGURE 1 | Central metabolism, aromatics biosynthetic pathways, and transport pathways from engineered *E. coli*. Dashed arrows indicate multiple enzyme reactions. Ei, PTS enzyme I; HPr, PTS phosphohistidine carrier protein; EIIA, PTS glucose-specific enzyme II; PTS IICB^{Glc}, integral membrane glucose permease; GalP, galactose permease; XylFGH, xylose transport proteins, AraFGH, arabinose transport proteins; DAHPs, DAHP synthase; *aroG^{fbr}*, gene encoding a feedback-inhibition-resistant version of DAHPs; *tktA*,

transketolase; *tyrB*, tyrosine aminotransferase gene; PAL, phenylalanine ammonia lyase; TAL, tyrosine ammonia lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; AaeXAB, efflux pump from *E. coli*; SrpABC, efflux pump from *P. putida*; G6P, glucose-6-phosphate; F6P, fructose-6-phosphate; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; R5P, ribose-5-phosphate; Ru5P, ribulose-5-phosphate; S7P, sedoheptulose-7-phosphate; X5P, xylulose-5-phosphate; PYR, pyruvate; AcCoA, acetyl-CoA; TCA, tricarboxylic acids.

expressed in various microbial hosts to enable the capacity of transforming L-Phe and L-Tyr into CA and pHCA, respectively. **Table 1** shows the sources of various PAL/TAL enzymes and their kinetic parameters (when known). As it can be observed, the genes employed originate from various biological groups, including bacteria, yeasts, and plants. The kinetic characterization of these enzymes provides data that can be used to compare them regarding substrate affinity and catalytic efficiency. Several enzymes of this family display both PAL and TAL activities. However, a wide range of K_m values can be observed for substrates L-Phe and L-Tyr (**Table 1**). A microbial strain that expresses a gene encoding a PAL/TAL enzyme acquires the capacity for transforming L-Phe or L-Tyr into the corresponding phenylpropanoid acid. Therefore, in a production context, the aromatic amino acid must be supplemented to the culture medium, where it is then internalized and deaminated by the PAL/TAL enzyme.

Engineering of Pathway Regulation

Most microbial hosts have the metabolic capacity for synthesizing L-Phe or L-Tyr from simple carbon sources. Therefore, to reduce production costs, it is desirable to enhance endogenous biosynthesis of the aromatic substrates to avoid having to add them to the culture medium. The strategies for generating L-Phe or L-Tyr overproducer strains are well-known and they have been applied to generate microbial strains that can produce these amino acids at grams level from simple carbon sources (Ikeda and Katsumata, 1992; Ikeda et al., 2006; Báez-Viveros et al., 2007; Lütke-Eversloh and Stephanopoulos, 2007, 2008; Chávez-Bejar et al., 2008; Juminaga et al., 2012; Kang et al., 2012). The elimination of enzyme feedback inhibition regulation and transcriptional regulatory processes are the most common modification that enhances flux to the L-Phe or L-Tyr biosynthetic pathway. The high-level expression of feedback inhibition resistant (fbr) versions of enzyme

TABLE 1 | Kinetic parameters for phenylalanine ammonia lyase and tyrosine ammonia lyase enzymes from various organisms.

Organism	K_m L-Phe (μM)	K_m L-Tyr (μM)	Reference
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	1277	15.6	Kyndt et al. (2002)
<i>Zea mays</i>	270	19	Rosler et al. (1997)
<i>Petroselinum crispum</i>	24.5	7.8	Appert et al. (1994)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	560	60	Vannelli et al. (2007b)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	161	44	Xue et al. (2007)
<i>Trichosporon cutaneum</i>	2330	432	Vannelli et al. (2007a)
<i>Rhodotorula minuta</i>	584	212	Vannelli et al. (2007a)
<i>Rhodotorula graminis</i>	448	154	Vannelli et al. (2007a)
<i>Streptomyces maritimus (encP)</i>	23	–	Xiang and Moore (2005)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1340	560	Zhu et al. (2013)
<i>Arabidopsis thaliana (PAL1)</i>	68	–	Cochrane et al. (2004)
<i>Arabidopsis thaliana (PAL2)</i>	64	–	Cochrane et al. (2004)
<i>Arabidopsis thaliana (PAL3)</i>	256	–	Cochrane et al. (2004)
<i>Arabidopsis thaliana (PAL4)</i>	71	–	Cochrane et al. (2004)
<i>Saccharothrix espanaensis</i>	2860	15.5	Berner et al. (2006)

DAHP synthase causes an increase in carbon flow from central metabolism to the shikimate pathway. This increased flux toward CHO synthesis can be redirected to the specific L-Phe and L-Tyr biosynthetic pathway by overexpressing fbr versions of PDT and PDH, respectively. In addition to the aforementioned strategies for increasing synthesis capacity of aromatic amino acids, other approaches, such as a combination of strain random mutagenesis and selection, have proven successful for generating mutants that overproduce L-Phe or L-Tyr (Bongaerts et al., 2001). Random mutagenesis and selection schemes have also been employed to generate *P. putida* strains for the production of CA and pHCA. The *P. putida* strain S12 was isolated in cultures containing a high styrene concentration and has been shown to be solvent tolerant (Weber et al., 1993). This strain was engineered by expressing the gene coding for the PAL/TAL from *R. toruloides*. To increase L-Phe biosynthesis capacity, this strain was subjected to random mutagenesis and a selection process on the toxic analog m-fluorophenylalanine. An isolated mutant produced 5 mM CA from glucose (Nijkamp et al., 2005). In addition to CA, this strain produced a very low amount of pHCA. To obtain a high-level pHCA producer strain, random mutagenesis and m-fluorophenylalanine selection were employed, considering that L-Phe and L-Tyr share steps in their biosynthetic pathways. Following this procedure, a strain was obtained that showed a 14-fold increase in pHCA synthesis. However, degradation of pHCA was observed in the culture. It is known that *P. putida* has a pCHA catabolic pathway. The gene *fcs* encoding feruloyl-CoA synthetase was inactivated in *P. putida* S12, thus eliminating the first step in the degradative pathway. This modification caused a 2.5-fold increase in pHCA titer (224 μM); however, a large amount of CA was also produced (350 μM). To reduce CA production, L-Phe auxotrophic mutants were generated by random mutagenesis. One of such mutants produced 860 and 70 μM of pHCA and CA, respectively (Nijkamp et al., 2007). These results demonstrate how random mutagenesis schemes coupled to selection with toxic analogs can be employed to successfully yield overproducing strains. However, a drawback of such methods is the lack of knowledge on the

specific mutations responsible for the observed phenotype. The application of genome sequencing to characterize such mutants should yield information that will allow for the future rational design of production strains.

Engineering Building Blocks Supply

The capacity for synthesizing aromatic amino acids can be improved by increasing availability of central metabolism precursors PEP and E4P. The enzymes transketolase (Tkt) and transaldolase (Tal) from the pentose phosphate pathway participate in E4P metabolism. The overexpression of each enzyme showed a positive effect on DAHP synthesis from glucose. It was found that *tktA* overexpression had a larger positive effect on increasing E4P availability for aromatics biosynthesis. Unexpectedly, simultaneous expression of Tkt and Tal genes did not show a synergistic effect on DAHP synthesis from glucose (Draths et al., 1992; Lu and Liao, 1997). PEP participates in several anabolic and catabolic pathways. In addition, it serves as phosphate donor during import and phosphorylation of glucose and other sugars by the PEP:sugar phosphotransferase system (PTS) (Erni, 2012). When a bacterium grows on a sugar source that can be internalized by the PTS, such as glucose, this system is the major consumer of PEP as one mole of this molecule is required to transport and phosphorylate 1 mole of glucose, generating glucose-6-phosphate (G6P), and PYR (Figure 1). Various studies have stabilized that PEP availability determines the yield of aromatic amino acids synthesized from glucose (Patnaik et al., 1995). The maximal theoretical yield for the synthesis of aromatics precursor DAHP from glucose in a strain with an active PTS is 0.43 mol/mol. However, if glucose phosphorylation is PEP independent, the maximal theoretical yield could be increased twofold to 0.86 mol/mol (Báez et al., 2001). The reactions catalyzed by enzymes Ppc and Pyk consume PEP and for this reason they have become targets for strain improvement. The inactivation of gene *ppc* caused a 10-fold increase in L-Phe production, but μ was severely affected (Miller et al., 1987). The enzyme Pps, encoded by *ppsA*, catalyzes a gluconeogenic reaction synthesizing PEP from PYR. The overexpression of *ppsA* in *E. coli* has been shown to increase DAHP production to near the maximum theoretical yield. However, it was also determined that *ppsA* overexpression caused partial growth inhibition (Patnaik et al., 1995).

Engineering of Substrate Utilization

To increase PEP availability for aromatics production, one approach involves inactivation of PTS activity and its replacement by alternate import and phosphorylation mechanisms. Mutant strains of *E. coli* lacking PTS activity (PTS⁻) have been generated and characterized. These PTS⁻ mutants display very low rates of glucose consumption and growth (PTS⁻ glucose⁻ phenotype). Therefore, they are not useful for production applications. For this reason, several strategies have been followed to improve glucose import capacity in these mutant strains. Starting from a PTS⁻ glucose⁻ strain, a continuous culture system was employed to select evolved bacterial clones displaying a fourfold higher specific growth rate (μ) (PTS⁻ glucose⁺ phenotype) (Flores et al., 1996). The characterization of these laboratory evolved strains revealed that glucose uptake and phosphorylation are carried out

by a PTS-independent mechanism involving galactose permease (GalP) and glucokinase (Glc) (Flores et al., 1996, 2002). The enzyme Glc phosphorylates the cytoplasmic glucose employing ATP as the phosphate donor, so in these strains, PEP is not consumed for this reaction. An alternative method for generating PTS⁻ glucose⁺ strains involves the overexpression of genes encoding native or heterologous proteins having glucose import and ATP-dependent phosphorylating activities (Snoep et al., 1994; Hernández-Montalvo and Martínez, 2003). The characterization of several PTS⁻ glucose⁺ strains shows that aromatics yield from glucose can be increased to a level close to the maximal theoretical yield calculated for a strain with PEP-independent glucose import (Flores et al., 1996; Báez et al., 2001).

The use of substrates derived from lignocellulosic hydrolyzates is a current trend in the development of biotechnological processes. These are abundant and relatively inexpensive carbon sources that can become the basis of sustainable production processes. Although the composition of such materials differ according to their origin, most of them contain a mixture of pentoses and hexoses, mainly glucose, arabinose, and xylose. The efficient utilization of such sugar mixture by the production strains is an important characteristic. Therefore, microbial species that naturally consume such mixtures must be employed, or genetic modification must be employed to provide such trait. The PTS is involved in carbon catabolic repression, a regulatory process responsible for the sequential utilization of mixtures of carbon sources in *E. coli* and other bacteria. To determine the effect of PTS inactivation on sugar mixtures utilization and aromatics acids production, a combinatorial study was reported where the effect of various phenotypes on CA and pHCA production were compared. The authors generated strains derived from wild type and a PTS⁻ glucose⁺ mutant that expressed PAL/TAL from *Rhodotorula glutinis* or *A. thaliana* as well as genes encoding an fbr version DAHP synthase and Tkt. These strains were grown in medium supplemented with glucose, arabinose, xylose, or a simulated lignocellulosic hydrolyzate containing a mixture of these three sugars and acetate. When grown in the simulated lignocellulosic hydrolyzate, sequential sugar utilization was observed in the wild-type strain, whereas they were simultaneously consumed by the PTS⁻ glucose⁺ strain. This is a trait that might prove to increase productivity when employing hydrolyzates from lignocellulosic raw materials (Vargas-Tah et al., 2015).

The organism *S. lividans* has the natural capacity to grow employing various complex carbon sources, including cello-oligosaccharide and xylo-oligosaccharide (Noda et al., 2012). This is a useful trait since no previous physical or chemical treatment of the lignocellulosic biomass is required to generate free sugars. This bacterium was modified for CA production by the heterologous expression of gene *encP* coding for a PAL from *Streptomyces maritimus*. Production of CA was observed when culturing in complex medium supplemented with glucose or glycerol as carbon source. Carbon sources that can be derived from biomass were also tested, including xylose, xylan, and raw starch with CA titers of 300, 130, and 460 mg/L, respectively (Noda et al., 2011). In another report, the *S. lividans* strain expressing *encP* was employed for producing CA from oligosaccharides as carbon sources in complex

medium. This strain produced 490, 400, and 160 mg/L of CA with cello-oligosaccharide, xylo-oligosaccharide, and Avicel as carbon sources, respectively (Noda et al., 2012). A strain of *S. lividans* was constructed for pHCA production by expressing a gene encoding a TAL from *Rhodobacter sphaeroides*. This strain produced 786 and 736 mg/L of pHCA from glucose or cellobiose as carbon source. This strain was further modified by expressing a gene encoding an endoglucanase from *Thermobifida fusca* YX. The recombinant *S. lividans* strain produced 500 mg/L of pHCA from phosphoric acid swollen cellulose (Kawai et al., 2013).

Engineering of Product Tolerance

It is known that CA and pHCA are toxic compounds for several microorganisms (Qi et al., 2007; Sariaslani, 2007; Vargas-Tah et al., 2015). For example, a concentration of 10 g/L of pHCA completely abolishes growth in *E. coli* (Sariaslani, 2007). Under production conditions where these compounds accumulate to high titers, a negative effect on productivity and cell viability would be expected. Two general approaches have been followed to mitigate the negative effects of CA and pHCA accumulation on production strain performance. The first one is based on the overexpression of efflux systems that can employ pHCA as substrate. In one study, it was demonstrated that *E. coli* mutants in TolC, the outer membrane factor for several efflux systems, are more sensitive to the negative effects of pHCA. The main multidrug efflux system in *E. coli* is AcrAB, it requires TolC to export several kinds of toxic compounds. An increase in sensitivity to pHCA of *acrAB* mutants showed that this compound is a substrate of this efflux system. However, the sensitivity was higher in a strain with mutated efflux system and TolC, suggesting that other(s) efflux system(s) could be active with pHCA. As a strategy to identify gene candidates encoding proteins involved in pHCA efflux, transcriptome analysis was performed with *E. coli* grown in the presence of this aromatic acid. This study found genes *aaeA* and *aaeB* to be upregulated. Genes *aaeXAB* encode an efflux pump, when this operon was overexpressed in *E. coli*, a twofold increase in tolerance to pHCA was observed (Figure 1) (Van Dyk et al., 2004; Sariaslani, 2007). This study also found that *AaeXAB* is functional in the absence of TolC, thus indicating the existence of an additional aromatics acids efflux system that is dependent on TolC (Van Dyk et al., 2004).

The second approach to avoid the toxic effects or aromatic acid is based on the use as production host of an organism having a natural high tolerance to these compounds. The *P. putida* strain S12 was isolated from cultures containing a high concentration of styrene. Characterization of this strain has revealed that it is tolerant to various organic solvents (Weber et al., 1993). An efflux pump encoded by genes *srpABC* in this strain has been identified as an important factor in solvent tolerance and in its capacity to export chemical products (Figure 1). Their expression in a solvent-sensitive *P. putida* strain increases its resistance to solvents (Kieboom et al., 1998). As mentioned above, engineering of this strain has led to production hosts displaying the highest reported CA and pHCA titers in production cultures (Nijkamp et al., 2005, 2007).

Microbial Hosts Employed for Phenylpropanoid Acids Production

As mentioned above, various microbial strains have been modified for the production of CA or pHCA by employing diverse metabolic engineering strategies. This includes Gram-negative, Gram-positive, and eukaryotic organisms. The Gram-negative bacterium *E. coli* is a facultative anaerobe that can employ a large variety of organic compounds as carbon and energy sources. *E. coli* was the first organism modified by genetic engineering and it is currently employed as an important model in metabolic engineering experiments. The existence of a wide array of genetic modification techniques developed for *E. coli* has enabled the engineering of this organism for aromatic acids production. As shown in **Table 2**, CA and pHCA *E. coli* production strains have been generated that express PAL/TAL enzymes from various origins, having the capacity to employ single sugars or mixtures as substrates. Even though *E. coli* is a useful host organism, increasing its tolerance to aromatic acids is still a challenge for developing robust production strains.

The genus *Streptomyces* includes Gram-positive organisms displaying the natural capacity for synthesizing antibiotics and other secondary metabolites. Among them, the bacterium *S. lividans* synthesizes enzymes that enable it to consume various biomass-derived polymers, such as xylan, starch, cello-oligosaccharide, and xylo-oligosaccharide (Noda et al., 2012). This organism has been genetically modified for production of CA and pHCA from simple sugars or polymers as carbon sources. The rate of production for

the aromatic acids was lower with sugar polymers when compared to simple sugars. This indicates that further strain improvement would be required to increase the cellular activities related to polymer consumption (**Table 2**) (Noda et al., 2011, 2012; Kawai et al., 2013).

The Gram-negative bacterium *P. putida* is a versatile organism, displaying the capacity to colonize diverse niches. A *P. putida* strain designated S12 was isolated from cultures containing a high styrene concentration and it has been shown to be tolerant to several organic solvents (Weber et al., 1993). *P. putida* S12 has been engineered to generate CA and pHCA production strains. These strains have reached the highest aromatic acids titers in production cultures a result likely attributed to the solvent tolerance of the progenitor strain (**Table 2**). The introduction of functions related to sugar polymer consumption would bring *P. putida* S12 closer to an ideal aromatics acids production strain.

The yeast *S. cerevisiae* is a unicellular eukaryotic organism that has been employed as an important biological model. In addition, yeast is an industrial organism that has been fundamental to the development of various fermentative processes. Currently, there is one example of the genetic modification of *S. cerevisiae* for pHCA production. A production strain was generated by expressing the *R. glutinis* PAL/TAL. This *S. cerevisiae* strain also expressed the Cytochrome P-450 enzyme system from the plant *Helianthus tuberosus*. When culturing this yeast strain with glucose or raffinose as carbon sources, the highest titers of pHCA were 14.6 and 202.8 (Vannelli et al., 2007a,b).

TABLE 2 | Comparison of production parameters for aromatic acids synthesized by engineered microbial strains.

Organism	PAL/TAL	Carbon source	pHCA (mg/L)	CA (mg/L)	Reference
<i>E. coli</i> (w3110)	<i>R. glutinis</i>	Glucose	7.0	4.9	Vannelli et al. (2007a)
<i>E. coli</i> (DH10B)	<i>R. glutinis</i>	Glucose	46.0	41.5	Vannelli et al. (2007a)
<i>E. coli</i> (ATCC 31884)	<i>R. glutinis</i>	Glucose	24.6	56.3	Vannelli et al. (2007a)
<i>E. coli</i> (BL21*AI)	<i>T. cutaneum</i>	LB	79	186	Vannelli et al. (2007a)
<i>E. coli</i> (PTS ⁻)	<i>R. glutinis</i>	Glucose	15.0	29.0	Vargas-Tah et al. (2015)
<i>E. coli</i> (PTS ⁻)	<i>A. thaliana</i>	Glucose	–	78.5	Vargas-Tah et al. (2015)
<i>E. coli</i> (W3110)	<i>A. thaliana</i>	Arabinose	–	151.4	Vargas-Tah et al. (2015)
<i>E. coli</i> (W3110, <i>pheA</i> ⁻)	<i>R. glutinis</i>	Simulated hydrolyzate	58.4	15.6	Vargas-Tah et al. (2015)
<i>E. coli</i> (W3110)	<i>A. thaliana</i>	Simulated hydrolyzate	–	55.9	Vargas-Tah et al. (2015)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>R. glutinis</i>	Glucose	2.3	–	Vannelli et al. (2007a)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>R. glutinis</i>	Raffinose	31.8	–	Vannelli et al. (2007a)
<i>P. putida</i> S12 C1	<i>R. torulooides</i>	Glucose	36.8	46.5	Nijkamp et al. (2007)
<i>P. putida</i> S12 C3	<i>R. torulooides</i>	Glucose	141.2	10.4	Nijkamp et al. (2007)
<i>P. putida</i> S12 C3	<i>R. torulooides</i>	Glucose	1740.1	22.2	Nijkamp et al. (2007)
<i>P. putida</i> S12	<i>R. torulooides</i>	Glucose	–	61.4	Nijkamp et al. (2005)
<i>P. putida</i> S12	<i>R. torulooides</i>	Glucose	–	740.3	Nijkamp et al. (2005)
<i>P. putida</i> S12	<i>R. torulooides</i>	Glycerol	–	799.5	Nijkamp et al. (2005)
<i>S. lividans</i>	<i>R. sphaeroides</i>	Glucose	786	–	Kawai et al. (2013)
<i>S. lividans</i>	<i>R. sphaeroides</i>	Cellulose	736	–	Kawai et al. (2013)
<i>S. lividans</i> , endoglucanase expressing	<i>R. sphaeroides</i>	Glucose	753	–	Kawai et al. (2013)
<i>S. lividans</i> , endoglucanase expressing	<i>R. sphaeroides</i>	Cellulose	743	–	Kawai et al. (2013)
<i>S. lividans</i> , endoglucanase expressing	<i>R. sphaeroides</i>	Cellulose	500	–	Kawai et al. (2013)
<i>S. lividans</i>	<i>S. maritimus</i>	Glucose	–	80.0	Noda et al. (2012)
<i>S. lividans</i>	<i>S. maritimus</i>	Glucose	–	209.8	Noda et al. (2012)
<i>S. lividans</i>	<i>S. maritimus</i>	Glycerol	–	450	Noda et al. (2011)
<i>S. lividans</i>	<i>S. maritimus</i>	Xylose	–	300.0	Noda et al. (2012)
<i>S. lividans</i>	<i>S. maritimus</i>	Xylan	–	130.0	Noda et al. (2011)
<i>S. lividans</i>	<i>S. maritimus</i>	Raw starch	–	460.0	Noda et al. (2011)
<i>S. lividans</i>	<i>S. maritimus</i>	Cello-oligosaccharide	–	490	Noda et al. (2012)

Production of CA and pHCA Using Biotransformation

As mentioned above, biological synthesis of CA and pHCA starting from simple or complex sugars has the potential for becoming a relatively inexpensive manufacturing scheme. However, such processes must deal with the issue of product toxicity, which places an upper limit on attainable product titers. A solution to this problem would be to employ a manufacturing alternative based on performing a biotransformation where L-Phe and L-Tyr are employed as substrates for the production of CA and pHCA, respectively. In this scheme, the cell host is required only for the synthesis of the PAL/TAL enzyme, which can be purified for performing the deamination reactions. Production of pHCA was studied by comparing PAL/TAL enzymes from yeast *R. glutinis* (RgTAL) and fungus *Phanerochaete chrysosporium* (PcTAL). The genes coding for these enzymes were expressed in *E. coli* and the protein products were purified. Characterization of purified enzymes showed that PcTAL is thermostable, with a maximal activity at 55–60°C. In experiments with whole cells of *E. coli* expressing PcTAL, 42.2 g/L of pHCA were produced with a specific productivity of 1.11 g/g h (Xue et al., 2007). In another report, the RgTAL was stabilized by encapsulation within polyethyleneimine-mediated biomimetic silica. The free enzyme lost all its activity when exposed 1 h to a temperature of 60°C, whereas encapsulated RgTAL retained 43% of its initial activity (Cui et al., 2015). These results show how a natural version of PAL/TAL or one that has been stabilized can constitute viable alternatives for the synthesis of aromatic acids from L-Phe or L-Tyr substrates.

Conclusion and Outlook

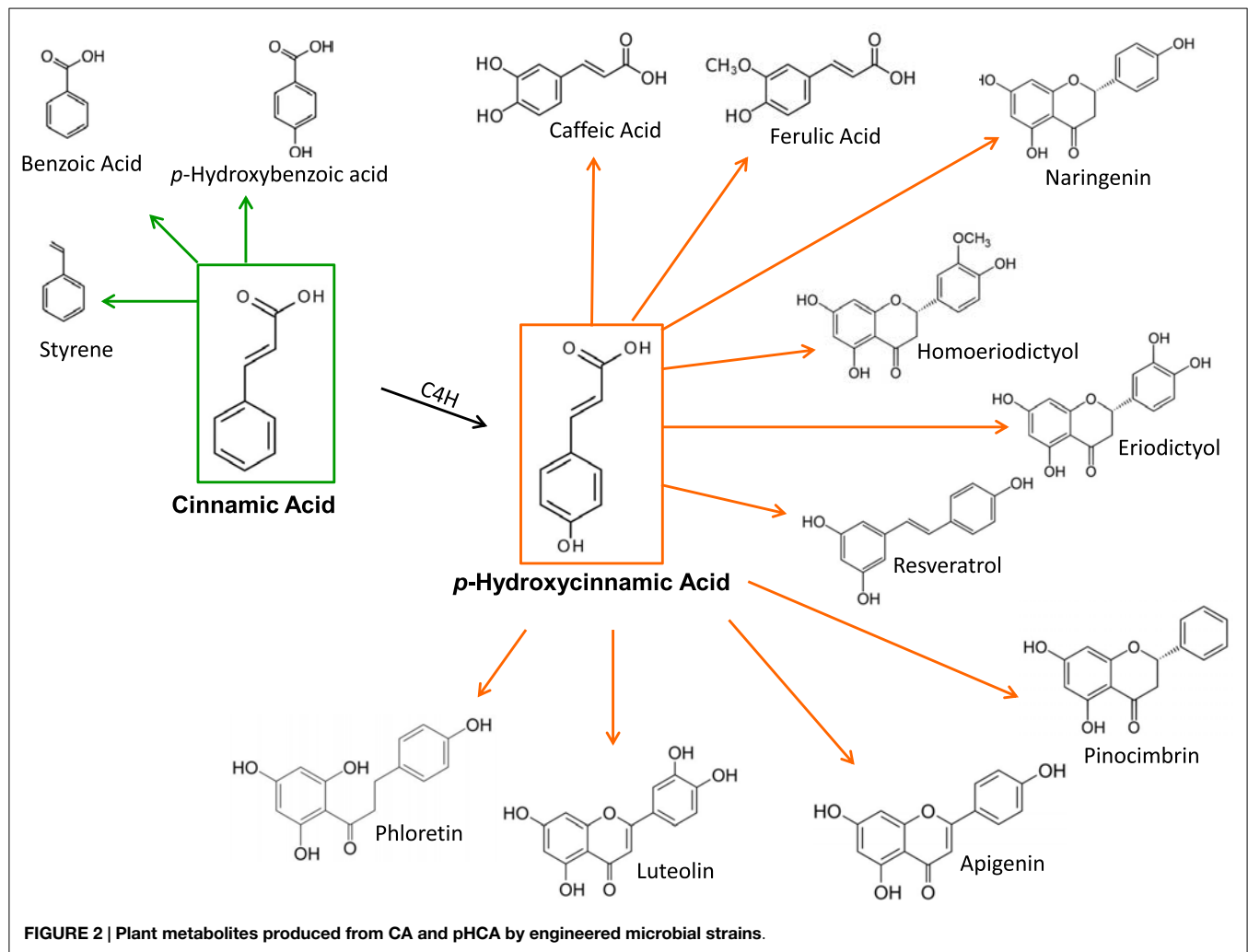
The development of microbial strains for the production of CA and pHCA from simple carbon sources involves extensive engineering of cellular metabolism. In addition to improving production characteristics, these modifications will likely also cause unexpected alterations to the cell's physiology. System biology approaches offer the opportunity of better understanding the consequences of genetic modifications and the responses to various stress factors during the production stage. The application of omics-based approaches, such as transcriptomics, proteomics, fluxomics, and metabolomics, provides a comprehensive view of the cell's physiology response to various genetic modifications as well as environment factors, such as product toxicity. For the case of microbial strains for the production of CA and pHCA, there is a lack of studies based on omics approaches. However, there are some reports focusing on the study of strains modified for the production of precursors of aromatic acids. In one report, proteome analysis was performed to understand the effect of inactivating a PYR kinase PykF in *E. coli*. Among proteins differentially expressed in the mutant strain, some were related to E4P synthesis and the common aromatic pathway, suggesting a higher capacity for aromatics synthesis (Prabhakar et al., 2007). Transcriptome analysis was performed to compare a PTS⁺ and a PTS⁻ glucose⁺ *E. coli* strain modified for L-Phe production. Among differentially expressed genes, it was found that operon

acs-actP that is involved in acetate consumption was upregulated in the PTS⁻ glucose⁺ strain (Báez-Viveros et al., 2007). This response is consistent with the lower level of acetate accumulation in culture medium observed for strain PTS⁻ glucose⁺ when compared to PTS⁺. These results provide useful data that helps in identifying genetic targets for strain improvement. Future studies focused on characterizing CA and pHCA production strains will likely identify novel targets for strain optimization.

Aromatic acids CA and pHCA are valuable chemicals having direct applications and serving also as precursors for the synthesis of a large number of useful compounds. During the last years, various microbial hosts have been modified by metabolic engineering to generate production strains. These efforts have been fundamental for defining strain development strategies and for identifying factors that limit productivity. In contrast to other biotechnological products where a single microbial host is usually employed, for the case of CA and pHCA production, several different species show promise as production platforms. As reviewed here, *E. coli*, *S. cerevisiae*, *P. putida*, and *S. lividans* display particular characteristics that can favor aromatics acids production. Although much progress has been made with regard to production strain construction and process development, the yields of aromatic acids are still low when compared to other aromatic products (Bongaerts et al., 2001). An important factor limiting productivity is the toxicity of CA and pHCA. In this regard, studies identifying genes encoding efflux systems in *E. coli* and *P. putida* S12 enable a better understanding of the processes involved in mitigating aromatic acids toxicity (Kieboom et al., 1998; Van Dyk et al., 2004). The overexpression of these genes in each organism clearly increases resistance to toxic compounds. It remains to be determined if the solvent-tolerance trait can be transferred to a different species. The use of an omics approach to determine the transcriptional response to CA and pHCA should prove to be valuable for identifying systems that participate in toxic resistance in other microbial species.

Generating a single product is usually the expected outcome in a biotechnological production system. In microbial strains engineered to produce aromatic acids from simple carbon sources, it has been shown that synthesis of CA as only product is possible, as a result of PAK specificity toward L-Phe. However, this is not the case for pHCA, since known TAL enzymes can also employ L-Phe as substrate. Therefore, pHCA is produced always with a certain amount of CA. Although downstream processing could be employed to separate pHCA from CA, this approach would result in increased production costs. Another solution to this issue could be based on applying protein engineering methods to modify substrate specificity of a TAL enzyme for reducing or abolishing CA production, while maintaining high-catalytic activity to increase production of pHCA. As an alternative, the search for novel TAL proteins in natural diversity has the potential for finding enzymes having substrate specificity only toward L-Tyr.

Microbial strains having the capacity for producing CA or pHCA have been employed as platforms for the synthesis of various phenylpropanoid compounds. These include simple phenylpropanoids as well as lignoids, flavonoids, coumarins, and other related compounds (Figure 2) (Dixon and Steele, 1999).



These plant metabolites have been shown to have pharmacological activities, such as antioxidants, anticancer, antiviral, anti-inflammatory, anti-nitric oxide production and antibacterial agents, among others (Dhanalakshmi et al., 2002). The microbial production of these compounds represents an attractive alternative to plant tissue extraction processes. However, at present, these microbial strains produce a low level of these plant compounds. It can be expected that some of the metabolic engineering strategies

applied to CA and pHCA production strains, as reviewed here, should provide a basis for the future improvement of microbial strains that synthesize useful plant metabolites.

Acknowledgments

This work was supported by CONACyT grant 177568. AV-T was supported by a fellowship from CONACyT.

References

- Achnine, L., Blancaflor, E. B., Rasmussen, S., and Dixon, R. A. (2004). Colocalization of l-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 16, 3098–3109. doi:10.1105/tpc.104.024406
- Appert, C., Logemann, E., Hahlbrock, K., Schmid, J., and Amrhein, N. (1994). Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from Parsley (*Petroselinum crispum* Nym.). *Eur. J. Biochem.* 225, 491–499. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.00491.x
- Báez, J. L., Bolívar, F., and Gosset, G. (2001). Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase transport system. *Biotechnol. Bioeng.* 73, 530–535. doi:10.1002/bit.1088
- Báez-Viveros, J. L., Flores, N., Juárez, K., Castillo-España, P., Bolívar, F., and Gosset, G. (2007). Metabolic transcription analysis of engineered *Escherichia coli* strains that overproduce l-phenylalanine. *Microb. Cell Fact.* 6, 30. doi:10.1186/1475-2859-6-30
- Berner, M., Krug, D., Bihlmaier, C., Vente, A., Müller, R., and Bechthold, A. (2006). Genes and enzymes involved in caffeic acid biosynthesis in the actinomycete *Saccharothrix espanaensis*. *J. Bacteriol.* 188, 2666–2673. doi:10.1128/JB.188.7.2666-2673.2006
- Bongaerts, J., Krämer, M., Müller, U., Raeven, L., and Wubbolts, M. (2001). Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metab. Eng.* 3, 289–300. doi:10.1006/mben.2001.0196
- Chávez-Béjar, M. I., Lara, A. R., López, H., Hernández-Chávez, G., Martínez, A., Ramírez, O. T., et al. (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. Microb.* 74, 3284–3290. doi:10.1128/AEM.02456-07
- Chemler, J. A., and Koffas, M. A. (2008). Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 597–605. doi:10.1016/j.copbio.2008.10.011
- Cochrane, F. C., Davin, L. B., and Lewis, N. G. (2004). The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry* 65, 1557–1564. doi:10.1016/j.phytochem.2004.05.006
- Cui, J., Liang, L., Han, C., and Lin Liu, R. (2015). Stabilization of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula glutinis* by encapsulation in polyethyleneimine-mediated biomimetic silica. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 176, 999–1011. doi:10.1007/s12010-015-1624-0
- Cui, J. D., Qiu, J. Q., Fan, X. W., Jia, S. R., and Tan, Z. L. (2014). Biotechnological production and applications of microbial phenylalanine ammonia lyase: a recent review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 34, 258–268. doi:10.3109/07388551.2013.791660
- Dhanalakshmi, S., Singh, R. P., Agarwal, C., and Agarwal, R. (2002). Silibinin inhibits constitutive and TNF α -induced activation of NF- κ B and sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells to TNF α -induced apoptosis. *Oncogene* 21, 1759–1767. doi:10.1038/sj/onc/1205240
- Dixon, R. A., and Steele, C. L. (1999). Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* 4, 394–400. doi:10.1016/S1360-1385(99)01471-5
- Draths, K. M., Pompliano, D. L., Conley, D. L., Frost, J. W., Berry, A., Disbrow, G. L., et al. (1992). Biocatalytic synthesis of aromatics from d-glucose: the role of transketolase. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 3956–3962. doi:10.1021/ja00036a050
- Emiliani, G., Fondi, M., Fani, R., and Gribaldo, S. (2009). A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. *Biol. Direct* 4, 7. doi:10.1186/1745-6150-4-7
- Erni, B. (2012). The bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS): an interface between energy and signal transduction. *J. Iranian Chem. Soc.* 10, 593–630. doi:10.1007/s13738-012-0185-1
- Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolivar, F., and Valle, F. (1996). Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 14, 620–623. doi:10.1038/nbt0596-620
- Flores, S., Gosset, G., Flores, N., de Graaf, A. A., and Bolívar, F. (2002). Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling and NMR spectroscopy. *Metab. Eng.* 4, 124–137. doi:10.1006/mben.2001.0209
- Hernández-Montalvo, V., and Martínez, A. (2003). Expression of galP and Glk in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnol. Bioeng.* 83, 687–694. doi:10.1002/bit.10702
- Ikeda, M. (2006). Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Appl. Environ. Microb.* 69, 615–626. doi:10.1007/s00253-005-0252-y
- Ikeda, M., and Katsumata, R. (1992). Metabolic engineering to produce tyrosine or phenylalanine in a tryptophan-producing *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl. Environ. Microb.* 58, 781–785.
- Juminaga, D., Baidoo, E. E., Redding-Johanson, A. M., Batth, T. S., Burd, H., Mukhopadhyay, A., et al. (2012). Modular engineering of L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microb.* 78, 89–98. doi:10.1128/AEM.06017-11
- Kaneko, T., Thi, T. H., Shi, D. J., and Akashi, M. (2006). Environmentally degradable, high-performance thermoplastics from phenolic phytomonomers. *Nat. Mater.* 5, 966–970. doi:10.1038/nmat1778
- Kang, S. Y., Choi, O., Lee, J. K., Hwang, B. Y., Uhm, T. B., and Hong, Y. S. (2012). Artificial biosynthesis of phenylpropanoic acids in a tyrosine overproducing *Escherichia coli* strain. *Microb. Cell Fact.* 11, 153. doi:10.1186/1475-2859-11-153
- Kawai, Y., Noda, S., Ogino, C., Takeshima, Y., Okai, N., Tanaka, T., et al. (2013). p-Hydroxycinnamic acid production directly from cellulose using endoglucanase and tyrosine ammonia lyase-expressing *Streptomyces lividans*. *Microb. Cell Fact.* 12, 45. doi:10.1186/1475-2859-12-45
- Kieboom, J., Dennis, J. J., de Bont, J. A., and Zylstra, G. J. (1998). Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance. *J. Biol. Chem.* 273, 85–91. doi:10.1074/jbc.273.1.85
- Korkina, L., Kostyuk, V., De Luca, C., and Pastore, S. (2011). Plant phenylpropanoids as emerging anti-inflammatory agents. *Mini Rev. Med. Chem.* 11, 823–835. doi:10.2174/138955711796575489
- Kyndt, J. A., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A., and Van Beeumen, J. J. (2002). Characterization of a bacterial tyrosine ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein. *FEBS Lett.* 512, 240–244. doi:10.1016/S0014-5793(02)02272-X
- Limem, I., Emmanuel, G., Alain, H., Frédéric, B., Leila, C. G., Jean-Marc, E., et al. (2008). Production of phenylpropanoid compounds by recombinant microorganisms expressing plant-specific biosynthesis genes. *Process Biochem.* 43, 463–479. doi:10.1016/j.procbio.2008.02.001
- Louie, G. V., Bowman, M. E., Moffitt, M. C., Baiga, T. J., Moore, B. S., and Noel, J. P. (2006). Structural determinants and modulation of substrate specificity in phenylalanine-tyrosine ammonia-lyases. *Chem. Biol.* 13, 1327–1338. doi:10.1016/j.chembiol.2006.11.011
- Lu, J. L., and Liao, J. C. (1997). Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: role of transaldolase. *Biotechnol. Bioeng.* 53, 132–138. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19970120)53:2<132::AID-BIT2>3.0.CO;2-P
- Lütke-Eversloh, T., and Stephanopoulos, G. (2007). L-tyrosine production by deregulated strains of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 103–110. doi:10.1007/s00253-006-0792-9
- Lütke-Eversloh, T., and Stephanopoulos, G. (2008). Combinatorial pathway analysis for improved L-tyrosine production in *Escherichia coli*: identification of enzymatic bottlenecks by systematic gene overexpression. *Metab. Eng.* 10, 69–77. doi:10.1016/j.mben.2007.12.001
- Maeda, H., and Dudareva, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 73–105. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105439
- 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. doi:10.1007/BF01569421
- Nijkamp, K., van Luijk, N., de Bont, J. A., and Wery, J. (2005). The solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 as host for the production of cinnamic acid from glucose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 170–177. doi:10.1007/s00253-005-1973-7
- Nijkamp, K., Westerhof, R. G., Ballerstedt, H., de Bont, J. A., and Wery, J. (2007). Optimization of the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 as host for the production of p-coumarate from glucose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 617–624. doi:10.1007/s00253-006-0703-0
- Noda, S., Miyazaki, T., Miyoshi, T., Miyake, M., Okai, N., Tanaka, T., et al. (2011). Cinnamic acid production using *Streptomyces lividans* expressing phenylalanine ammonia lyase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 643–648. doi:10.1007/s10295-011-0955-2
- Noda, S., Miyazaki, T., Miyoshi, T., Miyake, M., Okai, N., Tanaka, T., et al. (2012). Production of *Streptovorticillium cinnamoneum* transglutaminase and cinnamic acid by recombinant *Streptomyces lividans* cultured on biomass-derived carbon sources. *Bioresour. Technol.* 104, 648–651. doi:10.1016/j.biortech.2011.10.045
- Patel, N., Pierson, D. L., and Jensen, R. A. (1977). Dual enzymatic routes to L-tyrosine and L-phenylalanine via pretyrosine in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 252, 5839–5846.
- Patnaik, R., Spitzer, R. G., and Liao, J. C. (1995). Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli*: confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA, and Pps activities. *Biotechnol. Bioeng.* 46, 361–370. doi:10.1002/bit.260460409
- Prabhakar, K., Roshan, C., and Kazuyuki, S. (2007). Proteomic investigation on the Pyk-F gene knockout *Escherichia coli* for aromatic amino acid production. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 455–465. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.03.018
- Qi, W. W., Vannelli, T., Breinig, S., Ben-Bassat, A., Gatenby, A. A., Haynie, S. L., et al. (2007). Functional expression of prokaryotic and eukaryotic genes in *Escherichia coli* for conversion of glucose to p-Hydroxystyrene. *Metab. Eng.* 9, 268–276. doi:10.1016/j.mben.2007.01.002
- Rosler, J., Krekel, F., Amrhein, N., and Schmid, J. (1997). Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol.* 113, 175–179. doi:10.1104/pp.113.1.175
- Sariaslani, F. S. (2007). Development of a combined biological and chemical process for production of industrial aromatics from renewable resources. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 51–69. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093248
- Snoep, J. L., Arfman, N., Yomano, L. P., Fliege, R. K., Conway, T., and Ingram, L. O. (1994). Reconstruction of glucose uptake and phosphorylation in a glucose-negative mutant of *Escherichia coli* by using *Zymomonas mobilis* genes encoding the glucose facilitator protein and glucokinase. *J. Bacteriol.* 176, 2133–2135.

- Van Dyk, T. K., Templeton, L. J., Cantera, K. A., Sharpe, P. L., and Sariaslani, F. S. (2004). Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve? *J. Bacteriol.* 186, 7196–7204. doi:10.1128/JB.186.21.7196-7204.2004
- Vannelli, T., Wei Qi, W., Sweigard, J., Gatenby, A. A., and Sariaslani, F. S. (2007a). Production of p-hydroxycinnamic acid from glucose in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* by expression of heterologous genes from plants and fungi. *Metab. Eng.* 9, 142–151. doi:10.1016/j.ymben.2006.11.001
- Vannelli, T., Zhixiong, X., Sabine, B., Wei Qi, W., and Sariaslani, F. S. (2007b). Functional expression in *Escherichia coli* of the tyrosine-inducible tyrosine ammonia-lyase enzyme from yeast *Trichosporon cutaneum* for production of p-hydroxycinnamic acid. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 413–422. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.03.013
- Vargas-Tah, A., Martínez, L. M., Hernández-Chávez, G., Rocha, M., Martínez, A., Bolívar, F., et al. (2015). Production of cinnamic and p-hydroxycinnamic acid from sugar mixtures with engineered *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 14, 6. doi:10.1186/s12934-014-0185-1
- Weber, F. J., Ooijkaas, L. P., Schemen, R. M., Hartmans, S., and de Bont, J. A. (1993). Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to high concentrations of styrene and other organic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3502–3504.
- Xiang, L., and Moore, B. S. (2005). Biochemical characterization of a prokaryotic phenylalanine ammonia lyase. *J. Bacteriol.* 187, 4286–4289. doi:10.1128/JB.187.12.4286-4289.2005
- Xue, Z., McCluskey, M., Cantera, K., Ben-Bassat, A., Sima Sariaslani, F., and Huang, L. (2007). Improved production of p-hydroxycinnamic acid from tyrosine using a novel thermostable phenylalanine/tyrosine ammonia lyase enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 58–64. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.07.025
- Zhu, L., Cui, W., Fang, Y., Liu, Y., Gao, X., and Zhou, Z. (2013). Cloning, expression and characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnol. Lett.* 35, 751–756. doi:10.1007/s10529-013-1140-7

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Vargas-Tah and Gosset. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

6. Nijkamp K, Westerhof RGM, Ballerstedt H, de Bont JAM, Wery J. Optimization of the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 as host for the production of p-coumarate from glucose. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;74:617–24.
7. Gosset G. Production of aromatic compounds in bacteria. *Curr Opin Biotechnol*. 2009;20:651–8.
8. Lütke-Eversloh T, Stephanopoulos G. L-tyrosine production by deregulated strains of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;75:103–10.
9. Chávez-Béjar MI, Lara AR, López H, Hernández-Chávez G, Martínez A, Ramírez OT, et al. 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*. 2008;74:3284–90.
10. Yakandawala N, Romeo T, Friesen AD, Madhyastha S. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance phenylalanine production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;78:283–91.
11. Lütke-Eversloh T, Stephanopoulos G. Combinatorial pathway analysis for improved L-tyrosine production in *Escherichia coli*: identification of enzymatic bottlenecks by systematic gene overexpression. *Metab Eng*. 2008;10:69–77.
12. Flores N, Xiao J, Berry A, Bolívar F, Valle F. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*. 1996;14:620–3.
13. Báez JL, Bolívar F, Gosset G. Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase transport system. *Biotechnol Bioeng*. 2001;73:530–5.
14. Xue Z, McCluskey M, Cantera K, Ben-Bassat A, Sariaslani FS, Huang L. Improved production of p-hydroxycinnamic acid from tyrosine using a novel thermostable phenylalanine/tyrosine ammonia lyase enzyme. *Enzyme Microb Technol*. 2007;42:58–64.
15. Noda S, Miyazaki T, Miyoshi T, Miyake M, Okai N, Tanaka T, et al. Cinnamic acid production using *Streptomyces lividans* expressing phenylalanine ammonia lyase. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011;38:643–8.
16. Vannelli T, Xue Z, Breinig S, Qi WW, Sariaslani FS. Functional expression in *Escherichia coli* of the tyrosine-inducible tyrosine ammonia-lyase enzyme from yeast *Trichosporon cutaneum* for production of p-hydroxycinnamic acid. *Enzyme Microb Technol*. 2007;41:413–22.
17. Watts KT, Lee PC, Schmidt-Dannert C. Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol*. 2006;6:22.
18. Rohde A, Morreel K, Ralph J, Goeminne G, Hostyn V, De Rycke R, et al. Molecular phenotyping of the *pal1* and *pal2* mutants of *Arabidopsis thaliana* reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism. *Plant Cell Online*. 2004;16:2749–71.
19. Cochrane FC, Davin LB, Lewis NG. The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry*. 2004;65:1557–64.
20. Kang S-Y, Choi O, Lee JK, Hwang BY, Uhm T-B, Hong Y-S. Artificial biosynthesis of phenylpropanoic acids in a tyrosine overproducing *Escherichia coli* strain. *Microb Cell Fact*. 2012;11:153.
21. Nijkamp K, van Luijk N, de Bont JM, Wery J. The solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 as host for the production of cinnamic acid from glucose. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;69:170–7.
22. Noda S, Miyazaki T, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. Production of Streptovorticillium cinnamoneum transglutaminase and cinnamic acid by recombinant *Streptomyces lividans* cultured on biomass-derived carbon sources. *Bioresour Technol*. 2012;104:648–51.
23. De Anda R, Lara AR, Hernández V, Hernández-Montalvo V, Gosset G, Bolívar F, et al. 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. *Metab Eng*. 2006;8:281–90.
24. Bachmann BJ. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev*. 1972;36:525–57.
25. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*. 2006;2:2006.0008.
26. Balderas-Hernández VE, Sabido-Ramos A, Silva P, Cabrera-Valladares N, Hernández-Chávez G, Báez-Viveros JL, et al. Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. 2009;8:19.
27. Amann E, Ochs B, Abel K. Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene*. 1988;69:301–15.
28. Caspeta L, Caro-Bermúdez MA, Ponce-Noyola T, Martínez A. Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Appl Energy*. 2014;113:277–86.
29. Hernández-Montalvo V, Martínez A, Hernández-Chavez G, Bolívar F, Valle F, Gosset G. Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnol Bioeng*. 2003;83:687–94.
30. Luedeking R, Piret EL. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *J Biochem Microbiol Technol Eng*. 1959;1:393–412.
31. Kawai Y, Noda S, Ogino C, Takeshima Y, Okai N, Tanaka T, et al. p-Hydroxycinnamic acid production directly from cellulose using endoglucanase- and tyrosine ammonia lyase-expressing *Streptomyces lividans*. *Microb Cell Fact*. 2013;12:45.
32. Hernández-Montalvo V, Valle F, Bolívar F, Gosset G. Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001;57:186–91.
33. McKenna R, Nielsen DR. Styrene biosynthesis from glucose by engineered *Escherichia coli*. *Metab Eng*. 2011;13:544–54.
34. Notley-McRobb L, Death A, Ferenci T. The relationship between external glucose concentration and cAMP levels inside *Escherichia coli*: implications for models of phosphotransferase-mediated regulation of adenylate cyclase. *Microbiology*. 1997;143(Pt 6):1909–18.
35. Sigala JC, Flores S, Flores N, Aguilar C, de Anda R, Gosset G, et al. Acetate metabolism in *Escherichia coli* strains lacking phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system; evidence of carbon recycling strategies and futile cycles. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2009;16:224–35.
36. Zhu L, Cui W, Fang Y, Liu Y, Gao X, Zhou Z. Cloning, expression and characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnol Lett*. 2013;35:751–6.
37. Kleeb AC, Edalat MH, Gamper M, Haugstetter J, Giger L, Neuenschwander M, et al. Metabolic engineering of a genetic selection system with tunable stringency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:13907–12.
38. Van Dyk TK, Templeton LJ, Cantera KA, Sharpe PL, Sariaslani FS. Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve? *J Bact*. 2004;186:7196–204.
39. Qi WW, Vannelli T, Breinig S, Ben-Bassat A, Gatenby A, Haynie SL, et al. Functional expression of prokaryotic and eukaryotic genes in *Escherichia coli* for conversion of glucose to p-hydroxystyrene. *Metab Eng*. 2007;9:268–76.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

