



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**Ingeniería de vías metabólicas para la
producción de tirosina y melanina a
partir de glucosa en *Escherichia coli*.**

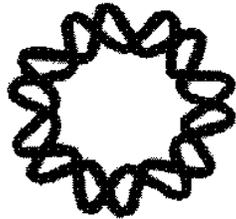
Tesis

Que para obtener el título de
Doctor en Ciencias

Presenta:

I.B.Q María Inés Chávez Béjar

Tutor: Dr. Guillermo Gosset Lagarda



CUERNAVACA, MORELOS

2010



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 se realizó en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología, en la Universidad Nacional Autónoma de México, con la asesoría del Dr. Guillermo Gosset Lagarda.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de CONACYT a través del proyecto D43243-Z, así como las becas para realizar estudios de postgrado del CONACYT y de la DGEP/UNAM.

Jurado

Presidente: Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Secretario: Dr. José Luis Báez Viveros

Vocal: Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos

Suplente: Dr. Néstor Octavio Pérez Ramírez

Suplente: Dr. Guillermo Gosset Lagarda

A Dios, a mis papás y a mis hermanos.

Por su amor, por valorarme, por sus sabios consejos, por enseñarme cómo vivir y a levantarme rápido, por tirar de mis orejas cuando fue necesario, y por estar siempre conmigo a pesar de mí misma. Gracias por enseñarme el valor del trabajo honesto, constante y esmerado.

Agradecimientos

- A mi asesor de tesis, el Dr. Guillermo Gosset Lagarda, por compartir conmigo su experiencia en la investigación y por su esmero en mi formación como investigadora.
- A mi comité tutorial, los Drs. Mario Soberón Chávez, Rodolfo Quintero Ramírez, y Alfredo Martínez Jiménez; por sus aportaciones para lograr los objetivos de mi proyecto de doctorado.
- A los investigadores con quienes colaboré en el desarrollo de mi trabajo experimental, a M.C. Natividad Cabrera, Dr. Joel Osuna, Dr. Alvaro Lara, Dr. Víctor Balderas, Dra. Aida Gutiérrez .
- Por su apoyo técnico y por su amistad; a M.C. Georgina Hernández , a Mercedes Enzaldo y a M.C. Ramón de Anda,.
- A mis sinodales, los Drs. Guadalupe Espín, José Luis Báez, Miguel Ángel Cevallos y Néstor Pérez; por sus valiosos comentarios en la preparación de mi tesis.
- A mis compañeros del laboratorio Bolívar-Gosset y del IBT, por su amistad y por compartir conmigo sus concimientos.
- A mis amigos de Kairós y de Kelaia, especialmente a Josué Reyes y a Mariana Herrera, por su sincera amistad, por su alegría y su cariño.
- A Luis Ramos, por su cariño, apoyo, paciencia, compañía, consejos y por compartir su fé conmigo... y por ayudarme a editar las figuras de mi tesis.
- A mis amigos y amigas de las noches de tubos eppendorf, del karaoke, de la honorable sociedad consumidora de palomitas, de los fines *gourmet* y más: Naty Cabrera, Lidia Leal, Noemix Sirena y Angelito, Chiopillina, Karla Martínez, Marta, Alvaro Lara, Alejandra Vargas, Telmita Pariente, Montse Orencio, Gerardo Huerta, Andrea Sabido, la Chamuca, Estefa Sierra, Luis Fernando Delgadillo, Marina Gómez, Daniela Morales, al malvado Dr. TyrA y a sus secuaces, la L-TIR y la MEL.
- A mis *roomies*, Arlette Mena y Germán Plascencia.

Índice general

página

Índice de figuras

Índice de tablas

I. Resumen

II. Introducción

2.1. Visión general sobre la producción de compuestos aromáticos:
Importancia de la producción de L-TIR y MEL

III. Antecedentes

3.1. Vías metabólicas involucradas en la biosíntesis de L-TIR

3.1.1. Biosíntesis de L-TIR en *E. coli*

3.1.2. Diversidad metabólica en la biosíntesis
de L-TIR

3.2. Familia de proteínas TyrA

3.3. Enzimas bifuncionales involucradas en la biosíntesis de L-
Fenilalanina y L-TIR en *E. coli*

3.3.1. Corismato mutasa-prefenato deshidratasa

3.3.2. Corismato mutasa-prefenato deshidrogenasa

3.4. Ciclohexadienil deshidrogenasa de *Z. mobilis*: un miembro de
la familia TyrA que no es inhibido por L-TIR

3.5. Qué es la IVM y cómo se ha aplicado a la producción de
compuestos aromáticos en *E. coli*

3.5.1. Definición, enfoque y estrategias generales de la
IVM

3.5.2. Modificación de la vía de síntesis de los compuestos
aromáticos

3.5.3. Modificación del metabolismo central para incrementar la
disponibilidad de los precursores de la vía del shiquimato

3.6. Producción de L-TIR en microorganismos

3.7. Melaninas

3.7.1. Las melaninas en la naturaleza

3.7.2 Producción de melaninas

3.8. Justificación

3.9. Hipótesis

IV. Objetivos

4.1. Objetivo general

4.2. Objetivos particulares

V. Materiales y métodos

5.1. Técnicas generales de biología molecular

5.2. Bioinformática

5.3. Procedimientos generales de cultivo

5.4. Cepas bacterianas

5.5. Oligonucleótidos

5.6. Plásmidos

5.6.1. Clonación del gen *tyrA*

5.6.2. Clonación del gen *tyrC* y construcción del operón
tyrCpheA_{CM}

5.6.3. Construcción del plásmido pACM*melAI*

5.6.4. Construcción del plásmido pM*melA**tyrCpheA_{CM}*

5.7. PCR mutagénico y construcción del banco PDH

5.8. Complementación

5.9. Ensayos de actividad PDH y CM

5.10. Electroforesis de proteína

5.11. Cinéticas de producción de L-TIR y melanina

5.11.1. Cultivos en matraz para la producción de L-TIR y
melanina

5.11.2. Cultivos en biorreactor para la producción de L-TIR

5.12. Purificación de MEL

5.13. Métodos analíticos

- 5.13.1. Cuantificación del crecimiento y formación de melanina
- 5.13.2. Cuantificación de L-TIR y L-FEN
- 5.13.3. Cuantificación de glucosa, DHS, SHIK y acetato
- 5.13.4. Espectroscopía de infrarrojo

VI. Resultados

6.1. Sección I: Modificación de la regulación a nivel enzimático de la vía específica de biosíntesis de L-TIR

6.1.1. Mutagénesis del gen *tyrA* y selección de clonas por complementación funcional de variantes activas de la CM-PDH.

6.1.2. Actividades enzimáticas de las enzimas TyrA

6.1.3. Identificación de residuos importantes en la generación de enzimas resistentes no inhibidas por L-TIR

6.1.4. Modelo de la estructura de la CM-PDH

6.1.5. Caracterización inicial del operón *tyrCpheA_{CM}*

6.1.6. Comparación de la producción de L-TIR en matraces entre las diferentes variantes de *tyrA* y el operón *tyrCpheA_{CM}*

6.2. Sección II: Ingeniería metabólica para la sobreproducción de L-TIR en *E.coli*.

6.2.1. Efecto de diversas modificaciones en las vías de síntesis de los compuestos aromáticos, sobre la capacidad de síntesis de L-TIR

6.2.2. Experimentos en biorreactor para la producción de L-TIR empleando las cepas PB12C y PB12CP

6.3. Sección III: Ingeniería metabólica para la producción de MEL a partir de glucosa en *E. coli*

6.3.1. Caracterización en matraces de diversas cepas productoras de MEL desde glucosa

6.3.2. Caracterización de MEL producida por VH33A, VH33D y VH33E

VII. Discusión

7.1. Sección I: Generación y caracterización de variantes de la CM-PDH insensibles a inhibición por L-TIR

7.2. Sección II: Ingeniería metabólica para la sobreproducción de L-TIR en *E. coli*, mediante la expresión de una ciclohexadienil deshidrogenasa y una corismato mutasa.

7.3. Sección III: Ingeniería metabólica para la producción de MEL a partir de glucosa en *E. coli*

VIII. Conclusiones

IX. Perspectivas

X. Referencias

Apéndice I. Abreviaturas empleadas en el texto, en las tablas y las figuras (en orden alfabético).

Apéndice II. Código de una letra para los aminoácidos.

Apéndice III. Publicaciones

Índice de figuras

página

- Figura 1.** Compuestos producidos a partir de la L-TIR.
- Figura 2.** Vía de síntesis de los compuestos aromáticos en *E. coli*.
- Figura 3.** Vías de biosíntesis de L-TIR presentes en la naturaleza.
- Figura 4.** Alineamiento múltiple que compara las diferentes enzimas de la familia proteínas TyrA.
- Figura 5.** Estructura tridimensional de la TyrA_p de *Aquifex aeolicus*.
- Figura 6.** Interacción de los sustratos con el sitio activo de la TyrA_{pAa}.
- Figura 7.** Metabolismo central en *E. coli*.
- Figura 8.** Síntesis de eumelaninas (70).
- Figura 9.** Estructura propuesta de las eumelaninas.
- Figura 10.** Estrategia de evolución dirigida de *tyrA*.
- Figura 11.** Construcción del operón *pTrctyrCpheA_{CM}*
- Figura 12.** Mutagénesis al azar y selección de variantes del gen *tyrA*.
- Figura 13.** Alineamiento múltiple de CM-PDH silvestre y diversas variantes de CM-PDH.
- Figura 14.** Construcción y caracterización del efecto de cada mutación identificada en TyrA84, TyrA130 y TyrA155.
- Figura 15.** Niveles de expresión de mutantes de la CM-PDH generadas por mutagénesis al azar.
- Figura 16.** Niveles de expresión de las mutantes de la CM-PDH generadas por mutagénesis dirigida.
- Figura 17.** Alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas TyrA que han sido cristalizadas en comparación con la CM-PDH
- Figura 18.** Alineamiento de las estructuras secundarias de las proteínas TyrA que han sido cristalizadas en comparación con la CM-PDH
- Figura 19.** Comparación de estructuras cristalográficas de las proteínas TyrA. Modelo de la CM-PDH.

página

- Figura 20.** Modelos de la estructura de TyrA84, TyrA130 y TyrA155.
- Figura 21.** Diagrama que resume las estrategias empleadas en este estudio en la construcción de cepas de *E. coli* sobreproductoras de L-TIR.
- Figura 22.** Complementación de FA114/pTrctyrCpheA_{CM}.
- Figura 23.** Comparación de la producción de L-TIR entre las variantes de la CM-PDH (entre ellas TyrA^{fbr}) y la expresión de TyrA_{cZm} a las 24h de cultivo.
- Figura 24.** Cinética de crecimiento y producción de L-TIR mediante la sobreexpresión de los genes *tyrC* y *pheA_{CM}*.
- Figura 25.** Cinéticas de producción de L-TIR en biorreactor para las cepas PB12C y PB12CP.
- Figura 26.** Comparación de diversos parámetros calculados a partir de los datos generados en biorreactor en la producción de L-TIR.
- Figura 27.** Cultivos en matraz en medio mineral con las cepas W3110 y W3110A para la producción de MEL en medio suplementado con L-TIR y CuSO₄ al inicio del cultivo.
- Figura 28.** Cinética de crecimiento en medio mineral (M9) con glucosa y L-TIR; y M9 con glucosa para W3110F y W3110A.
- Figura 29.** Estrategia de cultivo para la producción de MEL.
- Figura 30.** Cinética de crecimiento y producción de MEL con la cepa W3110A con adición de CuSO₄ a las 16 horas.
- Figura 31.** Cinéticas de producción de MEL a partir de glucosa.
- Figura 32.** Experimentos de producción de L-TIR a partir de glucosa.
- Figura 33.** Comparación de producción de MEL y L-TIR por las cepas caracterizadas en este estudio. Balance de la L-TIR.
- Figura 34.** Espectro de IR de las MEL producidas por las diferentes cepas evaluadas en este estudio.
- Figura 35.** Imágenes de cultivos en matraz con MEL y MEL seca purificada de cultivos con VH33D.

Índice de tablas

página

Tabla 1. Clasificación de las proteínas TyrA en base al sustrato que emplean, dominios catalíticos con los cuales pueden estar fusionadas, y su distribución en la naturaleza.

Tabla 2. Sustratos e inhibidores de algunas proteínas TyrA.

Tabla 3. Trabajos representativos en la producción de L-TIR. Las cepas descritas aquí fueron generadas por métodos clásicos de mutagénesis y por IVM.

Tabla 4. Tipos de melaninas, vías metabólicas empleadas en su síntesis y enzimas involucradas.

Tabla 5. Concentración final de los antibióticos.

Tabla 6. Cepas empleadas en este estudio.

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados en este estudio.

Tabla 8. Plásmidos empleados en este estudio.

Tabla 9. Variantes seleccionadas del banco PDH por complementación funcional

Tabla 10. Actividad específica de PDH determinada en extractos crudos en presencia y en ausencia de 0.6 mM de L-TIR.

Tabla 11. Grupo de variantes secuenciadas del banco PDH seleccionadas por complementación

Tabla 12. Residuos del sitio activo de la TyrA_{pAa}, el residuo equivalente en la CM-PDH se muestra entre paréntesis

Tabla 13. Actividades enzimáticas de TyrA_{cZm} y PheA_{CM} en diferentes concentraciones de L-TIR.

Tabla 14. Clave para las cepas empleadas en la sobreproducción de L-TIR.

Tabla 15. Concentración de L-TIR a las 24 h de cultivo.

Tabla 16. Parámetros cinéticos y estequiométricos en la producción de L-TIR en experimentos en matraz.

Tabla 17. Parámetros cinéticos y estequiométricos para la producción de L-TIR en experimentos en biorreactor con las cepas PB12C y PB12CP.

página

Tabla 18. Clave para las cepas empleadas en la producción de L-TIR y MEL.

Tabla 19. Comparación de μ en cultivos en medio mínimo con 2g/L de glucosa con las cepas W3110F y W3110A

Tabla 20. Parámetros cinéticos y estequiométricos para la producción de MEL en experimentos en medio mínimo con 10 g/L de glucosa, enriquecido con L- TIR con la cepa W3110A.

Tabla 21. Comparación de la producción de L-TIR y MEL en medio mineral con 10 g/L de glucosa. El CuSO_4 se añadió a las 16 h.

I. Resumen

En la construcción de una cepa de *Escherichia coli* sobreproductora de L-TIR, se emplearon dos estrategias para evitar que la L-tirosina (L-TIR) inhiba la actividad de la corismato mutasa-prefenato deshidrogenasa (CM-PDH): la evolución dirigida de proteínas y la biodiversidad. Se obtuvieron tres variantes de la enzima CM-PDH que conservaron el 2, 42 y 62% de actividad en presencia de L-TIR con respecto a la actividad de cada una de las variantes sin L-TIR. Se identificaron las mutaciones responsables de eliminar parcialmente la inhibición por L-TIR en las tres variantes. El análisis de dichas mutaciones en un modelo de la CM-PDH sugiere que F200L y G201D se encuentran en el sitio activo de la CM-PDH, mientras que V346M está localizada en una hélice cercana a un residuo catalítico (R294) involucrado en la unión de los sustratos. Los resultados sugieren que la L-TIR se une al sitio activo de la CM-PDH. Con la expresión de una de las variantes de la CM-PDH llamada TyrA130, se produjo 46% más L-TIR en comparación con la cepa que expresaba la CM-PDH silvestre (cepa llamada PB12A). Por otro lado, la ciclohexadienil deshidrogenasa de *Z. mobilis* (TyrA_{cZm}), al igual que la CM-PDH, participa en la biosíntesis de L-TIR, pero su actividad no es inhibida por la L-TIR. Se demostró que con la expresión del gen que codifica a TyrA_{cZm}, se acumuló 4.1 veces más L-TIR en comparación con PB12A. Por otro lado, con la expresión simultánea de TyrA_{cZm} y una corismato mutasa, se acumuló 22% más L-TIR en comparación con la L-TIR que produjo la cepa que expresaba la variante TyrA130. Una vez que se eliminó el control negativo de la L-TIR sobre su vía de síntesis, para mejorar la producción de L-TIR se incrementó el flujo de carbono dirigido a su vía de síntesis mediante diferentes modificaciones en el metabolismo central y la vía de síntesis de los compuestos aromáticos. De tal manera que en una cepa de *E. coli* modificada para la sobreproducción de L-TIR, fue posible la producción de melanina (MEL) por la expresión de un gen que codifica para una tirosinasa. En matraces, en la mejor cepa productora de MEL se convirtió el 30% de la L-TIR en MEL, y produjo 263 mg/L de MEL. De tal manera que mediante la modificación racional del metabolismo de *E. coli* fue posible la producción de L-TIR y MEL en medio mineral con glucosa como única fuente de carbono.

II. *Introducción*

2.1. Visión general sobre la producción de compuestos aromáticos. Importancia de la producción de L-TIR y MEL

La biotecnología, en un sentido amplio, ha sido empleada por el hombre desde la antigüedad. El término se acuñó recientemente, pero involucra el uso ya conocido de las fermentaciones y las enzimas en la obtención de aminoácidos, antibióticos y ácidos orgánicos. Los productos obtenidos por fermentación se basan en la conversión de azúcares a productos de interés llevada a cabo por un organismo vivo o un extracto enzimático. El desarrollo de la ingeniería genética, los bioprocesos, la genómica y la ingeniería de vías metabólicas (por mencionar algunas disciplinas), ha influenciado profundamente la biotecnología, y han hecho posible el desarrollo de procesos biotecnológicos a escala industrial, con altos rendimientos y elevadas productividades volumétricas. Ahora, estas herramientas están disponibles para las células vegetales, animales, e incluso para el uso de animales y plantas transgénicas como hospederos, y han hecho posible la obtención de productos sofisticados .

Los compuestos aromáticos son un ejemplo de la producción de químicos utilizando microorganismos. Mediante la optimización de las rutas metabólica y la creación de nuevas vías con la expresión de genes heterólogos; ha sido posible producir diferentes compuestos como los aminoácidos aromáticos (AAA), el índigo, los fenilpropanoides, el ácido adípico y el catecol (7, 16).

La producción de L-tirosina (L-TIR) ha recibido menor atención que la de los otros dos aminoácidos aromáticos, probablemente por motivos económicos. El mercado mundial de la L-TIR es menor que el mercado del L-triptofano (L-TRP) y la L-fenilalanina (L-FEN). Según datos del año 2006, se producen alrededor de 200 toneladas de L-TIR por año (82). La L-TIR se emplea como materia prima en la síntesis de productos farmacéuticos, como la L-DOPA, útil para el tratamiento del mal del Parkinson (7); y en la producción de derivados de la N-(2-benzoilfenil)-L-Tirosina, que podría ser usado en el tratamiento de la diabetes (40). La L-TIR se utiliza en la síntesis química de

policarbonatos y poliarilatos, polímeros biodegradables con aplicación en la ingeniería de tejidos (10). También es posible producir diversos compuestos derivados de la ruta de los fenilpropanoides, como el cinamaldehído, que ayuda a controlar la concentración de glucosa en la sangre (78, 83). Recientemente, debido a estas y otras aplicaciones, la producción de L-TIR empleando bacterias modificadas genéticamente, ha tomado relevancia y se han publicado y patentado diversos trabajos relacionados con la producción de este aminoácido y compuestos derivados de la L-TIR (Figura 1) (17, 59, 64, 68, 86).

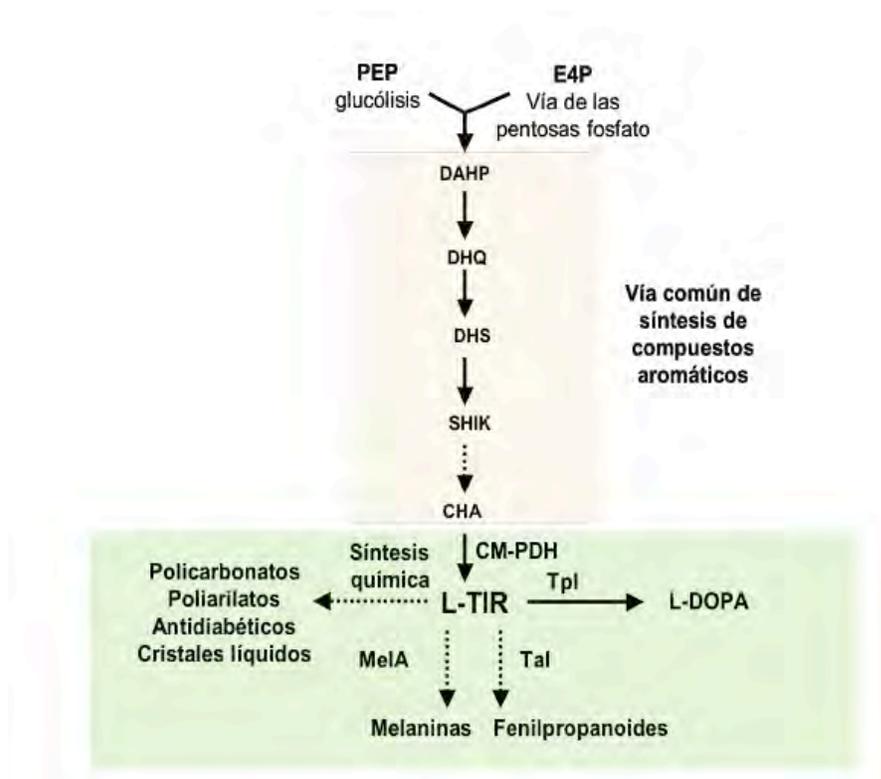


Figura 1. Biosíntesis de L-TIR en *E.coli* y síntesis de compuestos derivados mediante el uso de vías heterólogas o síntesis química. Las líneas punteadas representan dos o más reacciones (Ver Apéndice 1 para el significado de las abreviaturas).

La L-TIR es posible producirla a través de tres procesos: puede obtenerse en cultivos en biorreactor con bacterias como *Corynebacterium glutamicum* (45), a través de procesos enzimáticos mediante el uso de la tirosina fenol liasa (65) o a través de su extracción de hidrolizados de proteínas (56).

La biosíntesis de L-TIR es costosa para la célula, ya que involucra directamente al menos 9 reacciones enzimáticas, con el gasto de fosfoenolpiruvato (PEP), eritrosa-4-fosfato (E4P), glutamato, NAD^+ , NADP^+ y ATP. Por esta razón, en distintos organismos se desarrollaron mecanismos de regulación que le permiten producir solo la cantidad necesaria para la biosíntesis de proteínas y otros metabolitos esenciales para su desarrollo, por lo cual no es posible encontrar bacterias que normalmente sobreproducen L-TIR y que la excreten al medio de cultivo. Por lo tanto, las modificaciones iniciales en la construcción de microorganismos que sobreproducen L-TIR son eliminar los mecanismos de control de la vía. Antiguamente, el conocimiento que se tenía sobre las vías metabólicas era limitado, por esta razón, las primeras cepas sobreproductoras de L-TIR se generaron por mutagénesis generalizada (mediante agentes físicos y químicos) y se seleccionaron con análogos tóxicos de los AAA (37, 45, 47). Recientemente, con la aparición de la ingeniería de vías metabólicas (IVM), el desarrollo de diversas técnicas de ingeniería genética y de evolución dirigida de proteínas, ha sido posible el diseño racional de microorganismos que sobreproducen este aminoácido (17, 59, 64, 68, 86).

Las melaninas (MEL), un polímero producido a partir de la L-TIR, son un grupo de pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza, ya que es posible encontrarlas en los animales, hongos, bacterias y plantas (41). Las eumelaninas, pigmentos de color café-negro, son las MEL producidas a partir de L-TIR como resultado de la actividad de enzimas como las tirosinasas. Por ejemplo, el color de la piel es el resultado de la producción de dos clases de MEL: las eumelaninas y las feomelaninas. Estos compuestos se purifican a partir de tejidos de plantas y animales. También es posible producirlas usando bacterias que la sintetizan naturalmente, o con bacterias recombinantes, en procesos que involucran el uso de L-TIR exógena. Debido a su estructura química, las MEL tienen propiedades fisicoquímicas que les permite ser usadas como resinas de intercambio iónico, semiconductores y en la generación de electricidad. Estas y otras aplicaciones hacen que la construcción de cepas que producen MEL, sean un blanco interesante para su producción a gran escala.

En este estudio, en la construcción de una cepa sobreproductora de L-TIR, se emplearon dos estrategias, el uso de la biodiversidad y la ingeniería de proteínas, para eliminar el

control negativo que tiene la L-TIR en su vía terminal de biosíntesis. Se incrementó el flujo de carbono dirigido hacia la vía específica de biosíntesis de L-TIR mediante diferentes modificaciones en el metabolismo central y la vía de síntesis de los compuestos aromáticos. De tal manera que en una cepa de *E. coli* modificada para la sobreproducción de L-TIR, fué posible la producción de MEL por la expresión de un gen que codifica para una tirosinasa, creciendo a *E. coli* en medio mineral con glucosa como única fuente de carbono.

III. Antecedentes

3.1. Vías metabólicas involucradas en la biosíntesis de L-TIR

3.1.1. Biosíntesis de L-TIR en *E. coli*

La vía común de síntesis de los compuestos aromáticos, también llamada la vía del shiquimato (VSHIK), inicia con la condensación del fosfoenolpiruvato (PEP) y la eritrosa-4-fosfato (E4P), para producir el 3-deoxy-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP) en una reacción catalizada por la enzima DAHP sintasa (DAHPS). Después de siete reacciones enzimáticas, se produce el corismato (CHA). A partir de CHA inician las vías terminales de síntesis de cada uno de los AAA. En *E. coli* existen tres isoenzimas DAHPS, codificadas por los genes *aroG*, *aroF* y *aroH*; que son inhibidas alostéricamente por L-FEN, L-TIR y L-TRP, respectivamente. Así mismo, la L-TIR inhibe la actividad de la enzima deshidroquinato sintasa (DHQS), que cataliza la conversión del DAHP en ácido deshidroquinico (DHQ) (4) (Figura 2).

La enzima bifuncional corismato mutasa-prefenato deshidrogenasa (CM-PDH), codificada por el gen *tyrA*, interviene en la etapa final de la biosíntesis de L-TIR. La reacción inicial involucra la conversión del CHA en prefenato (PPA) por la corismato mutasa (CM). Posteriormente, el PPA es sustrato de la prefenato deshidrogenasa (PDH), la cual descarboxila y oxida al PPA en 4-hidroxifenilpiruvato (HPP) empleando NAD^+ . La conversión del HPP en L-TIR la cataliza la aminotransferasa de L-TIR, codificada por el

gen *tyrB*. La L-TIR controla su vía terminal de síntesis inhibiendo la actividad de la CM-PDH.

E. coli transporta la L-TIR al interior de la célula mediante dos sistemas, una permeasa que transporta los tres aminoácidos aromáticos (transporte general de aminoácidos aromáticos) y que es codificada por el gen *aroP*; y un transportador específico de L-TIR, codificado por el gen *tyrP*. Es difícil justificar la razón por la cual *E. coli* debería tener un sistema para exportar AAA, ya que tiene bien regulada su biosíntesis. Se ha propuesto que el exporte de AAA podría ocurrir de dos maneras distintas, 1) mediado por el producto del gen *aroP*, ya que mutantes en este gen acumulan una menor cantidad de aminoácidos en el medio (12). 2) Recientemente se determinó que el gen *yddG* codifica para una proteína que funciona como un exportador de AAA, ya que la sobreexpresión de *yddG* en *E. coli* incrementó la acumulación de aminoácidos AAA en el medio de cultivo. Sin embargo no se tiene la certeza que ésta sea la función fisiológica de YddG en *E. coli* (29).

Además del control que ejercen los aminoácidos sobre algunas enzimas de la vía, la expresión de varios genes de la vía de síntesis de los compuestos aromáticos es regulada por atenuación y por represión. La proteína TyrR puede activar o inhibir la expresión de genes de dicha vía mediante el reconocimiento de secuencias específicas en el DNA llamadas cajas TyrR. En presencia de ATP y L-TIR (o elevadas concentraciones de L-FEN y L-TRP), TyrR forma hexámeros y reprime la expresión de los genes *tyrP*, *aroP*, *tyrB*, *aroL* y el operón *aroFtyrA*. También reprime la expresión de los genes *aroG*, *tyrR*, *aroF*, *aroL*, *tyrP* en un mecanismo independiente de la interacción de TyrR con alguno de los tres AAA. Por otro lado, la expresión de *aroP* se activa por TyrR en presencia de cualquiera de los tres aminoácidos, mientras que *tyrP* se activa en presencia de L-FEN y L-TRP. Sin embargo, la represión de la expresión de *aroP* y *tyrP* por L-TIR es el fenotipo dominante (69).

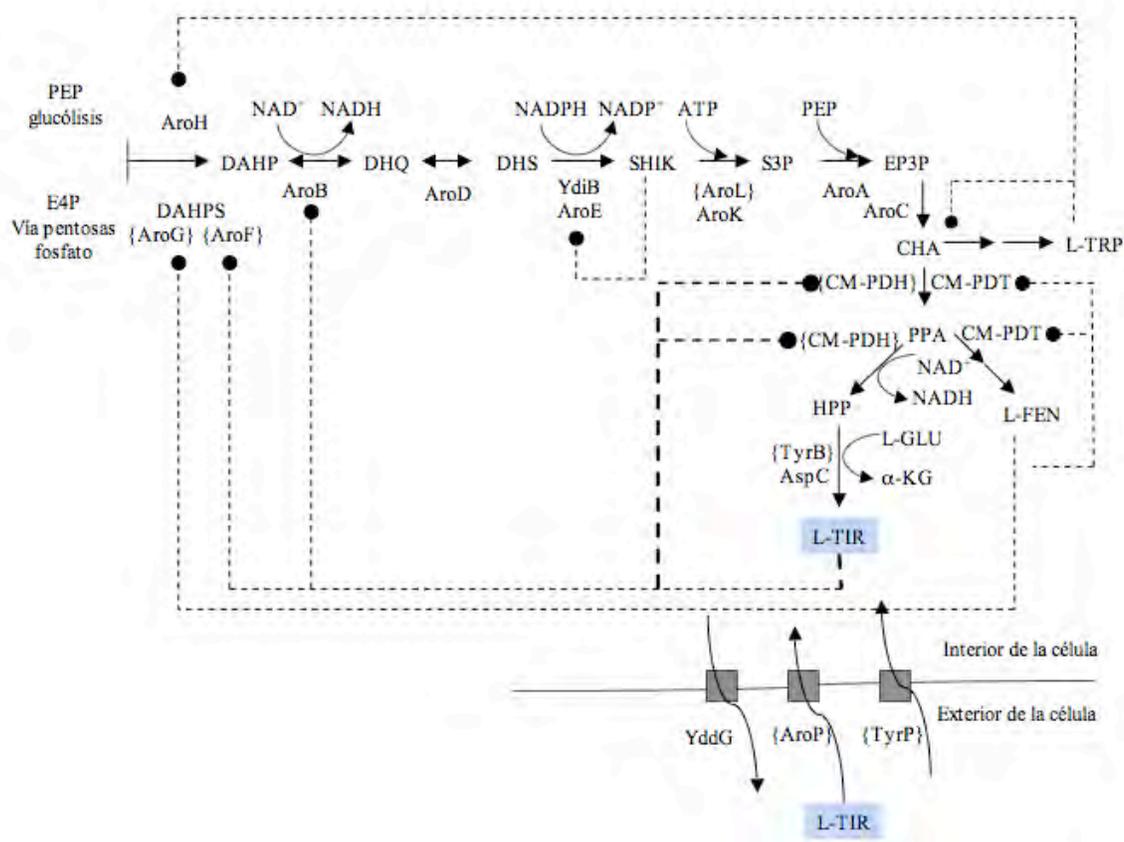


Figura 2. Vía de síntesis de los compuestos aromáticos en *E. coli*. En la figura solo se detallan las reacciones de biosíntesis y transporte de L-TIR. ● Indica inhibición de la enzima por el correspondiente AAA. Solo AroE se inhibe por SHIK. {} indica que los genes que codifican dichas enzimas son miembros del regulón TyrR. El significado de las abreviaturas se encuentra en el Apéndice I

3.1.2. Diversidad metabólica en la biosíntesis de L-Tirosina

La vía de síntesis de los compuestos aromáticos es posible encontrarla en organismos como bacterias, plantas y hongos. *E. coli* utiliza esta vía solo para producir metabolitos primarios como los tres AAA empleados en la síntesis de proteínas; y los ácidos *p*-aminobenzoico, *p*-hidroxibenzoico y 2,3-dihidroxibenzoico; precursores de compuestos esenciales como la enteroquelina y el ácido fólico. Sin embargo, otros organismos utilizan esta vía para la biosíntesis de una gran variedad de metabolitos secundarios: antibióticos como el cloranfenicol en *Streptomyces* sp.; fenilpropanoides, como la lignina; y alcaloides, como la morfina; los dos últimos producidos por las plantas.

Los mamíferos, como el hombre, no tienen esta vía por lo que deben obtener la L-FEN y el L-TRP de los alimentos (39).

La vía de síntesis de los compuestos aromáticos comprende siete reacciones desde la conversión del PEP y la E4P en CHA. Las vías específicas de síntesis de los AAA y otros compuestos aromáticos inician con la conversión del CHA en un intermediario de alguna de las vías (Figura 2).

Las reacciones de la vía común se han conservado entre los diferentes organismos, y es posible identificar diferencias a nivel de genes, enzimas, y de la regulación a nivel transcripcional y enzimática. Por ejemplo, organismos como *Neurospora crassa*, *Sacharomyces cerevisiae*, y *Aspergillus niger* cuentan con el complejo multienzimático *arom*, que es una sola cadena polipeptídica que cataliza 5 reacciones de la vía común (39). Mientras que en organismos como *E. coli*, cada reacción de la vía común se cataliza por una proteína distinta. También hay diferencias en la regulación de la vía. *E. coli* cuenta con tres isoenzimas DAHPS, inhibidas alostéricamente por cada uno de los AAA. En contraste, *Corynebacterium glutamicum*, tiene dos isoenzimas DAHPS, una de ellas se inhibe por L-FEN y L-TIR (39).

En la naturaleza existen dos rutas específicas de biosíntesis de L-TIR: las cianobacterias y las plantas convierten el PPA en L-arogenato (L-AGN) mediante una reacción de transaminación. La L-TIR se sintetiza a partir de L-AGN en una reacción catalizada por una arogenato deshidrogenasa (TyrA_a). Organismos como las enterobacterias, convierten el PPA en HPP mediante la enzima pafenato deshidrogenasa (TyrA_p). Posteriormente, el HPP se convierte a L-TIR por una aminotransferasa. En organismos como *Pseudomonas aeruginosa*, coexisten ambas rutas, debido a que cuentan con la enzima TyrA_c que convierte el PPA en HPP, o el L-AGN en L-TIR (8). Sin embargo, no se tiene la certeza de que ambas vías estén activas en estos organismos (Figura 3).

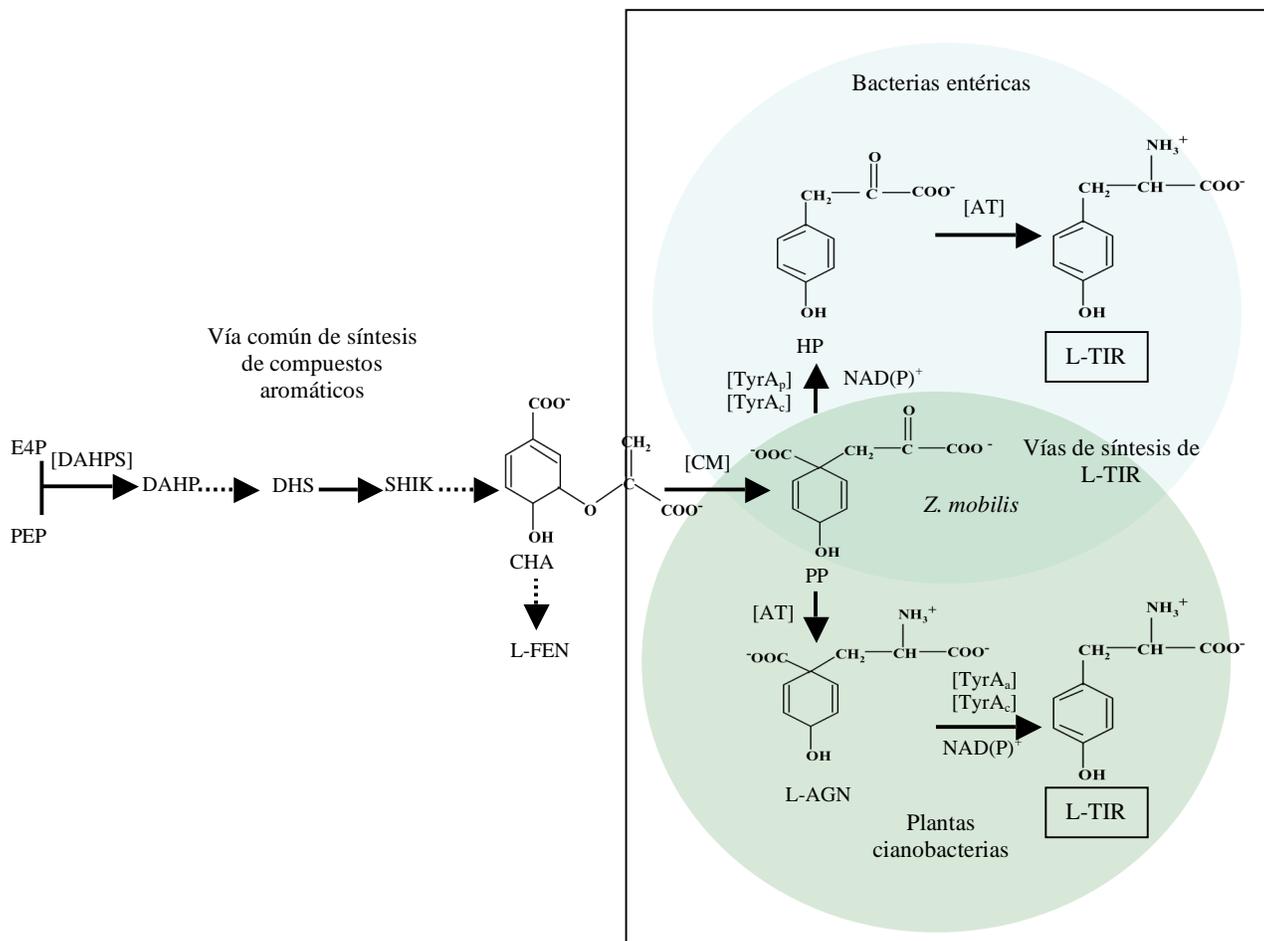


Figura 3. Vías de biosíntesis de L-TIR presentes en la naturaleza. (Ver Apéndice I para el significado de las abreviaturas).

3.2. Familia de proteínas TyrA

El dominio PDH de la enzima CM-PDH de *E. coli* pertenece a la familia de proteínas TyrA, que comprende al grupo de deshidrogenasas que participan en la biosíntesis de L-TIR. Estas enzimas emplean como sustrato L-AGN, PPA o ambos. Dependiendo del sustrato que utilicen se les clasifica como arogenato deshidrogenasas (TyrA_a), prefenato deshidrogenasas (TyrA_p) y ciclohexadienil deshidrogenasas (TyrA_c), respectivamente. Estas enzimas también se diferencian por el dinucleótido que pueden unir, que puede ser

NAD^+ , NADP^+ , o ambos. Se ha observado que generalmente las enzimas específicas en el uso de PPA, requieren específicamente NAD^+ , y que las enzimas que emplean L-AGN, que es más positivo, generalmente emplean NADP^+ (8) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las enzimas TyrA en base al sustrato que emplean, dominios catalíticos con los cuales pueden estar fusionadas, y su distribución en la naturaleza.

Símbolo	Nombre común	Sustrato	Cosustrato	Otros dominios catalíticos	Distribución en la naturaleza
TyrA _p	Prefenato deshidrogenasa	PPA	NAD^+	ACT	gram positivas
			NADP^+		
			NAD^+ , NADP^+	ACT	<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6
TyrA _a	Arogenato deshidrogenasa	L-AGN	NAD^+		Actinobacterias
			NADP^+		Plantas, cianobacterias
			NAD^+ , NADP^+		Actinobacterias
TyrA _c	Ciclohexadienil deshidrogenasa	PPA, L-AGN	NAD^+	ACT ES3P Sintasa	bacterias división gamma superior
			NADP^+		Acinetobacter
			NAD^+ , NADP^+		bacterias división beta
TyrA _{Λc} (1)		PPA (3)	NAD^+	CM	enterobacterias
TyrA _x (2)		X	NAD^+	CM, REG, PheA, ACT	Archaea
			NADP^+	HisH _b	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1

(1) En comparación con las TyrA monofuncionales estas enzimas no tienen varios segmentos de aminoácidos en el interior del dominio TyrA. (2) X significa que no se conoce cuál de los sustratos utilizan estas enzimas. (3) tienen una marcada preferencia por PPA, aunque pueden utilizar L-AGN (ver el significado de las abreviaturas en el apéndice I).

Los diferentes miembros de la familia también presentan diferencias en la sensibilidad a distintos inhibidores, como ocurre con la TyrA_c de *Z. mobilis* (TyrA_{cZm}), la cual no se inhibe por L-TIR, en contraste con la TyrA_c de *Pseudomonas stutzeri* que se inhibe por HPP y L-TIR. Es así que se ha determinado que las TyrA_p son inhibidas por L-TIR, y que las TyrA_a, al igual que las TyrA_c, pueden o no ser inhibidas por L-TIR (Tabla 2). El mecanismo de inhibición de las proteínas TyrA que han sido caracterizadas es competitivo

y la diferencia en la sensibilidad ante distintos inhibidores podría deberse a los diferentes motivos en la estructura de los inhibidores que son esenciales en la unión al sitio activo. En el caso de TyrA_{cZm} esta enzima requiere de la presencia de un grupo carboxilo en la posición 1 del anillo del sustrato para interactuar con la enzima, sustituyente que no está presente en la molécula de la L-TIR (91). Por otro lado, algunas de las proteínas de la familia TyrA tienen una extensión en el C-terminal, que en el caso de las *archeas*, corresponde a un probable dominio de regulación alostérica denominado REG. Proteínas como la TyrA_p de *Bacillus subtilis*, tienen un dominio ACT, que es un dominio de regulación alostérica presente en varias enzimas como la acetolactato sintasa, corismato mutasa-prefenato deshidratasa, y la fenilalanina hidroxilasa (81).

Tabla 2. Sustratos e inhibidores de algunas proteínas TyrA (81).

Organismo	Sustrato	Cosustrato	Inhibidor
<i>Synechocystis</i> sp.	L-AGN	NADP ⁺	L-TIR
<i>Arabidopsis thaliana</i>	L-AGN	NADP ⁺	L-TIR
<i>Nitrosomonas europaea</i>	L-AGN	NADP ⁺	No tiene inhibidor
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	L-AGN	NAD ⁺ o NADP ⁺	No tiene inhibidor
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PPA (1)	NAD ⁺	HPP
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	PPA y L-AGN	NAD ⁺	HPP y L-TIR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PPA y L-AGN	NAD ⁺	HPP y L-TIR
<i>Zymomonas mobilis</i>	PPA y L-AGN	NAD ⁺	No tiene inhibidor

(1) Esta TyrA_c tiene una marcada preferencia por PPA.

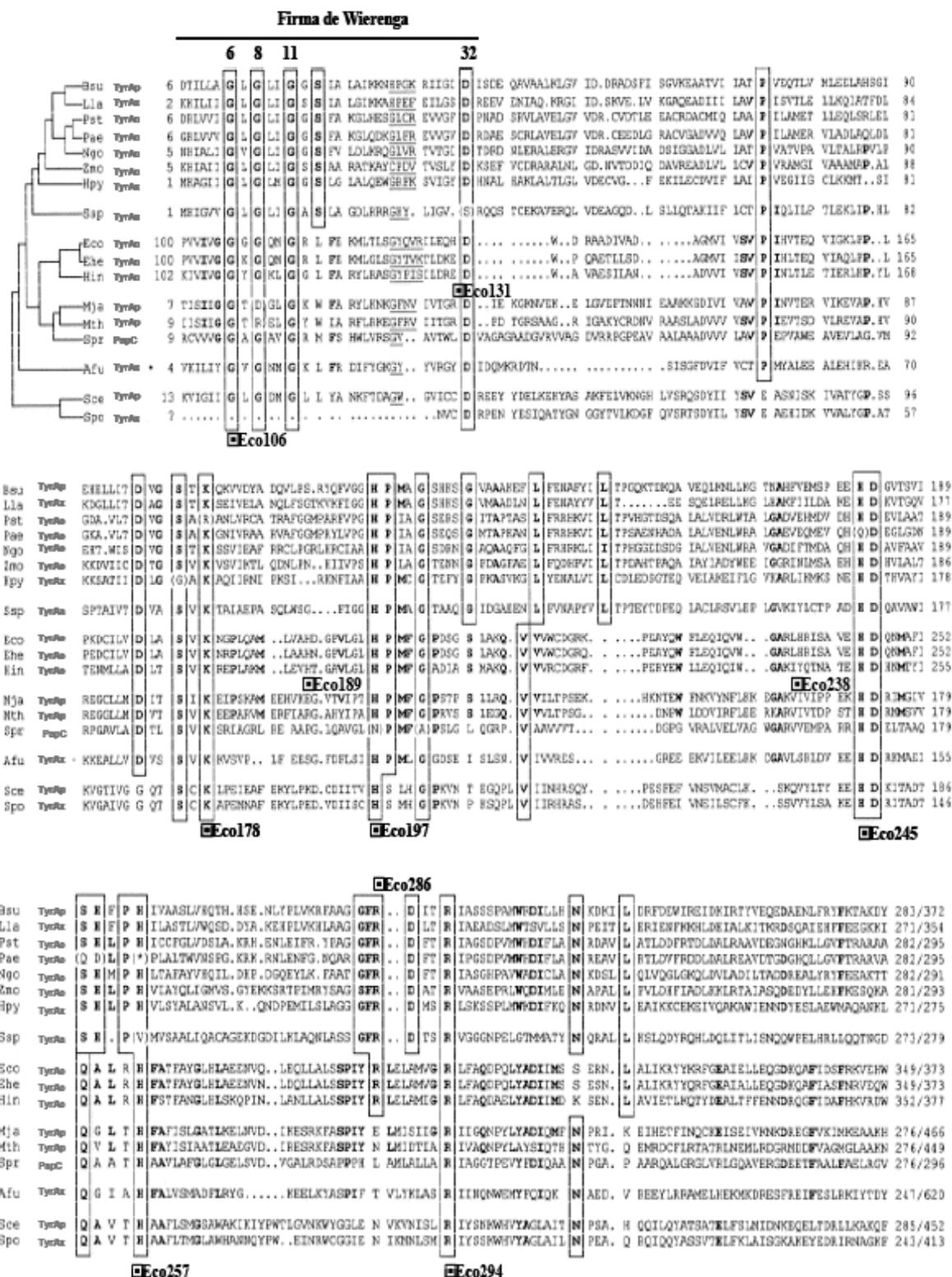


Figure 4 (Ver siguiente página)

Figura 4. Alineamiento múltiple que compara las diferentes enzimas de la familia proteínas TyrA. Bsu, *B.subtilis*; Lla, *Lactococcus lactis*; Pst, *P. Stutzeri*; Pae, *P. Aeruginosa*, Ngo, *Neisseria gonorrhoeae*; Zmo, *Z.mobilis*; Hpy, *Helicobacter pylori*; Ssp, *Synechocystis* sp; Eco, *E. coli*; Ehe, *Erwinia herbicola*; Hin, *Haemophilus influenzae*; Mja, *Methanococcus jannaschii*; Mth, *Methanobacterium thermoautotrophicum*; Spr, *Streptomyces pristubaespirakis*; Afu, *Archaeoglobus fulgidus*; Sce, *Saccharomyces cerevisiae*; Spo, *Schizosaccharomyces pombe*. TyrAx, TyrA con especificidad por el sustrato desconocida, PapC, 4-amino-4-deoxyprehenato deshidrogenasa. Los residuos muy conservados entre las proteínas TyrA están encerrados en rectángulos, residuos conservados solo en un grupo particular de proteínas están resaltados en negritas. □ residuos mutagenizados en la CM/PDH de *E. coli* (91).

Además de los dominios de regulación ACT y REG, se ha encontrado que en la naturaleza las proteínas de esta familia pueden estar fusionadas a otros dominios catalíticos, tales como CM y DAHPS (81) (Tabla 1).

El núcleo catalítico de las proteínas TyrA consta de 180 aminoácidos, tamaño definido por las proteínas TyrA_c y TyrA_a, que no están fusionadas a un dominio catalítico y/o de regulación. Esta región representa el módulo básico de las proteínas TyrA necesario para catalizar las reacciones de conversión del PPA en HPP y del L-AGN en L-TIR (Figura 4), el cual no está muy conservado, ya que comparte entre las diferentes proteínas alrededor de un 20% de identidad. El dominio de unión a dinucleótido es una región rica en glicinas, localizado en el N-terminal de estas proteínas, y que se identifica por la presencia del motivo GxGxxG conocido como firma de Wierenga, con un plegamiento βαβ, llamado plegamiento de Rossmann, que ha sido bien caracterizado entre las deshidrogenasas. Puesto que la CM-PDH de *E. coli*, por estar fusionada a la CM, la primera glicina de la firma se encuentra situada en el aminoácido 106 correspondiente a la región N-terminal de la PDH. La posición 32 de la firma permite predecir el nucleótido que se unirá a la proteína. Cuando se une el NAD⁺, la posición la ocupa un residuo con carga negativa (aspartato o glutamato). Debido a la carga negativa extra del NADP⁺, en proteínas que unen ambos cofactores la posición 32 la ocupa una asparagina; sin embargo, no existe un motivo claro en la secuencia que permita predecir cuando la enzima puede unir ambos dinucleótidos (81). En la secuencia de aminoácidos de las proteínas TyrA no se observa un patrón claro que permita determinar tanto la especificidad de la enzima por algún sustrato, como la presencia o ausencia de inhibición por cierto metabolito.

Además del dominio de unión a dinucleótido, las proteínas TyrA comparten algunos residuos conservados (Figura 4). Entre ellos (en numeración de la CM-PDH *E.*

coli), se encuentra la H197 que interacciona con el OH del C-4 del PPA es lo que facilita la transferencia del hidruro al NAD^+ (19); y la R294 que participa en la unión del PPA (19). Las mutaciones en los residuos K178 y R286 afectan severamente la actividad de la CM-PDH, por lo que estos aminoácidos son importantes en la catálisis. Existen varias histidinas que están conservadas en las proteínas TyrA, las mutaciones en las posiciones H189, H238, H245 de la enzima de *E. coli* afectan la actividad CM, mientras que el cambio en la H131 prácticamente no modifica la actividad de la CM-PDH (19, 21).

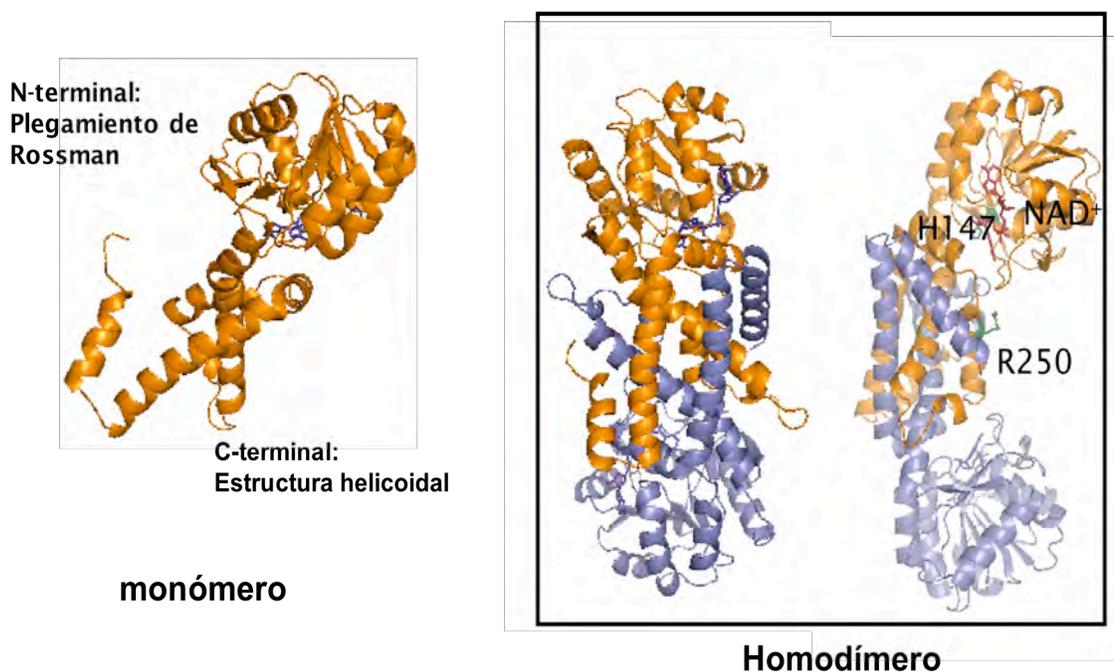


Figura 5. Estructura tridimensional de la TyrA_p de *Aquifex aeolicus*. Los residuos H145 y R250 de la TyrA_p de *A. aeolicus*, se ha demostrado que en la enzima de *E. coli* son residuos importantes para la catálisis(85).

Durante la realización de este estudio se reportaron las estructuras cristalográficas de una TyrA_p de la bacteria hipertermófila *Aquifex aeolicus* (9, 84, 85) (Figura 5), de una TyrA_a de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 (55), de la TyrA_p de *Haemophilus influenzae* (JCSG, depositada en el PDB 22-agosto-2007), y la TyrA_p de *Streptococcus termophilus* (Zhang, Z. *et al.* depositada en el PDB 12-agosto-2008). La CM-PDH de *E. coli* no ha sido cristalizada.

Estas enzimas son homodímeros, en donde cada monómero consta de dos dominios, el N-terminal con un plegamiento tipo Rossmann, que es característico de las enzimas que unen dinucleótidos. El dominio C-terminal consta solo de α -hélices las cuales interaccionan con las α -hélices del otro monómero para formar el dímero, formando un eje central. El N-terminal de cada subunidad se localiza en los extremos opuestos del dímero. Ambos monómeros contribuyen en la formación del sitio activo, (Figura 5), que está formado por tres regiones: 1) iónica, 2) hidrofóbica, y 3) polar (Tabla 12). En la Figura 6 se muestran los residuos en el sitio activo de la TyrA_{pAa} que interaccionan con la L-TIR, el PPA, HPP (84). En numeración de TyrA_{pAa}, la región iónica interactúa con el OH del C-4 del PPA (Figura 6), a través de residuos como la H147 y S126. Este residuo polariza al PPA y facilita la transferencia del hidruro del PPA al NAD⁺. La S126 participa en una red de puentes de hidrógeno entre la H147, NAD⁺ y una molécula de H₂O. El OH unido al C-4 es un motivo estructural común entre el PPA, el HPP la L-TIR. El carboxilato y la cadena piruvil unidas al C-1 del PPA se encuentran en un ambiente polar. El grupo guanidino de la R250 interacciona con ambos grupos. La R250, forma puentes de hidrógeno con la G153 de una subunidad, y con la L246 y N247 de la otra subunidad. Se propone que estas interacciones modulan la entrada del PPA al sitio activo (Figura 6) (85). El grupo ceto del HPP forma parte de una serie de puentes de hidrógeno entre la G244, H217, S254 y una molécula de agua (Figura 6). El grupo amino de la L-TIR se sitúa del lado opuesto al grupo ceto del HPP, de tal manera que queda lejos de la H217 y la G244 (Figura 6). Si se sobrelapan el HPP y la L-TIR en el sitio activo de la TyrA_{pAa}, es posible observar que la cadena unida al C1 de los ligandos toma una conformación distinta dependiendo de la presencia de un grupo ceto o un grupo amino (Figura 6). Sustituciones en la H217 por A o N generan mutantes insensibles a inhibición por L-TIR de TyrA_{pAa}(84). En este trabajo se propone que los residuos alrededor de la H217 determinan la unión de los sustratos a la enzima.

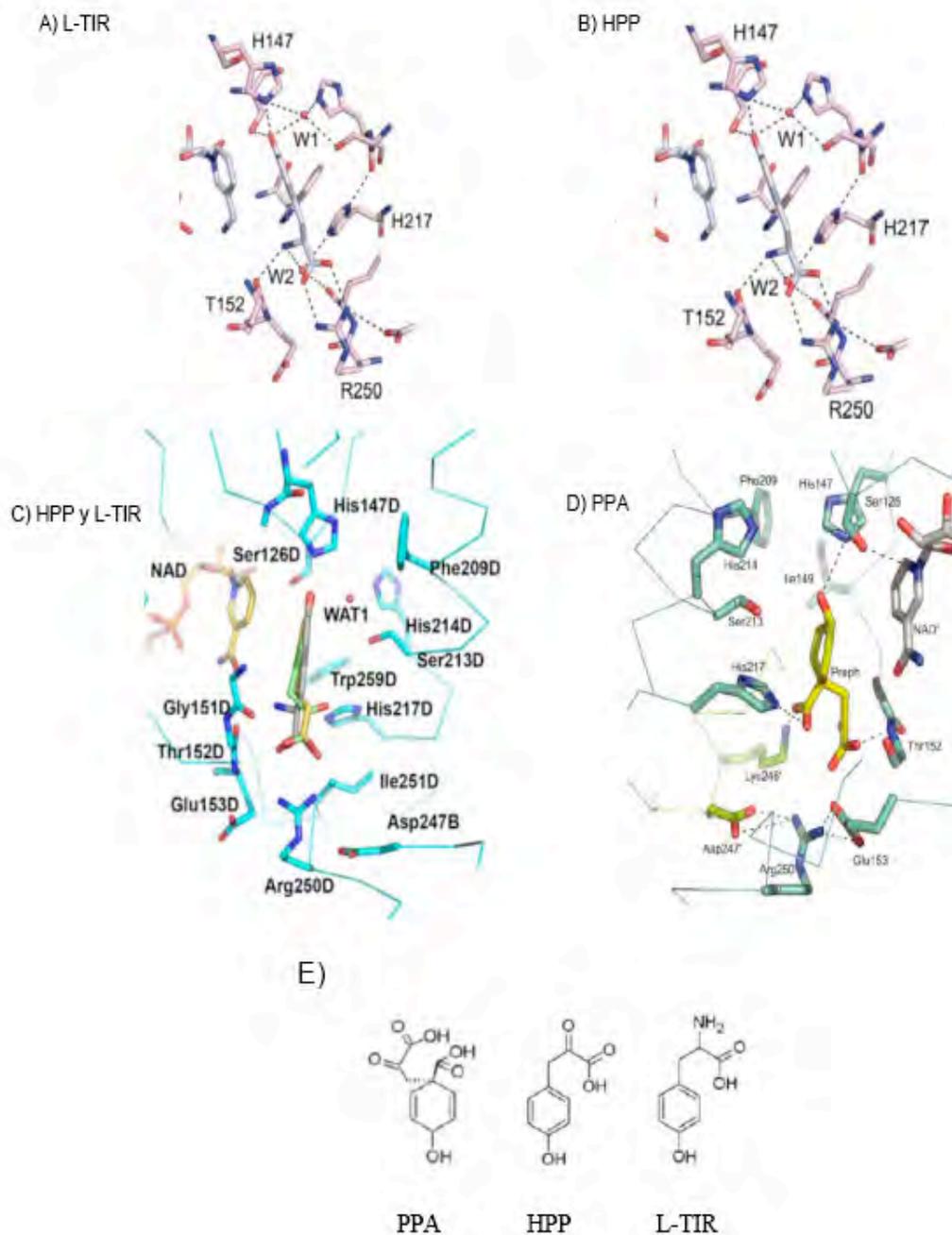


Figura 6. Interacción de los sustratos con el sitio activo de la $Tyra_{pAa}$. A) Residuos en contacto con la L-TIR B) HPP en el sitio activo C) comparación de la forma en la que la L-TIR y el HPP se unen al sitio activo D) El PPA fue modelado en el sitio activo de la enzima, las otras figuras provienen de cristales de $Tyra_{pAa}$ generados en presencia de L-TIR y HPP (84, 85). E) estructura química de la L-TIR, PPA y HPP.

3.3 *Enzimas bifuncionales involucradas en la biosíntesis de L-tirosina y de L-Fenilalanina en E. coli*

3.3.1. Corismato mutasa-prefenato deshidratasa

Las vías terminales de la biosíntesis de L-TIR y de L-FEN inician con la conversión del CHA en PPA, la reacción es catalizada por la CM. Para la biosíntesis de L-FEN, la prefenato deshidratasa (PDT) convierte el PPA en fenilpiruvato, mientras que en la biosíntesis de L-TIR, se produce HPP a partir de PPA. En *E. coli*, las dos reacciones involucradas en la conversión de CHA en PPA, y del PPA en fenilpiruvato es catalizada por una enzima bifuncional: la corismato mutasa-prefenato deshidratasa (CM-PDT), codificada por el gen *pheA*. Para modular la cantidad de L-FEN producida, esta enzima se inhibe por L-FEN (Figura 2). Al igual que con la L-TIR, existen rutas alternativas en la biosíntesis de L-FEN que no se discutirán en este texto.

La CM-PDT es un homodímero, cada subunidad tiene un peso molecular aproximado de 43 000 Da. La L-FEN es el inhibidor de la enzima, ya que abate el 90% de la actividad PDT, y el 55% de la actividad de la CM. Mediante ingeniería genética se han expresado varios fragmentos de esta enzima con diferentes longitudes. En este estudio se determinó que proteínas que abarcaban los residuos 1-285 y 1-300 tenían las actividades CM y PDT, y ambas actividades no eran inhibidas por L-FEN. Los polipéptidos que comprendían los residuos 101 a 300 retenían actividad PDT, y no tuvieron actividad de CM. Por otro lado, se demostró que los residuos 286 al 386 eran importantes para la unión de la L-FEN en la CM-PDT silvestre. De aquí se concluyó que el dominio CM está localizado en los residuos 1-109, el dominio PDT comprende los residuos 101-285; y que el dominio de regulación (R) abarca los aminoácidos 286-386. Los tres dominios es posible expresarlos de manera independiente, obteniéndose enzimas activas (92). Estudios posteriores demostraron que dos regiones muy conservadas, GALV (residuos 309 a 312) y ESRP (residuos 329 al 332) estaban involucrados en la unión de la L-FEN y la inhibición de la CM-PDT (71). Por otro lado, en otro estudio se expresó solo el dominio CM de esta enzima (residuos 1-109), o fusionado al dominio R de la CM-PDT, y se analizó el efecto

de la L-FEN sobre la actividad de estas proteínas. Se determinó que el dominio CM se activó en presencia de L-FEN, mientras que la proteína que constaba de los dominios CM y R fue inhibida por L-FEN (93).

La posibilidad de obtener versiones no inhibidas por L-FEN de la CM-PDT expresando variantes de esta enzima que abarcaron solo los dos dominios catalíticos sin el dominio R fue explorada con éxito por Báez-Viveros, *et al.* (2004), en la construcción de cepas sobreproductoras de L-FEN (3).

3.3.2. Corismato mutasa-prefenato deshidrogenasa

El dominio PDH de la enzima bifuncional CM-PDH pertenece a la familia de proteínas TyrA. Este dominio se le ha llamado prefenato deshidrogenasa (PDH) por su elevada afinidad por el PPA. Debido a que se demostró que la PDH puede emplear PPA y L-AGN como sustratos, se considera que esta enzima es en realidad una TyrA_c. Se especula que la CM-PDH se originó por fusión de los genes *tyrA* (que codifica para la PDH), y *aroQ* (que codifica para una CM). Como resultado de la fusión, la CM-PDH no tiene varios segmentos de aminoácidos en el interior del dominio PDH en comparación con otras enzimas de la familia TyrA (Figura 17), por lo que clasificaciones recientes la agrupan como TyrA_{Δc} (Tabla 1), es decir, como una TyrA_c que ha perdido un grupo de residuos en el interior de su secuencia (81).

La CM-PDH de *E. coli* es una proteína de 373 aminoácidos con un peso molecular de 42 000 Da. Estudios con inhibidores han demostrado que la enzima es un solo polipéptido con dos sitios activos (88, 89). El NAD⁺ activa a la CM, y el CHA activa a la PDH. La L-TIR es el inhibidor de la enzima, abatiendo en un 90% la actividad de PDH, y en un 45% a la CM (88). Se han realizado estudios de mutagénesis que determinaron algunos residuos críticos para PDH (datos comentados en la sección III.2 de esta tesis). Solo se ha identificado un residuo importante para la actividad CM. La mutante K37Q perdió la actividad CM, conservando la actividad PDH en niveles similares a la CM-PDH silvestre. Estos resultados sugieren que K37 es importante en la actividad CM (20).

Al igual que en la CM-PDT se ha reportado la expresión de distintos fragmentos de la CM-PDH, se determinó que el dominio CM abarca los residuos 1-88, mientras que el dominio PDH comprende los residuos 94-373. En este estudio se observó que no es posible expresar ambos dominios de la proteína por separado y obtener enzimas activas. La unión de la L-TIR y la inhibición por producto final no se atribuye a un dominio estructural de regulación independiente a los dominios CM y PDH y se sugiere que los últimos 30 aminoácidos del C-terminal podrían estar involucrados en la interacción de la L-TIR con la proteína (18).

El 90% de la actividad PDH y el 50% de la CM se inhiben con 0.6-0.8 mM de L-TIR. Los estudios cinéticos sobre el mecanismo de inhibición por L-TIR se contraponen. Se proponen tres modelos, uno de ellos propone la unión de la L-TIR al sitio activo de la enzima y a otros sitios específicos de unión (22); la existencia de un sitio alostérico en la enzima (88), y un tercer modelo que propone la competencia entre el PPA y la L-TIR por el sitio activo a través de la formación de dos especies que están en equilibrio, un dímero que es la conformación activa de la enzima, y un tetramero, que es la forma inactiva y que tiene una elevada afinidad por la L-TIR y el NAD^+ (44). Cuando se inició este estudio no se contaba con información cinética o estructural sobre cómo interaccionaba la L-TIR con la CM-PDH, lo que hacía difícil el diseño racional de una variante de la CM-PDH que no fuese inhibida por L-TIR.

Durante la realización de este estudio, se reportó la generación de las primeras variantes de la CM-PDH de *E. coli* resistentes a la inhibición por L-TIR (TyrA^{fbr}) obtenidas por mutagénesis del gen *tyrA* empleando *meta*-fluoro-D,L-L-L-Tirosina durante la selección (86) (59). Se demostró que mutaciones sencillas en los residuos 250-270 generan variantes de la CM-PDH que ya no son inhibidas por L-TIR (86).

3.4. Ciclohexadienil deshidrogenasa de Z. mobilis: un miembro de la familia TyrA que no es inhibido por L-TIR

Las ciclohexadienil deshidrogenasas (TyrA_c), son un grupo de enzimas de la familia TyrA que se caracterizan por una amplia especificidad de sustratos, es decir, emplean PPA como

sustrato para convertirlo en HPP, o bien, unen L-AGN y lo convierten en L-TIR. De este grupo de enzimas solo han sido caracterizadas a nivel bioquímico las TyrA_c de *Pseudomonas aeruginosa*, *P.stutzeri* y *Z. mobilis* (81). Si bien por análisis de secuencias se predice la existencia de TyrA_c con especificidad por NAD⁺ y NADP⁺, las enzimas aquí mencionadas son específicas en la unión de NAD⁺. Por otro lado, las enzimas de *P. aeruginosa* y *P. stutzeri* son inhibidas por L-TIR, y la enzima TyrA_c de *Z. mobilis* (TyrA_{czm}) no se inhibe por este aminoácido (tabla 2). En su mayoría las TyrA_c son monofuncionales aunque por análisis de secuencia se ha encontrado que podrían estar fusionadas al dominio ACT y a la ES3P sintasa (tabla 1).

TyrA_{czm} es una proteína monofuncional, es decir no está fusionada a otro dominio catalítico o de regulación. Por análisis de su secuencia, fue posible identificar el dominio de unión a NAD⁺ en el N-terminal de la enzima. La enzima es un homodímero de 293 aminoácidos. Cada subunidad tiene un peso molecular de 32 000 Da. La actividad específica con L-AGN como sustrato es tres veces superior que la actividad específica en presencia de PPA. Sin embargo tiene una mayor afinidad por el PPA, ya que la K_m en presencia de PPA es 0.18 mM, en comparación de 0.25mM por el L-AGN. Esta enzima es específica para NAD⁺ como cofactor y no se inhibe por L-TIR, L-TRP y L-FEN (94).

3.5. Qué es la IVM y cómo se ha aplicado a la producción de compuestos aromáticos en E. coli

3.5.1. Definición, enfoque y estrategias generales de la IVM

La IVM tiene como propósito el mejoramiento de las propiedades celulares y la producción de metabolitos mediante la introducción o modificación de reacciones bioquímicas específicas en la célula utilizando técnicas de ADN recombinante. Entre algunos ejemplos en los cuales la IVM ha sido aplicada con éxito están el diseño y construcción de cepas productoras de aromáticos y de biocombustibles (63).

La IVM no es sólo la aplicación de la ingeniería genética al mejoramiento de cepas de producción industrial. El esfuerzo al aplicar la IVM tiene por objetivo maximizar el flujo

de carbono dirigido a la vía de síntesis del producto que se desea producir, para lograr este fin se requiere de la interacción con otras áreas del conocimiento como la ingeniería bioquímica, las matemáticas y la bioinformática. Es posible distinguir tres etapas en su aplicación: una de ellas es la modificación genética del organismo huésped. La segunda etapa, involucra la caracterización de la fisiología y la capacidad de producción del metabolito de interés en la nueva cepa en comparación con la cepa progenitora. Este paso incluye el uso de los métodos de análisis postgenómicos (*omics*), es decir, el análisis del proteoma, el transcriptoma, el fluxoma y el metaboloma de la nueva cepa. La aplicación de este tipo de técnicas permiten aproximarse a un entendimiento global de cómo se modificó la fisiología del nuevo organismo (66). Finalmente, en el último paso, se efectúa el análisis de la literatura y de la información experimental generada que permita identificar nuevos blancos para diseñar y realizar una nueva ronda de modificaciones genéticas (63). Para hacer esto necesario conocer con precisión las reacciones, los genes, las enzimas y los mecanismos de regulación de la vía metabólica de interés.

Si bien el objetivo primordial de la IVM es la modificación racional del metabolismo, el conocimiento que se tiene de las vías metabólicas es aún limitado. El metabolismo de un organismo es un conjunto de interacciones entre las enzimas, los metabolitos, los ácidos nucleicos y los reguladores, que hacen que el análisis sea complejo. Aún no es posible predecir con facilidad el efecto de una mutación sobre la fisiología de un organismo y la capacidad de producción de un metabolito de interés, por lo que muchos blancos de modificación genética no son obvios o no tienen los efectos esperados. Por lo expuesto hasta aquí, la tendencia actual de la IVM en el diseño de cepas, involucra el uso de un enfoque combinado, es decir, realizar el diseño racional de las vías cuando esto sea posible; y cuando las modificaciones genéticas no son obvias o no se cuenta con el conocimiento suficiente, se deben realizar modificaciones al azar y emplear los *omics* para tratar de identificar todos los cambios favorables en la cepa, esto último es conocido como IVM reversa (Metabolic Engineering VII: Health and Sustainability. Puerto Vallarta, septiembre del 2008).

Tradicionalmente, las modificaciones genéticas realizadas en un organismo se han enfocado en eliminar la regulación transcripcional y la inhibición por producto final de la

vía de interés, eliminar las vías metabólicas que compiten con dicha ruta, modificar otras vías para incrementar la disponibilidad de los precursores, y finalmente, identificar los pasos limitantes de la ruta ya que estos son puntos de mejora en la cepa (16). Siguiendo las estrategias de IVM ha sido posible lograr que *E. coli* sobreproduzca diversos metabolitos de la vía de los aromáticos. Las estrategias más utilizadas se resumen en los dos apartados siguientes.

3.5.2. Modificación de la vía de síntesis de los compuestos aromáticos

En el contexto de la producción de compuestos aromáticos en microorganismos se han empleado estrategias de la IVM para lograr la modificación del metabolismo con el fin de aumentar la productividad y el rendimiento a partir de la fuente de carbono en la síntesis de algún metabolito aromático. Para lograr estos objetivos, es necesario efectuar modificaciones en los flujos, tanto en la vía de síntesis de los compuestos aromáticos como en el metabolismo central.

La regulación en la vía de síntesis de los compuestos aromáticos impide que *E. coli* pueda sobreproducir alguno de los AAA. Por esta razón, en la construcción de cepas sobreproductoras ha sido fundamental la sobreexpresión de una DAHPS que no sea regulada alostéricamente, ya que esto incrementa la magnitud del flujo de carbono proveniente del metabolismo central hasta la síntesis de CHA, último intermediario de la vía común y punto a partir del cual inician las vías terminales de síntesis de los AAA. Sin embargo, la sobreexpresión de una DAHPS no sería suficiente para sobreproducir AAA, ya que su acumulación en el medio de cultivo inhibiría la actividad de la primera enzima de cada una de las vías terminales de síntesis. Por esta razón, para optimizar la producción de aminoácidos, adicionalmente, es necesaria la sobreexpresión de la primera enzima de cada una de las vías terminales de biosíntesis de AAA, y de preferencia que esta enzima no sea inhibida por producto final, ya que esta característica incrementa la capacidad de síntesis de cada uno de los AAA (16).

Las primeras mutantes DAHPS resistentes a inhibición por cada uno de los AAA fueron obtenidas de cepas generadas por métodos clásicos de mutagénesis. Mediante el análisis de las mutaciones presentes en distintas versiones de estas enzimas se identificaron tres

regiones en las cuales es necesario efectuar mutaciones para obtener DAHPS con estas características. En base a la estructura de AroG se sugiere estas regiones están involucradas en la formación del sitio de unión para los aminoácidos (7, 49, 50, 52, 73). De igual manera, han sido obtenidas por mutagénesis clásica versiones mutantes resistentes a inhibición de las enzimas CM-PDT, y de la antranilato sintasa (primera enzima de la vía terminal de L-TRP). La actividad en las enzimas silvestres se inhibe por L-FEN y L-TRP, respectivamente. El caso de la CM-PDH ya se discutió previamente (7, 16).

Una vez que se realizan modificaciones en la vía de aromáticos y en el metabolismo central (que se discutirá en el siguiente apartado), las reacciones de la vía común se vuelven pasos limitantes, evidencia de esto es que los sustratos de las enzimas se acumulan en el medio de cultivo. Se ha analizado en varios reportes el efecto de la sobreexpresión sencilla y simultánea de los genes de la vía común, observándose que esta estrategia tiene un efecto positivo sobre la producción de L-FEN y L-TIR {(26, 57)}. De tal manera que algunos grupos de investigación, como práctica regular, integran en el cromosoma varios de estos genes en cepas productoras de algún compuesto aromático (4).

3.5.3. Modificación del metabolismo central para incrementar la disponibilidad de los precursores de la vía del shiquimato

Con el propósito de incrementar el rendimiento producto/sustrato en la síntesis de los compuestos aromáticos se han valorado diferentes enfoques para redirigir el flujo de carbono del metabolismo central con el fin de incrementar la disponibilidad de los precursores de la vía del SHIKV (Figura 7).

Para incrementar la disponibilidad de E4P se ha sobreexpresado el gen *tktA* (que codifica para la enzima transcetolasa) en cepas de *E. coli* que sobreexpresan una DAHPS insensible a regulación alostérica, obteniéndose un incremento aproximadamente del doble en el flujo de carbono dirigido hacia la síntesis de aromáticos (30).

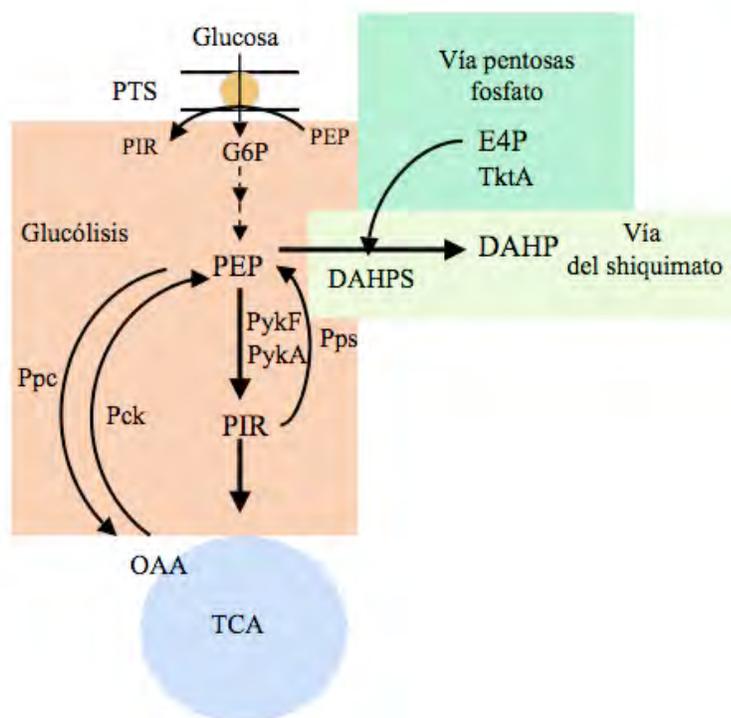


Figura 7. Metabolismo central en *E. coli*. En la figura se muestran algunas de las reacciones involucradas en la síntesis y consumo de los precursores de la vía del shiquimato, el PEP y la E4P (Apéndice I).

Por otro lado, entre las estrategias que han sido evaluadas para incrementar la disponibilidad de PEP, se encuentra la inactivación del sistema de fosfotransferasa (PTS) (33), de las isoenzimas piruvato cinasa (PykA y PykF) (35) y de la PEP carboxilasa (62), estas actividades compiten con la vía de aromáticos por este precursor. Además se ha analizado la sobreexpresión de la enzima PEP sintasa, que interviene en la conversión de piruvato en PEP (67).

PTS es el mayor consumidor de PEP cuando una bacteria crece en glucosa, ya que un mol de este compuesto es utilizado por PTS para internalizar y fosforilar un mol de este azúcar. Por esta razón, se seleccionaron en un cultivo continuo en medio mineral con glucosa, cepas mutantes de *E. coli* con el sistema PTS inactivo (PTS^-) pero con la capacidad de asimilar glucosa eficientemente ($PTS^- Glc^+$) (33). Se demostró que la inactivación de este sistema incrementa significativamente el flujo de carbono dirigido hacia la síntesis de los compuestos aromáticos (16, 33). Mediante análisis genético y

bioquímico de las cepas $\text{PTS}^- \text{Glc}^+$ generadas en cultivo continuo, se determinó que transportan y fosforilan la glucosa mediante un sistema independiente de PTS, haciendo uso de la galactosa permeasa (GalP) y la glucocinasa (Glk) (33). GalP transporta cada mol de glucosa con gasto de un protón, y luego la glucocinasa la fosforila con un mol de ATP. En un estudio posterior se determinó que la sobreexpresión de GalP es suficiente para que cepas PTS^- recuperen la capacidad de utilizar la glucosa, creciendo con una velocidad 89% en comparación con la cepa silvestre. Con la expresión simultánea de ambos genes, *galP* y *glk*, la velocidad específica fue igual a la cepa silvestre (42). También se demostró que es posible recuperar la capacidad de crecer en glucosa de cepas PTS^- con la expresión de los genes *glf_{Zm}* y *glk_{Zm}*, que codifican, respectivamente, para un facilitador de glucosa (Glf) y para Glk de *Z. mobilis* (79).

3.6. Producción de L-TIR en microorganismos

Las vías metabólicas para la biosíntesis de los 20 aminoácidos en *E. coli* y otras bacterias están fuertemente reguladas. Estos organismos desarrollaron distintos mecanismos de control para asegurarse que no sean desperdiciados energía y carbono que podrían ser empleados para cumplir con otras funciones esenciales. La inhibición por producto final sería el primer mecanismo de control en actuar ya que responde directamente a los niveles de aminoácidos presentes en el medio ambiente, por esta razón, la modificación inicial en una cepa de producción se enfoca en eliminar la inhibición por producto final de la vía de interés.

El esfuerzo inicial para el desarrollo de procesos biotecnológicos para la biosíntesis de L-TIR se enfocó principalmente a la generación de cepas sobreproductoras mediante métodos de mutagénesis clásica empleando radiación UV o compuestos químicos como el N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidino (NTG) (60). Entre otras modificaciones, es esperado que mediante este tipo de procedimientos, varios mecanismos de regulación en la VSHIK y la vía específica de síntesis de L-TIR sean eliminados. La selección de las cepas se llevó a cabo empleando análogos tóxicos de los AAA. Solamente las cepas sobreproductoras son capaces de crecer en análogos tóxicos, debido a que la sobreproducción y excreción del aminoácido diluye la presencia del análogo. En varios

reportes se demostró que en estas cepas se eliminó la retroinhibición sobre algunas enzimas como DAHPS, CM y enzimas de la familia TyrA (15, 38, 47). En la tabla 3 se presentan algunos estudios representativos de la generación de cepas sobreproductoras de L-TIR mediante mutagénesis generalizada con agentes químicos y físicos.

El método de mutagénesis clásica han demostrado ser efectivo en la generación de cepas sobreproductoras de aminoácidos, pero tiene la desventaja que no se puede controlar y conocer con precisión los cambios provocados en la cepa, es necesaria la búsqueda entre un gran número de mutantes, y además que no es posible realizar modificaciones específicas en la cepa para mejorarla. Es así que la IVM es la alternativa racional a los métodos tradicionales de mutagénesis. En diversos reportes se aplicaron estrategias de la IVM para mejorar la capacidad de síntesis de L-TIR en las cepas generadas por métodos de mutagénesis clásica (Tabla 3). Entre las estrategias evaluadas se cuentan: 1) la sobreexpresión de los genes que codifican para las enzimas DAHPS y CM desreguladas obtenidas a partir de las cepas mutantes generadas por mutagénesis química. Con esta estrategia se produjo 26 g/L en cultivos de alta densidad celular (45). 2) Con la sobreexpresión del gen que codifica para la transcetolasa se logró un incremento en la síntesis de L-TIR de 1.12 veces (46). 3) La sobreexpresión del gen *aroL* que codifica para la enzima shiquimato cinasa. Con esta modificación se incrementó la producción de L-TIR 1.24 veces (48).

De manera simultánea a la realización del trabajo experimental que dio origen a esta tesis, se reportaron diferentes estudios que mediante la IVM e ingeniería de proteínas en la

TABLA 3. Trabajos representativos en la producción de L-TIR. Las cepas descritas aquí fueron generadas por métodos clásicos de mutagénesis y por IVM.

Método/cepa	Características importantes	L-TIR producida	Referencias
Cepas generadas por técnicas clásicas de mutagénesis			
<i>E. coli</i>	Seleccionada en pFP ^R (1)	n.r. (2)	(23)
<i>B. subtilis</i> NP164	Auxótrofa a L-FEN, D-tirosina ^R	70 mg/g células	(15)
<i>C. glutamicum</i> pr-20	Auxótrofa a L-FEN, generada por mutagénesis química con NTG, aminotirosina ^R , <i>p</i> -aminofluorofenilalanina ^R ,	17.6 g/L	(37)

	pFP ^R , hidroxamato de tirosina ^R .		
<i>B. lactofermentum</i> FT-1	Tratamiento con NTG, auxótrofa a L-FEN, <i>m</i> -fluoro-D,L-fenilalanina ^R .	14.4 g/L	(47)
<i>A. globiformis</i> P ₄₆ NT _E	Generada por radiación UV, auxótrofa a L-FEN, 3-nitrotirosina ^R .	2.4 L	(76)
Cepas generadas por IVM			
<i>B. lactofermentum</i> FT-1	Cepa generada por métodos clásicos (ver arriba en esta tabla), en la cual el gen <i>aroL</i> se sobreexpresó.	21.6 g/L	(48)
<i>C. glutamicum</i> KY10865	Sobreproductora de L-TRP generada por métodos clásicos de mutagénesis, las versiones de las enzimas DAHPS ^{fbr} y CM ^{fbr} de <i>C. glutamicum</i> fueron sobreexpresadas.	26 g/L	(45)
<i>C. glutamicum</i> KY10621	<i>S</i> -(2-amino etil) cisteína ^R , el gen <i>tkl</i> fue sobreexpresado	6.3 g/L	(46)
<i>E. coli</i> W3110	Los genes <i>tyrR</i> , <i>tyrA</i> , <i>pheA</i> fueron interrumpidos. Los genes <i>aroG</i> ^{fbr} , <i>aroL</i> and <i>tyrA</i> ^{fbr} fueron sobreexpresados.	6.3 g/L	(86)
<i>E. coli</i> MG1655	El gen <i>tyrR</i> fue interrumpido. Los genes <i>ppsA</i> , <i>tklA</i> , <i>aroG</i> ^{fbr} y <i>tyrA</i> ^{fbr} fueron sobreexpresados.	9.7 g/L	(59).
<i>E. coli</i> DPD4195	Sobreproductora de L-FEN generada por métodos clásicos, en la cual el gen <i>pheA</i> fue interrumpido, el promotor nativo del gen <i>tyrA</i> fue reemplazado por el promotor <i>trc</i> .	55g/L	(64, 68)

(1) N^R Cepa seleccionada por su capacidad de crecer en diversos compuestos análogos tóxicos de los AAA (2) n.r. La cantidad de L-TIR producida por esta cepa no fue reportada.

construcción de cepas de *E. coli* que sobreproducen L-TIR (59, 86). Como parte de la construcción de las cepas se obtuvieron versiones insensibles a inhibición por L-TIR de la CM-PDH (TyrA^{fbr}) mediante PCR mutagénico. En cepas con el gen *tyrR* interrumpido, se sobreexpresaron TyrA^{fbr} y una versión de la DAHPS resistente a inhibición por L-FEN (AroG^{fbr}). Una de las cepas reportadas, que además tenía sobreexpresado los genes *ppsA* y *tklA*, produjo en cultivos lote alimentado 9.7 g/L de L-TIR con un rendimiento L-TIR/glucosa (Y_{L-TIR/glc}) de 0.10 g/g, con una productividad específica (q_{L-TIR}) de 73 mg/g cél. h (58, 86). Olson, *et al.* empleó un enfoque distinto, convirtieron una cepa sobreproductora de L-FEN obtenida por métodos clásicos de mutagénesis en una cepa productora de L-TIR reemplazando el promotor nativo del gen que codifica para la enzima CM-PDH por el promotor *trc*. En cultivos lote alimentado la cepa produjo 55g/L de L-TIR, con un Y_{L-TIR/glc} de 0.3g/g, y una q_{L-TIR} de aproximadamente 57 mg/g cél. h. (64, 68). En otro estudio se analizó el efecto de sobreexpresar distintas combinaciones de los genes de la vía común

para incrementar la producción de L-TIR. Se encontró que con la sobreexpresión simultánea de los genes que codifican las enzimas shiquimato deshidrogenasa y shiquimato cinasa se incrementó la producción de L-TIR en un rango del 38 al 54%, dependiendo del fondo genético utilizado (57). En otro reporte, se empleó mutagénesis con transposones para encontrar blancos de modificación genética que no son obvios y que mejoren la producción de L-TIR. Empleando la síntesis de MEL como método de selección. Se aislaron dos cepas mutantes que incrementaron su capacidad de síntesis de L-TIR. Los dos genes interrumpidos codifican, cada uno, para la subunidad epsilon de la DNA polimerasa III y la proteína hipotética YgdT (77).

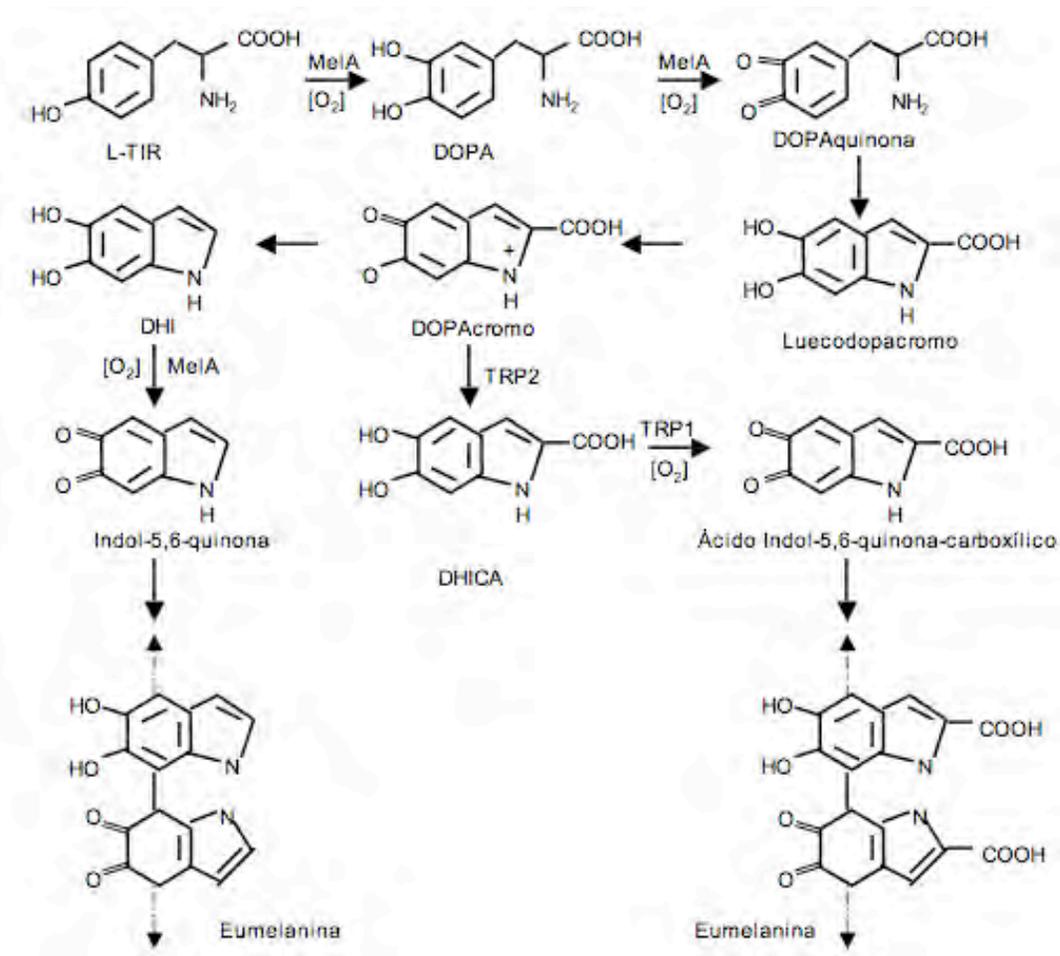


Figura 8. Síntesis de eumelaninas (Ver Apéndice I)(70).

3.7. Melaninas

3.7.1. Las melaninas en la naturaleza

Las MEL son polímeros heterogéneos de compuestos fenólicos o indólicos, que en la naturaleza pueden estar asociadas a proteínas y carbohidratos, y tienen distintos colores como el amarillo, el café y el negro. Las MEL están ampliamente distribuidas en la naturaleza, ya que es posible encontrarlas en los animales, hongos, bacterias y plantas. (41).

Se ha propuesto que cumplen con diversas funciones biológicas, por ejemplo, conferir resistencia a la deshidratación, a las radiaciones y a la toxicidad de metales pesados (74). Existen distintos tipos de MEL, dependiendo del precursor del cual son sintetizadas. Se ha identificado que la vía del shiquimato, la vía de los policétidos y las vías de degradación de L-TIR y L-FEN están involucradas en la biosíntesis de MEL (tabla 4). En ciertos hongos, por ejemplo, los precursores en la biosíntesis de MEL se encuentran en su medio ambiente y estos organismos excretan enzimas, como fenol oxidasas, para oxidarlos (13, 70).

La eumelanina es sintetizada a partir de L-TIR, en una reacción en la que interviene la tirosinasa. Esta enzima es una monofenol oxigenasa que requiere cobre como cofactor y cataliza la hidroxilación de los monofenoles (L-TIR) a *o*-difenoles (L-DOPA). Los *o*-difenoles son posteriormente oxidados por la tirosinasa a *o*-quinonas, las cuales reaccionan espontáneamente para dar origen a las MEL (Figura 8) (13, 41).

Dada su complejidad, la estructura de las MEL no se conoce con precisión. La más estudiada es la de la eumelanina, que es la MEL producida de L-TIR. Estas MEL son polímeros de DHI, DHICA y sus formas oxidadas (Figura 9). Existe una discusión sobre la forma en la cual están organizados estos monómeros para formar los oligómeros de MEL. Una de las propuestas es que los monómeros se unen al azar, mientras que otra propone que forman tetrámeros o pentámeros como se muestra en la figura 9 (51). En los tetrámeros, los átomos de nitrógeno quedan en el interior de la estructura formando un anillo parecido al de la clorofila o al grupo hemo de la hemoglobina, que están involucrado en la unión de metales. Por esta característica se ha propuesto usar MEL en biorremediación para eliminar metales pesados y en la generación de energía (74, 80).

Generalmente se acepta que 4 a 6 oligómeros interactúan para formar hojas, y estas hojas interactúan entre sí mediante fuerzas de van der Waals para dar origen a las eumelaninas (Figura 9) (41). Aún queda por determinarse las características estructurales de las melaninas que son útiles para ciertas aplicaciones.

3.7.2 Producción de melaninas

Se han contemplado diferentes aplicaciones para las MEL debido a sus propiedades fisicoquímicas. Entre las propiedades importantes se encuentran absorber radiaciones UV, aceptar o donar de electrones, unir metales pesados, y estos polímeros pueden ser empleados como intercambiadores iónicos, semiconductores, en biorremediación como agentes quelantes de metales pesados, antioxidantes, antivirales; y recientemente, se han empleado en la generación de electricidad (27, 74, 80). En la actualidad, a nivel comercial, las MEL tienen uso principalmente como fotoprotectores en el área de los cosméticos y en la fabricación de lentes para el sol. Se estimó que el mercado de MEL en México es de 1 a 10 Ton por año (72) y su origen es de importación. En el mercado internacional, las MEL son producidas con un costo de aproximadamente 150 dólares por kilogramo. Las MEL pueden ser producidas *in vitro* empleando enzimas como tirosinasas y los precursores en estado puro. Es posible encontrar la oferta de productos como *Melasyne*, que es una melanina de origen natural que es solubilizada en agua mediante un proceso enzimático (72).

También está en el mercado la producción de MEL vegetales mediante la oxidación química de algunos de sus precursores como la L-TIR, la L-DOPA y polifenoles (34). En otros procesos, extraen MEL de tejidos vegetales y animales. SIGMA ofrece al mercado MEL extraídas de la tinta producida por *Sepia officinalis*. Finalmente, algunas patentes refieren la producción de MEL utilizando microorganismos recombinantes como *Streptomyces lividans* (36). En general, los cultivos con estos organismos fueron optimizados en medios ricos enriquecidos con hidrolizados de caseína, extracto de levadura, peptona, aminoácidos, y L-TIR. En uno de los mejores procesos con *S. lividans* se lograron títulos 2.2g/L de MEL, en al menos 130h (36).

E. coli no tiene la capacidad de producir MEL, ya que no tiene genes que codifiquen para tirosinasas. Existen varios reportes de producción de MEL en *E. coli* mediante la expresión de tirosinasas provenientes de otros organismos como *Pseudomonas maltophilia*, *Streptomyces antibioticus* y *Rhizobium etli* CFN42, 27, 54, 90) añadiendo L-TIR al medio de cultivo.

Tabla 4. Tipos de melaninas, vías metabólicas empleadas en su síntesis y enzimas involucradas

Tipo de melanina	Precusores	Color	Vía de síntesis	Enzimas clave involucradas	Organismos que las producen
Eumelanina	L-TIR o L-FEN	Negro-café	Vía del shiquimato	Tirosinasa Polifenol oxidasa	Mamíferos Bacterias
Feomelanina	L-TIR, L-cisteína y glutatona	Amarillo-café-rojo	Vía del shiquimato	Tirosinasa	Mamíferos aves
Alomelaninas	di- o tetrahidroxinaftaleno (DHN) y catecol	Café, negro Azul, verde	Vía de los pentacétidos Vía shiquimato	Policétido sintasa tipo I	Hongos Tetrahymena (protozoario) plantas
Piomelaninas*	Ácido homogentísico y HPP	Café	Vía de degradación de L-TIR	Tirosil aminotransferasa, hidroxifenilpiruvato deshidrogenasa	Hongos Bacterias, humanos
Melanina de GDHB	g-glutamín-4-hidroxibenceno	Café	Vía del shikimato	Tirosinasa g-glutamíntransferasa	Hongos

* Algunas clasificaciones incluyen a las piomelaninas como parte del grupo de las alomelaninas. Aquí se incluye como un grupo distinto ya que emplean otra vía de síntesis. Las piomelaninas reciben el nombre de alkaptomelaninas cuando son producidas en humanos.

En los reportes señalados, la producción de MEL se logra empleando medios ricos o minerales enriquecidos con L-TIR. Una de las mejores cepas de *E. coli* productoras de MEL reportadas hasta ahora, producen 6 g/L de MEL en 80 horas, en un medio mineral suplementado con 5.8 g/L de L-TIR (54).

Para optimizar estos procesos es interesante la posibilidad de modificar genéticamente a *E. coli* para que sobreproduzca su propia L-TIR creciendo en medios minerales con glucosa y que simultáneamente exprese una tirosinasa. Hasta donde sabemos, el único reporte relacionado con la producción de MEL empleando glucosa como única fuente de carbono, es un artículo reciente publicando durante la realización de nuestro estudio, en el cual se empleó la producción de MEL como método de selección para identificar cepas sobreproductoras de L-TIR. La selección se realizó en base a la

intensidad del color de las colonias crecidas en placas medio mineral con glucosa como fuente de carbono sin adicionar L-TIR. No se determinó la capacidad de producción de MEL en estas cepas (77). A partir de este punto se referirá como MEL a las eumelaninas.

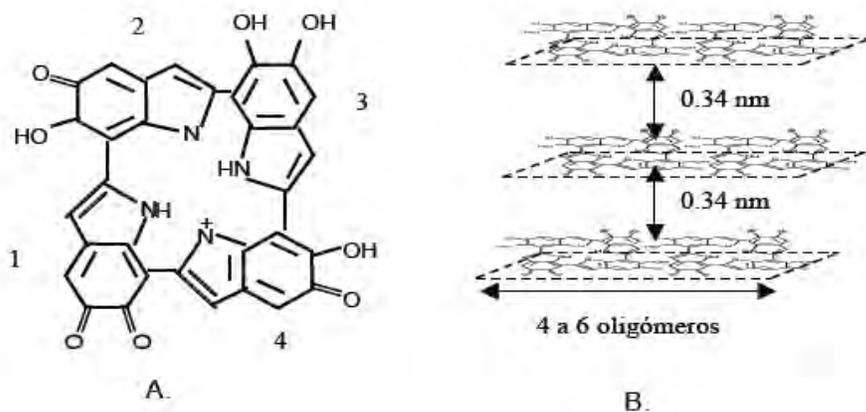


Figura 9. Estructura propuesta de las eumelaninas. A. Oligómero está formado de subunidades de 1) indol-5,6-quinona, 2) quinona imina, y 3) DHI (51). B. Los oligómeros se unen formando hojas, las cuales interactúan entre sí por fuerzas de van der Waals. Los grupos hidroxilo se orientan hacia afuera (41).

3.8. Justificación

La L-TIR tiene aplicación como materia prima en la síntesis de productos como la L-DOPA o la MEL. Es una idea atractiva modificar las vías metabólicas para ser capaces de producir en un solo microorganismo la L-TIR, que es el precursor, y un compuesto derivado de L-TIR con un mayor valor como lo es la MEL.

Un elemento importante entre las modificaciones de las vías metabólicas para la sobreproducción de L-TIR, es eliminar la regulación negativa de la L-TIR sobre la actividad de la CM-PDH. Un enfoque para lograr esto sería obtener una versión insensible a inhibición por L-TIR de la CM/PDH mediante evolución dirigida de proteínas. Para encontrar una variante de la CM-PDH que haya perdido la inhibición por L-TIR, y que además tenga un buen nivel de actividad, es necesario contar con un método de selección adecuado y buscar entre un gran número de mutantes. Por esta razón, también se consideró seguir una alternativa más simple y no usada previamente para la producción de L-TIR, que es aprovechar la diversidad de enzimas que participan en la biosíntesis de L-

TIR en distintos organismos, expresando los genes que codifiquen para enzimas, que no se inhiban por L-TIR, y que además cumplan con la función de la CM-PDH de *E. coli*.

Este estudio contribuirá al conocimiento sobre la relación existente entre la actividad de estas enzima y el flujo de carbono en la vía de síntesis de L-TIR y MEL. También contribuirá a identificar y evaluar el efecto de sustituir ciertos residuos sobre la actividad e inhibición de la CM-PDH por la L-TIR. Por otro lado, la construcción de una cepa sobreproductora de L-TIR abre la posibilidad de producir en una sola cepa, no solo MEL, sino diversos compuestos derivados de L-TIR de un alto valor agregado y de gran utilidad para el ser humano.

Debido a todas las posibles aplicaciones de las MEL, éstas son un compuesto interesante para producirlo a gran escala. Mediante la extracción de MEL de tejidos animales y vegetales, no es posible controlar la composición, ya que está influenciada por el medio ambiente en el que son generadas y las condiciones en las que son purificadas (41). La producción *in vitro* involucra el uso de precursores de alto grado de pureza, por lo que son costosos y solo podría ser utilizados para aplicaciones en el laboratorio. En este sentido, una alternativa a considerar es la modificación de microorganismos como *E. coli* para producirlas a gran escala en condiciones controladas. Si bien se ha logrado la producción de MEL en biorreactores alcanzando títulos elevados, utilizando tanto microorganismos que la producen naturalmente como recombinantes, su producción aún requiere de la adición de los inductores de las tirosinasas, el empleo de medios ricos y la adición de los precursores de las MEL. Una de las mejores tecnologías reportadas hasta ahora, y que fue diseñada en el laboratorio de IVM en el IBT/UNAM, involucra la producción de MEL en *E. coli* en medio mínimo enriquecido con L-TIR. Tomado en consideración la información proporcionada en un análisis económico de este proceso, la L-TIR constituye alrededor del 50% del costo total de las materias primas (72). Por lo que la producción de MEL en cualquier medio mineral empleando glucosa sin añadir L-TIR, con el uso de bacterias modificadas por IVM, podría ser una mejora importante a este proceso. Con la ventaja que esta nueva tecnología abre la posibilidad de producir MEL utilizando cualquier fuente de carbono de bajo costo, como el glicerol, o su producción a partir de residuos agroindustriales.

3.9. Hipótesis

3.9.1. Si se mutageniza al azar el dominio PDH de la CM-PDH y se seleccionan las variantes que tardan más tiempo en complementar, es posible que en dichas variantes cambió algún residuo catalítico que afecte severamente la actividad de la enzima. Es probable que dicho residuo o residuos estén relacionados con la inhibición de la actividad de la CM-PDH en presencia de L-TIR,

3.9.2. Si se elimina la inhibición por producto final en las reacciones catalizadas por las enzimas DAHPS y CM-PDH, será posible sobreproducir L-TIR cuando *E. coli* crezca en medio mineral con glucosa.

3.9.3. Si se realizan modificaciones genéticas en el metabolismo central y en la vía del shiquimato para incrementar el flujo de carbono proveniente de la glucosa hacia la biosíntesis de L-TIR, en esta cepa será posible la producción de MEL cuando la cepa también exprese una tirosinasa.

IV. *Objetivos*

4.1. Objetivo general

Eliminar el control negativo de la L-TIR sobre la actividad de la CM-PDH mediante evolución dirigida de proteínas y aprovechando la biodiversidad existente en la familia de proteínas TyrA, y evaluar el efecto de cada enzima sobre la capacidad de *E. coli* para producir L-TIR y MEL a partir de glucosa.

4.2. Objetivos particulares

4.2.1. Generar y caracterizar versiones de la enzima CM-PDH que no se inhiban por L-TIR.

4.2.2. Evaluar el efecto de cada una de las mutaciones encontradas en las versiones TyrA^{fbr}, sobre la actividad e inhibición por L-TIR de la CM-PDH.

4.2.3. Construir y caracterizar el operón *tyrCpheA_{CM}* que exprese las enzimas TyrA_{czm} y la CM de la enzima CM-PDT de *E. coli*.

4.2.4. Determinar el efecto de la sobreexpresión de las diferentes variantes TyrA^{fbr} y el operón *tyrCpheA_{CM}* sobre el rendimiento y la productividad en la síntesis de L-TIR y MEL.

4.2.4. Caracterizar la MEL producida con las cepas de *E. coli* modificadas genéticamente para producir MEL en medio mínimo con glucosa.

V. Materiales y métodos

5.1. Técnicas generales de biología molecular

El DNA cromosomal y plasmídico se purificó por lisis alcalina y empleando diversos kits comerciales. Las enzimas de restricción, polimerasas y ligasas se utilizaron siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Con la finalidad de ver, cuantificar y purificar DNA, se utilizó electroforesis en geles de agarosa al 1% tiñendo el DNA con bromuro de etidio (20µl de una solución 0.04% para 200 mL de TBE). El DNA fue cuantificado por densitometría, y los fragmentos de DNA fueron purificados de geles de agarosa al 1% empleando kits comerciales.

Las cepas de *E. coli* fueron transformadas mediante electroporación utilizando células electrocompetentes o células crecidas en placas de medio YENB.

Para obtener la secuencia de nucleótidos, se purificaron 600-900 ng de cada plásmido y se mezcló con 10 pmol de cada oligonucleótido (tabla 7), en un volumen final de 16 μ l. El DNA fue secuenciado en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del DNA (IBT/UNAM).

5.2. Bioinformática

Para el diseño de las estrategias de clonación, se utilizaron los programas DNA Star, Clone Manager y BioEdit. Para el análisis de secuencias de DNA y proteínas se emplearon las bases de datos: PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), Blastp-NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.org>); Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>); Dali Server (http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server); T-Coffee (<http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>); Colibrí (<http://genolist.pasteur.fr/Colibri>). En el análisis se utilizaron las opciones predeterminadas de cada algoritmo.

Tabla 5. Concentración final de los antibióticos.

Antibiótico*	Plásmido	Concentración final (μ g/mL)
Ampicilina (Ap)	Plásmidos derivados de pTrc99A	200
Carbenicilina (Cb)	Plásmidos derivados de pTrc99A	100
Tetraciclina (Tc)	pRW300, pJLBaroG ^{br}	30
Cloranfenicol (Cm)	Plásmidos derivados de pACYC184	30
Espectinomicina (Spt)	pCL <i>tkA</i>	30
Kanamicina (Km)	pCR -Blunt II- TOPO y derivados	50

* En la tabla se indica la concentración final de antibiótico que se utilizó para seleccionar cada plásmido.

Tabla 6. Cepas empleadas en este estudio

Cepas	Genotipo relevante	Referencias
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac^rZDM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Stratagene, La Jolla, CA
<i>E. coli</i> FA114	como FA113 (5), pero Δ <i>tyrA</i> , Δ <i>pheA</i>	Osuna, J. (IBT/UNAM)
<i>E. coli</i> JM101	<i>supE</i> , <i>thi</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), F'	(6)
<i>E. coli</i> PB12	como JM101 pero Δ (<i>ptsHIcrr</i>)::Km pero Glc ⁺ por cultivo continuo	(33)
<i>Z. mobilis</i> ATCC3182	cepa silvestre	Colección del laboratorio
<i>E. coli</i> W3110	F' λ INV(<i>rrnD-rrnE</i>)1	Colección del laboratorio
<i>E. coli</i> VH33	derivada de VH32 Gal P ⁺ , es decir, W3110 Δ <i>ptsH</i> , <i>ptsI</i> , <i>crr</i> ::km, Δ <i>lacI</i> , <i>lacZ</i> ::loxP, P _{trc} - <i>galP</i> , sensible a Cm.	Colección del laboratorio
<i>E. coli</i> VH33 <i>tyrR</i>	derivada de VH33, pero Δ <i>tyrR</i> ::FRT	Colección del laboratorio

Para extraer DNA cromosomal, *Z. mobilis* ATCL 31821 fue cultivada en un medio rico (glucosa, 20 g/L; YE, 10 g/L, KH₂PO₄, 2 g/L; pH 6.0) a 30°C por 24 horas. El DNA fue purificado siguiendo los mismos procedimientos empleados para *E. coli*.

Para conservar las cepas después de la electroporación, se estiró una colonia aislada de cada cepa en cajas de LB y se incubó a 37°C. En un cultivo líquido fresco en LB con antibióticos de dicha colonia, se le añadió glicerol a una concentración final del 40%, y se congeló a -70°C.

Para seleccionar los plásmidos, las cepas fueron crecidas en medios con los antibióticos correspondientes en la concentración indicada en la Tabla 5. Se cuidó que los diferentes plásmidos que se transformaron en una sola cepa tuvieran orígenes de replicación distintos.

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados en este estudio. Los sitios de corte de las enzimas de restricción están subrayados. Los codones de término están señalados en negrita.

Oligonucleótido	secuencia
Clonación de <i>tyrA</i>	
tyrA3	5' GGCTTAAGAGGTTT <u>ACCATGGTTGCTGAATTG</u> 3'
tyrA5	5' CCCCAAGCTT <u>GATGAAAAGGTGCCGGATGATGTG</u> 3'
Clonación de <i>tyrC</i>	
tyrC5	5' GCAGGCGCTCT <u>CCATGGCCGTCTTTAAG</u> 3'
tyrC3	5' CCCCAAGCTT <u>GTTCATGCTGCGATCAATCG</u> 3'
Clonación de <i>pheA_{CM}</i>	
CM5	5' CCCCAAGCTT <u>CACACAGGAAACAGACCATGG</u> 3'
CM3	5' CCCCAAGCTT <u>TTATCAGAGAAAAGCGATGCGTGC</u> 3'
Mutagénesis al azar	
PdhtyrA5	5' GGTGTACCGCC <u>AGATCTGATTGAGGATG</u> 3'
MtyrA3	5' CTGTATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCC 3'
MtyrA5	5' GTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAAC 3'
Secuenciación	
pTrc2	5' CAGTTATCATCGACTGCAC 3'
sectyrA5	5' GTGTGCCAATCCACGTTACTG 3'
99Nco	5' GCGCCGACATCATAACGGTTCTGGC 3'
99Hind	5' GGACCACCGCGCTACTGCCGCCAGG 3'
M13 <i>reverse</i> ****	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'
M13 <i>forward</i> ****	5' GTAAAACGACGGCCAG 3'
tyrA1500	5' CTGTTTTATCAGACCGCTTCTGC 3'

**** Invitrogene (Carlsbad, CA.).

5.4. Cepas bacterianas

Las cepas empleadas en este estudio están descritas en la Tabla 6:

E. coli XL1-Blue (Stratagene) fué utilizada como vehículo para clonar y conservar los plásmidos. También fue empleada en la construcción del banco PDH.

FA114 fué amablemente proporcionada por el Dr. Joel Osuna (IBT/UNAM). En esta cepa, los genes *tyrA* y *pheA*, que codifican para las enzimas CM-PDH y CM-PDT, respectivamente, fueron interrumpidos (5). Se utilizó en los ensayos de complementación,

en la selección de las variantes activas del banco PDH, y para preparar los extractos crudos para medir actividad enzimática de CM, PDH y TyrA_{cZm}.

La cepa de *Z. mobilis* ATLC 31821 fue utilizada para extraer DNA cromosomal con el fin de clonar el gen *tyrC* que codifica para la enzima TyrA_{cZm}.

La cepa JM101 es una cepa silvestre de *E. coli* que se empleó para extraer DNA cromosomal y así clonar el gen *tyrA*, que codifica para la CM/PDH de *E. coli*.

PB12 es una cepa con el fenotipo PTS⁻ glucosa⁺ seleccionada en un cultivo continuo por su capacidad de crecer en medio mínimo con glucosa (33). Esta cepa se utilizó para evaluar la capacidad de producir L-TIR entre las diversas variantes del banco PDH y la enzimas CM de CM/PDT y TyrA_{cZm}. W3110 es una cepa silvestre de *E. coli* que se empleó previamente para expresar el gen *mela* de *R. etli* CFN42 y producir MEL añadiendo L-TIR al medio de cultivo (14). En esta cepa se probaron distintas modificaciones genéticas para la producción de MEL desde glucosa.

VH33 es la cepa PTS⁻ glucosa⁺ derivada de W3110. Esta cepa recuperó su capacidad de crecer en glucosa porque el promotor nativo del gen *galP*, que codifica para la galactosa permeasa, fue sustituido por el promotor *trc* (25). Esta cepa a diferencia de VH32 GalP⁺, se eliminó la resistencia a Cm (Meza, E. Tesis de doctorado en proceso). Esta cepa se empleó para la producción de MEL desde glucosa. VH33 *tyrR*⁻ es la derivada de VH33 que se interrumpió el gen *tyrR*, que codifica para un regulador de la vía de síntesis de los compuestos aromáticos (Muñoz, A.J., Tesis de maestría en proceso). Se empleó en la producción de MEL desde glucosa.

5.5. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados para la clonación de genes, mutagénesis y secuenciación están descritos en la tabla 7.

5.6. Plásmidos

Los plásmidos construidos y empleados en este trabajo se resumen en la tabla 8:

El plásmido **pJLBaroG^{fbr}** (3) y **pRW300** (35) portan el gen *aroG^{fbr}* que codifica para una versión insensible a inhibición por L-FEN de una DAHPS de *E. coli*.

El plásmido **pCL*tktA*** porta el gen *tktA*, que codifica para la transcetolasa A de *E. coli* (35).

pTrc*pheA^{fbr}* es un plásmido que contiene el gen que codifica para una versión de la CM-PDT que no tiene el dominio de regulación, por lo que ya no se inhibe por L-FEN (3).

La serie de plásmidos **pTrcM*tyrA*** codifica para las mutantes del gen *tyrA* generadas por mutagénesis al azar y por mutagénesis sitio dirigida. Los cambios de aminoácido se muestran en la tabla 8. En los siguientes apartados se detalla la construcción y selección de las variantes obtenidas por mutagénesis al azar. Las variantes generadas por mutagénesis sitio dirigida fueron construidas por el Dr. Joel Osuna (IBT/UNAM) y empleadas en este estudio.

5.6.1. Clonación del gen *tyrA*

El gen *tyrA* fue amplificado por PCR desde el codón de inicio (ATG) hasta el codón de término (TAA) empleando como templado el DNA cromosomal de la cepa *E. coli* JM101 (6). El gen se amplificó con los oligonucleótidos *tyrA3* y *tyrA5*, creando en el gen los sitios de corte para las enzimas *Nco*I y *Hind* III para facilitar su clonación (Tabla 7), generándose un fragmento de 1193 pares de bases (pb). El producto del PCR fue clonado en el plásmido pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) para obtener el plásmido **pTOPO*tyrA***. El plásmido anterior se digirió con las enzimas *Nco* I y *Hind* III. El fragmento de 1168 pb se purificó de gel y se clonó en el fragmento *Nco* I/*Hind* III de pTrc99A (2), obteniéndose el plásmido **pTrc*tyrA***. En este plásmido, la expresión del gen *tyrA* está regulada por el **promotor *trc*, que es inducido por IPTG**. pTrc*tyrA* fue transformado en la cepa FA114 para confirmar que el gen *tyrA* se expresaba adecuadamente mediante complementación en medio mínimo (Las condiciones del ensayo se describen abajo). Se utilizó como control la cepa FA114 transformada con pTrc99A, creciendo las cepas en presencia y en ausencia de 0.02g/L de L-TIR. El gen *tyrA* fue secuenciado utilizando los oligonucleótidos *tyrA5*, *tyrA3*, pTrc2 y *sectyrA5* (Tabla 7).

5.6.2. Clonación del gen *tyrC* y construcción del operón *tyrCpheA_{CM}*

Para realizar la clonación, se tomó en consideración la información reportada por Zhao, et al., 1993 (94). El codón de inicio para este gen es un GTG, el cuál fue cambiado por ATG, con la finalidad de crear un sitio *Nco* I en el gen, y facilitar su clonación en el plásmido pTrc99A; también se introdujo un sitio *Hind* III después del codón de término (TAA). De esta manera, el gen *tyrC* fue amplificado desde el codón de inicio hasta el codón de término por PCR utilizando como templado DNA cromosomal de *Z. mobilis* ATCC3184, empleando los oligonucleótidos tyrC5 y tyrC3, que contienen los sitios de restricción para su clonación en pTrc99A. El producto del PCR se clonó en el plásmido pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogene, Carlsbad, CA), generándose el plásmido **pTOPO_{tyrC}**. El gen *tyrC* fue secuenciado usando los oligonucleótidos M13 *reverse* y M13 *forward* (Tabla 7), siendo igual a la secuencia del gen *tyrC* reportada para el genoma de *Z. mobilis*. El plásmido anterior se digirió con las enzimas *Nco*I y *Hind* III, se purificó de gel el fragmento de 985 pb y se clonó en el plásmido pTrc99A, el cual previamente se digirió con *Nco* I y *Hind* III y se purificó de gel un fragmento de 4120 pb. En el nuevo plásmido, **pTrctyrC**, la expresión del gen *tyrC* quedó bajo el control del promotor *trc*.

Para construir el operón **pTrctyrCpheA_{CM}**, el fragmento del gen que codifica para el dominio CM de la CM-PDT se amplificó por PCR del plásmido pTrcpheA^{fb}r (3), con los oligonucleótidos CM5 y CM3 (ver tabla 7). El producto del PCR incluía el sitio de unión al ribosoma del pTrc99A, hasta el nucleótido 593 de pTrcpheA^{fb}r. Mediante los oligonucleótidos, se incluyeron dos sitios *Hind* III, y dos codones de paro (TGA y TAA) inmediatamente después del nucleótido 593. Al fragmento del gen *pheA* que se amplificó se le denominó *pheA_{CM}* y comprende los primeros 109 aminoácidos del dominio CM de la CM-PDT (93). También, en el diseño de los oligonucleótidos, se tuvo el cuidado que *pheA_{CM}* no tuviera el mismo marco de lectura que el gen *tyrC* para no fusionar ambas proteínas. *pheA_{CM}* se clonó en el sitio *Hind* III de pTrctyrC, previamente digerido con *Hind* III y purificado por gel, obteniéndose el plásmido pTrctyrCpheA_{CM}. (Figura 11). Se verificó la construcción mediante secuenciación con los oligos tyrC5 y MtyrA3, y con geles de poliacrilamida a 15%, (ver sección V.10). además de realizar ensayos de complementación (ver sección V.8).

En el plásmido **pTrctyrCphea_{INV}**, *pheA_{CM}* quedó en la orientación incorrecta para su expresión. Se utilizó como control en los ensayos de complementación.

5.6.3. Construcción del plásmido pACM*melAI*

El gen *melA* codifica para la tirosonasa de *Rhizobium etli* CFN42 (14). En este estudio se utilizó una mutante espontánea del gen *melA* a la que se denominó *mutmelA*. Tiene un cambio en el aminoácido 535 (N535G), y se decidió utilizarla porque en estudios preliminares se observó que producía MEL en menor tiempo en comparación con el gen silvestre, en medios enriquecidos con L-TIR (N. Cabrera y G. Gosset, comunicación personal). Esta versión se utilizó para la optimización de la producción de MEL en reactores de 1L, utilizando medio mínimo suplementado con L-TIR (54).

El plásmido **pACM*melAI*** fue construido por ligación de un fragmento de 2500 pb obtenido de la digestión con *Ssp* I de pTrc*mutmelA* (54) con el plásmido pACYC184 digerido en el sitio *EcoR* V. El fragmento de 2500 pb de la digestión con *Ssp* I de pTrc*mutmelA* fue purificado previamente de gel. El fragmento clonado incluye el promotor *trc*, el gen *mutmelA* y los terminadores del plásmido pTrc99A. Se verificó que la cepa transformada con pACM*melAI* producía MEL en medios ricos suplementados con L-TIR, y fue incapaz de crecer en medio con Tc. Cabe señalar que pACYC184 es posible seleccionarlo con Tc y Cm. Se eliminó la resistencia a Tc para poder transformar en una sola cepa plásmidos que sean seleccionados con Tc y con orígenes de replicación distintos al del pACYC184. Este plásmido se construyó con ayuda de N. Cabrera-Valladares.

5.6.4. Construcción del plásmido pM*melAtyrCphea_{CM}*

El plásmido pACM*melAI* fue digerido con la enzima *Bstz* 17I, obteniéndose un fragmento de 5899 pb. Por otra parte, pTrctyrC*phea_{CM}* fue digerido con *Ssp* I, obteniéndose dos fragmentos, uno de ellos de alrededor de 2000 pb en el cual se encontraba el promotor *trc*, los genes *tyrC* y *phea_{CM}*, y los tres terminadores del pTrc99A. Sin purificar las digestiones anteriores, ambos fragmentos se ligaron, para dar origen al plásmido

Tabla 8. Plásmidos empleados en este estudio.

Plásmido	Características importantes	Referencia
pTrc99A	Vector de clonación que tiene el promotor <i>trc</i> , y los genes <i>bla</i> (Ap ^R) y <i>lacI^f</i> . Origen de replicación del pBR322 (ColE1). El promotor <i>trc</i> es inducible por IPTG.	(2)
pACYC184	Vector de clonación que tiene los genes <i>cat</i> y <i>tet</i> , y el origen de replicación p15A.	(75)
pCR -Blunt II- TOPO	Vector de clonación. Promotor Lac, contiene los genes <i>kan</i> y <i>ccdb</i> , origen del pBR322.	Invitrogene, Carlsbad, CA
pTrc <i>pheA^{fbr}</i>	Gen <i>pheA^{fbr}</i> codifica para una versión truncada de la CM-PDT, su expresión es regulada por <i>trc</i> . El superíndice fbr significa resistente a inhibición por producto final.	(3)
pRW300	El <i>aroG^{fbr}</i> bajo la regulación del promotor lacUV5, tiene los genes <i>lacI^f</i> y <i>tet</i> genes. Origen de replicación del pBR322.	(35)
pJLBaro <i>G^{fbr}</i>	Similar al pRW300, con origen de replicación del pACYC184.	(3)
pCL <i>tktA</i>	Derivado del plásmido pCL1920. Contiene el gen <i>tktA</i> , el promotor <i>lac</i> y el gen <i>aada</i> . Origen de replicación del pSC101.	(35)
pTrc <i>mutmelA</i>	Gen <i>mutmelA</i> clonado en pTrc99A.	Colección del laboratorio
pTOPO <i>tyrA</i>	Gen <i>tyrA</i> clonado en PCR-BluntII-TOPO.	(17)
pTrc <i>tyrA</i>	Gen <i>tyrA</i> clonado en pTrc99A	(17)
pTOPO <i>tyrC</i>	Gen <i>tyrC</i> clonado en PCR -Blunt II- TOPO	(17)
pTrc <i>tyrC</i>	Gen <i>tyrC</i> clonado en pTrc99A	(17)
pTrc <i>tyrCpheA_{CM}</i>	Genes <i>tyrC</i> y <i>pheA_{CM}</i> bajo el control del promotor <i>trc</i> . <i>pheA_{CM}</i> codifica para la CM de CM-PDT.	(17)
pTrc <i>tyrCpheA_{INV}</i>	Similar al pTrc <i>tyrCpheA_{CM}</i> pero <i>pheA_{CM}</i> está clonado en la orientación opuesta necesaria para su expresión.	(17)
pAC <i>MmelA I</i>	Gen <i>mutmelA</i> clonado en pACY184. Esta construcción solo tiene el gen <i>cat</i> .	Este estudio
p <i>MmelA</i> <i>tyrCpheA_{CM}</i>	Los genes <i>tyrC</i> y <i>pheA_{CM}</i> clonados en pAC <i>MmelA I</i>	Este estudio
Variantes del gen <i>tyrA</i>	Cambio de aminoácido	Referencia
pTrc <i>MtyrA2 (tyrA 2)</i>	M117I, D142A, L280I	Este estudio
pTrc <i>MtyrA83 (tyrA 83)</i>	L331Q	Este estudio
pTrc <i>MtyrA84 (tyrA 84)</i>	D134G, V346M	Este estudio
pTrc <i>MtyrA85 (tyrA 85)</i>	E86K, G108S, I147M	Este estudio
pTrc <i>MtyrA130 (tyrA 130)</i>	G160D, G201D, L330S	Este estudio
pTrc <i>MtyrA142 (tyrA 142)</i>	H189R, I284T	Este estudio
pTrc <i>MtyrA155 (tyrA 155)</i>	K161N, F200L, R356C	Este estudio
pTrc <i>MtyrA160 (tyrA 160)</i>	F114Y, Q333H, L364F	Este estudio
pTrc <i>MtyrA162 (tyrA 162)</i>	D246N, E326D	Este estudio

pMmelA_{tyr}Cp_{heA}CM. La cepa XL1Blue transformada con este plásmido fue capaz de producir MEL en medios ricos, mientras que FA114/ pMmelA_{tyr}Cp_{heA}CM creció en medio mínimo sin L-TIR.

5.7. PCR mutagénico y construcción del banco de mutantes de PDH

Se mutagenizó el fragmento del gen *tyrA* que codifica para los aminoácidos 68 al 373, desde el sitio de reconocimiento para la enzima *Bgl* II, presente en el interior del gen *tyrA* hasta el sitio de corte para *Hind* III (Figura 10). La mutagénesis al azar se efectuó utilizando el kit *GeneMorph Random Mutagenesis* (Stratagene), empleando los oligonucleótidos pdhtyrA5 (*Bgl* II) y MtyrA3 (*Hind* III), respectivamente (Tabla 7), generándose un producto de PCR de 1022 pb. La mezcla de reacción (50 µl) contenía amortiguador para la *Mutazyme* 1X, 0.2mM de cada uno de los dNTP, 1.25 ng de pTrctyrA como templado, 10 pmol de cada oligonucleótido, y 2.5 U de Mutazyme DNA polimerasa (Stratagene). Las condiciones del PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 30 s a 96°C, 30s 50°C, 2 min 72°C; 30 ciclos 30s 94°C, 30s 50°C, 2 min 72°C; y una extensión final de 5 min a 72°C.

Los productos de PCR fueron digeridos con *Bgl* II y *Hind* III, purificados de gel para eliminar el templado, y ligados en un fragmento de 4325 pb de pTrctyrA. Previamente, el plásmido pTrctyrA fue digerido con *Bgl* II y *Hind* III, para eliminar la región del gen que codifica los aminoácidos del 68 a 373, purificando a partir de gel el fragmento de 4325 pb. Siguiendo esta estrategia los fragmentos obtenidos por PCR reemplazaron la región correspondiente del gen *tyrA* silvestre (Figura 10). El banco de plásmidos fue transformado en XL1Blue. Después de recuperar las células en medio fresco, una alícuota fue sembrada por triplicado en cajas de LB con Ap para determinar el tamaño del banco. Se determinó la tasa de mutagénesis secuenciando los plásmidos obtenidos de 10 colonias elegidas al azar de las cajas anteriores, usando el oligo tyrA3 (Tabla 7). Las células restantes fueron cultivadas en medio LB líquido con Ap, por 12 horas a 37°C, y los plásmidos del banco fueron purificados y congelados a -20°C.

Es importante señalar que también se mutagenizó al azar del gen *tyrA* completo, siguiendo las mismas condiciones para la mutagénesis del dominio PDH, pero usando 20 pmoles de los oligos MtyrA5 y MtyrA3 (Tabla 7). La tasa de mutagénesis se controló empleando dos concentraciones diferentes de pTrctyrA como templado (1.25 y 4 ng), y se hizo una segunda ronda de mutagénesis empleando como templado 1.25 ng de un PCR del gen *tyrA* previamente mutagenizado. Tanto los productos de PCR como el vector fueron digeridos con *NcoI* y *HindIII* y fueron purificados de gel y ligados. El banco tiene un tamaño de 1 355 500 clonas con una tasa de mutagénesis de 4.3 mutaciones/Kb.

5.8. Selección de mutantes de PDH mediante complementación funcional

Para seleccionar las variantes activas, el banco de variantes del gen *tyrA* construido por mutagénesis al azar, se transformó en FA114. Después de la electroporación y recuperación, las células fueron lavadas una vez con M9 frío y sembradas en cajas de medio de selección, e incubadas a 30°C por 5 días. Debe señalarse que a partir de aproximadamente 3.4 días ya no crecieron nuevas colonias, solo aumentaron de tamaño las colonias existentes en las cajas. Las clonas fueron seleccionadas al azar y clasificadas por el tiempo de tardaron en complementar. Se purificó el plásmido y se transformó nuevamente en FA114 para comprobar el fenotipo. La región mutagenizada de *tyrA* fue secuenciada a partir de plásmidos purificados de una sola colonia.

Se utilizó medio M9 con 2 g/L de glucosa, 0.01g/L ácido *p*-hydroxybenzoico, 0.01 g/L ácido *p*-aminobenzoico, 0.01 g/L ácido 2,3-dihydroxybenzoico, 0.02 g/L L-TRP, 0.02 g/L L-FEN, 0.02 g/L L-leucina, 0.02 g/L L-isoleucina, 0.1mM isopropil-β-tiogalactopiranosido (IPTG) y Ap . Como parte del desarrollo de un método de selección se añadió al medio sólido para complementación Hidroxamato de L-tirosina (HxTir) en el rango de 0.0005-0.8g/L. Se seleccionaron las colonias que complementaron primero, ya que solo las cepas sobreproductoras de L-TIR crecerían en medio con el análogo.

Este ensayo también fue empleado para comprobar que los diversos plásmidos que portaban los genes *tyrA* y *tyrC* y *pheA_{CM}* eran funcionales después de su construcción. Con este fin, se electroporaba a FA114 con el plásmido recién construido. Tanto los controles

como la cepa problema se crecían en medio LB por una noche, y se lavaban una vez en M9 frío. El medio de selección se inoculaba con una O.D. 600 nm inicial de 0.05. En esta condición, la cepa FA114 transformada con pTrc99A no complementó.

5.9. Ensayos de actividad PDH y CM

Para la preparación de los extractos crudos, la cepa FA114 transformada con los plásmidos que portaban los genes *tyrA*, las mutantes del gen *tyrA*, y el operón con los genes *tyrC* y *pheA_{CM}*, fueron crecidas en medio LB con 0.1mM de IPTG y Cb, a 30°C por 12 horas. Las células se cosecharon y se lavaron una vez en amortiguador de lisis (0.1M Tris, 1mM EDTA de sodio, 1mM ditioneitol y 50 mM KCl, pH 7.5). Para sonicar, la pastilla de células se resuspendía en amortiguador de lisis a una concentración final de 20 D. O. 600 nm. Los restos celulares se eliminaban centrifugando a 15 500 x g por 10 min a 4°C, y se colectó el sobrenadante. Se prepararon extractos crudos con la cepa FA114/pTrc99A, que se utilizaron como control negativo.

La actividad PDH fué determinada espectrofotométricamente a 30°C, siguiendo la formación de NADH a 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}}$ para el NADH más HPPP, $6.4 * 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), en la presencia o en la ausencia de 0.6mM de L-TIR. La actividad de PheA_{CM} fue determinada a 30°C midiendo la desaparición del CHA a 290 nm, en ausencia y en presencia de 0.6 y 1.1 mM de L-TIR ($\epsilon_{290\text{nm}}$ para CHA, $1.85 * 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía 50mM Tris, 0.5mM EDTA de sodio, 0.1mg/mL albúmina de suero bovino (BSA). Las siguientes concentraciones de sustratos fueron utilizadas: 0.2mM PPA y 2 mM NAD⁺, para la actividad PDH; y 1mM de CHA para la actividad de PheA_{CM}. La reacción se inició con la adición del extracto crudo. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (11), empleando BSA como estándar. Se realizaron dos o tres experimentos independientes para cada extracto. Una unidad se define como la cantidad de enzima que produce un μmol de NADH o consume un μmol de CHA, por minuto a 30°C.

5.10. Electroforesis de proteínas

Para determinar los niveles de expresión de las proteínas TyrA seleccionadas del banco, se prepararon extractos crudos con FA114. Las condiciones de cultivo fueron similares a las descritas para los ensayos enzimáticos, excepto que se añadió 1mM de IPTG. Las células se cosecharon, se lavaron dos veces en M9 frío y se concentraron a 0.3 D.O. 600 nm/ mL.

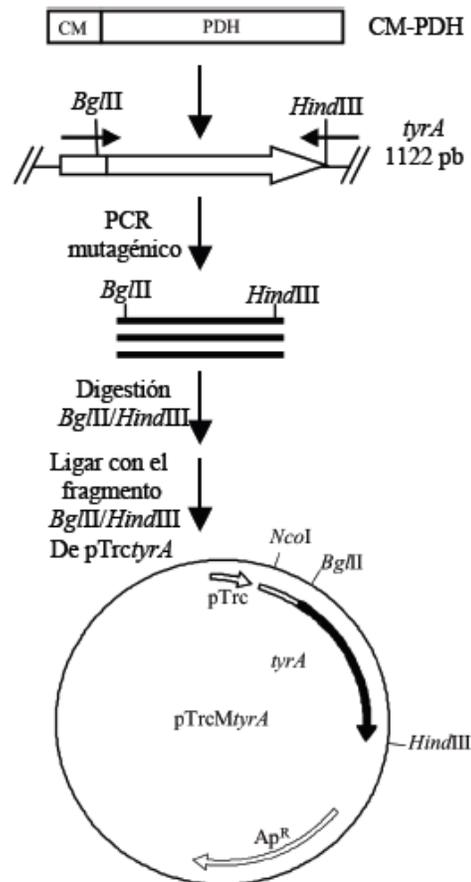


Figura 10. Estrategia de evolución dirigida de *tyrA* (Ver materiales y métodos).

La pastilla se resuspendió en amortiguador de carga (12.5 mM Tris pH 6.8, 30% SDS, 2% glicerol, 10% β -mercaptoetanol) y se rompieron por sonicación. Las muestras fueron separados en un gel al 15% (SDS-PAGE) y teñidas con azul de Coomassie (Laemmli, 1970). La intensidad de las bandas fue determinada utilizando el programa Image 1.31s (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

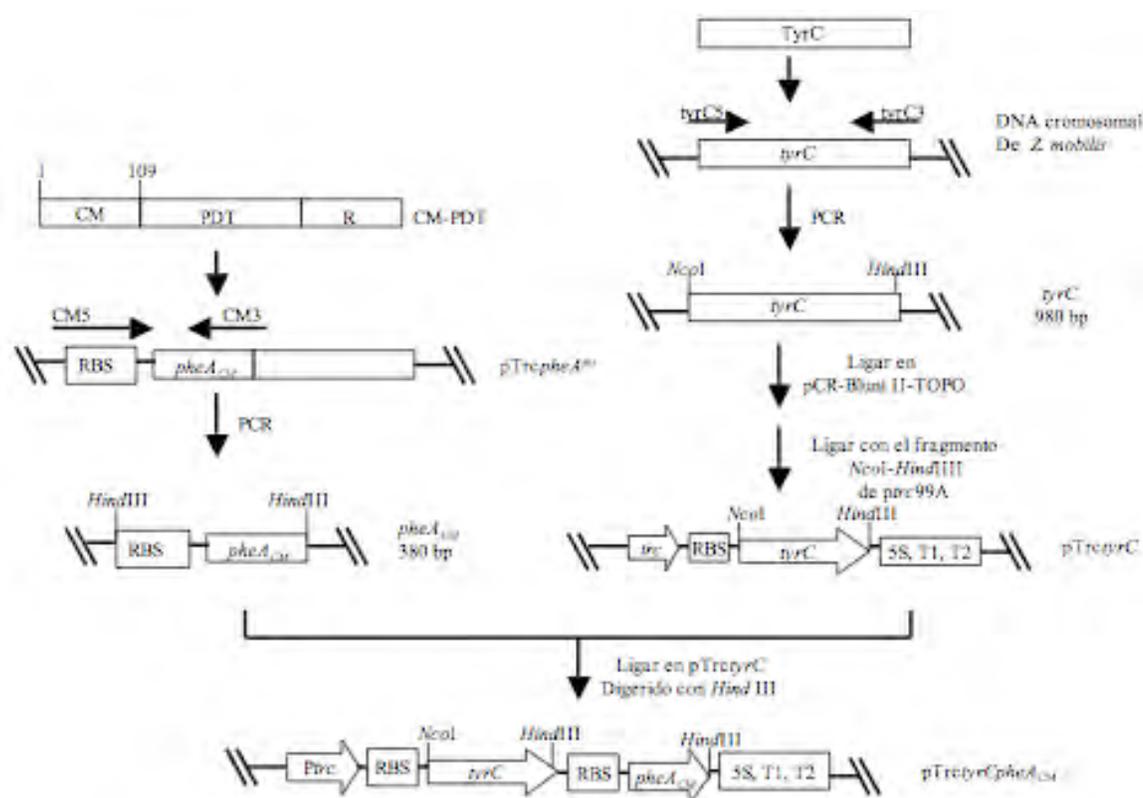


Figura 11. Construcción del operón *pTrctyrCpheA_{CM}* (Ver materiales y métodos).

5.11. Cinéticas de producción de L-TIR y MEL

5.11.1. Cultivos en matraz para la producción de L-TIR y MEL

Los ensayos de producción de L-TIR y MEL en matraz se efectuaron en medio mínimo M9 con los antibióticos correspondientes (consultar la sección V.3. Procedimientos generales de cultivo). El medio mineral M9 contiene 6g/L de Na_2HPO_4 , 3g/L de KH_2PO_4 , 1g/L de NH_4Cl , 0.5g/L de NaCl , 1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1mM CaCl_2 , 1mg/L tiamina-HCl. Los cultivos se iniciaron estriando las cepas conservadas a -70°C en cajas de LB con antibióticos. Se tomó una asada de las cajas y se crecieron las cepas en LB líquido con antibióticos a 37°C . Los inóculos se prepararon en M9 con 2 g/L de glucosa y se añadió la cantidad de LB líquido necesaria para iniciar con una D.O. 600 nm de 0.1. Se incubó a 30°C , 300 r.p.m., en matraces con mamparas. Se incubó cada grupo de cepas el tiempo

indicado a continuación: las cepas derivadas de PB12, 18-20 horas; de W3110, 12-15 horas; y de VH33, 48-60 horas. En el tiempo indicado, las cepas alcanzaron D.O 600 nm de 1.2 a 1.5. Se centrifugó el volumen necesario del inóculo para iniciar las cinéticas de producción con las siguientes D.O. 600 nm: los cultivos de producción de L-TIR empleando a PB12 se iniciaron con una D.O. de 0.1, mientras que las cinéticas de producción de MEL y L-TIR con el grupo de cepas de W3110 y VH33, se realizaron con una D.O. 600 nm inicial de 0.25.

En las cinéticas de producción de L-TIR en matraz se empleó 10 g/L de glucosa, IPTG en una concentración final de 0.1mM, en matraces con mamparas, a 300 r.p.m., 30°C. En los cultivos de producción de MEL, se utilizaron las condiciones indicadas para los cultivos de producción de L-TIR, con algunas modificaciones. Se añadió CuSO₄ en una concentración final de 20 µg/mL, al inicio o a las 16 horas de cultivo. Como control, en algunos cultivos iniciales, la L-TIR fue añadida en polvo, a una concentración final de 0.4g/L. Para determinar la capacidad de síntesis de L-TIR por las cepas empleadas para la producción de MEL, no se añadió CuSO₄ para que la tirosinasa no fuese activa y no consumiera la L-TIR producida por la cepa.

5.11.2. Cultivos en biorreactor para la producción de L-TIR

En los experimentos en biorreactor para la producción de L-TIR, el inóculo se preparó con sales M9, con 5g/L de glucosa, 5 g/L de YE y metales traza en la siguiente concentración final (µg por litro): EDTA de sodio 2H₂O 8.74, CoCl₂ 6H₂O 1.55, MnCl₂ 9.30, CuCl₂ 0.93, Na₂MoO₄ 2H₂O 1.30, acetato de Zn H₂O 20.96, Fe (III) citrato de Fe(III) 62.49 y H₃BO₃ 1.86. Previamente, se crecieron en cajas de LB con antibióticos las cepas PB12C y PB12CP (ver tabla 15 para nomenclatura), que se utilizaron para iniciar los inóculos con una D.O. 600 nm de 0.1. El inóculo se incubó 8 horas, a 300 r.p.m., 37°C, hasta alcanzar una D.O. 600 nm de 6, aproximadamente. Se calculó el volumen necesario de inóculo para iniciar los cultivos en biorreactor con 2.0 D.O. a 600nm (alrededor de 200 mL de inóculo). En el biorreactor, el medio se formuló para generar aproximadamente 40 g/L de células. Como se tomó como referencia la composición del M9, nos referiremos a este medio como M9Tir. El medio M9Tir contiene por litro: Glucosa 50 g, Na₂HPO₄ 6 g, KH₂PO₄ 3

g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g, citrato de sodio $2\text{H}_2\text{O}$ 2 g, YE 10 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, CaCl_2 550 mg, tiamina-HCl 40 mg, Tc 30 μg , Cb 100 μg y 23.83 mg IPTG. Los metales traza se añadieron en la siguiente concentración, en μg por litro: EDTA de sodio $2\text{H}_2\text{O}$ 8.74, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.55, MnCl_2 9.30, CuCl_2 0.93, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.30, acetato de zinc H_2O 20.96, citrato de Fe(III) 62.49 y H_3BO_3 1.86. Los cultivos se hicieron en Biorreactores de 1L (BioFlo 110 Modular Fermentor System, New Brunswick Scientific, NJ). Los reactores fueron controlados con el programa AFS-Biocommand Bioprocessing (New Brunswick Scientific, NJ). Las condiciones de cultivo fueron: volumen de trabajo 0.6 L, temperatura 37°C , flujo de aire 0.6 L/min, el oxígeno disuelto se mantuvo por arriba del 30% de la saturación, incrementando la velocidad de agitación (500 a 1200 r.p.m), el pH se mantuvo en 7.0 por la adición de una solución de NH_4OH 15%. Se añadió antiespumante en función de la demanda.

5.12. Purificación de MEL

Para purificar melanina de la cepa W3110A (Ver tabla 19 para nomenclatura), se hizo un cultivo en fermentador con un volumen de trabajo de 10 L, en M9 con 10 g/L de glucosa, 30°C , 250 r.p.m. Se Añadió CuSO_4 a las 16 horas. El cultivo se inició con una D.O. 600 nm de 0.1. En el caso de las cepas VH33D y VH33E (Ver tabla 19 para nomenclatura), las cepas se crecieron en matraces ferbbatch, en un volumen final de 1 L, en M9 con 5g/L de glucosa y 5 g/L de glicerol (se utilizó glicerol porque se observó que las cepas derivadas de VH33 duplican su velocidad de crecimiento en presencia de glicerol, Chávez Béjar, datos no mostrados), a 30°C , 300 r.p.m. Se añadió CuSO_4 a las 16 horas, y los cultivos se iniciaron con una D.O. 600 nm de 0.1. Las células se eliminaron por centrifugación a 4500 r.p.m. por 5 minutos, y se guardó el sobrenadante del medio de cultivo a 4°C (la preparación de los inóculos se describe en la sección V.11.1).

La melanina se recuperó del medio de cultivo precipitándola ajustando el pH a 2 con HCl 6N y refrigerando a 4°C por 72 horas. El medio fué centrifugando a 12 000 r.p.m por 10 min. Después de lavar con agua, la melanina fué secada a 42°C por 48 h.

5.13. Métodos analíticos

5.13.1 Cuantificación del crecimiento y formación de MEL

Se determinó el crecimiento midiendo la D.O. a 600 nm, haciendo las diluciones apropiadas, y se convirtió a gramos de célula en peso seco (g cél/L) con el factor 1 D.O. 600nm = 0.37 g/L (43).

La formación de melanina se determinó midiendo absorbancia a 400 nm a los sobrenadantes del medio de cultivo haciendo las diluciones apropiadas, teniendo en cuenta que 1D.O.₄₀₀ equivale a 0.066g/L de MEL (54).

5.13.2. Cuantificación de L-TIR y L-FEN

La L-TIR y la L-FEN fueron cuantificados en los sobrenadantes de los medios de cultivo, empleando el sistema HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Ca), con la columna Phenomenex Synergy Hydro RP18 (150 X 4.6 mm, 4 µm). La fase móvil empleada fue metanol 10% en ácido acético 0.1%, con un flujo de 0.5 mL/min. La detección se hizo con dos métodos, por espectrometría de masas, empleando un equipo LC/MSD Agilent, serie 1100, con interfase de electrospray y analizador de cuadrupolo. Las condiciones de análisis fueron: voltaje del capilar: 3000 V, fragmentor: 100V, T gas (N₂): 200°C. La detección en masas se hizo por TIC (*Total Ion Current*). En estas condiciones se detectaron los iones: L-FEN, 166.3 [M+H]⁺ y L-TIR, 182.2 [M+H]⁺. La cuantificación por UV se hizo 220 nm, y finalmente, empleando un detector de arreglo de diodos.

Es importante señalar que la L-TIR es insoluble en agua por arriba de 0.4-0.5 g/L a pH 7, por esta razón las muestras en las que se esperaba una concentración superior a estos valores, se añadía 50 µl de HCl 6N por cada mL de medio de cultivo con células, las muestras se mezclaban e incubaban a 42°C por 30 min. Finalmente, eran centrifugadas a 12 000 r.p.m por 5 minutos para eliminar las células del medio.

5.13.3. Cuantificación de glucosa, DHS, SHIK y acetato

La glucosa, el DHS, SHIK y acetato, se cuantificaron por HPLC (bomba cuaternaria 600E, detector de índice de refracción 2410, inyector automático 717, y detector de arreglo de

diodos 996, Waters, Milford, MA), utilizando la columna Aminex HPX-87H (300 X 7.8 mm, 9 μ m) (Bio-Rad, Hercules, CA). Las condiciones del análisis fueron: fase móvil, H₂SO₄, 5 mM; flujo, 0.5 mL/min; temperatura de la columna, 50°C. En estas condiciones, la glucosa y el ácido acético fueron cuantificados empleando el detector de índice de refracción. El SHIK y el DHS, fueron cuantificados empleando el detector de arreglo de diodos a 210 nm.

La glucosa también fue cuantificada por dos métodos enzimáticos (2700 biochemistry analyzer, YSI, Yellow Springs, OH.; y Accu-Chek, Roche Diagnostics Corporation, Alemania).

5.13.4 Espectroscopía de infrarrojo

Las muestras fueron mezcladas con KBr utilizando una dilución de 1:100. Los espectros de infrarrojo se registraron en un espectrómetro FTIR marca Nicolet modelo Magna 750 con 4 cm⁻¹ de resolución y 100 barridos por espectro. Antes de realizar la prueba de la mezcla, KBr-muestra se hizo una pastilla de aproximadamente 25 mg/cm². Todas las pruebas se llevaron a cabo a temperatura ambiente. La técnica y la interpretación de los espectros la realizó la, UNICAT (Unidad de Investigación en Catálisis)/UNAM

VI. Resultados

6.1. Sección I: Modificación de la regulación a nivel enzimático de la vía específica de biosíntesis de L-TIR

6.1.1. Mutagénesis del gen *tyrA* y selección por complementación funcional de variantes activas de la CM-PDH

En la etapa en la que se inició este estudio, no se contaba con información que permitiera generar por mutagénesis sitio-dirigida mutantes del gen *tyrA* que codificaran para enzimas no inhibidas por L-TIR. Por esta razón, se efectuó mutagénesis al azar *tyrA* en la región del gen que codifica el dominio PDH y el 24% del dominio CM (residuos 68 al 373) (Figuras 10 y 12). Con el grupo de productos de PCR se construyó un banco de aproximadamente 850 000 clonas, con una tasa de mutagénesis de 3.4 cambios por Kb (datos no mostrados, ver materiales y métodos). Fueron secuenciados en total 7259 nucleótidos, a partir de colonias crecidas sin selección. Se observó que las mutaciones se encontraban distribuidas al azar a lo largo de la zona secuenciada, sin encontrarse algún sesgo, en este proceso se encontró también un plásmido con el gen *tyrA* silvestre (Figura 12). El banco tenía un porcentaje de transversiones (cambios de purina por pirimidina y pirimidina por purina) del 56%, y de transiciones (cambios de purina por purina, y pirimidina por pirimidina) del 44%. De las mutaciones encontradas, el 44% fueron silenciosas. También se mutagenizó el gen *tyrA* completo, sin embargo el banco que se construyó con el conjunto de productos de PCR ya no se utilizó porque, como se detallará en las siguientes secciones, se encontraron variantes resistentes a inhibición por L-TIR en el banco PDH.

Para seleccionar las clonas del banco PDH que retuvieron la actividad después de la mutagénesis, se transformó el banco en la cepa FA114, que es una cepa *tyrA⁻pheA⁻* por lo que es auxótrofa a L-TIR y L-FEN, y se sembró en cajas de medio para complementación. Las primeras colonias aparecieron después de 31 horas de incubación a

30°C. Las colonias se clasificaron en base al tiempo de complementación. Se seleccionaron al azar las clonas *tyrA2*, *tyrA83*, *tyrA84*, *tyrA85*, *tyrA130*, *tyrA142*, *tyrA155*, *tyrA160* y *tyrA162*. *tyrA2* complementó a las 42 horas, *tyrA83* y *tyrA84*, a las 81 horas; *tyrA130*, *tyrA142*, *tyrA155*, *tyrA160* y *tyrA162*, a las 101 horas (Tabla 9). Cabe señalar que la cepa transformada con el gen silvestre complementa en estas condiciones a las 24-36 horas, y que FA114 transformada con pTrc99A –plásmido vacío- no complementa en las condiciones utilizadas en la selección. Se purificaron los plásmidos y se transformaron nuevamente en FA114 y las clonas complementaron nuevamente.

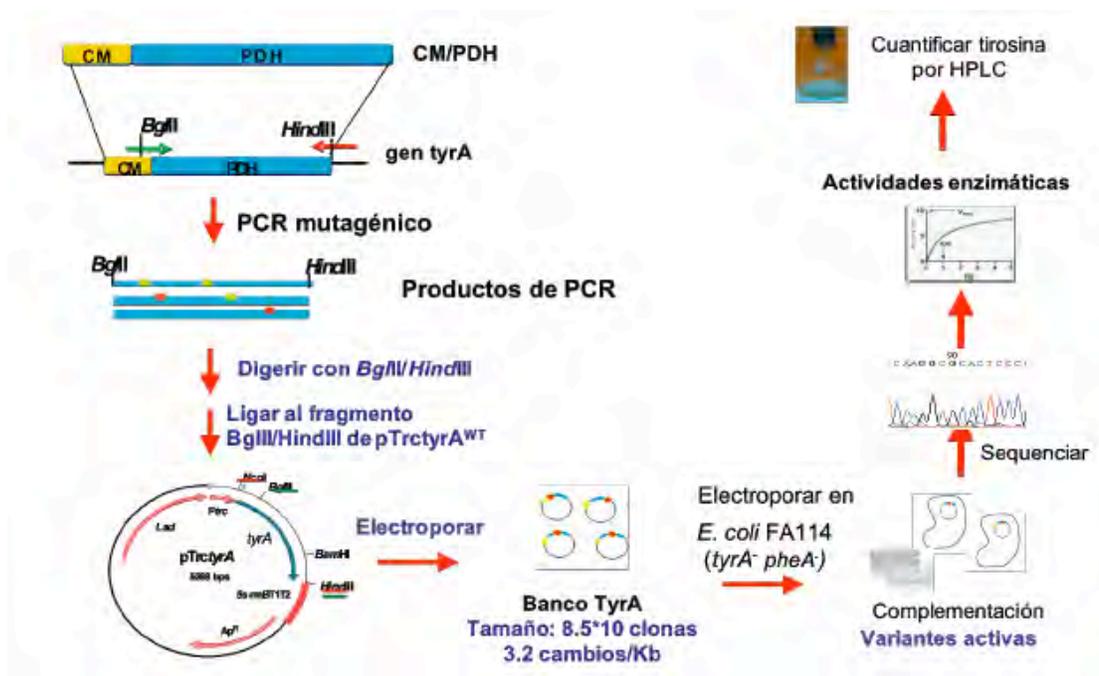
Se trabajó en desarrollar un método de selección añadiendo al medio de complementación distintas concentraciones de hidroximato de L-tirosina (HxTir) . Este análogo se usó en otro estudio en la selección de cepas sobreproductores de L-TIR generadas por mutagénesis clásica (93). Sin embargo, tanto la cepa transformada con la CM-PDH como las transformadas con variantes sensibles a inhibición por L-TIR crecieron en las concentraciones más altas del análogo. En la secuencia nucleotídica de 10 variantes seleccionadas en 0.2, 0.6 y 0.8 g/L de HxTir, se observó que se seleccionó una colonia transformada con el gen *tyrA* silvestre y otras dos variantes que tenían solamente mutaciones silenciosas (datos no mostrados). No se utilizó otro análogo ya que en ese momento ya se habían identificado tres variantes resistentes a inhibición por L-TIR.

Tabla 9. Variantes seleccionadas del banco PDH por complementación funcional.

variante	Cambio de aminoácido	Tiempo de complementación (tamaño colonia)
TyrA2	M117I, D142A, L280I	42 h (grande)
TyrA83	L331Q	57 h (mediana)
TyrA84	D134G, V346S	57 h (mediana)
TyrA85	E86K, G108S* , I147M	57 h (mediana)
TyrA122	S97P, R294L	81 h (mediana)
TyrA130	G160D, G201D , L330S	81 h (mediana)
TyrA142	H189R, I284T	81 h (mediana)
TyrA155	<i>K161N</i> , F200L , R356C	101 h (chica)
TyrA160	F114Y, Q333H, L364F	101 h (chica)
TyrA162	D246N , E326D	101 h (chica)

*En negritas se muestran los residuos muy conservados en la familia TyrA

**En itálicas se muestran residuos donde hay sustituciones semiconservadas en la familia TyrA

**Figura 12.** Mutagénesis al azar y selección de variantes del gen *tyrA*.

seleccionadas del banco mostraron distintos niveles de actividad y de resistencia a L-TIR. Las mutantes TyrA2, TyrA83 y TyrA160 tuvieron el 1.8, 3 y 5.2% de actividad tomando como referencia la enzima silvestre. Estas enzimas fueron totalmente inhibidas por L-TIR. Las variantes TyrA85, TyrA142 y TyrA162 no tuvieron actividad detectable tanto en presencia como en ausencia de L-TIR. Por otro lado, se determinó que las mutantes TyrA84, TyrA130 y TyrA155, tenían un 23.0, 0.36 y 2.00 %, respectivamente, de la actividad de la enzima silvestre en ausencia de L-TIR. Mientras que 0.6 mM de L-TIR las inhibió solo de manera parcial, ya que presentaron niveles de actividad del 2.08, 41.1 y 61.8%, respectivamente, en relación con la actividad de cada una de las variantes en ausencia de L-TIR.

Para determinar si las diferencias en las actividades enzimáticas se debían o no a diferencias en niveles de expresión, se hicieron geles SDS-PAGE con extractos crudos de las mutantes del gen *tyrA* transformadas en FA114. Se utilizó como control extractos de la cepa FA114 transformada con pTrc99A y pTrc*tyrA*. Se determinó por densitometría que la diferencia en los niveles de proteína para las mutantes y la enzima silvestre fue menor al 10%, excepto para la TyrA162, cuyo nivel de expresión 20% superior al de la enzima silvestre (Figura 15).

Se determinó la secuencia nucleotídica para las mutantes de *tyrA*. La tabla 9 y la figura 13 indican las mutaciones encontradas en cada una de las variantes. Las variantes fueron secuenciadas completamente dos veces y no se encontraron mutaciones en el promotor que pudieran afectar los niveles de expresión. En la figura 13 se muestra un alineamiento múltiple para TyrA silvestre y las mutantes. Se incluyeron el dominio PDH completo y los últimos 28 aminoácidos de la CM, que corresponde a la región de gen *tyrA* que fue mutagenizada. Las variantes de TyrA que fueron seleccionadas, tuvieron de 1 a 3 mutaciones. Excepto para la variante TyrA85, las mutaciones se localizaron en el dominio PDH. En la figura 13 se señalaron las mutaciones recientemente reportadas por Lütke-Eversloh et al. 2005 (58).

Tabla 10. Actividad específica de PDH determinada en extractos crudos en presencia y en ausencia de 0.6 mM de L-Tir.

variante	Actividad específica PDH (U/mg)	
	0 mM de L-Tir	0.6 mM de L-Tir
CM-PDH	46.27 ± 3.32	n.d.
TyrA2	0.81 ± 0.07	n.d.
TyrA83	1.38 ± 0.12	n.d.
TyrA84	10.67 ± 0.76	0.22 ± 0.005
TyrA85	n.d.	n.d.
TyrA130	0.17 ± 0.002	0.07 ± 0.007
TyrA142	n.d.	n.d.
TyrA155	0.93 ± 0.11	0.57 ± 0.06
TyrA160	2.39 ± 0.20	n.d.
TyrA162	n.d.	n.d.
TyrAD134G	25.55 ± 1.95	n.d.
TyrAV346M	5.1 ± 0.74	0.45 ± 0.27
TyrAG160D	19.6±3.78	n.d.
TyrAG201D	0.45 ± 0.29	0.25 ± 0.07
TyrAL330S	18.56 ± 1.10	n.d.
TyrAK161N	23.91 ± 3.69	n.d.
TyrAF200L	7.89 ± 0.46	1.51 ± 0.53
TyrAR356C	26.18 ± 2.11	n.d.

n.d. no detectable.

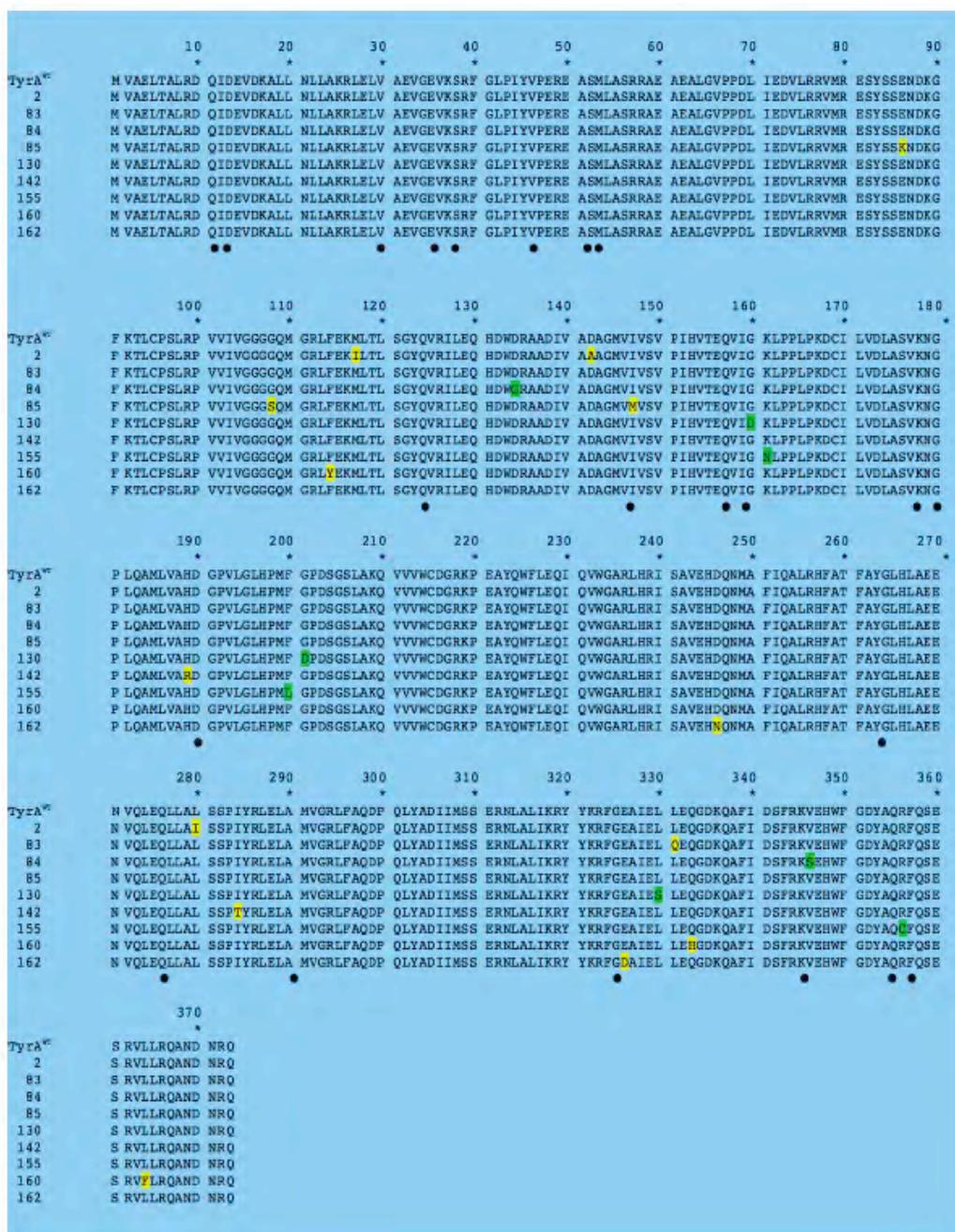


Figura 13. Alineamiento múltiple de CM-PDH silvestre y diversas variantes de CM-PDH. **A** Mutaciones identificadas en las variantes del banco PDH que fueron inhibidas por L-TIR. **A** Mutaciones en las Tyra^{br} aisladas del banco PDH ● Mutaciones encontradas en las Tyra^{br} reportadas en otro estudio ((58)).

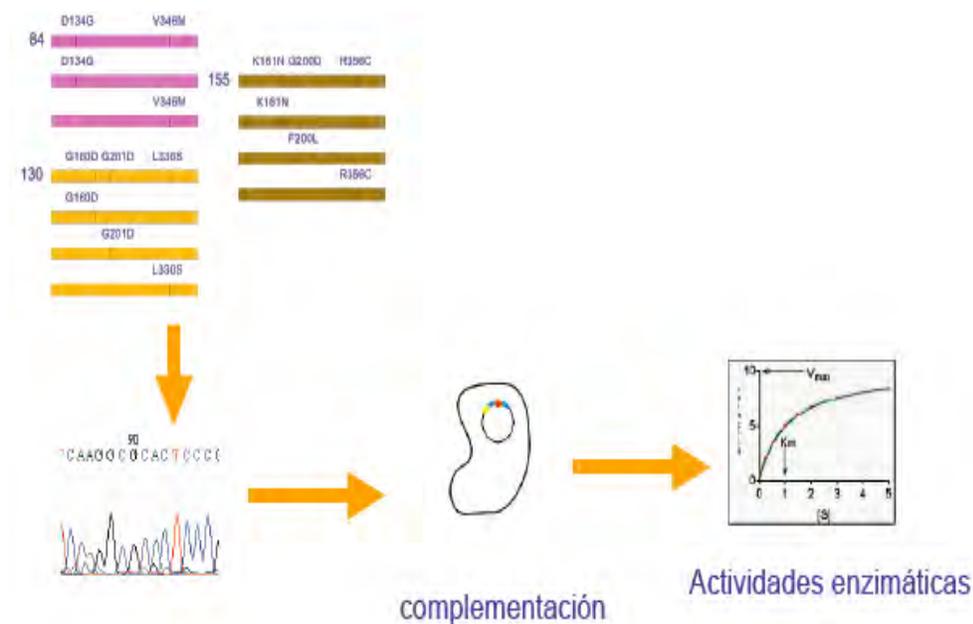


Figura 14. Construcción y caracterización del efecto de cada mutación identificada en TyrA84, TyrA130 y TyrA155.

6.1.3. Identificación de residuos importantes en la generación de enzimas resistentes no inhibidas por L-TIR

Las variantes que conservaron su actividad en los ensayos en presencia de L-TIR (TyrA^{fbr}), tuvieron dos o tres cambios de aminoácidos en diversas regiones de la CM-PDH. Para determinar la contribución de cada mutación sobre la actividad y la resistencia

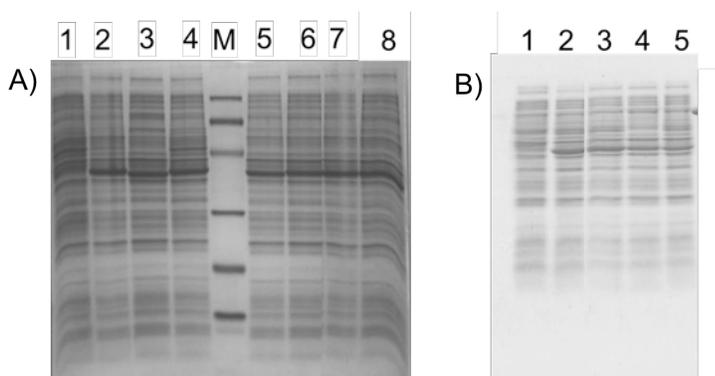


Figura 15. Niveles de expresión de mutantes de la CM-PDH generadas por mutagénesis al azar. **A)** 1. Control negativo (FA114/pTrc99A); 2. CM-PDH; 3. TyrA2; 4. TyrA83; 5. TyrA84; 6. TyrA85; 7. TyrA155; 8. TyrA160; **M.** marcador de peso molecular (de arriba hacia abajo: Fosforilasa b (97 400 Da), BSA (66 200 Da), ovoalbúmina (45 000 Da), anhidrasa carbónica (31 000 Da), inhibidor de tripsina (21 500 Da), lisozima (14 400)). **B)** 1. Control negativo (FA114/pTrc99A); 2. CM-PDH; 3. TyrA130; 4. TyrA142; 5. TyrA162.

Tabla 11. Grupo de variantes secuenciadas del banco PDH seleccionadas por complementación

Variante	Mutaciones	Tiempo complementación (tamaño colonia)
69	W133G, Q183H, P238P, P300S	57 horas (mediana)
88	V177M, L278Q, L287P	57 horas (chica)
90	V74V, F296S	57 horas (chica)
122	S97P, R294L	81 horas (mediana)
126	E115STOP, G201S , L255L, L280L, A327A	81 horas (mediana)
133	I103I, K116STOP, A175T, K345E, S359N	81 horas (mediana)
142	I152I, H189R, I284T	81 horas (mediana)
152	Q247STOP, S310S	101 horas (chica)
161	R135STOP, V158A, Q183H, P198P, A250A	101 horas (chica)
162	P220P, D246N , F251F, E326D	101 horas (chica)
163	E129K	101 horas (chica)

En negritas se indican los residuos conservados

a L-TIR, se construyeron variantes con cada cambio encontrado en las variantes TyrA^{fbt} (tabla 9 y figura 14). Estas variantes se transformaron en FA114 y realizaron ensayos enzimáticos en presencia y en ausencia de L-TIR. Los resultados de actividad enzimática se muestran en la tabla 10. Las enzimas con cambio de aminoácidos en los residuos 134, 160, 161, 330 y 356 tuvieron una actividad de 55, 43, 52, 40, 57%, respectivamente, en comparación con la actividad de la enzima silvestre en ausencia de L-TIR. Al añadir 0.6 mM a la mezcla de reacción estas variantes son inhibidas totalmente por L-TIR. El Cambio de aminoácido en las posiciones 200, 201 y 346 se generan enzimas con 17, 0.97 y 11%, respectivamente, con respecto a la actividad de la enzima silvestre en ausencia de L-TIR. Estas variantes en presencia de L-TIR permanecen parcialmente activas. En comparación con la actividad específica en ausencia de L-TIR, F200L conservó el 19% de actividad, G201D el 55% y V346M, 9% de la actividad en 6mM de L-TIR.

Se determinaron los niveles de expresión de las proteínas anteriores con respecto a la silvestre. Se determinó por densitometría que la diferencia en los niveles de proteína para la mutantes y la enzima silvestre fue menor al 15% (Figura 16).

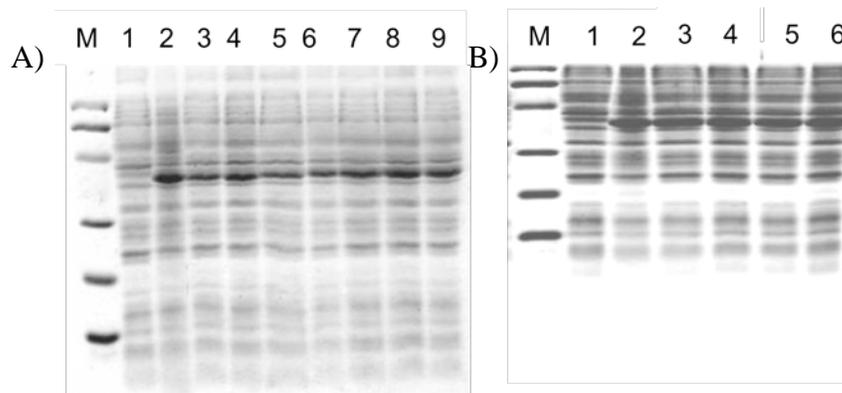


Figura 16. Niveles de expresión de las mutantes de la CM-PDH generadas por mutagénesis dirigida. A) 1. Control negativo (FA114/pTrc99A); 2. CM-PDH; 3. TyrA84; 4. TyrAD134G; 5. TyrAV346M; 6. TyrA130; 7. TyrAG160D 8. TyrAG201D; 9. TyrAL330S; M. Marcador de peso molecular (de arriba hacia abajo: Fosforilasa b (97 400 Da), BSA (66 200 Da), ovoalbúmina (45 000 Da), anhidrasa carbónica (31 000 Da), inhibidor de tripsina (21 500 Da), lisozima (14 400)). B) 1. Control negativo (FA114/pTrc99A); 2. CM-PDH; 3. TyrA155; 4. TyrAK161N; 5. TyrAF200L; 6. TyrAR356C.

6.1.4. Modelo de la estructura de la CM-PDH

Con la finalidad de comprender a nivel estructural el efecto de cada una de las mutaciones de las TyrA^{fbr} identificadas en este estudio, se construyó un modelo de la estructura secundaria y terciaria de la CM-PDH, y se realizó un análisis comparativo con las estructuras de otras proteínas de la familia que han sido determinadas experimentalmente. Comparando la secuencias primarias, la CM-PDH tiene un 57% de identidad con la TyrA_p de *H. influenzae*[¶] (TyrA_{pHi}); 20% con la TyrA_p de *A. aeolicus* (TyrA_{pAa}); 3) 23% con la TryA_a de *Synechocystis sp* (TyrA_{pS}); y 4) no tiene una similitud significativa con la

[¶] Es importante señalar que TyrA_{pHi} es también una CM-PDH, sin embargo, solo se cristalizó el dominio PDH en presencia de la L-TIR.

Figura 17. Alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas TyrA que han sido cristalizadas en comparación con la CM-PDH (T-coffee v. 7.73): CM-PDH *E. coli*, TyrA_{pSt}, TyrA_p de *Streptococcus thermophilus*; TyrA_{pHi}, TyrA_p *Haemophilus influenzae*; TyrA_{pAa}, TyrA_p *Aquifex aeolicus*; TyrA_{aS}, TyrA_a *Synechocystis sp.* El símbolo “*” significa que el residuo es el mismo en todas las secuencias; el símbolo “:” significa sustituciones conservadas; “.” significa que se observaron sustituciones semiconservadas, “+” indica los residuos que interactúan directamente con la L-TIR en las estructuras cristalográficas de TyrA_{pAa} y TyrA_{pHi}; “+” Son los residuos que interactúan con la L-TIR en TyrA_{pAa}; “+” Son los residuos que interactúan con la L-TIR en TyrA_{pHi}.

TyrA_p *S. thermophilus* (TyrA_{pSt}) en las condiciones predeterminadas del algoritmo de Blastp. En el alineamiento múltiple de dichas secuencias (Figura 17) se puede observar que la mayoría de los residuos importantes en la unión de los sustratos están conservados en las cinco proteínas que fueron comparadas, como es el caso de la R294, la H197 (en numeración de la CM-PDH); y las glicinas de la firma de Wierenga. En esta figura están encerrados en rectángulos los residuos de TyrA_{pAa} y TyrA_{pHi} que interaccionan la L-TIR, (85)(JCSG, depositada en el PDB 22-agosto-2007) y que forman parte del sitio activo de ambas enzimas. Dichos residuos están conservados en las proteínas alineadas, salvo algunas excepciones, como la Thr152 (numeración de TyrA_{pAa}) que está presente solo en 2 de las cinco proteínas que fueron comparadas, y que es un residuo que interactúa con el grupo amino de la L-TIR en TyrA_{pAa}. Es interesante notar que a la CM-PDH y a TyrA_{pHi} son proteínas fusionadas a la CM no tienen un grupo de aminoácidos en esa región de la proteína que sí están presentes en otras proteínas TyrA.

A pesar que las proteínas alineadas no tienen una similitud alta con la CM-PDH y entre sí, la comparación de las estructuras secundaria y terciaria indican que las proteínas son estructuralmente muy similares (Figuras 18 y 19).

El modelo de la estructura de la CM-PDH se obtuvo por homología empleando como templado la estructura de la corismato mutasa-prefenato deshidrogenasa de *H. influenzae* haciendo uso de la página Swiss Model. En el N-Terminal de la enzima, que corresponde a la región donde están los residuos que está en contacto con el NAD en TyrA_{aAa} y TyrA_{pHi}, consta de 7 hojas β y 6 hélices. El C-terminal de la enzima es un dominio helicoidal que consta de 7 hélices (Figuras 18 y 19). El modelo obtenido muestra que la CM-PDH tiene una estructura muy similar a las determinadas experimentalmente, salvo

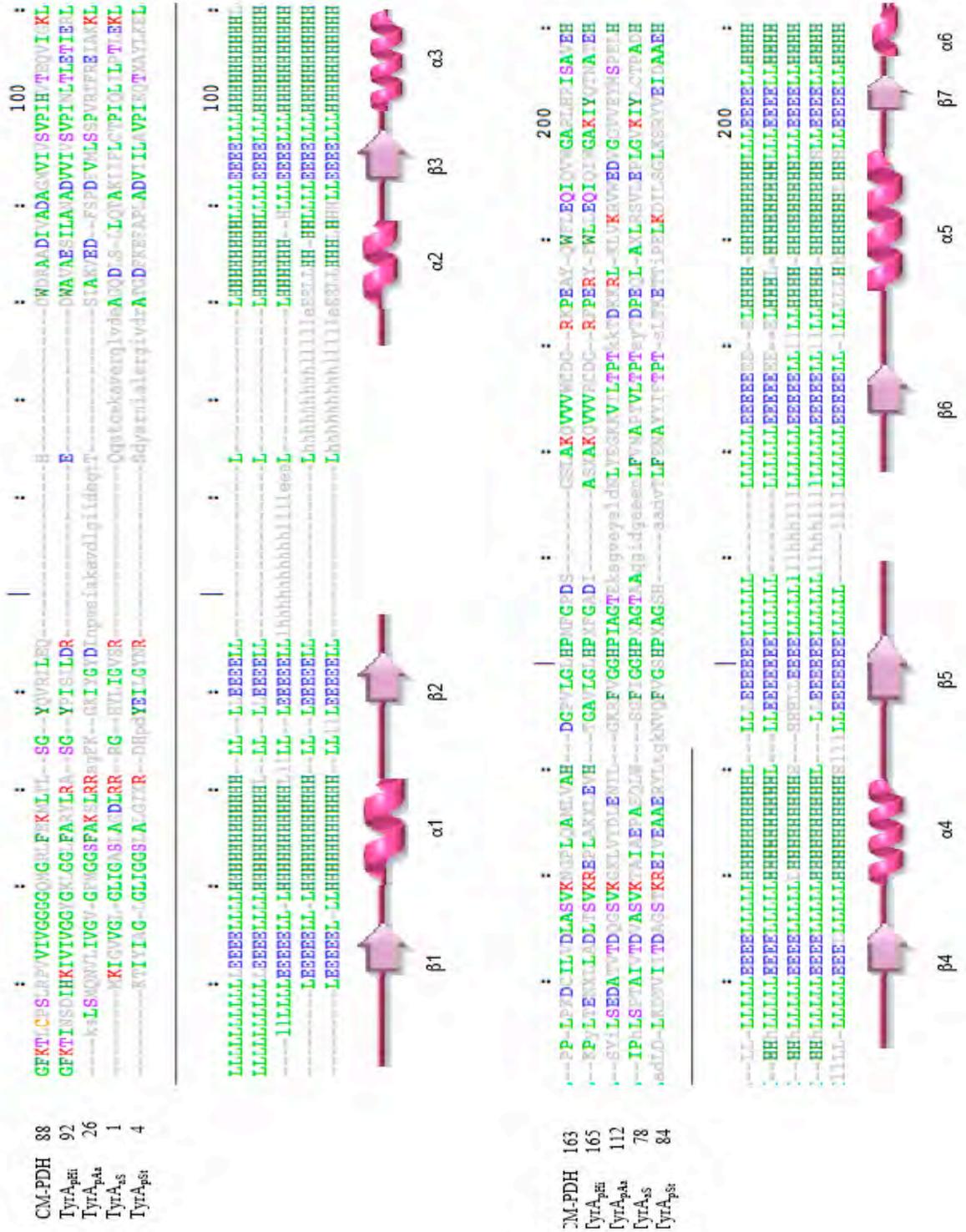


Figura 18 (continúa en la siguiente página).

Tabla 12. Residuos del sitio activo de la TyrA_{pAa}, el residuo equivalente en la CM-PDH se muestra entre paréntesis

Región sitio activo	Residuo
Región polar	H147 (H197), S126 (S176), H214, S213, F209, y H205 (H245)
Región hidrofóbica	I149, Ala-150 (F200), G151 (G201), Thr-152 (S202), H217 (H257), F221 (F261), M258, y Trp-259
Región iónica	Q153 (Q253), R250 (R296), I251 (L297), y Asp-247

algunas diferencias: la ausencia de una hélice, que corresponde a una región en la CM-PDH y la TyrA_{pHi} donde faltan dos segmentos de residuos, que se especula son el resultado de la fusión del dominio PDH al dominio CM (81). Otra diferencia es la existencia de una hélice extra (α 13) en el C-terminal de la enzima (Figura 18). En la figura 17 están resaltados los residuos que hacen contacto directo con la L-TIR en TyrA_{pHi} y TyrA_{aA}. Estos residuos forman parte del sitio activo de dichas enzimas. En la figura 19 se muestra los ligandos (NAD⁺ y L-TIR) localizados en el probable sitio activo en el modelo de la CM-PDH. En la tabla 13 se muestran los residuos que tienen alguna interacción con la L-TIR en TyrA_{pAa} y el residuo equivalente en la CM-PDH. Es interesante resaltar que G201 y F200 se encuentran situados entre los residuos del sitio activo que tienen interacción con la L-TIR (figura 20). En la figura 20 B, C se observa que F200L es una mutación que acorta la distancia entre esta región del probable sitio activo con los residuos cercanos como Q210 y S204 (Figura 20). En el caso de G201D (Figura 20 D, E) en el modelo se observa que la mutación hace más pequeña la cavidad que ocupa la L-TIR y el PPA en el sitio activo. Por otro lado la V346 es un residuo que se encuentra en la subunidad que contribuye con menos residuos para la formación del sitio activo, este residuo está cerca a la R294 de la otra subunidad, debido a que el modelo de la CM-PDH incluye solo una de las subunidades, la mutación se indicó en la estructura de TyrA_{Hi} (figura 20 F, G). Analizando el modelo no es posible discernir el efecto de esta mutación sobre la unión de la L-TIR.

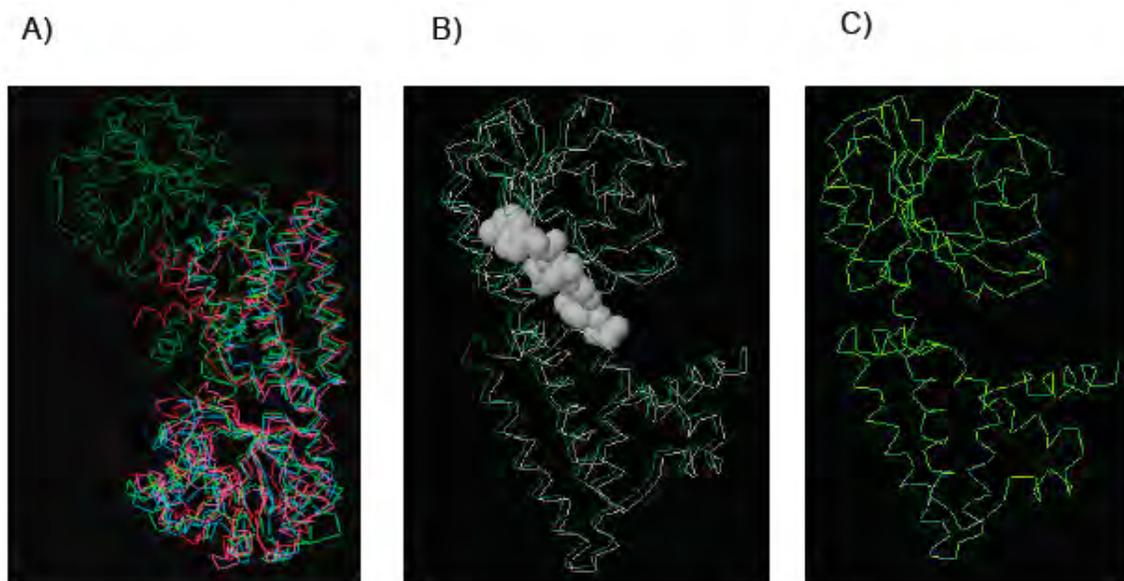


Figura 19. **A)** Comparación de estructuras cristalográficas de TyrA_{pHi} (verde y rojo), TyrA_{pAa} (rosa), TyrA_{pSt} (amarillo) TyrA_{aS} (azul). **B)** Comparación de la estructura cristalográfica de TyrA_{pHi} (gris) con el modelo obtenido por homología con la CM-PDH (verde). En gris se muestra el NAD⁺ y la L-TIR unidos al sitio activo de TyrA_{pHi}. Solo se muestran los monómeros. **C)** modelo de una subunidad de la CM-PDH. (Dali Server, L Holm (1998) Unification of protein families. Current Opinion in Structural Biology 8, 372-379).

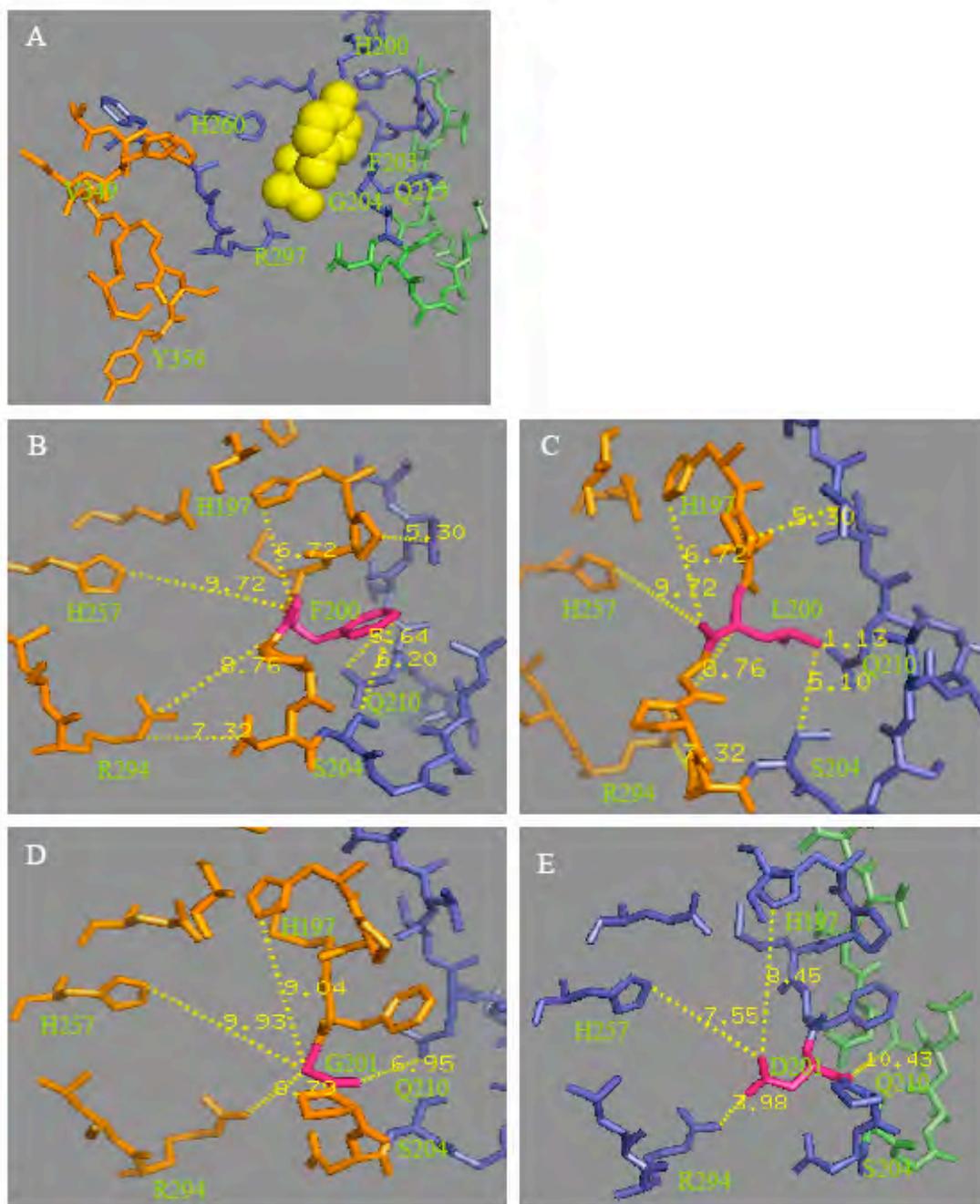


Figura 20 (continúa en la siguiente página)

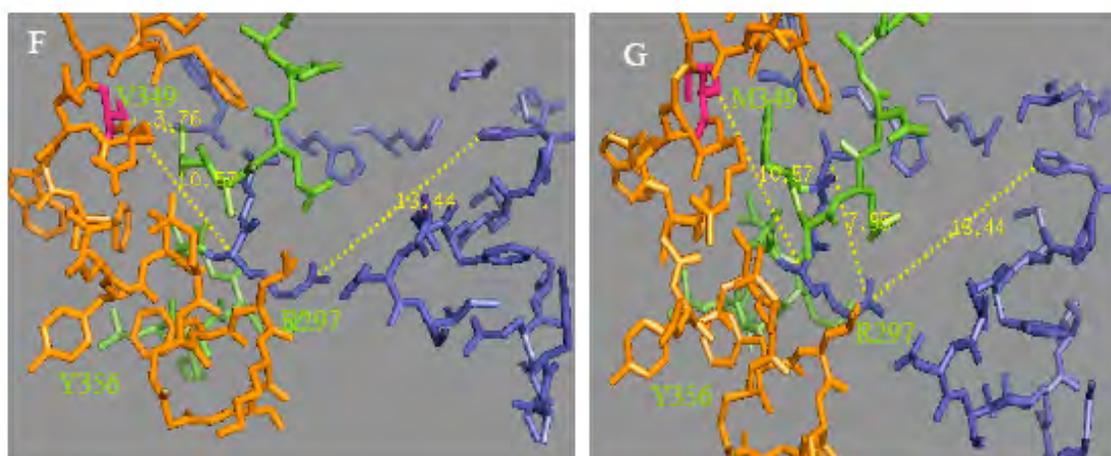


Figura 20. Modelo de la estructura de TyrA84, TyrA130 y TyrA155. A) Sitio activo de TyrA_{pHi}. Los residuos equivalentes en la CM-PDH se muestran entre paréntesis H260 (H257), H200 (H197), F203 (F200), G204 (G201), G213 (Q210), R297 (R294), V349 (V346), Y356 (Y352). La molécula de color amarillo es la L-TIR. **B)** Sitio activo de la CM-PDH. En rosa se resaltó F200. **C)** Sitio activo de TyrA155. En rosa se resaltó la mutación L200. **D)** Sitio activo de CM-PDH. La G201 se resaltó en rosa. **E)** Sitio activo de TyrA130 en el cual se indicó en rosa la mutación D210. **F)** Sitio activo de TyrA_{pHi} en rosa se resaltó V349 (V346 en la CM-PDH). **G)** Sitio activo de TyrA84. En rosa se resaltó la mutación M349 (M346 en la CM-PDH). La línea amarilla punteada es la distancia en Å entre los átomos indicados (Ver la siguiente página).

6.1.5. Caracterización inicial del operón *tyrCphea_{CM}*

Por otra parte, en este estudio se analizó la posibilidad de eliminar el control de la L-TIR sobre su vía específica mediante la expresión de genes heterólogos que codifican enzimas que no son inhibidas por dicho aminoácido. En la figura 21 se describe el diseño de la nueva vía terminal de biosíntesis de L-TIR. Aunque las reacciones químicas son las mismas entre la vía nativa de *E. coli* y la vía TyrA_{CZm}-PheA_{CM}, esta última se considera una nueva vía al estar conformada por una enzima de *Z. mobilis* y un dominio de *E. coli* que normalmente participa en la síntesis de L-FEN. En esta vía alterna, se sobreexpresó TyrA_{CZm} y PheA_{CM}, que son enzimas que por separado tienen la misma actividad de la CM-PDH de *E. coli*. En la figura 11 se muestra la estrategia empleada para la clonación de los genes que codifican dichas proteínas. La secuencia de nucleótidos de ambos genes fue igual a la reportada en la literatura. En el diseño del operón se evitó que ambas proteínas

se fusionaran, cuidando que ambos genes tuvieran marcos de lectura diferentes (ver sección V.6.2). Lo anterior se corroboró mediante geles SDS-PAGE, ya que se observó solo una proteína de 32 000 Da, que corresponde a TyrA_{CM}, en lugar de observarse una proteína de aproximadamente 42 000 Da si TyrA_{CM} y PheA_{CM} estuviesen fusionadas. En las condiciones empleadas para realizar la electroforesis de proteínas no fue posible observar a PheA_{CM} (Datos no mostrados).

Como parte de la caracterización inicial de los genes de la nueva vía, fué necesario saber si se expresaban adecuadamente, y si podían restituir la capacidad de crecer en medio mínimo a *E. coli* FA114. Esta una cepa que no tiene corismato mutasas, prefenato deshidrogenas, ni prefenato deshidratasas, por lo que es auxótrofa a L-TIR y L-FEN. Se realizaron ensayos de complementación con la cepa FA114 (tabla 6), transformada con los plásmidos pTrc99A, pTrctyrA, pTrctyrCpheA_{CM} y pTrctyrCpheA_{CMINV} (tabla 8). Solo las cepas transformadas con los plásmidos pTrctyrA y pTrctyrCpheA_{CM} fueron capaces de crecer en medio mínimo sin L-TIR (figura 22).

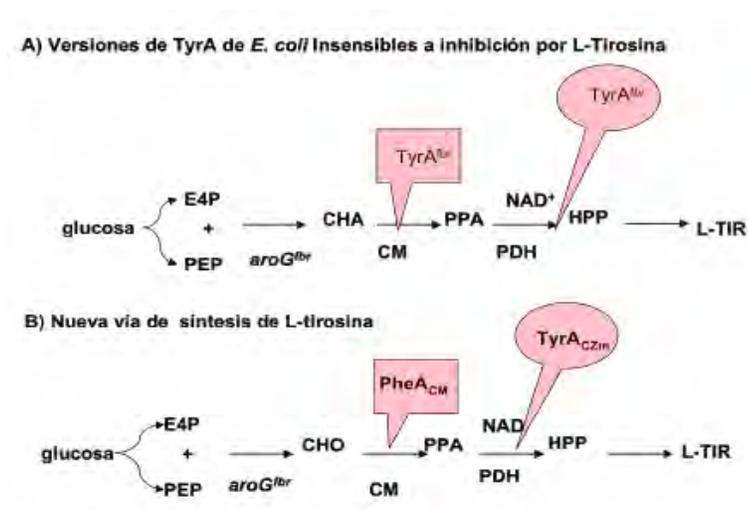


Figura 21. Diagrama que resume las estrategias empleadas en este estudio en la construcción de cepas de *E. coli* sobreproductoras de L-TIR.

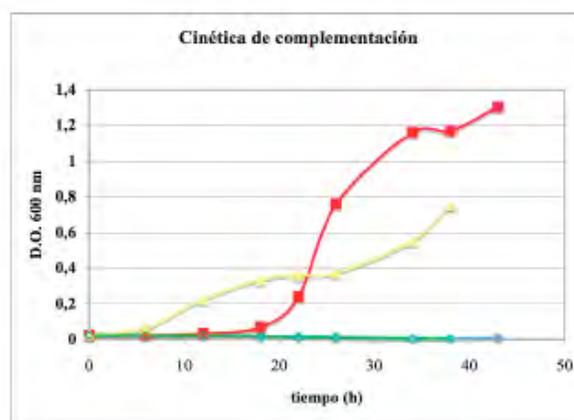


Figura 22. Complementación de FA114/pTrctyrCpheA_{CM}. ◆ FA114/pTrc99A; ■ FA114/pTrctyrA; ○ FA114/pTrctyrCpheA_{INV}; ▲ FA114/ pTrctyrCpheA_{CM}.

Estaba reportado que los AAA no son inhibidores de TyrA_{cZm}, y se había determinado que 2 mM de L-TIR no inhibía la actividad de dicha enzima (94). Sin embargo, hasta donde sabíamos, no habían reportes en los que se haya evaluado el efecto de la L-TIR sobre la actividad de la CM-PDT, ya que es una enzima involucrada en la biosíntesis de L-FEN. Por lo anterior, se realizaron ensayos enzimáticos para determinar si la L-TIR inhibía la actividad de PheA_{CM}, en presencia y en ausencia de L-TIR. Se utilizó como control la actividad de TyrA_{cZm}. La actividad específica de TyrA_{cZm} sin L-TIR, fue 1.54 ± 0.08 UI/mg proteína, mientras que la actividad no cambió en presencia de 0.6 mM de L-TIR (Tabla 13). En el caso de PheA_{CM}, se determinó que en ausencia de L-TIR, tuvo una actividad de 29.4 ± 5.34 IU/mg proteína, con 0.6 mM de L-TIR, no se inhibió la actividad de PheA_{CM}, mientras que con 1.1 mM de L-TIR, se observó una reducción del 28.6% de la actividad con respecto a la condición en ausencia del aminoácido (Tabla 13).

Tabla 13. Actividades enzimáticas de TyrA_{cZm} y PheA_{CM} en diferentes concentraciones de L-TIR.

Enzima	Actividad específica (UI/mg proteína)		
	0 mM L-Tyr	0.6mM L-Tyr	1.1 mM L-Tyr
PheA _{CM} Ec	29.4 ± 5.39	$34.4 \pm 3,09$	21.0 ± 0.23
TyrA _{cZm}	$1,54 \pm 0,08$	$1,34 \pm 0,47$	n.d.

n.d. no determinada

6.1.6. Comparación de la producción de L-TIR en matraces entre las diferentes variantes de *tyrA* y el operón pTrctyrCpheA_{CM}

Con la finalidad de realizar una evaluación preliminar de las dos estrategias exploradas para eliminar la regulación por producto final de la vía específica de biosíntesis de L-TIR, se hicieron cultivos en matraz en medio M9 con 10 g/L de glucosa, a 30°C, se tomó muestra a las 24 horas, y se determinó la L-TIR producida. Estos experimentos se realizaron con la cepa de *E. coli* PB12 (con el fenotipo PTS⁻Glc⁺), que al tener el sistema PTS inactivo, tiene una mayor disponibilidad de PEP para la biosíntesis de aromáticos (33). Es importante mencionar que *aroG^{fbr}* codifica para una versión mutante de la isoenzima DAHPS que no se inhibe por L-FEN. La sobreexpresión de *aroG^{fbr}* incrementa el flujo de carbono hacia la síntesis de AAA. PB12 fué transformada con *aroG^{fbr}*, y simultáneamente se sobreexpresó junto con con *aroG^{fbr}* cada una de las variantes de *tyrA* o el operón pTrctyrCpheA_{CM} (Ver tabla 15 para nomenclatura). Se utilizaron como controles la cepa PB12 transformada solo con el gen *aroG^{fbr}* (PB12G), y la cepa transformada solo con el gen *tyrA* (PB12AW).

Tabla 14. Clave para las cepas empleadas en la sobreproducción de L-Tir. PB12 es una cepa de *E. coli* con el fenotipo PTS⁻ glucosa⁺.

cepa	Clave	Genes sobreexpresados
PB12/pTrctyrA	PB12AW	<i>tyrA</i> *
PB12/pJLBaroG ^{fbr}	PB12G	<i>aroG^{fbr}</i>
PB12/pJLBaroG ^{fbr} /pTrctyrA	PB12A	<i>tyrA</i>
PB12/pJLBaroG ^{fbr} /pTrcMtyrA2	PB122	<i>aroG^{fbr}, tyrA2</i> **
PB12/pJLBaroG ^{fbr} /pTrcMtyrA83	PB1283	<i>aroG^{fbr}, tyrA83</i>
PB12/pJLBaroG ^{fbr} /pTrcMtyrA84	PB1284	<i>aroG^{fbr}, tyrA84</i>
PB12/pJLBaroG ^{fbr} /pTrcMtyrA85	PB1285	<i>aroG^{fbr}, tyrA85</i>
PB12/pJLBaroG ^{fbr} /pTrcMtyrA122	PB12122	<i>aroG^{fbr}, tyrA122</i>
PB12/pJLBaroG ^{fbr} /pTrcMtyrA130	PB12130	<i>aroG^{fbr}, tyrA130</i>
PB12/pJLBaroG ^{fbr} /pTrcMtyrA142	PB12142	<i>aroG^{fbr}, tyrA142</i>
PB12/pJLBaroG ^{fbr} /pTrcMtyrA155	PB12155	<i>aroG^{fbr}, tyrA155</i>
PB12/pJLBaroG ^{fbr} /pTrcMtyrA160	PB12160	<i>aroG^{fbr}, tyrA160</i>
PB12/pJLBaroG ^{fbr} /pTrcMtyrA162	PB12162	<i>aroG^{fbr}, tyrA162</i>
PB12/pJLBaroG ^{fbr} /pTrctyrC	PB12C	<i>aroG^{fbr}, tyrC</i>
PB12/pJLBaroG ^{fbr} /pTrctyrCpheA _{CM}	PB12CP	<i>aroG^{fbr}, tyrC, pheA_{CM}</i>

*Gen *tyrA* silvestre. ** Al banco de mutantes *tyrA*. El número a un costado indica el número de la variante seleccionada del banco PDH.

En la tabla 16 y figura 23 se muestra la concentración de L-TIR presente a las 24 h de cultivo. Tomando como referencia la cepa que sobreexpresa simultáneamente *aroG^{fb}* y *tyrA* (PB12A), en los datos se observa que con la sobreexpresión individual de *tyrA* (PB12AW) y *aroG^{fb}* (PB12G) hubo la acumulación de L-TIR en el medio de cultivo, produciendo 0.15 y 0.52 veces L-TIR en comparación con PB12A, respectivamente. Por otro lado, se puede notar que los niveles de L-TIR detectados en los sobrenadantes de la cepa transformada con cada una de las variantes, son en general, similares al control (PB12A), excepto para PB12130 y PB12142, que acumularon 1.46 y 0.27 veces L-TIR en relación a PB12A. Finalmente, se determinó que PB12CP fue la mejor productora de L-TIR, con un rendimiento de L-TIR producida por gramo de células 1.2 veces superior a PB12130, y 1.68 veces mayor a PB12A. Por razones de tiempo, no se determinó la L-TIR producida por la cepa PB12G transformada con cada una de las variantes sencillas.

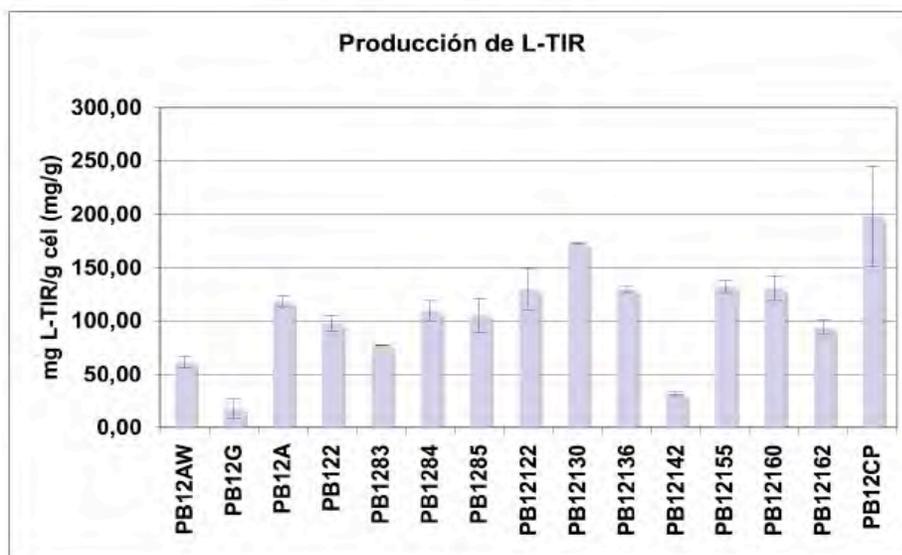


Figura 23. Comparación de la producción de L-TIR entre las variantes de la CM-PDH (entre ellas *TyrA^{fb}*) y la expresión de *TyrA_{cZm}* a las 24h de cultivo.

6.2. Sección II: Ingeniería metabólica para la sobreproducción de L-TIR en *E. coli*.

6.2.1. Efecto de diversas modificaciones en las vías de síntesis de los compuestos aromáticos, sobre la capacidad de síntesis de L-TIR

En los primeros experimentos de producción de L-TIR, se determinó que la sobreexpresión simultánea de los genes *tyrC* y *pheA_{CM}* en PB12 (PB12CP) fue una de las estrategias más prometedoras para la construcción de una cepa sobreproductora de L-TIR. Debido a lo anterior, se decidió realizar una caracterización más detallada, empleando en esta serie de experimentos a las cepas PB12C, que expresaba solamente el gen *tyrC*; y PB12CP, que expresaba simultáneamente los genes *tyrC* y *pheA_{CM}*. Se empleó como

Tabla 15. Concentración de L-Tir a las 24 h de cultivo. Experimentos en matraz en M9, 10 g/L de glucosa, 250 r.p.m., 30°C

Cepa	$Y_{L-Tir/cel}$ *	Comparación de $Y_{L-Tir/cel}$ **
PB12AW	61.39 ± 5.67	0.52
PB12G	17.91 ± 9.07	0.15
PB12A	118.26 ± 4.74	1.00
PB122	97.56 ± 7.42	0.82
PB1283	77.23 ± 0.60	0.65
PB1284	109.64 ± 9.47	0.93
PB1285	105.09 ± 15.74	0.89
PB12122	129.68 ± 19.30	1.10
PB12130	172.79 ± 0.56	1.46
PB12142	32.09 ± 1.46	0.27
PB12155	132.47 ± 5.69	1.12
PB12160	130.84 ± 11.67	1.11
PB12162	93.83 ± 6.76	0.79
PB12CP	198.14 ± 47.03	1.68

* $Y_{L-Tir/cel}$ = mg L-Tir/mg DCW en el tiempo 24 h. ** Comparación de $Y_{L-Tir/cel}$ = mg L-Tir producida por cada cepa/ mg L-Tir producida por PB12A.

control las cepas PB12G y PB12A. Los gráficos de crecimiento, consumo de glucosa y producción de L-TIR se muestran en la figura 24.

En general, cada cepa presentó un patrón distinto de producción de L-TIR. PB12A excretó L-TIR solo las primeras 24 horas, PB12G empezó a acumular L-TIR a partir de las 32 horas, mientras que PB12C y PB12CP produjeron L-TIR a lo largo de toda la cinética. Por esta razón se consideró más adecuado el cálculo de parámetros globales, es decir, calculados entre las cero y las 52 horas de cultivo.

Como ya se había observado en experimentos anteriores, PB12G excretó cantidades pequeñas de L-TIR. En comparación con PB12G, PB12A tuvo una velocidad específica de producción de L-TIR (q_{L-TIR}) 1.6 veces superior. El rendimiento de producción de L-TIR por gramo de glucosa consumida ($Y_{L-TIR/glc}$) de PB12A fué 1.1 veces mayor en comparación de PB12A (Tabla 16 y figura 24). PB12C produjo 275 ± 47.5 mg/L de L-TIR, mientras que PB12CP produjo alrededor de 183 ± 8.0 mg/L de L-TIR en 52 horas, que son 4.1 y 2.7 veces superiores a lo que puede producir la cepa PB12A. En comparación con PB12A, se logró un incremento en la q_{L-TIR} de 6.8 veces para PB12C y 5.8 veces superior para PB12CP. Comparando con PB12A, $Y_{L-TIR/glc}$ fue 6.6 veces mayor para PB12C; y 6.4 veces superior para PB12CP. Finalmente, no se observó un incremento en los valores de productividad específica, título y rendimiento por efecto de la sobreexpresión de la corismato mutasa de CM-PDT ($PheA_{CM}$) (Tabla 16 y Figura 24).

Tabla 16. Parámetros cinéticos y estequiométricos en la producción de L-Tir en experimentos en matraz.

Parámetro*	PB12G	PB12A	PB12C	PB12CP
$Y_{L-TIR/glc}$ (mg/g)	6.3 ± 0.32	10.0 ± 3.0	66.6 ± 15.8	64.3 ± 6.0
q_{L-TIR} (mg/g/h)	0.99 ± 0.24	1.1 ± 0.22	7.6 ± 0.55	6.4 ± 0.82

* q_{L-TIR} , velocidad específica de producción de L-Tir; $Y_{L-TIR/glc}$, Rendimiento de L-TIR por cada g de glucosa consumida. Los parámetros fueron calculados de las 0 a las 52 horas.

6.2.2. Experimentos en biorreactor para la producción de L-TIR empleando las cepas PB12C y PB12CP

Con la finalidad de estudiar estas cepas en una condición más cercana a la industria, se realizaron experimentos en fermentador con las cepas PB12C y PB12CP. Los resultados se muestran en la tabla 18 y figuras 25 y 26. Después de 21 y 27 horas de cultivo, PB12C y PB12CP alcanzaron 13.9 ± 0.9 y 11.1 ± 2.1 g/L de células (peso seco), respectivamente. En esta condición de cultivo se observaron diferencias en distintos parámetros entre las dos cepas. Se observó que la L-TIR acumulada por PB12CP al final del cultivo fue 2.95 g/L, que es un título 46% superior al de PB12C (Figura 25 y 26). En comparación con PB12C, el rendimiento L-TIR por gramo de células ($Y_{L-TIR/DCW}$) para PB12CP se incrementó en un 85%, mientras que q_{L-TIR} fue 36% superior. Finalmente, $Y_{L-TIR/glc}$ se incrementó en 48% en la cepa PB12CP en comparación con la cepa PB12C. Si consideramos que el rendimiento máximo teórico de producción de L-TIR a partir de glucosa es de 0.553g/g (59), los rendimientos de L-TIR producida a partir de glucosa representan el 7 y el 11.9 % del teórico máximo. Se cuantificaron ciertos metabolitos clave en la vía de aromáticos, con la finalidad de identificar algunos pasos limitantes y poder sugerir algunas modificaciones para mejorar estas cepas en el futuro. Fueron cuantificados el ácido 3-dehidroshiquímico (DHS) y el ácido shiquímico (SHIK) que son intermediarios de la vía común, y la fenilalanina (L-FEN), que compite por el CHA en la formación de L-TIR. Se determinó que ambas cepas utilizan la L-FEN aportada por el extracto de levadura, y no hubo producción de dicho aminoácido a lo largo del cultivo (datos no mostrados). Las concentraciones del DHS y SHIK acumulados al final del cultivo se muestran en la tabla 18. Del total de aromáticos producidos por PB12C y PB12CP (Suma de la L-TIR, SHIK y DHS cuantificados), la L-TIR representa el 45% y el 42%, respectivamente (Figura 26). Finalmente, no se detectó formación de acetato en el medio de cultivo.

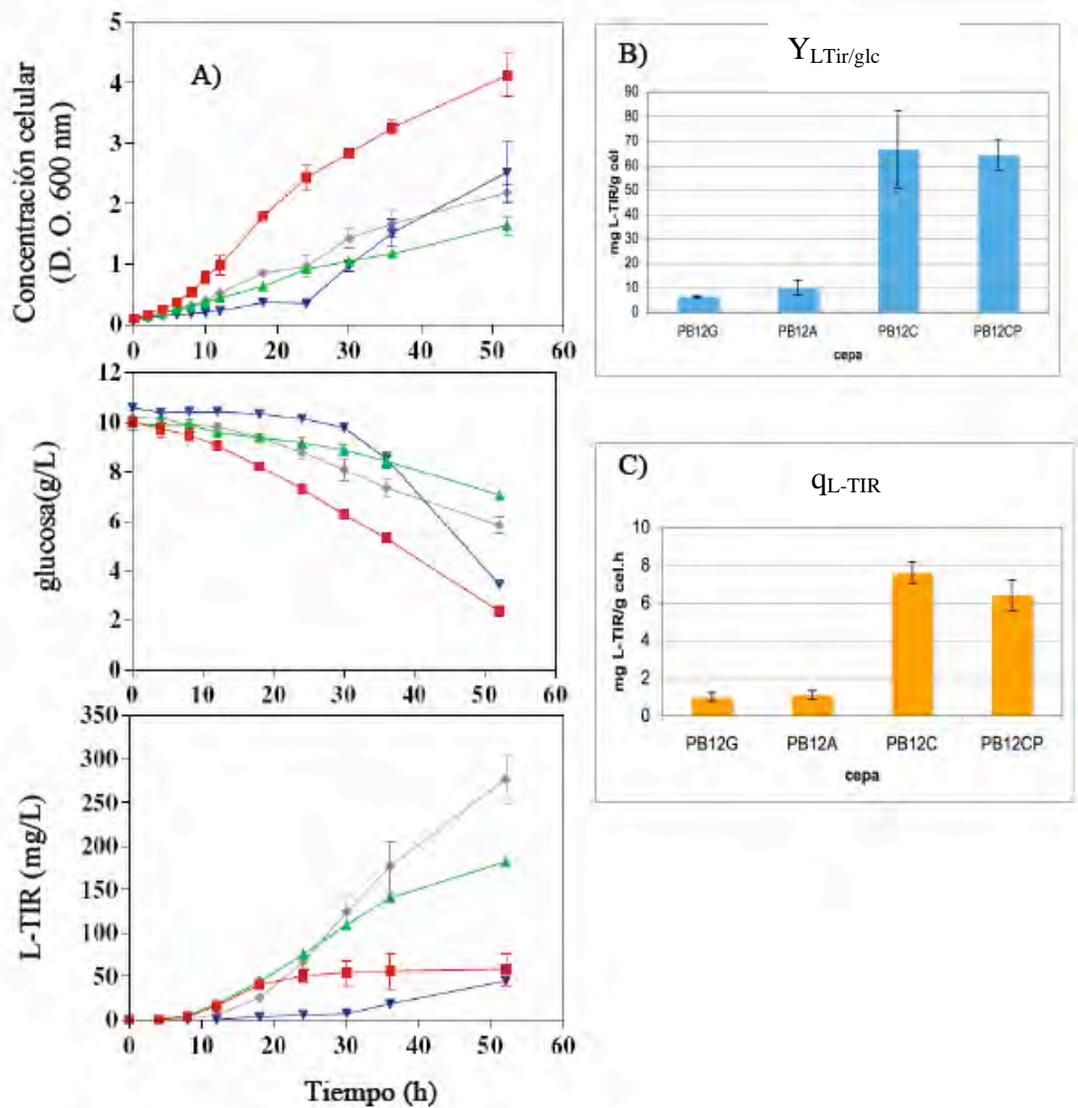


Figura 24. A) Cinética de crecimiento y producción de L-TIR mediante la sobreexpresión de los genes *tyrC* y *pheA_{CM}*. Experimentos en matraces en medio mineral con glucosa. ▼ PB12G; ■ PB12A; ◆ PB12C; ▲ PB12CP. Comparación de B) $Y_{L-TIR/glc}$; y C) q_{L-TIR} ; entre las cepas PB12G, PB12A, PB12C y PB12CP.

Tabla 17. Parámetros cinéticos y estequiométricos para la producción de L-Tir en experimentos en biorreactor con las cepas PB12C y PB12CP.

Parámetro	PB12C	PB12CP
q_s (g/g/h)	0.17 ± 0.01	0.14 ± 0.01
Concentración de células al final del cultivo (g_{DCW}/l)	13.9 ± 0.8	11.1 ± 2.1
L-Tir producida (g/l)	2.0 ± 0.00	3.0 ± 0.29
$Y_{L-TIR/glc}$ (mg/g)	44.6 ± 8.1	66.0 ± 0.1
$Y_{L-TIR/DCW}$ (mg/g)	153.5 ± 10.7	284.0 ± 4.8
q_{L-TIR} (mg/g/h)	7.30 ± 0.51	9.96 ± 0.29
SHIK producido (g/l)	1.2 ± 0.04	2.5 ± 1.2
DHS producido (g/l)	1.2 ± 0.01	1.7 ± 0.04

* q_s , velocidad específica de consumo de glucosa; $Y_{L-TIR/glc}$, mg de L-Tir producida por gramo de glucosa consumido; $Y_{L-TIR/DCW}$, mg de L-Tir producida por g de célula en peso seco; q_{L-TIR} , velocidad específica de producción de L-Tir.

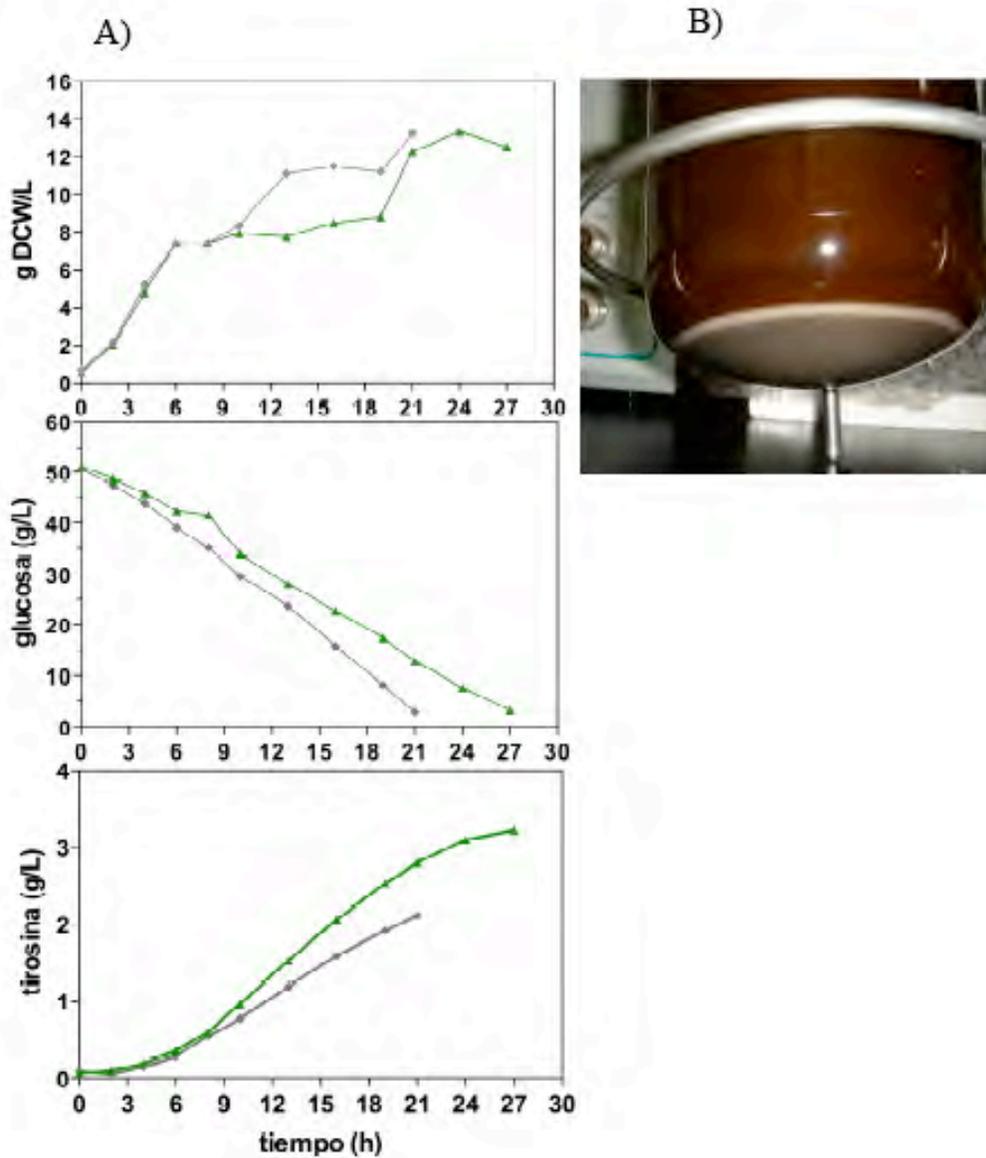


Figura 26. A) Cinéticas de producción de L-TIR en biorreactor para las cepas PB12C y PB12CP. ● PB12C; ▲ PB12CP. B) El polvo blanco que se observa al fondo del biorreactor es la L-TIR producida por PB12CP. Durante el cultivo, la L-TIR permanece suspendida por la agitación.

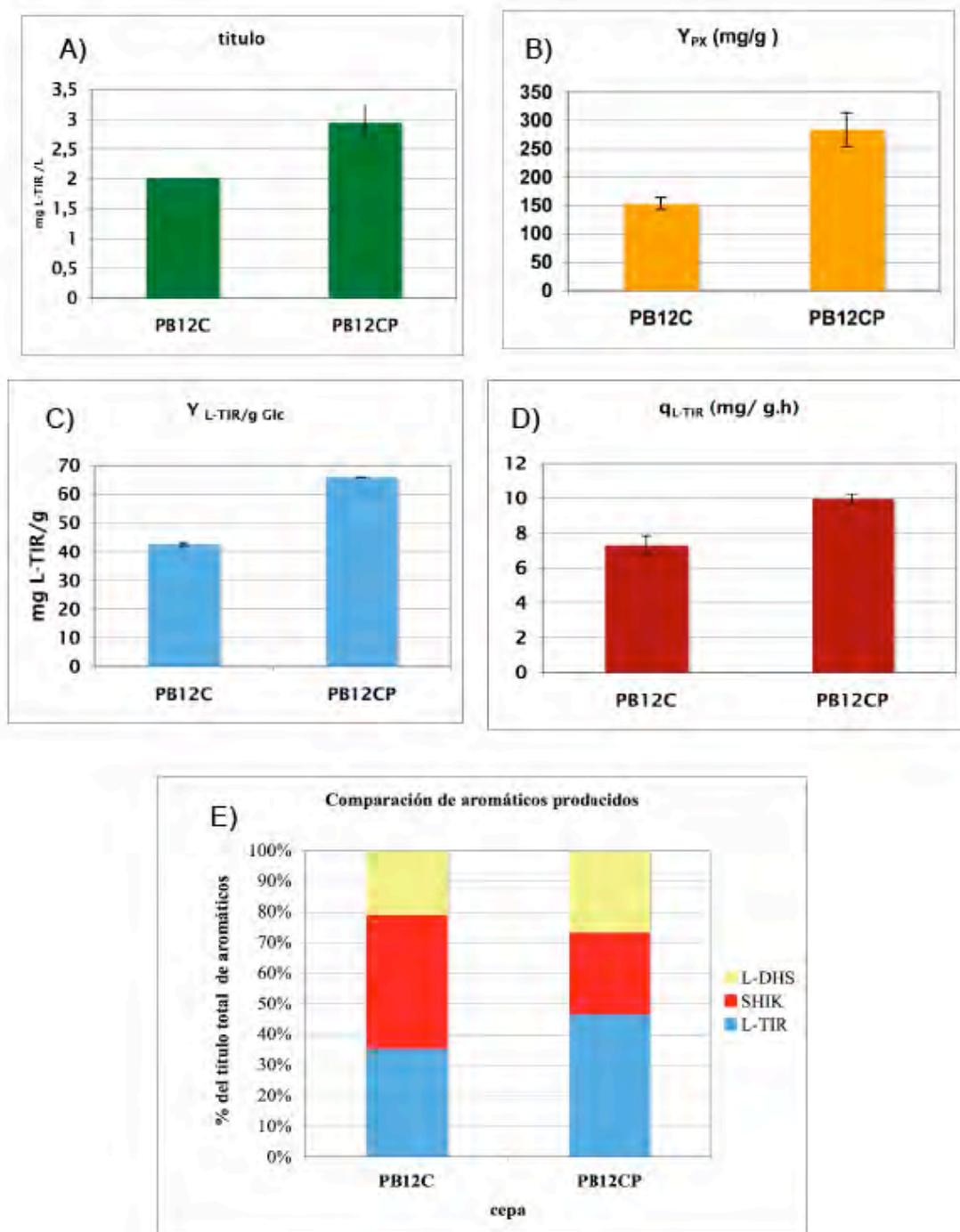


Figura 26. Comparación de diversos parámetros calculados a partir de los datos generados en biorreactor en la producción de L-TIR A) Título; B) Y_{PX} ; C) $Y_{L-TIR/g\ Glc}$; D) q_{L-TIR} ; y E) Comparación de los aromáticos producidos por PB12C y PB12CP. (Ver apéndice I)

6.3. Sección III: Ingeniería metabólica para la producción de MEL a partir de glucosa en *E. coli*

6.3.1. Caracterización en matraces de diversas cepas productoras de MEL desde glucosa

Una vez que se demostró que con la expresión de los genes *tyrC* y *pheA_{CM}* es posible incrementar la producción de L-TIR, se probaron diferentes modificaciones genéticas en el metabolismo central y en la vía de síntesis de los compuestos aromáticos, con la finalidad de incrementar el flujo de carbono hacia la vía de biosíntesis de L-TIR, ya que con la sobreexpresión del gen *MutmelA* sería posible la conversión de la L-TIR producida en MEL. En la tabla 19 se describen las cepas empleadas en este estudio y sus características relevantes. Es importante señalar que en cada cepa se evaluó el efecto de una modificación genética distinta que se esperaba incrementaría la producción de L-TIR. Por ejemplo, con respecto a VH33C, en VH33D se evaluaría el efecto de la inactivación del gen *tyrR*, sobre la producción de L-TIR y MEL.

Tabla 18. Clave para las cepas empleadas en la producción de L-Tir y melaninas.

Clave	Cepa	Fondo genético relevante	Genes sobreexpresados
W3110F	W3110/pACM <i>melAI</i>	silvestre	<i>melA</i>
W3110A	W3110/pRW300, pACM <i>melAI</i>	silvestre	<i>aroG^{br} melA</i>
W3110B	W3110/pRW300, p <i>MmelA</i> <i>tyrCpheA_{CM}</i>	silvestre	<i>aroG^{br} melA tyrC pheA_{CM}</i>
VH33C	VH33/ pRW300, p <i>MmelA</i> <i>tyrCpheA_{CM}</i>	PTS ⁻ , <i>P_{trc}-galP</i>	<i>aroG^{br} melA tyrC pheA_{CM}</i>
VH33D	VH33 <i>tyrR</i> / pRW300, p <i>MmelA</i> <i>tyrCpheA_{CM}</i>	PTS ⁻ , <i>P_{trc}-galP</i> , <i>tyrR</i> ⁻	<i>aroG^{br} melA tyrC pheA_{CM}</i>
VH33E	VH33 <i>tyrR</i> / pRW300, p <i>MmelA</i> <i>tyrCpheA_{CM}</i> , pCL <i>tktA</i>	PTS ⁻ , <i>P_{trc}-galP</i> , <i>tyrR</i> ⁻	<i>aroG^{br} melA tyrC pheA_{CM} tktA</i>

Inicialmente se realizó la caracterización de las cepas W3110 y W3110F en cultivos en M9 con 2 g/L de glucosa, 20 µg/ml de CuSO₄, 0.4 g/L de L-TIR (Figura 27). En estas condiciones la MEL se sintetizaría a partir de la L-TIR agregada al medio de cultivo. En

estos cultivos ambas cepas crecieron con μ similares: W3110, $0.29 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$, y W3110F, $0.27 \pm 0.08 \text{ h}^{-1}$. En estos cultivos se observó que solo la cepa W3110F, que expresaba el gen *Mutmela*, produjo $0.43 \pm 0.02 \text{ g/L}$ de MEL en 37 h, con una velocidad específica de producción de MEL (q_{MEL}) de $36.6 \pm 7.4 \text{ mg/g DCW/h}$, con un rendimiento de $1.07 \text{ g MEL/g L-TIR}$. Estos datos indican que toda la L-TIR fue convertida a MEL en estos cultivos.

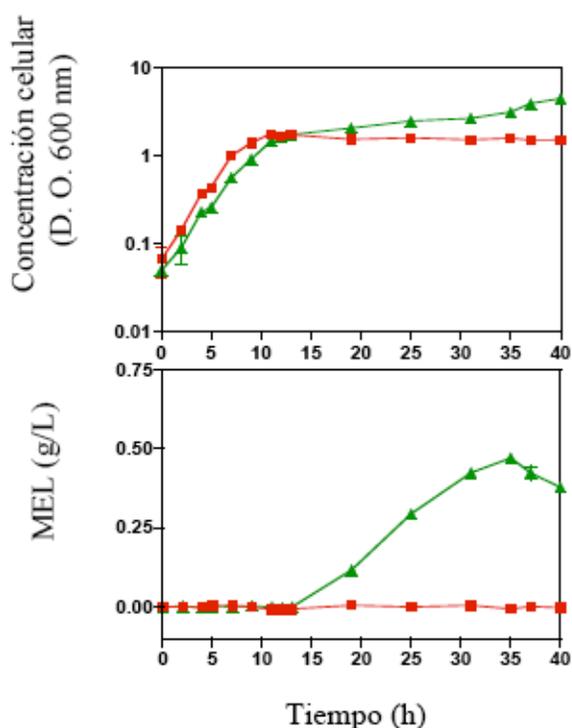


Figura 27

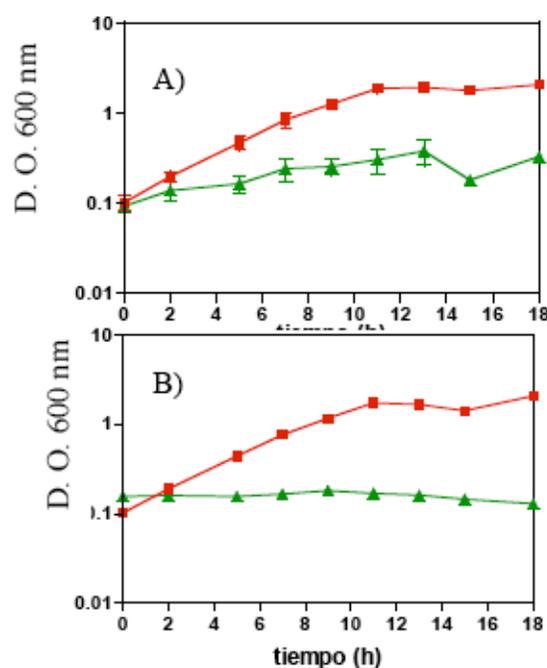


Figura 28

Figura 27. Cultivos en matraz en medio mineral con las cepas W3110 y W3110A para la producción de MEL en medio suplementado con L-TIR y CuSO_4 al inicio del cultivo. ■ W3110; ▲ W3110A.

Figura 28. Cinética de crecimiento en medio mineral (M9) con glucosa y L-TIR (rojo, control) y M9 con glucosa (Verde) para dos cepas A)W3110F y B) W3110A.

Buscando las condiciones adecuadas para evaluar la capacidad de síntesis de MEL a partir de glucosa, se efectuaron cultivos en M9 con 2 g/L de glucosa, $20 \mu\text{g/ml}$ de CuSO_4 sin L-TIR. Se realizaron cultivos con 0.4 g/L de L-TIR como control, con las cepas W3110F y W3110A. En los cultivos a los que no se les añadió L-TIR, se observó una

reducción del 66.5% en la μ de W3110F, mientras que W3110A no creció, contrario a lo observado en los cultivos enriquecidos con L-TIR (Figura 28, Tabla 19). Experimentos preliminares mostraron que si se añadía el CuSO_4 hasta el inicio de la fase estacionara, W3110F y W3110A recuperaban el crecimiento, y eran capaces de producir MEL a partir

Tabla 19. Comparación de μ en cultivos en medio mínimo con 2g/L de glucosa
Con las cepas W3110F y W3110A

Parámetro	L-TIR y CuSO_4 (inicio cultivo)	CuSO_4 (inicio cultivo)
W3110F	0.26 ± 0.001	0.087 ± 0.009
W3110A	0.25 ± 0.02	No creció

* μ , velocidad específica de crecimiento en h^{-1}

Tabla 20. Parámetros cinéticos y estequiométricos para la producción de MEL en experimentos en medio mínimo con 10 g/L de glucosa, enriquecido con L- TIR con la cepa W3110A

Parámetro	L-TIR y CuSO_4 (inicio cultivo)	L-TIR y CuSO_4 (16 horas)
μ (h^{-1})	0.26 ± 0.01	0.31 ± 0.01
q_{MEL} (mg/g/h)	26.5 ± 2.1	13.73 ± 1.2

* μ , velocidad específica de crecimiento; q_{MEL} , velocidad específica de producción de L-TIR.

de la L-TIR añadida al medio de cultivo. De tal manera que se diseñó una estrategia de cultivo en dos fases, en la primera etapa se generaría biomasa, y posteriormente, se adicionaría CuSO_4 , para evaluar la producción de MEL (Figura 29). Es importante señalar que sin Cu la tirosinasa no tiene actividad (14). Siguiendo esta idea, se realizaron cultivos en M9 con 10g/L de glucosa, con las cepa W3110A y se añadió CuSO_4 a las 16 h; se empleó como control cultivos a los cuales se les añadió CuSO_4 y L-TIR a las 16 h. En esta

condición, W3110A creció con una velocidad específica de crecimiento 20% superior que los cultivos enriquecidos con L-TIR y CuSO_4 desde el inicio (Tabla 20). Hubo producción de MEL en los cultivos a los que se añadió TIR y CuSO_4 a las 16 h, con una velocidad específica de producción de MEL (q_{MEL}) 51.8% inferior a la que se observa en cultivos en los cuales se añade L-TIR y CuSO_4 al inicio del cultivo (Tabla 20). Por otro lado, se observó la formación de una coloración café en los cultivos de W3110A, lo que no ocurrió en los cultivos con otras cepas (Figura 30). La formación de una coloración café sugiere que se sintetizó MEL, lo cual fue verificado mediante espectrofotometría (ver V.I3.4).

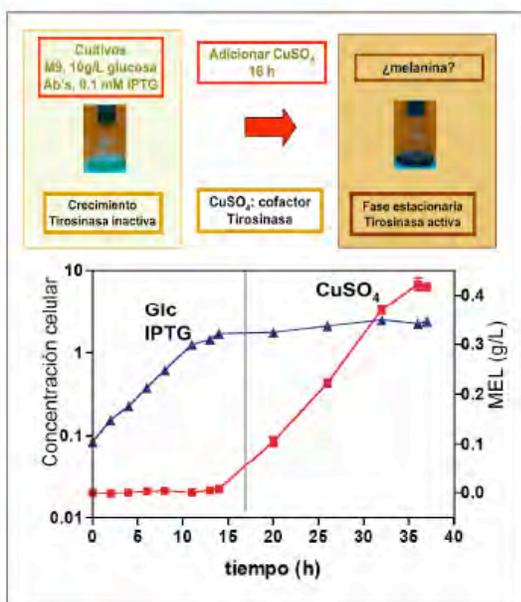


Figura 29

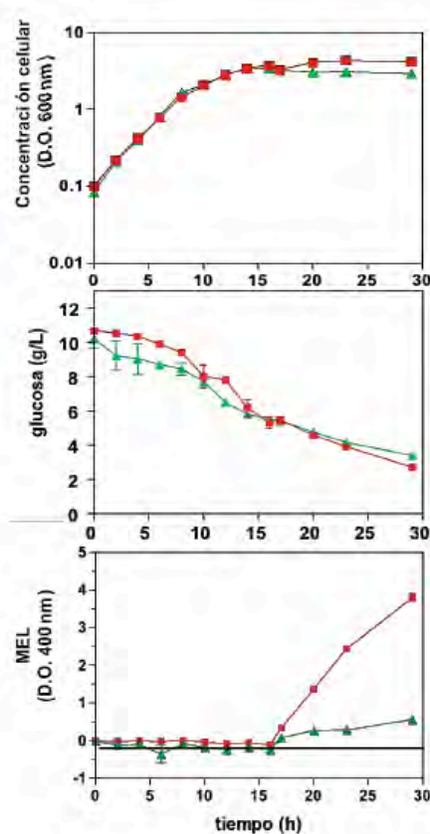


Figura 30

Figura 29. Estrategia de cultivo para la producción de MEL. El cultivo se dividió en dos fases, la primera de crecimiento, y la segunda de producción de MEL marcada con la adición de CuSO_4 .

Figura 30. Cinética de crecimiento y producción de MEL con la cepa W3110A. ■ El CuSO_4 y L-TIR se añadieron a las 16h (condición control); ▲ Se añadió CuSO_4 a las 16h.

Una vez establecidas las condiciones de cultivo para evaluar la producción de MEL empleando glucosa como única fuente de carbono, se caracterizaron las cepas W3110F, W3110A, W3110B, VH33C, VH33D y VH33E (Tabla 21). En la figura 31 se muestra el crecimiento, consumo de glucosa, producción de MEL y la L-TIR acumulada al final de cultivo. El CuSO_4 fue añadido a las 16 horas, según indica la flecha del gráfico. La cepa W3110F no produjo MEL. Tomando como referencia a W3110A, W3110B, que además tenía sobreexpresados los genes *tyrC* y *pheA_{CM}*, produjo 2.6 veces más MEL. Con la inactivación de PTS (WH33C) se observó un incremento de 4.8 veces con respecto a W3110A, y 1.8 veces en comparación con el título de W3110B. Con la inactivación del gen *tyrR* en VH33D, se observó un incremento de producción de MEL de 10.2 veces con respecto a W3110A y de 2.1 veces con respecto a la cepa VH33C. Con la sobreexpresión del gen *tktA* (VH33E) no se observó un incremento en la producción de MEL, con respecto a VH33D (Tabla 21, Figura 33).

En los cultivos anteriores se cuantificó la L-TIR que no fue convertida en MEL, y se observó que W3110F no acumuló L-TIR, en la mayor parte del cultivo de W3110A no se observó acumulación de L-TIR, mientras que W3110B acumuló 27.5 ± 12 mg/L de L-TIR al final del cultivo. Todas las cepas derivadas de VH33 acumularon L-TIR en una mayor proporción a las derivadas de W3110, alcanzándose un valor máximo en la cepa VH33D (263 ± 39 mg/L). (Figura 31, tabla 22).

Para cuantificar la L-TIR total producida por cada cepa no se añadió CuSO_4 a las 16 h, de esta manera la tirosinasa no estaría activa (figura 32 y tabla 23) y no convertiría la L-TIR producida por cada cepa. En la producción de L-TIR se observó el mismo patrón mostrado en la producción de MEL. Nuevamente W3110F no acumuló L-TIR en estos experimentos. En comparación con la cepa W3110A, W3110B produjo 8 veces más L-TIR por efecto de la expresión de *tyrC* y *pheA_{CM}*. En VH33C se produjo 13 veces más L-TIR en relación a W3110A, y observamos un máximo de producción en VH33D, cepa que produjo 66 veces más L-TIR que W3110A. Ya no se observó un incremento en la producción de L-TIR en VH33E, en comparación con VH33D (Figura 33).

En la figura 33 se muestra el resultado de un balance de L-TIR. L-TIR SUM es la suma de la L-TIR acumulada en los cultivos con CuSO_4 más la L-TIR convertida en MEL, esta

última calculada empleando el rendimiento de conversión de L-TIR en MEL. L-TIR máx representa la L-TIR acumulada en los cultivos a los que no se añadió CuSO_4 . En la figura 32 se observa que ambas cantidades son aproximadamente iguales para W3110B, VH33D y VH33E con una diferencia menor al 15% entre L-TIR SUM y L-TIR máx. En la tabla 22 se muestra el porcentaje de conversión de L-TIR en MEL. En la mejor productora de L-TIR y MEL, VH33D, solo el 30% de la L-TIR producida fue convertida en MEL.

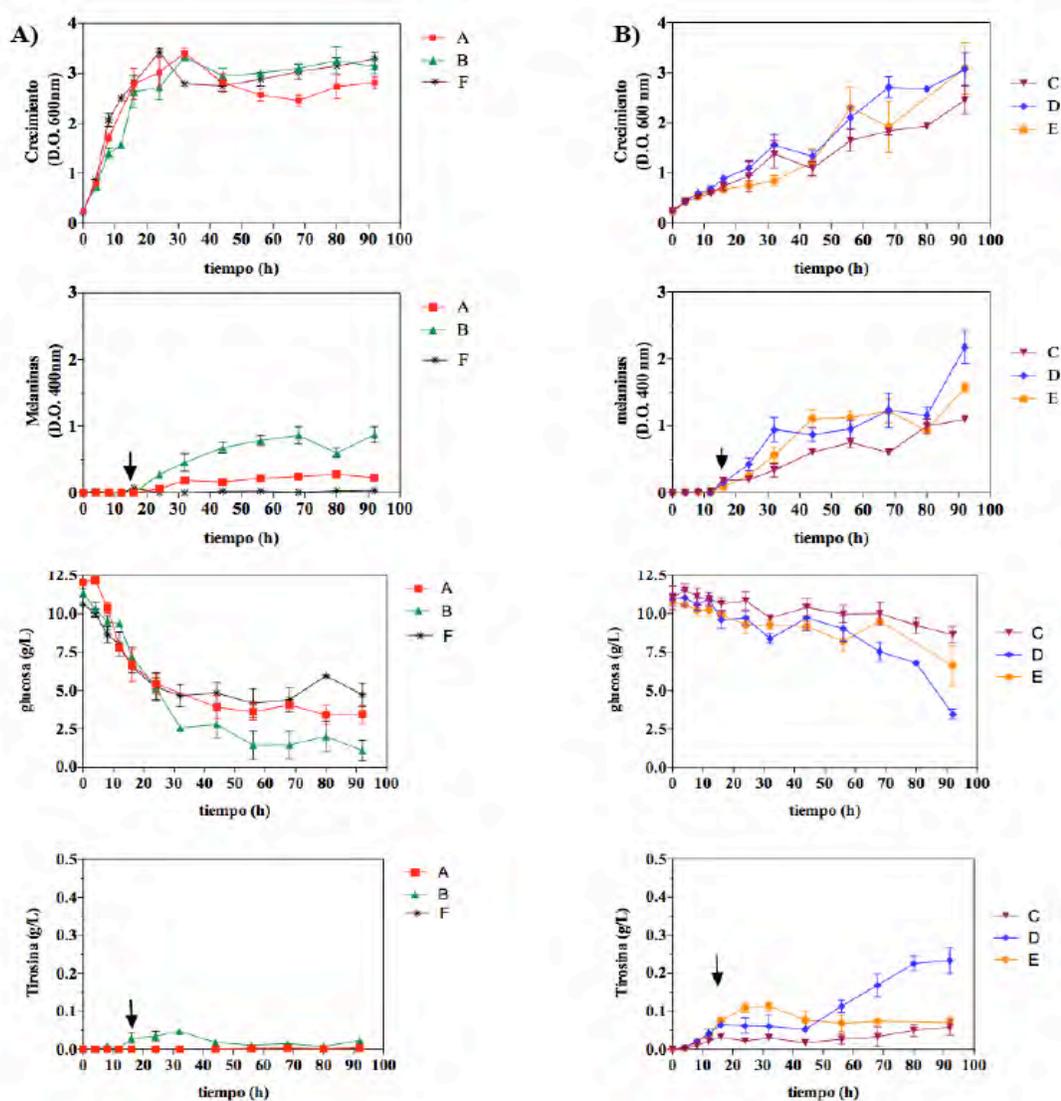


Figura 31. Producción de MEL a partir de glucosa con las cepas: A) W3110F (*F), W3110A (■A), W3110B (▲B). B) cepas VH33C (▼C), VH33D (◆D) y VH33E (●E). La flecha indica el momento en que se añadió el CuSO_4 .

Tabla 21. Comparación de la producción de L-TIR y MEL en medio mineral con 10 g/L de glucosa. El CuSO_4 se añadió a las 16 h.

Cepa	Título (mg/L)	L-TIR acum (mg/L)	L-TIR máx (mg/L)	% conversión
W3110F	0	0	0	0
W3110A	15.1 ± 3.7	7.10 ± 4.5	6.9 ± 6.4	198
W3110B	39.9 ± 2.6	27.5 ± 12.1	55.1 ± 14.9	66
VH33C	72.4 ± 1.5	70.6 ± 13.9	91.0 ± 2.5	72
VH33D	155 ± 34.8	263 ± 38.9	456 ± 29.4	30
VH33E	112 ± 14.8	66,4 ± 0.93	158 ± 46.3	64

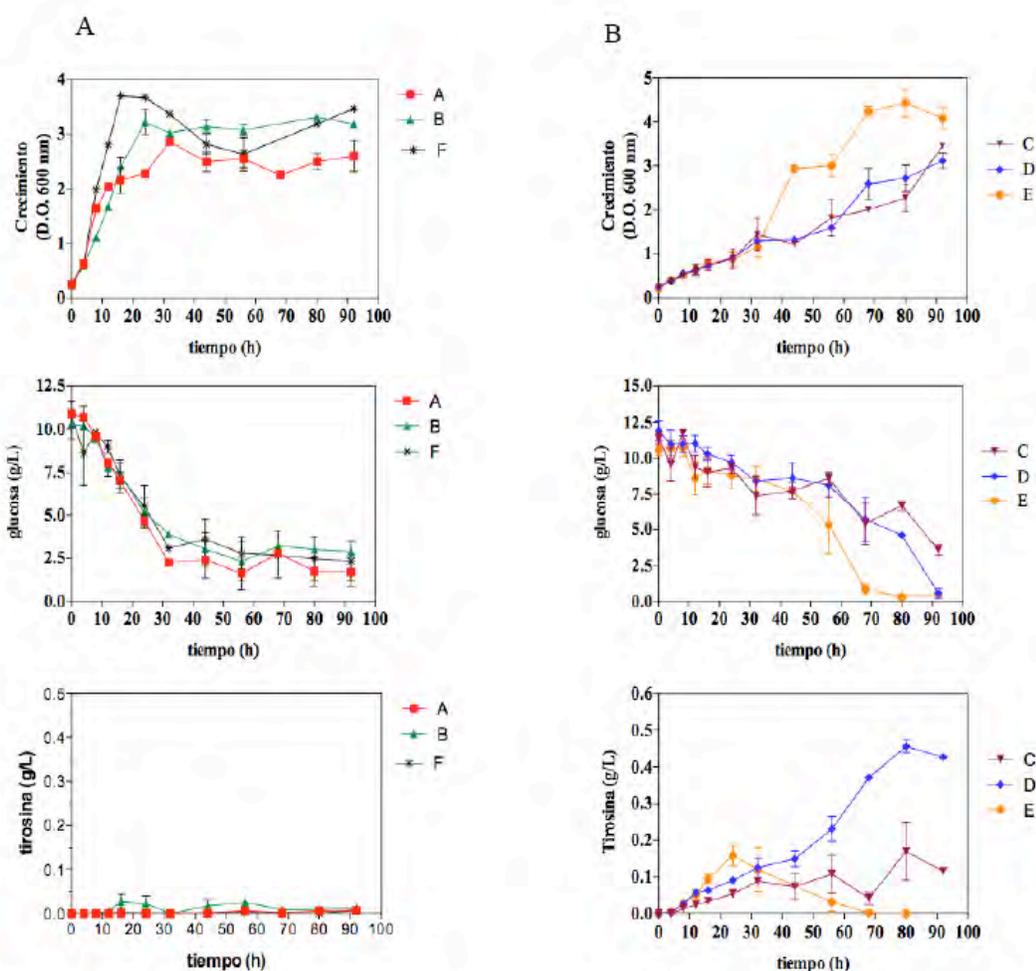


Figura 32. Experimentos de producción de L-TIR a partir de glucosa. Los cultivos se realizaron en iguales condiciones que las empleadas para la producción de MEL (figura 30), pero no se añadió CuSO_4 para mantener inactiva la tirosinasa y cuantificar la L-TIR total producida por cada cepa. A) W3110F (*F), W3110A (■ A), W3110B (▲ B). B) cepas VH33C (▼ C), VH33D (◆ D) y VH33E (● E).

6.3.2. Caracterización de MEL producida por VH33A, VH33D y VH33E

Las MEL producidas por W3110A, VH33D y VH33E fueron purificadas a partir de cultivos en medio mineral con el fin de realizar una caracterización del producto obtenido en los cultivos de estas cepas. Se obtuvieron los espectros de infrarrojo (IR) de todas las muestras empleando como control MEL producida por SIGMA mediante la oxidación de la L-TIR con peróxido de hidrógeno. En comparación con el control, en la figura 34 se observó que las bandas correspondientes los grupos funcionales principales del control también están presentes en las muestras problema.

En la región de $3200-3600\text{ cm}^{-1}$ se encuentra una banda muy ancha correspondiente a las vibraciones de los enlaces O-H y N-H. La anchura de la banda podría deberse a la presencia de enlaces de hidrógeno entre estos grupos funcionales. Los grupos hidroxilo podrían encontrarse formando enlaces C-OH debido a la presencia de bandas en la región $1000-1114\text{ cm}^{-1}$. En la región $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ se tienen 4 máximos que corresponden a vibraciones de los enlaces C-H₂ y C-H₃, que es característico de compuestos alifáticos, y que se confirma con la presencia de bandas en 1455 y 1380 cm^{-1} . En la región de 1715 cm^{-1} se presenta un máximo para el control y un hombro en las muestras de D y E, que es característico de los grupos carbonilo (C=O). Las bandas en la región $1624-1650\text{ cm}^{-1}$ corresponde a los enlaces conjugados C=C de anillos aromáticos. Esta banda también se podría relacionar con la presencia de quinonas. Las bandas en $1489-1385\text{ cm}^{-1}$ indican la presencia de iones carboxilato (COO⁻) y grupos carboxílicos (COOH) (Figura 34).

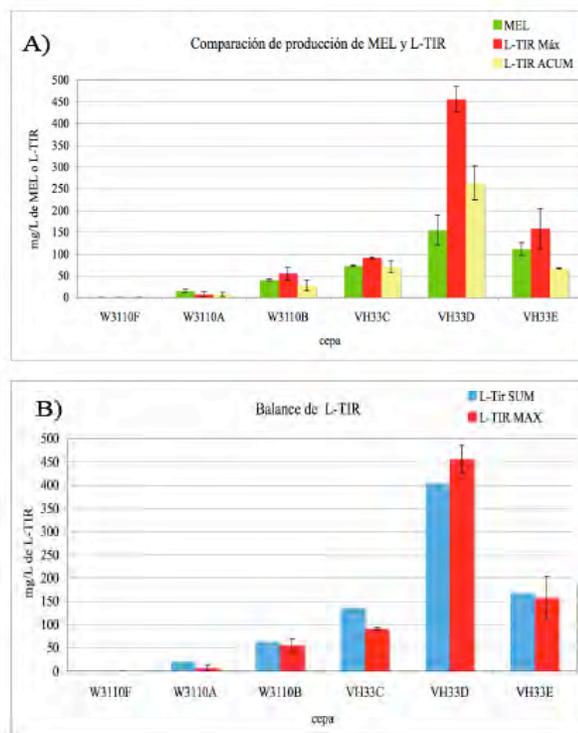


Figura 33

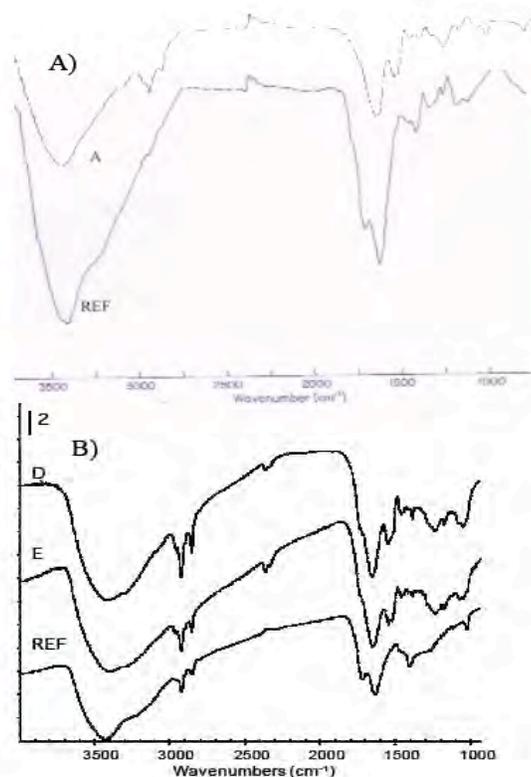


Figura 34

Figura 33. Comparación de producción de MEL y L-TIR por las cepas caracterizadas en este estudio. A) En verde y amarillo se graficaron la MEL y L-TIR acumulada en los cultivos a los que no se añadió CuSO₄. En rojo la L-TIR M_{áx} es la L-TIR máxima producida en cultivos sin CuSO₄. B) Balance de la L-TIR. L-TIR SUM es la suma de la L-TIR acumulada más el cálculo de la L-TIR que fue consumida para producir MEL en los cultivos con CuSO₄ (Ver página anterior).

Figura 34. Espectro de IR de las MEL producidas por las diferentes cepas evaluadas en este estudio. W3110A (A), W3110D (D) y W3110C (C). Como control se empleó una muestra comercial de MEL (REF).

VII. *Discusión*

7.1. *Sección I: Generación y caracterización de variantes de la CM-PDH insensibles a inhibición por L-TIR*

Del análisis de los reportes sobre la construcción de cepas productoras de aminoácidos, en particular de los AAA, fue posible generalizar que las modificaciones iniciales en la construcción de una cepa de producción tienen la finalidad de eliminar la regulación transcripcional y alostérica de una vía en particular.

Como ya se ha expuesto, el blanco más importante fue eliminar la inhibición por L-TIR de la CM-PDH. El mejor enfoque fue mutagenizar al azar el gen que codifica para la CM-PDH ya que no se contaban en ese tiempo con estructuras cristalográficas de proteínas de la familia. La meta durante la mutagénesis fue mutar el mayor número de residuos para aumentar la posibilidad de encontrar alguna de las mutantes buscadas. Solo fue mutagenizado el dominio PDH, porque esta estrategia incrementaría la posibilidad de encontrar la mutante, ya que los datos cinéticos indicaban que la L-TIR se unía al dominio PDH de esta proteína (44, 88), además que estudios de ingeniería de proteínas indicaban que los últimos 30 residuos de la CM-PDH eran importantes en la unión de la L-TIR (18).

De la secuenciación de las mutantes para determinar la tasa de mutagénesis y de la secuencia de las mutantes seleccionadas en hidroxamato de L-TIR, y por complementación encontramos mutaciones en toda la secuencia del dominio PDH, lo que nos indica que el gen se mutagenizó completamente sin tener una región preferida, lo cual daría la oportunidad de explorar un mayor número de cambios de aminoácido en la secuencia.

Las variantes fueron seleccionadas por complementación en medio mínimo sin L-TIR en la cepa de *E. coli tyrA⁻ pheA⁻*. Fueron seleccionadas al azar las colonias que tardaron más tiempo en complementar, con la hipótesis que una colonia que tarda en crecer fue aquella que se transformó con una variante cuya actividad se afectó severamente como resultado de una mutación en algún aminoácido importante. Podría ser que uno de esos aminoácidos

estuviese involucrado en la unión de la L-TIR. De acuerdo al método de selección empleado en este estudio, se identificaron mutaciones en varios residuos conservados en las variantes de la CM-PDH, algunos de ellos con alguna función conocida (Tablas 9, 11). Como se discutirá adelante, dos residuos muy conservados, F200 y G201, fueron identificados como los responsables de eliminar parcialmente la inhibición por la L-TIR de la CM-PDH. En la literatura han sido descritas mutaciones en algunos residuos muy conservados que generan TyrA^{fbr} en la CM-PDH, en particular en los aminoácidos 250-260, entre los que está la H257 en la CM-PDH (58, 86). En TyrA_{pAa}, mutaciones en la H217 (H257 en la CM-PDH) y R250 (R294 en la CM-PDH) (84). Esto sugiere que los sustratos deben unirse de manera más o menos similar en las proteínas TyrA.

Se caracterizaron 10 de las mutantes seleccionadas por complementación mediante ensayos enzimáticos en presencia y ausencia de 0.6 mM de L-TIR. Las variantes TyrA2, TyrA83, TyrA85, TyrA122, TyrA142, TyrA160 y TyrA162 tuvieron actividades en el rango del 22 al 0.37% de la actividad de la enzima silvestre, que coincide con el hecho de que dichas variantes transformadas en FA11A provocaban una mala complementación. Estas variantes fueron inhibidas totalmente por la L-TIR. Del análisis de la secuencia de este grupo de mutantes se puede observar que algunas de las mutaciones están situadas en regiones muy conservadas dentro de la familia TyrA, en particular G108S, R294L, D246N. En el caso de la G108 es una de las glicinas de la firma de Wierenga que interaccionan con el pirofosfato del NAD⁺ (84). Si se analiza modelo de la CM-PDH y las estructuras de TyrA_{pHI} y TyrA_{pAa}, se observa que G108 es un residuo del sitio activo que no interacciona directamente con L-TIR. Por otro lado, R294 es un residuo involucrado en unir al PPA, HPP y L-TIR interaccionando con el grupo COO⁻ de la cadena piruvil unida al C1 (Figura 6) (84). Está reportado que la mutación R250Q (R250 en un residuo equivalente a R294 en TyrA_{pAa}), genera una enzima que conserva el 50% de su actividad en presencia de L-TIR (84) Sin embargo, en la mutación R294L, R y L son aminoácidos con propiedades químicas diferentes. R es un aminoácido con carga positiva que está involucrada en la unión del PPA, mientras que L es un aminoácido no polar, que por sus características no puede unir al PPA, lo cual explicaría que la variante con esta mutación perdió su actividad.

De las variantes caracterizadas, solo TyrA84, TyrA130 y TyrA155 conservaron actividad en presencia de 0.6 mM de L-TIR, que es una concentración en la cual no fue posible detectar actividad en extractos de la enzima silvestre. Las mutaciones se encontraban en tres regiones: en los residuos D134, G160 y K161, residuos que forman parte del dominio de unión a NAD^+ en TyrA_{pAa} y TyrA_{pHi} en el N-terminal. Otras mutaciones se localizaron en los residuos G200, que es un residuo muy conservado en las proteínas TyrA (Figuras 4 y 17) (8); y F200L que es una F muy conservada en las proteínas TyrA de enterobacterias (Figuras 4 y 17). Se identificaron también mutaciones en los residuos L330, V346 y R356, que forman parte del dominio helicoidal responsable de la dimerización en el C-terminal de las proteínas TyrA (55, 85).

Mediante mutagénesis sitio dirigida se identificaron las mutaciones en TyrA84, TyrA130 y TyrA155 que les dio la propiedad de no ser inhibidas por L-TIR. Se determinó que las mutaciones en los residuos, D134, G160, K161L, L330S, R356C son enzimas que conservan alrededor del 50% de su actividad en comparación de la CM-PDH en ausencia de L-TIR (Tabla 9). En el modelo de la CM-PDH los residuos L330S y R356C están localizados en el C-terminal. En dos reportes se propone, si bien no se demuestra, que los aminoácidos del C-terminal (18, 58), en particular los últimos 30, son responsables de generar enzimas no inhibidas por L-TIR de la CM-PDH. sin embargo, las variantes sencillas con esas dos mutaciones en el C-terminal, aún son inhibidas por dicho aminoácido. Por otro lado D134, G160, K161 son residuos que forman parte del dominio de unión de NAD^+ en el N- Terminal de la enzima (Figura 17), por lo que hace sentido que las variantes de la CM-PDH con estas mutaciones son totalmente inhibidas por L-TIR. Las mutaciones F200L, G201D, V346M fueron las responsables de eliminar la inhibición por L-TIR en TyrA130, TyrA155 y TyrA84, respectivamente; ya que conservaron parcialmente su actividad en presencia del aminoácido. Según los datos estructurales y el modelo de la CM-PDH, F200 y G201 se encuentran en el sitio activo (Figura 6 y 17), lo que explica una pérdida importante de la actividad y que sugiere que la L-TIR se une en el sitio activo de la CM-PDH, igual que el PPA.

¿Cómo afectaron la unión de la L-TIR al sitio activo las mutaciones en los residuos 200 y 201? En la estructura reciente obtenida para la enzima de *A. aeolicus* se determinó que

existe un cambio conformacional en la enzima de una forma cerrada cuando está unido solo el NAD^+ a una forma abierta cuando une a los ligandos (como la L-TIR, el PPA o HPP). El cambio conformacional más notable está localizado en los residuos 149-156 en TyrA_{pAa} (que corresponden a los residuos 199-201 en la enzima de *E. coli*, ver Figuras 6, 17) que es una región hidrofóbica que forma la pared del sitio activo (85). Estos residuos están localizados en un lazo entre la $\beta 5$ y $\beta 6$ en el modelo de la CM-PDH (Figura 17). Se propone que este lazo tiene la función de discriminar los sustratos que se unen al sitio activo de la TyrA_{pAa} (85). En particular, Sun *et al.*, 2009 (determinaron que la G151 en TyrA_{pAa} (G201 en CM-PDH) es un residuo localizado en el lazo que se mueve de 2.5 a 3Å hacia afuera al unirse un sustrato, para evitar que exista un impedimento estérico en la unión del ligando a la enzima (84). En la figura 20 sugiere que la mutación D201 impide que el PPA y la L-TIR ya que reduce el espacio en el sitio activo disponible para los sustratos, mientras que L200 es un cambio que probablemente evita por impedimento estérico el cambio de conformación del lazo. De ahí que TyrA130, TyrA155, TyrAF200L y TyrAG210D tienen una baja actividad en comparación con la enzima silvestre, pero también perdieron parcialmente la inhibición por L-TIR, justo por que la enzima no puede unir a los sustratos.

También de los datos de mutagénesis sitio dirigida se determinó que V346M fue la mutación responsable de hacer parcialmente resistente a L-TIR a la mutante TyrA84. V346 está localizado en un residuo en la hélice 12 de una subunidad (en el modelo de la CM-PDH, figuras 18 y 20) que interacciona con la hélice 10 en donde se localiza la R294 de la otra subunidad. Estos residuos en la estructura se ven alejados (Figura 20) y no se observa un cambio estructural que pudiera afectar la unión de los sustratos. En la región en donde está localizada, Legrand *et al.* reportó que 4 mutaciones: H264Q, R265H, L266R y Q268L (en numeración de TyrA_{SS}) daban a esta proteína insensibilidad a inhibición por L-TIR en la TyrA_{SS} (55). Ellos proponen que estos residuos, en particular H264 interaccionan con una hélice del sitio activo donde se localiza el residuo equivalente a la R294 de la CM-PDH (la hélice 9 en el modelo de la CM-PDH, ver figura 18). Recientemente, se generaron las mutantes sencillas de una doble mutante TyrA^{fbr} de la

CM-PDH reportadas por Lütke-Eversloh, *et al.*, 2005 y empleada por este grupo para la producción de L-TIR (58). Una de las mutaciones estaban localizadas en el dominio CM (M53I) y la otra mutación en el C-terminal (Y354V). Solo la expresión de la variante con el cambio Y354V tuvo un efecto positivo sobre la producción de L-TIR (87). Lo que sugiere que Y354V es la mutación responsable de conferir resistencia a L-TIR. Esta mutación se localiza en la misma región que V346M, en los últimos 30 residuos de la CM-PDH (Figura 20).

Takai, *et al.* 2005 (86) reportó que las mutaciones en los residuos 250-260 de la CM-PDH generaban versiones TyrA^{fbr} insensibles a inhibición por L-TIR. En esta región está la H217 (H257 en la CM-PDH) en el sitio activo de la TyrA_{pAa}. Diferentes mutaciones en H217 generan mutantes casi totalmente insensibles a inhibición por L-TIR (84). Lutke-Eversloh, *et al.*, 2005 (58) identificaron mutaciones en la CM-PDH en los residuos 263 y en los residuos del C-terminal 354-357, sugieren que mutaciones en el C-terminal de la CM-PDH, son importantes en la unión de la L-TIR a la enzima. Cabe señalar que esta hipótesis no fue comprobada por mutagénesis sitio dirigida. Las mutaciones G210D y F200L, identificadas en este estudio, son mutaciones localizadas en una región de la CM-PDH que no ha sido previamente reportada y que generan versiones resistentes a inhibición por L-TIR, aunque menos activas que las reportadas previamente. Finalmente, V346M y los cambios de aminoácidos en TyrA_{aS} interactúan directamente con una hélice en que se localiza cerca R294 (en numeración de CM-PDH). Esto indica que la mayoría de las mutaciones identificadas hasta ahora en la CM-PDH están involucradas en algún cambio en el sitio activo del dominio PDH de la enzima, que afectan la unión del PPA y la L-TIR. Esto explica porque las TyrA^{fbr} caracterizadas hasta ahora de la CM-PDH pierden más del 70% de su actividad en comparación con la enzima silvestre. Es interesante señalar que mutaciones en el residuo H217 en TyrA_{pAa} prácticamente no pierden la actividad con respecto a la silvestre, lo que indica que hay diferencias en la manera en que unen los sustratos CM-PDH y TyrA_{pAa}. Como se expuso en los antecedentes, la información generada por la caracterización de las mutantes TyrA^{fbr} de la CM-PDH apoyan hipótesis previas generadas de estudios cinéticos que proponen que la L-TIR se une al sitio activo en el dominio PDH de la CM-PDH (22, 58). Finalmente, es

interesante señalar que TyrA_{cZm} tiene en su secuencia los residuos equivalentes a la G151, T152, H217, o R250 en TyrA_{pAa} por lo que otros residuos son los responsables en que pueda interactuar con el L-AGN y el PPA, y que no sea inhibida por la L-TIR.

7.2. Sección II: Ingeniería metabólica para la sobreproducción de L-TIR en *E. coli*

Para eliminar la regulación en la vía terminal de síntesis de L-TIR la búsqueda de proteínas de la familia TyrA que no son inhibidas por L-TIR es una alternativa simple a la evolución dirigida de la CM-PDH y que no había sido explorada. El uso de estas enzimas tiene la ventaja que han sido seleccionadas por la naturaleza para ser activas y eficientes en la producción de L-TIR en su organismo de origen. Esto es más difícil de lograr en las enzimas que son obtenidas por procesos de mutagénesis e ingeniería de proteínas, ya que involucra la búsqueda y selección entre cientos o miles de cepas y de variantes.

Se han caracterizado diversas TyrA_a y TyrA_c que no son inhibidas por L-TIR (tabla 2). Para la sobreproducción de L-TIR podría utilizarse cualquier TyrA que no fuese inhibida por dicho aminoácido. Sin embargo, *E. coli* no tiene las enzimas para la biosíntesis de L-AGN, razón por la cual junto con la sobreexpresión de una TyrA_a sería necesaria la sobreexpresión del gen que codificara una enzima que convirtiera el PPA en L-AGN (PPA aminotransferasa). Sería más sencillo emplear una enzima que empleara el PPA como sustrato, por lo que se eligió TyrA_{cZm} porque está reportado que no se inhibe por los tres AAA, y emplea como sustratos PPA y L-AGN. Mediante ensayos enzimáticos se corroboró (tabla 14), que TyrA_{cZm} no pierde su actividad en presencia de 0.6 mM de L-TIR.

Se pensó que si solo se sobreexpresaba una proteína TyrA, la reacción en la que se sintetiza PPA a partir de CHA, catalizada por la CM, sería limitante. Por esta razón se consideró que sería importante evaluar el efecto simultáneo de la expresión de una CM y de TyrA_{cZm} sobre la capacidad de producir L-TIR. No se utilizó la CM de la CM-PDH pues este dominio pierde actividad al ser expresado como una enzima independiente (18). Se eligió la CM de la CM-PDT, porque es una enzima bien caracterizada, y es posible

expresarla como una proteína independiente, que conserva su actividad y ya no se inhibe por L-FEN (93). Si bien no se encontraron reportes en la literatura en los que se evaluara la L-TIR como inhibidor de la CM-PDT, esperábamos que al no ser el metabolito que controla la biosíntesis de L-FEN, la L-TIR no inhibiría la actividad de la CM-PDT. En ensayos enzimáticos, la actividad de PheA_{CM} fue inhibida en un 28% por 1.1 mM de L-TIR. Si bien este no era el resultado esperado, se sabe que otras CM pueden ser inhibidas por L-TIR (24). A pesar de esto, PheA_{CM} es menos sensible a inhibición por L-TIR, ya que en presencia de 0.6 mM de L-TIR, la CM de la CM-PDH se inhibe su actividad en un 40%, mientras que solo se observa una disminución del 28% de actividad de PheA_{CM} en presencia de 1.1 mM de L-TIR.

De tal manera se construyó un operón con el gen *tyrC*, que codifica para TyrA_{cZm}; y *pheA_{CM}*, que codifica para el dominio CM de la CM-PDT. Una última consideración en el diseño de la nueva vía fue no fusionar ambas proteínas ya que no se podía preveer el efecto de la fusión sobre la actividad de estas enzimas. Tal vez, después de fusionarlas ambas enzimas perderían su actividad, y sería necesario emplear diversas herramientas de ingeniería de proteínas para que ambas proteínas recuperaran su actividad. Es así, que se decidió tomar la opción más sencilla que fue expresarlas como enzimas independientes.

Para comprobar si ambas enzimas daban la capacidad a *E. coli* para la biosíntesis de L-TIR, se realizaron ensayos de complementación en la cepa de *E. coli* FA114 que es auxótrofa a L-TIR, comprobando mediante estos experimentos que los genes que forman parte del operón se expresaban adecuadamente y que confieren a la cepa la capacidad metabólica de sintetizar su propia L-TIR. Podría ser el caso que la expresión de los genes *tyrC* y *pheA_{CM}* en *E. coli* fuera suficiente para cubrir la demanda de L-TIR para biosíntesis, pero podrían no ser adecuados para la sobreproducción de dicho aminoácido, por esta razón se realizaron experimentos preliminares de producción de L-TIR en medio mineral con glucosa, y se cuantificó L-TIR a las 24 horas de cultivo. Esta serie de experimentos se realizó en iguales condiciones que los realizados para las variantes de la CM-PDH, con la finalidad de comparar el desempeño de las dos estrategias analizadas para eliminar el control de la L-TIR en la vía terminal. En este experimento se observó que con la sobreexpresión de los genes *tyrC* y *pheA_{CM}* en la cepa PB12CP se obtuvo un incremento

del 68% en el rendimiento $Y_{L-TIR/g\text{ cel}}$ con respecto a la cepa PB12A que sobreexpresaba el gen silvestre de la CM-PDH. Por otro lado, en esta serie de experimentos se determinó que PB12 transformada con los genes *tyrC* y *pheA_{CM}* fue una mejor productora de L-TIR en comparación con la cepa PB12 transformada con los genes que codificaban para la variante TyrA133, que es una TyrA^{fbr} obtenida por complementación en el banco PDH. Estos resultados son consistentes con una patente que fue publicada simultáneamente a este estudio. Los autores demostraron que la cepa que sobreexpresaba TyrA_{cZM} produjo 65% más L-TIR en comparación con la cepa que expresaba la CM-PDH. En este trabajo construyeron por mutagénesis sitio dirigida las variantes TyrA^{fbr} reportadas por Lütke-Eversloh et al. 2005, tanto las mutantes sencillas como la combinación de las mutaciones que dieron resistencia a L-TIR. La mejor variante construida (con los cambios Y263H y A354V) produjo 19% más L-TIR en comparación con la cepa que sobreexpresaba la CM-PDH. En dicho estudio determinaron que la cepa que tenía la actividad de TyrA_{cZm} produjo 8% más L-TIR que las variante mencionada previamente (87). Esta diferencia podría deberse a que las mutaciones en la CM-PDH que reducen la inhibición por L-TIR, también disminuyen de manera significativa su actividad.

Datos reportados en la literatura (59) y también obtenidos en este estudio, han determinado que diversas cepas silvestres de *E. coli* no acumulan L-TIR en el medio de cultivo. En los experimentos de las figuras 23 y 24 observamos que con la sobreexpresión individual de los genes *tyrA* y *aroG^{fbr}* fue suficiente para que se acumulara L-TIR. La sobreexpresión simultánea de ambos genes incrementó la producción de L-TIR (cepa PB12A). Por otro lado se observó que con la actividad de enzimas como TyrA130 y TyrA_{cZm} incrementaba la producción de L-TIR en un 48 y 68%, respectivamente, en comparación con PB12A. Estos datos confirmaron que es necesaria la sobreexpresión de enzimas insensibles a inhibición por L-TIR para incrementar la capacidad de producción de L-TIR. Resultados similares fueron obtenidos por Lütke-Eversloh, *et al.*, 2007 y Takai, *et al.*, 2005 (59, 86). En estos estudios determinaron que la sobreexpresión de alguna TyrA^{fbr} incrementaba de 1.7 a 3.6 veces la producción de L-TIR con respecto a la enzima silvestre.

Ya que se había demostrado que la actividad de enzimas como TyrA_{cZm} y PheA_{CM} daban la capacidad de sobreproducir L-TIR a *E. coli*, se realizó una evaluación más detallada de esta estrategia, en cultivos en medio mínimo con glucosa. Se determinó que con expresión del gen *tyrC* fue suficiente para incrementar el título de L-TIR 4.1 veces más en comparación con PB12A, mientras que con la sobreexpresión simultánea de ambos genes, en PB12CP, no se observó un incremento en la producción de L-TIR. Estos datos nos sugieren que la reacción de conversión de PPA en HPP es limitante en la sobreproducción de L-TIR, y que con la sobreexpresión del gen *tyrC*, y posiblemente, cualquier proteína de la familia TyrA no inhibida por L-TIR, es suficiente para la sobreproducción de L-TIR. Por otro lado, en experimentos en matraz no se observó un incremento en la sobreproducción de L-TIR por la sobreexpresión de *pheA_{CM}*, esto indica que, bajo ciertas condiciones, la reacción que convierte el CHA en PPA no es limitante en la sobreproducción de L-TIR. Está reportado que en cepas que tienen la actividad de alguna DAHPS insensible a inhibición por el AAA correspondiente, acumulan diversos metabolitos de la vía común (3, 26). El CHA acumulado también puede convertirse en PPA en una reacción espontánea, que no depende de la actividad de alguna enzima (39). En cepas sobreproductoras de ácido p-hidroxobenzoico (4), se observó la acumulación de cantidades considerables de PPA –en la escala de g/L- por conversión no enzimática del CHA en PPA. Tal vez del PPA producido por conversión no enzimática del corismato en PB12CP, sea suficiente para proveer de suficiente PPA para la reacción catalizada por TyrA_{cZm}. Esto podría ser una causa de porqué en los cultivos en matraz, la sobreexpresión de *pheA_{CM}* no tuvo un efecto positivo en la sobreproducción de L-TIR. Sin embargo, en los cultivos en bioreactor la sobreexpresión simultánea de ambos genes sí tuvo un efecto positivo en la producción de L-TIR en comparación con PB12C. El medio de cultivo empleado en los biorreactores tenía extracto de levadura. Está reportado que los AAA inhiben la actividad de varias enzimas de la vía común, de tal manera, que por inhibición de las enzimas de la vía común la acumulación de intermediarios de esta vía sea menor en bioreactor que en los experimentos realizados en medio mineral. De tal forma que el flujo de carbono dirigido hasta la síntesis de CHA sea menor, acumulándose una menor concentración de PPA por conversión no enzimática, y en esta condición la reacción

catalizada por PheA_{CM} tomó un papel relevante. Otra posible explicación podría ser que PheA_{CM} no fuese estable las 54 horas del cultivo en matraces. En la figura 24 podemos observar que en las primeras 24 horas de cultivo en matraz, aproximadamente, PB12CP produce L-TIR con mayor rapidez que PB12C, y a partir de ahí empieza a caer la velocidad de producción en PB12C. En los cultivos en bioreactor, solo observamos las primeras 27 horas de cultivo (Figura 25), etapa en la cual ambas cepas se terminaron la glucosa, de tal manera que no se alcanzó a observar el efecto de la pérdida de actividad de PheA_{CM}.

Por otro lado, se cuantificaron ciertos metabolitos clave en la vía de aromáticos, para identificar algunos pasos limitantes y poder sugerir algunas modificaciones para mejorar estas cepas en el futuro. Fueron cuantificados el DHS y el SHIK que son intermediarios de la vía común; y la L-FEN que compite por el CHA en la formación de L-TIR. Se determinó que ambas cepas utilizan la L-FEN aportada por el extracto de levadura, y no hubo producción de dicho aminoácido, lo que nos sugiere que TyrA_{cZm} compite con eficiencia por el corismato con la vía de síntesis de L-FEN. Por esta razón no sería necesario la obtención de cepas auxótrofas a L-FEN para mejorar esta cepa. En un trabajo similar se observó que las cepas que tenían la actividad TyrA_{cZm} acumulaban concentraciones menores de L-FEN en comparación con la cepa que expresaba la CM-PDH (87). Por otro lado la suma de las cantidades de SHIK y DHS acumulados igualan la cantidad de L-TIR producida, por lo que eliminando los diversos impedimentos presentes en la vía común, se podría, en teoría, duplicar la cantidad de L-TIR producida (Figura 26) (57).

La estrategia general empleada en el desarrollo de cepas sobreproductoras de AAA consiste en eliminar los mecanismos de control en la vía de síntesis de los compuestos aromáticos. Diversos microorganismos han sido modificados para la producción de L-TIR mediante procesos de mutagénesis generalizada. Estas cepas fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en análogos tóxicos de los AAA. Análisis bioquímicos de cepas de *C. glutamicum* sobreproductoras de L-TIR obtenidas por mutagénesis demostraron que enzimas como la DHPS y la CM perdieron en distintos niveles la inhibición por L-TIR y los otros dos AAA, mientras que la TyrA_a de este organismo no se inhibe por L-TIR (31).

La mejor cepa de *C glutamicum* sobreproductora de L-TIR, produjo 26 g/L de L-TIR en 80h en un lote alimentado con alta densidad celular. Recientemente, se empleó herramientas de la IVM y de evolución dirigida de proteínas para construir cepas sobreproductoras de L-TIR (17, 86, 58). En estos estudios variantes de la CM-PDH insensibles a inhibición por L-TIR fueron obtenidas por PCR mutagénico y seleccionadas en el análogo 3-fluoro-D,L- tirosina. Empleando *E. coli* como huésped, Takai *et al.*, 2005 (86) y Lütke-Eversloh *et al.*, 2007 (59) construyeron sobreproductoras de L-TIR realizando diversas modificaciones para eliminar los mecanismos de regulación de la vía del SHIK mediante la expresión del genes como *aroG^{fbr}*, que codifica para una versión insensible a inhibición por L-FEN de una DAHPS, versiones insensibles a inhibición por L-TIR de la CM/PDH, y la inactivación de la proteína reguladora TyrR. Para incrementar la disponibilidad de precursores se sobreexpresó los genes *ppsA* y *tktA*. Esta cepa es capaz de producir 9.7g/L de L-TIR con 34.4g/L de células (59). En este estudio se reconstruyó la vía terminal de síntesis de L-TIR mediante la expresión de genes que codifican para enzimas naturalmente insensibles a inhibición a L-TIR. Se demostró que en una cepa con el fenotipo PTS^- glucosa⁺, transformada con el gen *aroG^{fbr}* y los genes *tyrC* y *pheA_{CM}* es posible sobreproducir L-TIR, alcanzándose títulos de 2.9 g/L de L-TIR con 12 g/L de células. Este es un título menor en comparación con los que se han reportado, sin embargo, se demostró que es posible la sobreproducción de L-TIR con enzimas naturalmente insensibles a inhibición por este aminoácido. Esta estrategia es una alternativa sencilla a la de generar mutantes de la CM-PDH insensibles a inhibición por L-TIR. Esta misma estrategia podría ser utilizada para la producción de otros aminoácidos como la L-FEN, empleando enzimas como la ciclohexadienil deshidratasa que no se inhibe por L-FEN. Obtener títulos elevados de L-TIR es el resultado de dos factores, las características de cada cepa y las optimización de las condiciones de cultivo. PB12C y PB12CP aún son susceptibles de ser mejoradas ya que tienen menos modificaciones genéticas que las cepas sobreproductoras de L-TIR reportadas en otros estudios (59, 86). También es necesario optimizar las condiciones de cultivo de PB12C y PB12CP, como un cultivo lote alimentado, de tal forma que en la primera etapa se logren concentraciones

celulares más elevadas, similares a otros estudios (45, 59, 67). En una segunda etapa en la cual se limitaría el crecimiento y se favorezca la producción de L-TIR.

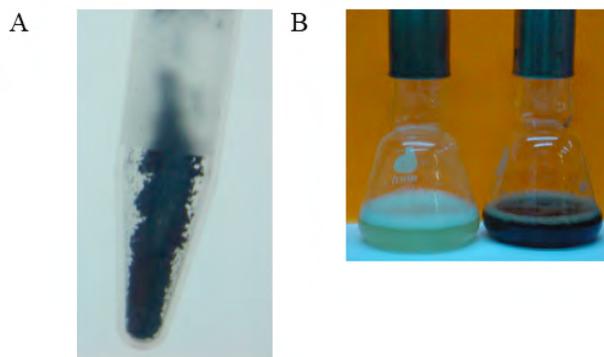


Figura 35. **A)** MEL producida por VH33D. La melanina fue recuperada del medio de cultivo por precipitación con HCl 1N (pH 2 del cultivo) y fué secada a 42°C por 48h. **B)** Solo la cepa W3110F, transformada con el gen *mutmelA*, produjo MEL en cultivos con L-TIR (matraz con el cultivo negro) en comparación con la cepa silvestre W3110 (matraz con el cultivo blanco).

VII.3. *Sección III: Ingeniería metabólica para la producción de melaninas a partir de glucosa en E. coli*

Un proceso de producción de melaninas desarrollado en el laboratorio de IVM del IBT/UNAM incluye la producción de melaninas utilizando a *E. coli* W3110 que expresa *Mutmela*, el gen que codifica para la tirosinasa de *R. etli* CFN42 (ver materiales y métodos). Se creció en medio mineral con glucosa enriquecido con L-TIR, sustrato de la tirosinasa. También se requiere la adición de CuSO_4 , ya que dos átomos de Cu se unen a dos histidinas del sitio activo de la tirosinasa. El Cu es necesario para que la tirosinasa pueda oxidar la L-TIR(14). La expresión del gen *MUTmela* requiere la adición de IPTG. En estas condiciones se observa que la producción de MEL inicia en la fase estacionaria, y que es posible convertir toda la L-TIR añadida en el medio de cultivo en MEL (14) (54). Este fue el proceso con el que se contaba cuando se inició este estudio.

E. coli naturalmente no produce melaninas, y la L-TIR que sintetiza a través de SHIKV es empleada para la síntesis de proteínas, por lo que una cepa silvestre no acumula L-TIR en el medio de cultivo. De tal manera, que solamente en medios enriquecidos con L-TIR y

mediante la expresión de genes heterólogos que codifican para tirosinasas, ha sido posible la producción de melaninas en *E. coli* (27) (90) (14). Es así que en medio mínimo con L-TIR y CuSO_4 , la cepa silvestre W3110 no acumula MEL, en contraste W3110F, la cepa que expresaba la tirosinasa de *R. etli* CFN42, en donde es posible observar la producción de MEL por la formación de una coloración negra en el medio de cultivo (Figuras 26 y 34). Por otro lado, en cultivos en medio mineral se observó que W3110F no acumuló L-TIR, con o sin la tirosinasa activa (Figura 30, Tabla 21), lo que confirma que *E. coli* no sobreproduce L-TIR.

Como parte de las condiciones para la producción de melaninas en medio mineral con glucosa, como factor importante fué añadir el CuSO_4 hasta las 16 horas de cultivo, que es cuando W3110F y W31130A alcanzan la fase estacionaria (Figura 26), debido a que en los cultivos en los que se añadía el CuSO_4 al inicio sin L-TIR, W3110F y W3110A no crecieron (Figura 27). Se propuso que dichas cepas no crecieron en medio mínimo sin L-TIR porque que al principio del cultivo la tirosinasa estaría consumiendo la L-TIR necesaria para la producción de MEL y no quedaría disponible L-TIR para el crecimiento de las células. Está reportado que la tirosinasa no tiene actividad cuando se produce en cultivos sin Cu (14). Se aprovechó lo anterior para que al tener la tirosinasa inactiva, las cepas crecieran y después produjeran melanina con la adición de CuSO_4 (Figura 29). Al añadir el Cu en cultivos en medio mínimo sin L-TIR a las 16 horas, las cepas recuperaron el crecimiento, lo cual apoyó la hipótesis anterior (Figura 29). De tal manera que se esperaba que si se aumentaba la capacidad de síntesis de L-TIR mediante diferentes modificaciones genéticas, las cepas podrían crecer aún añadiendo el CuSO_4 al inicio sin L-TIR, sin embargo en cultivos con las cepas VH33C, VH33D y VH33E no crecieron en dicha condición, probablemente a que las cepas anteriores acumularon L-TIR de forma considerable a partir de las 10 horas. Por otro lado, en cultivos en los que se añadió CuSO_4 y L-TIR a las 16 horas, se observó la formación de melaninas, lo que indicaba que con esta estrategia se tenía actividad de la tirosinasa. Ya que se determinó que solo se recupera el 8% de la actividad de la tirosinasa cuando se añade el cobre después de que se produce la apotirosinasa (14), se piensa que la formación de melaninas se debe sobretodo a que la tirosinasa activa que es sintetizada *de novo* después de la adición del Cu. En estas

condiciones en cultivos a los que se añadió el Cu y la L-TIR en la fase estacionaria, q_{MEL} se redujo en un 51.8%. El dato anterior sugiere que se tiene menor actividad de la tirosinasa probablemente porque se sintetizó una menor cantidad de esta enzima en su forma activa. Cabe señalar que la actividad de la tirosinasa no fue la única por la cual las cepas no crecieron, ya que se observó la cepa W3110 transformada con el plásmido pRW300 no creció en medio mínimo sin L-TIR con $CuSO_4$, al inicio y este efecto se eliminó al añadir L-TIR (datos no mostrados). Aún no hemos encontrado una explicación clara a este fenómeno. Aún así la tirosinasa tiene un efecto negativo sobre el crecimiento, ya que el crecimiento W3110F se afectó severamente. Otro aspecto que es importante puntualizar es que no era una buena opción controlar la expresión del gen *Mutmela* induciendo con IPTG después de varias horas que se iniciara el cultivo, ya que se observó la formación de 24% y 92% de melaninas en comparación con la condición en la que se añadía IPTG, en cultivos con L-TIR y $CuSO_4$ al inicio del cultivo (datos no mostrados), por lo que hay una elevada expresión del gen *Mutmela* aún sin IPTG, que no es deseable para el crecimiento de las cepas.

Para producir melaninas en medio mineral con glucosa, es necesario sobreproducir el precursor, la L-TIR. Las modificaciones genéticas que se realizaron en W3110 se enfocaron en incrementar el flujo de carbono hacia la vía de síntesis de los compuestos aromáticos y a la vía específica de producción de L-TIR. Conforme a lo que se esperaba, con cada modificación se incrementó la producción de L-TIR y de MEL; excepto para VH33E, cepa en la cual ya no se observó un incremento en la producción de L-TIR y MEL por la sobreexpresión del gen *tktA*, que codifica para la transcetolasa A. La mejor producción de L-TIR se observó con la cepa que además tenía inactivado el gen *tyrR*, uno de los reguladores de SHIKV, en la cepa VH33D. Esto por un lado indica que la inhibición de la expresión por varios genes por TyrR es un paso limitante importante en la producción de L-TIR.

Se reportó que en cultivos lote alimentado añadiendo $CuSO_4$ desde el inicio, 5.7g/L de L-TIR fueron convertidos en su totalidad en 6 g/L MEL en 80 h (54). Sin embargo, en este estudio, alrededor del 67% de L-TIR se convirtió en MEL en los cultivos con las cepas W3110B, VH33C y VH33E. En cultivos con VH33D solo se convirtió en MEL el 30% de

la L-TIR producida. Se sabe que en *E. coli* la tirosinasa se localiza en el interior de la célula (Lagunas, V., comunicación personal). Se tiene la hipótesis que cuando la L-TIR es añadida al medio de cultivo, *E. coli* la transporta al interior, mediante las permeasas AroP y TyrP, durante la fase estacionaria de crecimiento. Se ha propuesto que la oxidación de la L-TIR, de la L-DOPA, y de las primeras reacciones del proceso de melanogénesis en la que se generan los precursores (como el dopacromo o el DHI), ocurren en el interior de la célula. La polimerización se lleva a cabo cuando los precursores son excretados al medio de cultivo (54). De acuerdo a la hipótesis anterior, en las cepas empleadas en este estudio, la L-TIR es producida y oxidada por la tirosinasa en el interior de la célula. Los precursores formados en el citoplasma son excretados y la polimerización termina en el medio de cultivo. Como parte de la L-TIR es excretada al medio de cultivo, esto sugiere que la velocidad con la que la que es oxidada la L-TIR por la tirosinasa es superada por la velocidad de biosíntesis de L-TIR, y sugiere que la actividad de la tirosinasa está limitando la conversión de la L-TIR en melaninas.

En las condiciones en las que se añade L-TIR y CuSO_4 desde el inicio del cultivo, toda la L-TIR es convertida en MEL (54). Para la producción de MEL a partir de glucosa, el CuSO_4 se añade a las 16 h del cultivo. Como se mencionó previamente, se piensa que en esta condición la concentración de tirosinasa activa es menor en comparación cuando se añade al inicio, debido a que la tirosinasa producida las primeras horas es inactiva. Esto se refleja en que se convirtió una menor cantidad de L-TIR en MEL. Para mejorar estas cepas es importante considerar que es necesario incrementar los niveles de actividad de la tirosinasa utilizando un sistema de expresión distinto en los que se produzca una mayor cantidad de proteína o que se pueda regular finamente la expresión de *MutmelA* para mantener apagada su expresión el tiempo necesario. Otra posibilidad sería emplear la tirosinasa de otro organismo con un nivel de actividad superior, o generar una versión mutante de la tirosinasa de *R. etli* CFN42 con mayor actividad.

En los espectros IR del polímero producido por W3110A, VH33D y VH33E se determinó que se encuentran presentes los principales grupos funcionales en comparación con la MEL producida por SIGMA por síntesis química, así como otras MEL de origen bacteriano (53, 1). Este dato confirma que el pigmento de color negro acumulado en el

medio de cultivo es MEL. Por otro lado, en los espectros de las MEL producidas por las cepas generadas en este estudio hay varios picos que no están en el espectro del control, esto se debe a que la composición química de las melaninas está influenciada por las condiciones en la que es producida (ambiente) y el método de purificación empleado(28) (41).

Un aspecto a mejorar en la producción de melaninas en medio mineral con glucosa, es que la cepa VH33D tiene una velocidad de crecimiento menor a la cepa silvestre W3110, ya que en las condiciones probadas alcanza la concentración celular máxima (3 D.O.) en 92 horas, en contraste con W3110F, que alcanzó 3.3 D.O. en 24 horas. VH33 es una cepa con el sistema PTS inactivo que recuperó la capacidad de crecer en glucosa porque el promotor del gen *galP* (que codifica la permeasa de galactosa) fue cambiado por el promotor fuerte *trc* (25). En experimentos preliminares en medio mínimo empleando arabinosa, gluconato o glicerol se observó que la velocidad de crecimiento de VH33D mejoró alrededor de dos veces con las dos últimas fuentes de carbono (datos no mostrados). Cabe mencionar que el glicerol y el gluconato entran a la glucólisis como gliceraldehído-3-fosfato, lo que sugiere que la capacidad de consumir glucosa podría ser mejorada en VH33D. Si se empleara glicerol, una fuente de carbono de menor costo que el gluconato, sería posible mejorar la velocidad de crecimiento y así obtener concentraciones celulares mayores en menor tiempo. Está reportado que el uso del glicerol como fuente de carbono tiene un efecto positivo sobre la velocidad de crecimiento y de producción de aromáticos en cepas PTS⁻ glucosa⁺ (61). Otra opción podría ser la sobreexpresión del gen *glk* en VH33D, ya que en condiciones en las que se sobreproduce algún metabolito como MEL y L-TIR, la fosforilación de la glucosa podría ser limitante, por lo que sería necesaria la sobreexpresión simultánea de *galP* y *glk* para que la cepa PTS⁻ mejore su velocidad de crecimiento en glucosa (42). Finalmente, también se ha demostrado que la mutación en el gen *arcA*, que codifica un regulador transcripcional de genes del metabolismo central, mejora el crecimiento en glucosa en cepas PTS⁻, por lo que es una modificación interesante a evaluar en VH33D junto con a sobreexpresión del gen *glk* (32). En la literatura se han reportado diversos trabajos relacionados con la producción de melaninas empleando organismos recombinantes, o mediante síntesis química a partir de

los precursores, como L-DOPA, L-TIR y polifenoles (34). En el primer caso, se han reportado trabajos de producción de melaninas en microorganismos recombinantes, como *S. lividans* (36) y *E. coli* (14, 27). La producción de melaninas por estos organismos recombinantes requiere el uso de medios ricos suplementados con aminoácidos, especialmente de L-TIR, el sustrato de la tirosinasa. En estos cultivos se observa que entre más L-TIR se añade al medio de cultivo es posible incrementar la concentración de la melanina acumulada (36, 54). En este trabajo se modificaron las vías metabólicas de *E. coli* para que sobreprodujera L-TIR, el precursor en la síntesis de las eumelaninas. En una cepa que sobreproduce L-TIR, cuando expresa una tirosinasa, es posible la producción de MEL a partir de una fuente de carbono de bajo costo como la glucosa. Esto es una mejora importante al proceso de producción de MEL, ya que sería posible producir MEL con una composición química constante y reproducible, a diferencia de las melaninas de origen vegetal o animal, cuya composición puede variar dependiendo de las condiciones ambientales y de purificación. En comparación con los procesos de síntesis química, con las cepas generadas en este estudio es posible producir MEL con un menor costo ya que no se requiere el uso de precursores puros como la L-TIR y L-DOPA. De igual forma, en este proceso se utiliza un medio de cultivo menos complejo en comparación con otros trabajos reportados, que podría reflejarse en el costo de MEL.

Con los resultados descritos en este estudio fue posible demostrar que es posible en una sola cepa la producción de MEL desde glucosa. Hasta donde sabemos, solo hay un trabajo reciente en donde se produjo melaninas desde glucosa como método de selección de buenas productoras de L-TIR (77). Sin embargo los resultados de este trabajo fueron cualitativos. En nuestro estudio se caracterizó detenidamente la capacidad de síntesis de MEL y L-TIR. Lo que sigue es realizar cultivos con alta densidad celular con VH33D con glicerol y/o glucosa como fuentes de carbono. Se piensa que si se producen 10g/L de células, sería posible obtener alrededor de 2-3g/L de MEL en 96h aproximadamente, lo que convertiría a este proceso competitivo con los procesos biotecnológicos patentados hasta ahora.

VIII. Conclusiones

- Se obtuvieron tres mutantes de la CM-PDH resistentes a inhibición por L-TIR.
- Se determinó que solo es necesaria una mutación para generar variantes resistentes a inhibición por L-TIR.
- De las variantes anteriores, solo los cambios F200L, G201D y V346M generan versiones de la CM-PDH resistentes a inhibición por L-TIR. Dichas mutaciones no se han sido reportadas previamente por otros grupos.
- Análisis del modelo de la CM-PDH sugiere que las mutaciones F200L y G201D están localizadas en el sitio activo de la enzima .
- La mutación V346M está cerca de la R294, que podría provocar algún cambio en la estructura del sitio activo que disminuye el efecto inhibitorio de la L-TIR sobre la CM-PDH.
- El análisis de las mutaciones identificadas en el modelo de la CM-PDH sugieren que la L-TIR se une al sitio activo de la enzima que apoya el modelo de inhibición competitiva de la CM-PDH (22).
- Se demostró que es posible sobreproducir L-TIR mediante la expresión heteróloga de la Tyr_{Ac} de *Z. mobilis*, y esto se puede generalizar al uso de cualquier proteína TyrA resistente a inhibición por L-TIR.
- La reacción de conversión del PPA en HPP es un paso que limita la producción de L-TIR en medio mínimo.
- En cultivos de alta densidad celular, la expresión simultánea de *tyrC* y *pheA_{CM}* incrementó la producción de L-TIR.
- Se determinó que Tyr_{AcZm} compite eficientemente por el carbono con la vía de síntesis de L-FEN.
- En las condiciones experimentales empleadas, la expresión simultánea de Tyr_{AcZm} y Phe_{AcM} fue una mejor estrategia para la producción de L-TIR en comparación con la expresión de las variantes TyrA^{fbr}.
- El uso de la biodiversidad en las proteínas TyrA es una alternativa sencilla y funcional a la evolución dirigida de proteínas.

- La acumulación de metabolitos de la vía común sugieren que varias reacciones de la vía común limitaron la producción de L-TIR.
- Fue posible la producción de MEL en una cepa modificada para sobreproducir L-TIR en medio mineral con glucosa como única fuente de carbono.
- Se demostró que las melaninas producidas en este estudio son estructuralmente muy similares a las melaninas producidas por síntesis química.
- La tirosinasa de *R. etli* CFN42 limitó la conversión la L-TIR en MEL.

IX. Perspectivas

- Evaluar la producción de tirosina de las variantes de la enzima CM-PDH resistentes a inhibición por L-TIR en las condiciones evaluadas en la cepa transformada con la TyrA_{cZm} y PheA_{CM}.
- Mutagénesis a saturación de los residuos 200, 201 y 346 para identificar la mutación que genere variantes más activas y que sean menos inhibidas por L-TIR.
- Caracterización cinética de las variantes TyrA84, TyrA130 y TyrA155 así como de las variantes sencillas obtenidas por mutagénesis sitio dirigida.
- Purificar y cristalizar a CM-PDH y las TyrA^{fbt} en presencia de L- TIR.
- Mejorar la capacidad de producción de L-TIR recurriendo a los métodos de mutagénesis aleatoria que permitan identificar nuevos blancos no obvios que mejoren la cepa.
- Análisis de flujos y transcripcional de las cepas productoras de L-TIR y MEL para identificar futuras modificaciones genéticas.
- Establecer y optimizar las condiciones de cultivo en fermentadores para la producción de L-TIR.
- Producción de diversos productos de alto valor agregado derivados de la vía de síntesis de L-TIR.

- Sobreexpresión de enzimas como la ciclohexadienil deshidratasa para la sobreproducción de L-FEN.
- Actualmente se trabaja en la producción de L-DOPA y ácido cumárico empleando las cepas productoras de L-TIR construidas en este trabajo.
- Producir melaninas en biorreactor en la escala de g/L en cultivos con alta densidad celular empleando glucosa y glicerol como fuentes de carbono.
- Mejorar la producción de MEL utilizando otro sistema de expresión o mediante el uso de tirosinasas más activas.
- Evaluar la sobreexpresión del gen *glk* y la inactivación del gen *arcA* en la mejora de cepa productora de MEL (VH33D), sobre la velocidad de crecimiento y producción de MEL.
- Emplear la producción de melaninas desde glucosa como sistema de selección de: tirosinasas más activas, de genes de SHIKV u otras actividades relacionadas a partir de bancos del metagenoma. También podría emplearse como sistema de selección para encontrar otras TyrA^{fb} y en el diseño de nuevos sistemas de expresión.
- Caracterización fina de la estructura química de la MEL producida en este trabajo para determinar las aplicaciones más adecuadas para las MEL producidas por las cepas generadas en este estudio.

X. Referencias

1. **Aghajanyan, A. E., A. A. Hambardzumyan, A. S. Hovsepyan, R. A. Asaturian, A. A. Vardanyan, and A. A. Saghyan.** 2005. Isolation, purification and physicochemical characterization of water-soluble *Bacillus thuringiensis* melanin. *Pigment Cell Res* **18**:130-5.
2. **Amann, E., B. Ochs, and K. J. Abel.** 1988. Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **69**:301-15.
3. **Baez-Viveros, J. L., J. Osuna, G. Hernandez-Chavez, X. Soberon, F. Bolivar, and G. Gosset.** 2004. Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **87**:516-24.
4. **Barker, J. L., and J. W. Frost.** 2001. Microbial synthesis of p-hydroxybenzoic acid from glucose. *Biotechnol. Bioeng.* **76**:376-90.
5. **Bessette, P. H., F. Aslund, J. Beckwith, and G. Georgiou.** 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *PNAS*

- 96**:13703-13708.
6. **Bolívar, F., R. L. Rodríguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, and H. W. Boyer.** 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**:95-113.
 7. **Bongaerts, J. K., M. Muller, U. Raeven, L. Wubbolts, M.** 2001. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metab. Eng.* **3**:289-300.
 8. **Bonner, C. A., R. A. Jensen, J. E. Gander, and N. O. Keyhani.** 2004. A core catalytic domain of the TyrA protein family: arogenate dehydrogenase from *Synechocystis*. *Biochem J* **382**:279-91.
 9. **Bonvin, J., R. A. Aponte, M. Marcantonio, S. Singh, D. Christendat, and J. L. Turnbull.** 2006. Biochemical characterization of prephenate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Protein Sci* **15**:1417-32.
 10. **Bourke, S. L., and J. Kohn.** 2003. Polymers derived from the amino acid L-tyrosine: polycarbonates, polyarilates and copolymers with poly(ethylene glycol). *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**:447-466.
 11. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.
 12. **Brown, K. D.** 1971. Maintenance and exchange of the aromatic amino acid pool in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **106**:70-81.
 13. **Butler, M. J., Day, A.W.** 1998. Fungal Melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology* **44**:1115-1136.
 14. **Cabrera-Valladares, N., Martínez, A., Piñero, S., Lagunas-Muñoz, V.H., Tinoco, R., de Anda, R., Vázquez-Duhalt, R., Bolívar, F., Gosset, G.** 2006. Expression of the *melA* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase. *Enzyme and Microbial Technology* **38**:772-779.
 15. **Champney, W. S., and R. A. Jensen.** 1969. D-Tyrosine as a metabolic inhibitor of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **98**:205-14.
 16. **Chávez, M. I., Martínez, A., Bolívar, F., Gosset, G. .** 2005. Metabolic pathway engineering for microbial production of aromatic amino acids. *Res. Adv. in Food Science.* **5**:11-19.
 17. **Chávez-Béjar, M. I., A. R. Lara, H. Lopez, G. Hernandez-Chavez, A. Martinez, O. T. Ramirez, F. Bolivar, and G. Gosset.** 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.
 18. **Chen, S., S. Vincent, D. B. Wilson, and B. Ganem.** 2003. Mapping of chorismate mutase and prephenate dehydrogenase domains in the *Escherichia coli* T-protein. *Eur. J. Biochem.* **270**:757-63.
 19. **Christendat, D., V. C. Saridakis, and J. L. Turnbull.** 1998. Use of site-directed mutagenesis to identify residues specific for each reaction catalyzed by chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**:15703-12.

20. **Christendat, D., and J. Turnbull.** 1996. Identification of active site residues of chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **35**:4468-79.
21. **Christendat, D., and J. L. Turnbull.** 1999. Identifying groups involved in the binding of prephenate to prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**:4782-93.
22. **Christopherson, R. I., and J. F. Morrison.** 1985. Chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli*: positive cooperativity with substrates and inhibitors. *Biochemistry* **24**:1116-21.
23. **Cohen, G. N., and E. A. Adelberg.** 1958. Kinetics of incorporation of p-fluorophenylalanine by a mutant of *Escherichia coli* resistant to this analogue. *J. Bacteriol.* **76**:328-30.
24. **Cotton, R. G., and F. Gibson.** 1965. The Biosynthesis of Phenylalanine and Tyrosine; Enzymes Converting Chorismic Acid into Prephenic Acid and Their Relationships to Prephenate Dehydratase and Prephenate Dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* **100**:76-88.
25. **De Anda, R., A. R. Lara, V. Hernandez, V. Hernandez-Montalvo, G. Gosset, F. Bolivar, and O. T. Ramirez.** 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.
26. **Dell, K. A., and J. W. Frost.** 1993. Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: rate-limiting enzymes un the cimmon pathway of aromatic amino acid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **115**:11581-11589.
27. **della-Cioppa, G., S. J. Garger, G. G. Sverlow, T. H. Turpen, and L. K. Grill.** 1990. Melanin production in *Escherichia coli* from a cloned tyrosinase gene. *Biotechnology (N Y)* **8**:634-8.
28. **della-Cioppa, G., Garger, S., Sverlow, G., Turpen, T., Grill, L., Kumagai, M.** 1997. Melanin production by transformed organisms. US Patent 5631151.
29. **Doroshenko, V., L. Airich, M. Vitushkina, A. Kolokolova, V. Livshits, and S. Mashko.** 2007. YddG from *Escherichia coli* promotes export of aromatic amino acids. *FEMS Microbiol Lett* **275**:312-8.
30. **Draths, K. M., D.L. Pompliano, D.L. Conley, J.W. Frost, A. Berry, G.L. Disbrow, R.J. Staversky, and J. C. Lievens.** 1992. Biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: the role of transketolase. *J. Am. Chem. Soc.* **14**:620-623.
31. **Fazel, A. M., and R. A. Jensen.** 1979. Obligatory biosynthesis of L-tyrosine via the pretyrosine branchlet in coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* **138**:805-15.
32. **Flores, N., L. Leal, J. C. Sigala, R. de Anda, A. Escalante, A. Martinez, O. T. Ramirez, G. Gosset, and F. Bolivar.** 2007. Growth recovery on glucose under aerobic conditions of an *Escherichia coli* strain carrying a phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system deletion by inactivating *arcA* and overexpressing the genes coding for glucokinase and galactose permease. *J Mol Microbiol Biotechnol* **13**:105-16.
33. **Flores, N., J. Xiao, A. Berry, F. Bolívar, and F. Valle.** 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.*

- 14:620-3.
34. **Ghisalberti, C.** 2000. Synthetic vegetal melanins, process for their production and composition containing them. EP20000954851.
 35. **Gosset, G., J. Yong-Xiao, and A. Berry.** 1996. A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Ind. Microbiol. **17**:47-52.
 36. **Grill, L., Garger, S. Sverlow, G., Erwuin, R.** 1995. Melanin production. Patent EP0363792
 37. **Hagino, H., and K. Nakayama.** 1973. L-tyrosine production by analog-resistant mutants derived from a phenylalanine auxotroph of *Corynebacterium glutamicum*. Agr. Biol. Chem. **39**:2013-2023.
 38. **Hagino, H., and K. Nakayama.** 1975. The biosynthetic control in aromatic amino acid producing mutants of *Corynebacterium glutamicum*. Agr. Biol. Chem. **39**:351-361.
 39. **Haslam, E.** 1993. Shikimic acid: metabolism and metabolites, 1 ed. John Wiley & Sons, England.
 40. **Henke, B. R., S. G. Blanchard, M. F. Brackeen, K. K. Brown, J. E. Cobb, J. L. Collins, W. W. Harrington, Jr., M. A. Hashim, E. A. Hull-Ryde, I. Kaldor, S. A. Kliewer, D. H. Lake, L. M. Leesnitzer, J. M. Lehmann, J. M. Lenhard, L. A. Orband-Miller, J. F. Miller, R. A. Mook, Jr., S. A. Noble, W. Oliver, Jr., D. J. Parks, K. D. Plunket, J. R. Szewczyk, and T. M. Willson.** 1998. N-(2-Benzoylphenyl)-L-tyrosine PPAR γ agonists. 1. Discovery of a novel series of potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic agents. J Med Chem **41**:5020-36.
 41. **Henson, J. M.** 2001. Melanin. Wiley-VCH, Weinheim.
 42. **Hernández-Montalvo, V., A. Martínez, G. Hernández-Chávez, F. Bolívar, F. Valle, and G. Gosset.** 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.
 43. **Hernández-Montalvo, V., F. Valle, F. Bolívar, and G. Gosset.** 2001. Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. Appl. Microbiol. Biotechnol. **57**:186-91.
 44. **Hudson, G. S., G. J. Howlett, and B. E. Davidson.** 1983. The binding of tyrosine and NAD⁺ to chorismate mutase/prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli* K12 and the effects of these ligands on the activity and self-association of the enzyme. Analysis in terms of a model. J. Biol. Chem. **258**:3114-20.
 45. **Ikeda, M., and R. Katsumata.** 1992. Metabolic engineering to produce tyrosine or phenylalanine in a tryptophan-producing *Corynebacterium glutamicum* strain. Appl. Environ. Microbiol. **58**:781-785.
 46. **Ikeda, M., K. Okamoto, and R. Katsumata.** 1999. Cloning of the transketolase gene and the effect of its dosage on aromatic amino acid production in *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol **51**:201-6.
 47. **Ito, H., S. Sakurai, and T. Tanaka.** 1990. Genetic breeding of L-tyrosine producer *Brevibacterium lactofermentum*. Agr. Biol. Chem. **54**:699-705.
 48. **Ito, H., K. Sato, H. Enei, and Y. Hirose.** 1990. Improvement in microbial production of L-tyrosine by gene dosage effect of *aroL* gene encoding shikimate kinase. Agr. Biol. Chem. **54**:823-824.
 49. **Jiang, P. H., M. Shi, Z. K. Qian, N. J. Li, and W. D. Huang.** 2000. Effect of

- F209S mutation of *Escherichia coli* AroG on resistance to Phenylalanine feedback inhibition. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* **32**:441-444.
50. **Jossek, R., J. Bongaerts, and G. A. Sprenger.** 2001. Characterization of a new feedback-resistant 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase AroF of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**:145-8.
 51. **Kaxiras, E., A. Tsolakidis, G. Zonios, and S. Meng.** 2006. Structural model of eumelanin. *Phys Rev Lett* **97**:218102.
 52. **Kikuchi, Y., K. Tsujimoto, and O. Kurahashi.** 1997. Mutational analysis of the feedback sites of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **63**:761-2.
 53. **Kukulianskaia, T. A., N. V. Kurchenko, V. P. Kurchenko, and V. G. Babitskaia.** 2002. [Physicochemical properties of melanins produced by *Inonotus obliquus* ("chagi") in the nature and the cultivated fungus]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **38**:68-72.
 54. **Lagunas-Muñoz, V. H., Cabrera-Valladares, N., Bolívar, F., Gosset, G., Martínez, A.** 2006. Optimum melanin production using recombinant *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* **101**:1002-8.
 55. **Legrand, P., R. Dumas, M. Seux, P. Rippert, R. Ravelli, J. L. Ferrer, and M. Matringe.** 2006. Biochemical characterization and crystal structure of *Synechocystis arogenate* dehydrogenase provide insights into catalytic reaction. *Structure* **14**:767-76.
 56. **Leuchtenberger, W., K. Huthmacher, and K. Drauz.** 2005. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**:1-8.
 57. **Lutke-Eversloh, T., and G. Stephanopoulos.** 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.
 58. **Lütke-Eversloh, T., and G. Stephanopoulos.** 2005. Feedback inhibition of chorismate mutase/prephenate dehydrogenase (TyrA) of *Escherichia coli*: generation and characterization of tyrosine-insensitive mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7224-8.
 59. **Lütke-Eversloh, T., and G. Stephanopoulos.** 2007. L-tyrosine production by deregulated strains of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**:103-10.
 60. **Maiti, T. K., A. Roy, S. K. Mukherjee, and S. P. Chatterjee.** 1985. Microbial Production of L-tyrosine: a review. *Hindustan Antibiot. Bull.* **37**:51-65.
 61. **Martinez, K., R. de Anda, G. Hernandez, A. Escalante, G. Gosset, O. T. Ramirez, and F. G. Bolivar.** 2008. Couitilization of glucose and glycerol enhances the production of aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microb Cell Fact* **7**:1.
 62. **Miller, J. E., K. C. Backman, M. J. O'Connor, and R. T. Hatch.** 1987. Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology* **2**:143-149.
 63. **Nielsen, J.** 2001. Metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**:263-83.

64. **Olson, M. M., L. J. Templeton, W. Suh, P. Youderian, F. S. Sariaslani, A. A. Gatenby, and T. K. Van Dyk.** 2007. Production of tyrosine from sucrose or glucose achieved by rapid genetic changes to phenylalanine-producing *Escherichia coli* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**:1031-40.
65. **Para, G., P. Lucciardi, and J. Baratti.** 1985. Synthesis of L-tyrosine by immobilized *Escherichia intermedia* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**:273-279.
66. **Park, J. H., and S. Y. Lee.** 2008. Towards systems metabolic engineering of microorganisms for amino acid production. *Curr Opin Biotechnol* **19**:454-60.
67. **Patnaik, R., R. Spitzer, and J. C. Liao.** 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.
68. **Patnaik, R., R. R. Zolanz, D. A. Green, and D. F. Kraynie.** 2008. L-tyrosine production by recombinant *Escherichia coli*: fermentation optimization and recovery. *Biotechnol Bioeng* **99**:741-52.
69. **Pittard, J., H. Camakaris, and J. Yang.** 2005. The TyrR regulon. *Mol Microbiol* **55**:16-26.
70. **Plonka, P. M., and M. Grabacka.** 2006. Melanin synthesis in microorganisms--biotechnological and medical aspects. *Acta Biochim Pol* **53**:429-43.
71. **Pohnert, G., S. Zhang, A. Husain, D. B. Wilson, and B. Ganem.** 1999. Regulation of phenylalanine biosynthesis. Studies on the mechanism of phenylalanine binding and feedback inhibition in the *Escherichia coli* P-protein. *Biochemistry* **38**:12212-7.
72. **Quintero Ramirez, R.** 2008. Estudio de prefactibilidad técnico-económica del proyecto Producción de melanina mediante un proceso fermentativo.112.
73. **Ray, J. M., C. Yanofsky, and R. Bauerle.** 1988. Mutational analysis of the catalytic and feedback sites of the tryptophan-sensitive 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**:5500-6.
74. **Riley, P. A.** 1997. Melanin. *Int J Biochem Cell Biol* **29**:1235-9.
75. **Rose, R. E.** 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res* **16**:355.
76. **Roy, A., S. K. Murkhopadhyay, and S. P. Chatterjee.** 1997. Production of tyrosine by auxotrophic analogue resistant mutants of *Arthrobacter globiformis*. *Journal of Scientific and Industrial Research* **56**:727-733.
77. **Santos, C. N., and G. Stephanopoulos.** 2008. Melanin-based high-throughput screen for L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:1190-7.
78. **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.
79. **Snoep, J. L., N. Arfman, L. P. Yomano, R. K. Fliege, T. Conway, and L. O. Ingram.** 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**:2133-5.
80. **Solis, A., Lara, M. Rendon, L.** 2007. Photoelectrochemical properties of melanin.

- Nature precedings. hdl:10101/npre.2007.1312.1
81. **Song, J., C. A. Bonner, M. Wolinsky, and R. A. Jensen.** 2005. The TyrA family of aromatic-pathway dehydrogenases in phylogenetic context. *BMC Biol* **3**:13.
 82. **Sprenger, G. A.** 2007. From scratch to value: engineering *Escherichia coli* wild type cells to the production of L: -phenylalanine and other fine chemicals derived from chorismate. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**:739-49.
 83. **Subash Babu, P., S. Prabuseenivasan, and S. Ignacimuthu.** 2007. Cinnamaldehyde--a potential antidiabetic agent. *Phytomedicine* **14**:15-22.
 84. **Sun, W., D. Shahinas, J. Bonvin, W. Hou, M. S. Kimber, J. Turnbull, and D. Christendat.** 2009. The crystal structure of *Aquifex aeolicus* prephenate dehydrogenase reveals the mode of tyrosine inhibition. *J Biol Chem* **284**:13223-32.
 85. **Sun, W., S. Singh, R. Zhang, J. L. Turnbull, and D. Christendat.** 2006. Crystal structure of prephenate dehydrogenase from *Aquifex aeolicus*. Insights into the catalytic mechanism. *J Biol Chem* **281**:12919-28.
 86. **Takai, A., Joem Y., Nishi, R., Ito, H.** December 15, 2005 2005. L-tyrosine-producing bacterium and a method for producieg L-tyrosine. USA patent 20050277179.
 87. **Templeton, L. J., Van Dyk, T.** 2008. Method of Enhancing L-tyrosine production in recombinant bacteria. WO 2008/060387.
 88. **Turnbull, J., and J. F. Morrison.** 1990. Chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli*. 2. Evidence for two different active sites. *Biochemistry* **29**:10255-61.
 89. **Vincent, S., S. Chen, D. B. Wilson, and B. Ganem.** 2002. Probing the overlap of chorismate mutase and prephenate dehydrogenase sites in the *Escherichia coli* T-protein: a dehydrogenase-selective inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**:929-31.
 90. **Wang, G., A. Aazaz, Z. Peng, and P. Shen.** 2000. Cloning and overexpression of a tyrosinase gene mel from *Pseudomonas maltophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* **185**:23-7.
 91. **Xie, G., C. A. Bonner, and R. A. Jensen.** 2000. Cyclohexadienyl dehydrogenase from *Pseudomonas stutzeri* exemplifies a widespread type of tyrosine-pathway dehydrogenase in the TyrA protein family. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **125**:65-83.
 92. **Zhang, S., G. Pohnert, P. Kongsaree, D. B. Wilson, J. Clardy, and B. Ganem.** 1998. Chorismate mutase-prephenate dehydratase from *Escherichia coli*. Study of catalytic and regulatory domains using genetically engineered proteins. *J Biol Chem* **273**:6248-53.
 93. **Zhang, S., D. B. Wilson, and B. Ganem.** 2003. An engineered chorismate mutase with allosteric regulation. *Bioorg. Med. Chem.* **11**:3109-14.
 94. **Zhao, G. X., T. Ingram, L. O. Jensen, R. A.** 1993. An allosterically insensitive class of cyclohexadienyl dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Biochem.* **212**:157-65.

Apéndice I. Abreviaturas empleadas en el texto, en las tablas y las figuras (en orden alfabético).

a) Metabolitos

AAA, *Aminoácidos aromáticos*
 α -KG, *α -cetoglutarato*
 CHA, *ácido corísmico*
 DAHP, *3-deoxy-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato*
 DHQ, *ácido 3-dehidroquinico*
 DHS, *ácido-3-dehidroshiquímico*
 E4P, *eritrosa-4-fosfato*
 EP3P, *enolpiruvil shiquimato-3-fosfato*
 G6P, *glucosa-6-fosfato*
 HPP, *ácido - 4-hidroxifenilpirúvico*
 HxTir, *hidroxamato de L-Tirosina*
 L-AGN, *L-Arogenato*
 L-DOPA, *3,4-dihidroxifenil-L-alanina*
 L-FEN, *L-Fenilalanina*
 L-GLU, *L-Glutamato*
 L-TIR, *L-Tirosina*
 L-TRP, *L-Triptofano*
 OAA, *oxalacetato*
 PEP, *fosfoenolpiruvato*
 PIR, *piruvato*
 PPA, *ácido prefénico*
 SHIK, *ácido shiquímico*
 S3P, *enolpiruvil shiquimato-3-fosfato*
 TCA, *ciclo de los ácidos tricarbóxicos*
 MEL, *melaninas*. En la mayor parte de la tesis usamos el término MEL para hacer referencia a las eumelaninas, que se generan de L-TIR.

b) Enzimas

AroA,
 AroB, *DHQ sintasa*
 AroC, *CHA sintasa*
 AroD,
 AroE, YdiB; *shikimato deshidrogenasa*
 AroF, AroG, AroH; *isoenzimas DAHPS*
 AroG^{fbr}, *variantes de AroG que no son inhibidas por L-FEN*.
 AroK, AroL, *shiquimato quinasa, I y II, respectivamente*
 AroP, *transporte general de AAA*
 AT, *aminotransferasas*
 AspC, *Aspartato aminotransferasa*
 CM, *corismato mutasa*
 CM-PDH, *corismato mutasa-prefenato deshidrogenasa*
 CM-PDT, *corismato mutasa-prefenato deshidratasa*
 DAHPS, *DAHP sintasa*
 MelA, *Tirosinasa*
 PTS, *sistema de fosfotransferasa*
 Pck, *PEP carboxicinas*
 PDH, *prefenato deshidrogenasa de E. coli*
 Ppc, *PEP carboxilasa*
 Pps, *PEP sintasa*
 PykA, PykF, *piruvato cinasa I y II, respectivamente*
 PheA_{CM}, *CM de la CM-PDT*.

Tpl, *L-TIR fenol liasa*
 Tal, *L-TIR amonia liasa*
 TktA, *transcetolasa*
 TyrA_p, *proteína TyrA con especificidad por PPA (prefenato deshidrogenasa)*
 TyrA_c, *proteína TyrA que emplea L-AGN o PPA como sustratos (ciclohexadienil deshidrogenasa).*
 TyrA_a, *proteína TyrA con especificidad por L-AGN (arogenato deshidrogenasa)*
 TyrA_{cZm}, TyrA_c de *Z. mobilis*.
 TyrA_{pHi}, TyrA_p de *H. influenzae*.
 TyrA_{pAa}, TyrA_p de *A. aeolicus*.
 TyrA_{aS}, TyrA_a de *Synechocystis sp.* PCC 6803.
 TyrA_{pSt}, TyrA_p de *S. Termophilus*.
 TyrA^{fbr}, *variantes de la CM-PDH que no son inhibidas por L-TIR.*
 TyrB, *L-TIR aminotransferasa*
 TyrP, *Transporte específico de L-TIR*
 YddG, *Exportador de AAA*

c) Parámetros cinéticos y estequiométricos

q_{L-TIR}, velocidad específica de producción de L-TIR (mg/gDCW/h).
 Y_{L-TIR/glc}, rendimiento mg L-TIR producida a partir 1 g glucosa (mg/g).

Y_{L-TIR/DCW}, rendimiento mg L-TIR producida por un g células en peso seco (mg/DCW)
 q_{MEL}, velocidad específica de producción de L-TIR (mg/gDCW/h).
 q_s, velocidad específica de consumo de glucosa (g/g/h).
 μ, velocidad específica de crecimiento (h⁻¹).
 g DCW, g de células en peso seco.

d) otros

IVM, *Ingeniería de vías metabólicas*
 VSHIK, *vía común de síntesis de compuestos aromáticos o vía del shiquimato*

Enzima^{fbr}, *de las siglas en inglés*
feedback-resistance, *que significa que la*
enzima ya no es inhibida parcial o
totalmente por el producto final de la
vía.

VCA, *vía de síntesis de compuestos*
aromáticos.

Apéndice II: código de una letra para los aminoácidos

Aminoácido	Código de una letra
Alanina	A
Arginina	R
Aparagina	N
Ácido aspártico	D
Cisterna	C
Glutamina	Q
Ácido glutámico	E
Glicina	G
Histidina	H
Isoleucina	I
Lisina	K
Metionina	M
Fenilalanina	F
Prolina	P
Serina	S
Treonina	T
Triptófano	W
Tirosina	Y
Valina	V

Apéndice III: Publicaciones

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*[∇]

María I. Chávez-Béjar,¹ Alvaro R. Lara,^{2†} Hezraí López,¹ Georgina Hernández-Chávez,¹ Alfredo Martínez,¹ Octavio T. Ramírez,² Francisco Bolívar,¹ and Guillermo Gosset^{1*}

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62210, México,¹ and Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62210, México²

Received 31 October 2007/Accepted 8 March 2008

The expression of the feedback inhibition-insensitive enzyme cyclohexadienyl dehydrogenase (TyrC) from *Zymomonas mobilis* and the chorismate mutase domain from native chorismate mutase-prephenate dehydratase (PheA_{CM}) from *Escherichia coli* was compared to the expression of native feedback inhibition-sensitive chorismate mutase-prephenate dehydrogenase (CM-TyrA_p) with regard to the capacity to produce L-tyrosine in *E. coli* strains modified to increase the carbon flow to chorismate. Shake flask experiments showed that TyrC increased the yield of L-tyrosine from glucose ($Y_{L-Tyr/Glc}$) by 6.8-fold compared to the yield obtained with CM-TyrA_p. In bioreactor experiments, a strain expressing both TyrC and PheA_{CM} produced 3 g/liter of L-tyrosine with a $Y_{L-Tyr/Glc}$ of 66 mg/g. These values are 46 and 48% higher than the values for a strain expressing only TyrC. The results show that the feedback inhibition-insensitive enzymes can be employed for strain development as part of a metabolic engineering strategy for L-tyrosine production.

L-Tyrosine (L-Tyr) is an aromatic amino acid with several applications. It is used as precursor in the synthesis of some drugs (39), biodegradable polymers (10), melanin (12), and phenylpropanoids (38). The pathway leading to L-Tyr biosynthesis starts with the condensation of phosphoenolpyruvate (PEP) and erythrose-4-phosphate (E4P) in a reaction catalyzed by 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase (DAHPS). Seven reactions are necessary to produce chorismate (CHA), the common precursor for the synthesis of the three aromatic amino acids (Fig. 1). For L-phenylalanine (L-Phe) and L-Tyr biosynthesis, CHA is converted to prephenate (PPA) in a reaction catalyzed by chorismate mutase (CM). In nature, there are two distinct pathways that synthesize L-Tyr. In enteric bacteria, prephenate dehydrogenase (TyrA_p) catalyzes the conversion of PPA to *p*-hydroxyphenylpyruvate (HPP). L-Tyr is formed by transamination of HPP. In plants, PPA is converted to L-arogenate (L-AGN) by transamination. Conversion of L-AGN into L-Tyr is catalyzed by arogenate dehydrogenase (TyrA_a). *Zymomonas mobilis* and other organisms possess enzymes called cyclohexadienyl dehydrogenases (TyrA_c), which are capable of using either PPA or L-AGN as a substrate for L-Tyr biosynthesis (47). TyrA_a, TyrA_p, and TyrA_c belong to the TyrA protein family, which includes the group

containing all known dehydrogenases involved in L-Tyr biosynthesis, and use NAD⁺ or NADP⁺ or both dinucleotides as cofactors. Members of the TyrA protein family are frequently fused to other catalytic or regulatory domains. Furthermore, compounds like L-Tyr and HPP inhibit the activity of some TyrA proteins (8, 9, 40, 44). In *Escherichia coli*, L-Tyr inhibits the activity of three enzymes: the AroF DAHPS isozyme and 3-dehydroquinate synthase in the common aromatic pathway and the bifunctional enzyme chorismate mutase-prephenate dehydrogenase (CM-TyrA_p), in the L-Tyr biosynthetic pathway (4, 35) (Fig. 1).

The general strategy used for the development of aromatic amino acid-overproducing strains has involved the alleviation of control mechanisms in key pathways (7, 41). Several different microorganisms have been modified for L-Tyr production. *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter globiformis*, and *Brevibacterium lactofermentum* L-Tyr-overproducing strains were developed by classical mutagenesis methods, and they were selected based on their capacity to grow on toxic aromatic amino acid analogs (20, 25, 36). Biochemical analyses of *C. glutamicum* strains showed that enzymes like DAHPS and CM were not inhibited by the aromatic amino acids (Fig. 1), while the TyrA_a of this organism is naturally insensitive to feedback inhibition by L-Tyr (18, 21). The best *C. glutamicum* strain obtained by this procedure produced 26 g/liter of L-Tyr in 80 h in a fed-batch fermentation (24). Metabolic engineering and protein-directed evolution strategies have been used to construct *E. coli* L-Tyr-producing strains (31, 32; A. Takai, R. Nishi, Y. Joe, and H. Ito, U.S. patent application 20050277179). In these studies, feedback inhibition-resistant variants of CM-TyrA_p were obtained by error-prone PCR of

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.), Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62210, México. Phone: 52-777-3291601. Fax: 52-777-3172388. E-mail: gosset@ibt.unam.mx.

† Present address: Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, México City, México.

[∇] Published ahead of print on 14 March 2008.

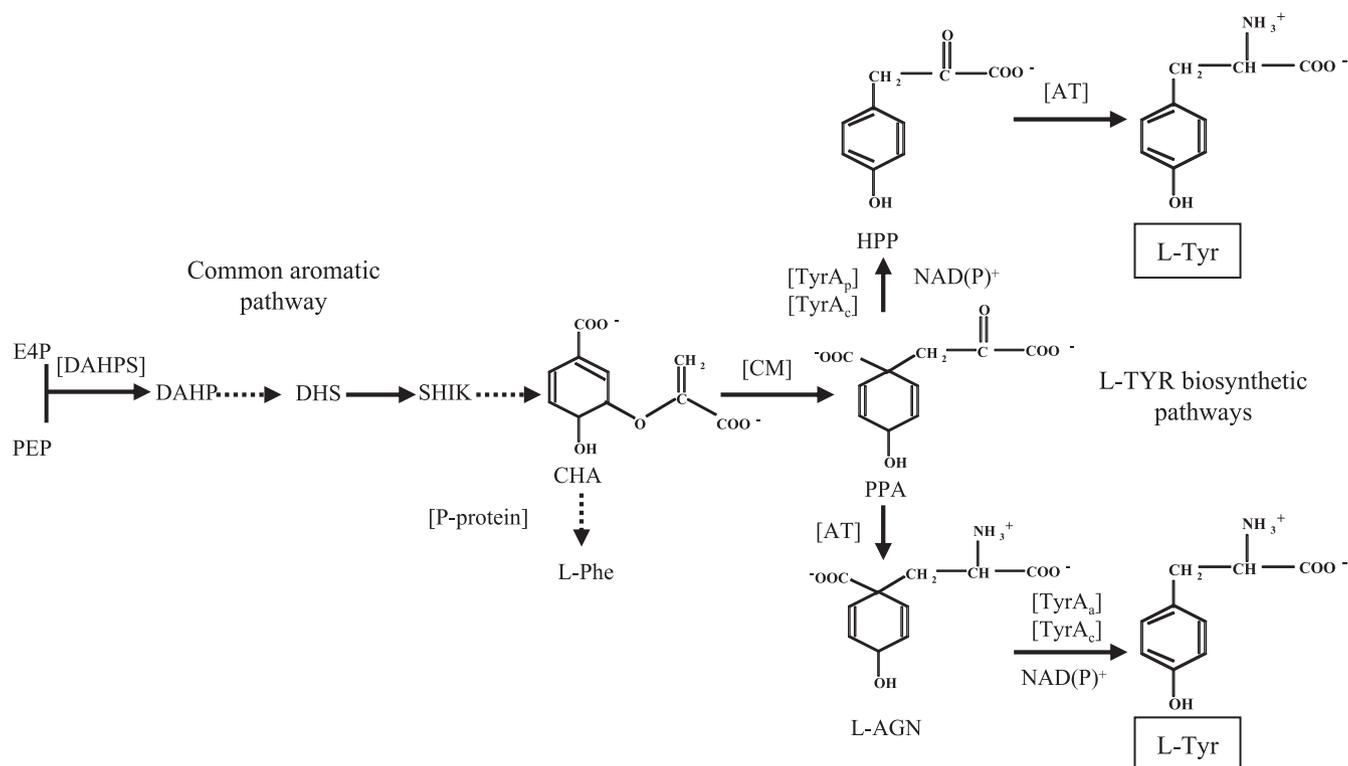


FIG. 1. L-Tyr biosynthetic pathways. The common aromatic pathway begins with the reaction between PEP and E4P, which yields 3-deoxy-D-*arabino*-heptulosonate-7-phosphate (DAHPS). CHA is the branch point of the pathway. PPA is formed from CHA in a reaction catalyzed by CM. L-AGN is produced from PPA by the action of an aminotransferase (AT). L-AGN is the substrate of TyrA_a or TyrA_c, and HPP is transaminated by the aminotransferase. In L-Tyr biosynthetic pathways, 1 mol of NAD⁺ or NADP⁺ is used. The dashed lines indicate two or more reactions.

the encoding gene *tyrA* and were selected using the toxic analog 3-fluoro-DL-tyrosine. Using *E. coli* as a host strain, Takai et al. (U.S. patent application 20050277179) and Lütke-Eversloh and Stephanopoulos (32) constructed *E. coli* L-Tyr producers by overexpression of feedback inhibition-resistant variants of DAHPS and CM-TyrA_p (13, 29, 31, 32; Takai et al., U.S. patent application 20050277179). One of the *E. coli* L-Tyr producers, which had additional central metabolism genetic modifications, produced 9.7 g/liter of L-Tyr, with an L-Tyr yield on glucose ($Y_{L-Tyr/Glc}$) of 0.10 g/g and an L-Tyr-specific production rate (q_{L-Tyr}) of 73 mg/g (dry weight)/h in a fed-batch fermentation (32). Olson et al. (33) employed a different approach for construction of an *E. coli* L-Tyr producer. An L-Phe-producing strain, which was developed by a classical mutagenesis procedure, was converted into an L-Tyr-producing strain by replacing the native promoter of *tyrA* with the *trc* promoter. This strain produced 55 g/liter of L-Tyr, with a $Y_{L-Tyr/Glc}$ of 0.3 g/g and a q_{L-Tyr} of around 57 mg/g (dry weight)/h (33, 34).

The cyclohexadienyl dehydrogenase (TyrC) of *Z. mobilis* is not inhibited by L-Tyr or the other two aromatic amino acids (47). Due to this property, this enzyme was used recently for the development of a tunable selection system for mutant prephenate dehydratases. In this system, TyrC diverted PPA into the L-Tyr pathway to avoid the nonenzymatic conversion of PPA into phenylpyruvate in L-Phe biosynthesis (26). On the other hand, CM-prephenate dehydratase (P-protein) from *E. coli* is involved in L-Phe biosynthesis. When the CM domain

(residues 1 to 109) of the P-protein is expressed alone (PheA_{CM}), it retains catalytic activity and becomes insensitive to L-Phe inhibition (45, 46). In contrast, the CM domain from CM-TyrA_p loses its catalytic activity when it is not fused to the corresponding TyrA_p domain (14).

Considering the information described above, an approach not dependent on random mutagenesis for generating a CHA-to-HPP pathway insensitive to feedback inhibition by L-Tyr was evaluated in this work. The strategy reported here was based on expressing genes encoding enzyme domains expected to be insensitive to feedback inhibition by L-Tyr. The *tyrC* gene from *Z. mobilis*, which codes for TyrC, was expressed in an *E. coli* strain previously modified to increase carbon flow to CHA. In addition, to reconstitute the complete CHA-to-HPP pathway, an operon was constructed with the *tyrC* gene and the region of the *pheA* gene (*pheA*_{CM}) that codes for the PheA_{CM} domain.

Details about the construction of plasmids pTrctyrC, pTrctyrCphea_{CM}, and pTrctyrCphea_{CMINV} are shown in Tables 1 and 2 and Fig. 2. In several experiments, a strain expressing the *tyrA* gene was used as a control. *tyrA* was cloned from *E. coli* JM101 chromosomal DNA (6) into pCR-Blunt II-TOPO to generate plasmid pTOPO*tyrA*. The *tyrA* gene was isolated from this plasmid and cloned into plasmid pTrc99A to construct pTrctyrA. The nucleotide sequences of the three genes were determined from plasmids and were found to be identical to those reported previously (Table 2).

Functional complementation assays were performed with *E.*

TABLE 1. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant features	Reference or source
<i>Z. mobilis</i> ATCC 31821	Wild-type strain	Laboratory stock
<i>E. coli</i> strains		
FA114	FA113 Δ <i>tyrA</i> Δ <i>pheA</i>	5
JM101	<i>supE thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) F'	6
PB12	JM101 Δ (<i>ptsHI crr</i>) Glc ⁺	19
PB12G	PB12 transformed with pJLBaroG ^{fbr}	This study
PB12A	PB12 transformed with pJLBaroG ^{fbr} and pTrctyrA	This study
PB12C	PB12 transformed with pJLBaroG ^{fbr} and pTrctyrC	This study
PB12CP	PB12 transformed with pJLBaroG ^{fbr} and pTrctyrC <i>pheA</i> _{CM}	This study
Plasmids		
pTrc99A	Cloning vector, carries <i>bla</i> and <i>lacI</i> ^a genes and <i>trc</i> promoter	1
pCR-BluntII-TOPO	Cloning vector, carries <i>kan</i> gene	Invitrogen (Carlsbad, CA)
pTOPO <i>tyrA</i>	<i>tyrA</i> gene cloned in pCR-BluntII-TOPO	This study
pTrctyrA	<i>tyrA</i> gene under control of the <i>trc</i> promoter	This study
pTOPO <i>tyrC</i>	<i>tyrC</i> gene cloned in pCR-Blunt II-TOPO	This study
pTrctyrC	<i>tyrC</i> gene under control of the <i>trc</i> promoter	This study
pTrc <i>pheA</i> ^{fbr a}	<i>pheA</i> ^{fbr} gene codes for CM and prephenate dehydratase domains of P protein under control of the <i>trc</i> promoter	3
pTrctyrC <i>pheA</i> _{CM}	<i>tyrC</i> and <i>pheA</i> _{CM} under control of the <i>trc</i> promoter; <i>pheA</i> _{CM} codes for the CM domain of P-protein	This study
pTrctyrC <i>pheA</i> _{CMINV}	Same as pTrctyrC <i>pheA</i> _{CM} but <i>pheA</i> _{CM} is not in the correct orientation for its expression	This study
pJLBaroG ^{fbr}	<i>aroG</i> ^{fbr} under control of the <i>lacUV5</i> promoter; carries <i>lacI</i> ^a and <i>tet</i> genes	3

^a The superscript fbr indicates feedback inhibition resistance.

coli FA114 (Table 1), which lacks CM, Tyr_A_p, and prephenate dehydratase activities. FA114 was transformed with each of the following plasmids: pTrc99A, pTrctyrA, pTrctyrC*pheA*_{CM}, and pTrctyrC*pheA*_{CMINV} (Table 1). Assays were performed at 30°C

TABLE 2. Sequences of the primers used in this study

Primer	Nucleotide sequence ^a
Cloning of <i>tyrA</i>	
tyrA3	5' GGCTTAAGAGGTTTACCATGGTTGCTGAATTG 3'
tyrA5	5' CCCCAAGCTTIGATGAAAAGGTGCGGATGATGTG 3'
Cloning of <i>tyrC</i>	
tyrC5 ^b	5' GCAGGCGCTCTCCATGGCCGTCTTTAAG 3'
tyrC3	5' CCCCAAGCTTIGTTCATGCTGCGATCAATCG 3'
Cloning of <i>pheA</i> _{CM}	
CM5	5' CCCCAAGCTTTCACACAGGAAACAGACCATGG 3'
CM3 ^c	5' CCCCAAGCTTTTATCAGAGAAAAGCGATGCGTGC 3'
Sequencing	
M13 reverse ^d	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'
M13 forward ^d	5' GTAAAACGACGGCCAG 3'
tyrA1500	5' CTGTTTATCAGACCGCTTCTGC 3'
SectyrA5	5' GTGTGCCAATCCACGTTACTG 3'
pTrc2	5' CAGCTTATCATCGACTGCAC 3'

^a In the nucleotide sequences key restriction enzyme sites are underlined.

^b To clone the *tyrC* gene in pTrc99A, the GTG start codon in the wild-type gene was changed to ATG in order to create an NcoI site.

^c Stop codons are indicated by bold type.

^d Obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA).

in liquid M9 minimal medium (37) supplemented with (per liter) 2 g glucose, 20 mg L-Phe, 20 mg L-tryptophan, 20 mg L-leucine, 20 mg L-isoleucine, 10 mg *p*-aminobenzoic acid, 10 mg *p*-hydroxybenzoic acid, 10 mg 2,3-dihydroxybenzoic acid, 200 μ g ampicillin, and 23.83 mg isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Only the cells transformed with plasmid pTrctyrA or pTrctyrC*pheA*_{CM} were able to grow in minimal medium (data not shown). This experiment indicated that the genes were expressed and the enzyme activity levels of TyrC and Phe_{CM} were sufficient to give FA114 the metabolic ability to synthesize L-Tyr.

In order to determine if L-Tyr inhibited TyrC and Phe_{CM} activities, enzymatic assays were performed in the presence or absence of L-Tyr. Strain FA114/pTrctyrC*pheA*_{CM} was grown in LB medium with 23.83 mg/liter of IPTG and 100 mg/liter of carbenicillin. Cultures were started at an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.03 and incubated at 30°C for 12 h. Cells were washed once with lysis buffer (0.1 M Tris, 1 mM sodium EDTA, 1 mM dithiothreitol, 50 mM KCl; pH 7.5) and disrupted by sonication. Phe_{CM} activity was assayed at 30°C by following the consumption of CHA at 290 nm (ϵ_{290} for CHA, $1.85 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). TyrC activity was measured at 30°C by monitoring the appearance of NADH at 340 nm (ϵ_{340} for NADH plus HPP, $6.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The reaction mixtures contained 50 mM Tris, 0.5 mM sodium EDTA, and 0.1 mg/ml bovine serum albumin (pH 7.5) at 30°C. The following concentrations of substrates were used: 2 mM NAD⁺, 0.2 mM PPA (for TyrC activity), and 1 mM CHA (for Phe_{CM} activity) (15, 27). Protein concentrations were determined by the Bradford method (11). One unit of TyrC activity was defined as the amount of enzyme that consumed 1 μ mol of CHA per min at 30°C, and 1 U of Phe_{CM} activity was defined as the amount

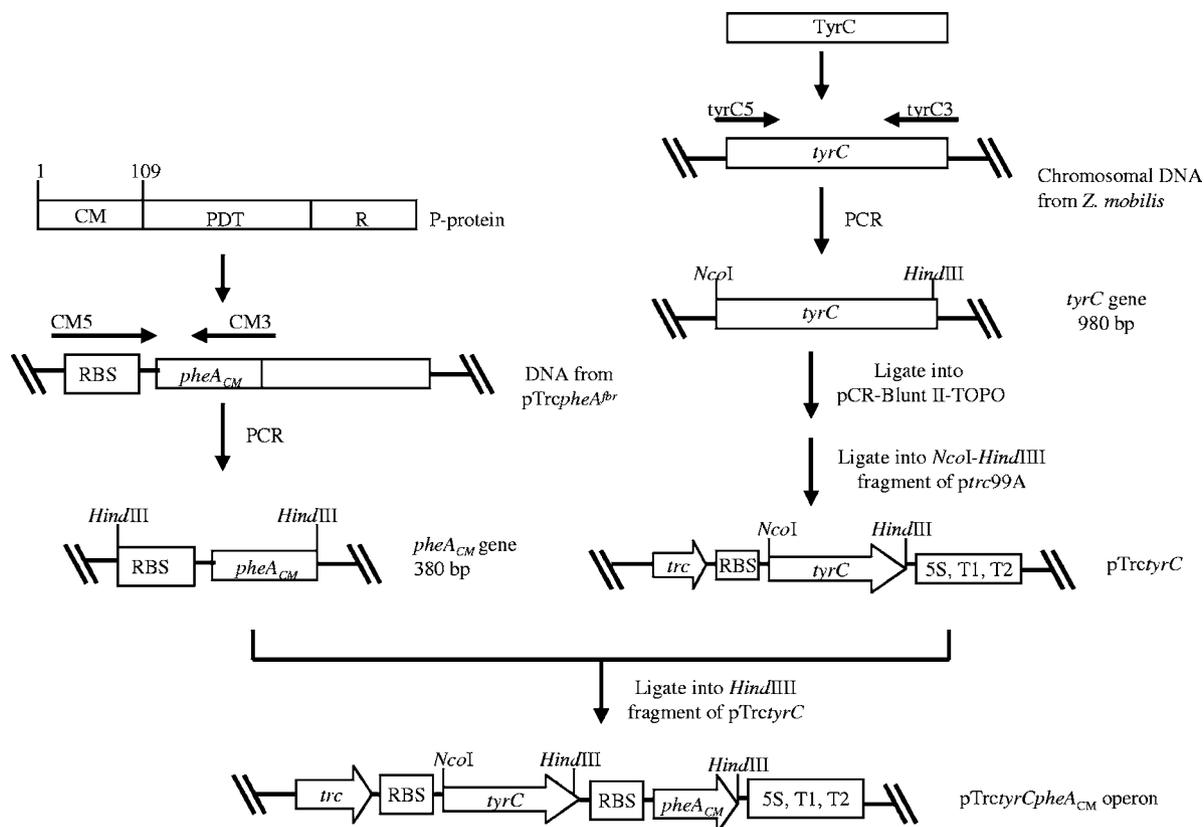


FIG. 2. Construction of plasmids pTrctyrC and pTrctyrCpheA_{CM}. The *tyrC* gene was amplified using PCR from chromosomal DNA of *Z. mobilis* ATCC 3182 and cloned into plasmid pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) to generate plasmid pTOPO_{tyrC}. Then the *tyrC* gene was obtained by digestion of pTOPO_{tyrC} and cloned into pTrc99A (1) to generate plasmid pTrctyrC. To construct the pTrctyrCpheA_{CM} operon, the CM domain from P-protein was amplified by PCR using plasmid pTrcpheA^{fbr} (3) as the template and cloned into pTrctyrC to generate plasmid pTrctyrCpheA_{CM} (Table 2). In plasmid pTrctyrCpheA_{CM}^{INV}, the *pheA_{CM}* gene was inserted in the incorrect orientation for its expression. PDT, prephenate dehydratase domain; R, regulatory domain; RBS, ribosome binding site.

of enzyme that produced 1 μmol of NADH per min at 30°C. TyrC had a specific activity of 1.54 ± 0.08 IU/mg protein, while in the presence of 0.6 mM L-Tyr the specific activity was 1.34 ± 0.47 IU/mg protein. These results show that TyrC is not sensitive to L-Tyr inhibition. This is in agreement with the results obtained by Zhao et al. (47), who determined that 2 mM L-Tyr did not inhibit the activity of TyrC. Previous reports have determined that the activity of PheA_{CM} is not inhibited by L-Phe (46). However, L-Tyr was not assayed as an inhibitor, because it does not inhibit P-protein activity. To determine the possible sensitivity of the PheA_{CM} domain to L-Tyr, assays were carried out as described above. The specific activity of PheA_{CM} was 29.4 ± 5.39 IU/mg protein without L-Tyr. The specific activities with 0.6 and 1.1 mM L-Tyr were 34.4 ± 3.09 and 21.0 ± 0.23 IU/mg protein, respectively. In the case of CM-TyrA_p, it has been reported that at concentrations higher than 0.5 mM, L-Tyr inhibits TyrA_p activity by 90% and CM activity by 45% (23, 43). Our results showed that both TyrC and PheA_{CM} are less sensitive to L-Tyr inhibition than corresponding activities of CM-TyrA_p.

The effect of expressing the *aroG^{fbr}*, *tyrA*, *tyrC*, and *pheA_{CM}* genes on L-Tyr production was evaluated in shake flask cultures. The *aroG^{fbr}* gene codes for a feedback inhibition-resistant DAHPS mutant; its expression causes an increase in the

carbon flux directed into the common aromatic amino acid pathway (3). These experiments were carried out with *E. coli* strain PB12, which lacks the phosphotransferase system operon genes; therefore, it does not use PEP to transport and phosphorylate glucose (19). In this way, PEP availability for aromatic biosynthesis is increased (2). PB12 was transformed with plasmid pJLBaroG^{fbr} to generate strain PB12G. Strain PB12G was then transformed with plasmid pTrctyrA (PB12A), pTrctyrC (PB12C), or pTrctyrCpheA_{CM} (PB12CP) (Table 1). Shake flask cultures were grown at 30°C in M9 liquid medium supplemented with (per liter) 10 g glucose, 23.83 mg IPTG, 30 μg tetracycline, and 100 μg carbenicillin. Growth was monitored by measuring the OD₆₀₀, and the results were converted to dry weight of cells by assuming that 1 OD₆₀₀ unit was equivalent to 0.37 g/liter (22). L-Tyr and L-Phe in culture supernatants were quantified using an Agilent 1100 high-performance liquid chromatography system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped with a Phenomenex Synergy Hydro RP18 column (150 by 4.6 mm; 4 μm) attached to an Agilent 1100 electrospray mass spectrometry detection system. Samples were eluted with 10% methanol in 0.1% acetic acid in water at an isocratic flow rate of 0.5 ml/min. UV quantitation was performed at 220 nm. The mass spectrometry conditions for amino acid determination were as follows: electrospray

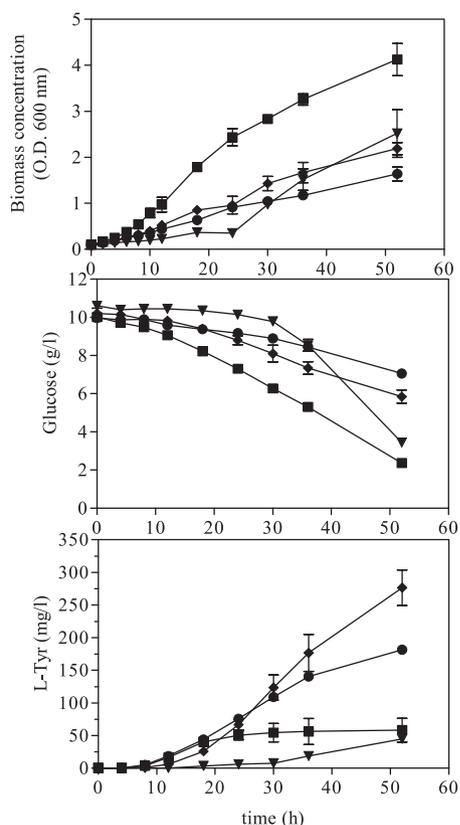


FIG. 3. Results of the shake flask experiments. ▼, PB12G; ■, PB12A; ◆, PB12C; ●, PB12CP.

ionization in the positive mode; fragmentor voltage, 90 V; drying gas temperature, 300°C; drying gas flow rate, 13 liters/min; capillary voltage, 4,000 V; and nebulizer pressure, 30 lb/in². For total scans, (M+1)⁺ ions were detected and identified for standards and also for samples. The *m/z* ratios for L-Phe and L-Tyr are 166 and 182, respectively. The glucose content was determined from culture supernatants using an enzymatic analyzer (2700 biochemistry analyzer; YSI, Yellow Springs, OH).

Compared with PB12G, PB12A had a q_{L-Tyr} and a $Y_{L-Tyr/Glc}$ that were 1.6- and 1.1-fold higher, respectively. On the other hand, the q_{L-Tyr} for PB12C and PB12CP were 6.8- and 5.8-fold higher, respectively, than the values for PB12A (Fig. 3 and Table 3). Compared with PB12A, PB12C and PB12CP had $Y_{L-Tyr/Glc}$ that were 6.6- and 6.4-fold higher, respectively. These results showed that overexpression of wild-type *tyrA* (CM-TyrA_p) resulted in only a small increase in the L-Tyr production capacity in a strain already expressing a feedback inhibition-resistant version of DAHPS. On the other hand, expression of *tyrC* resulted in a significant increase in L-Tyr production, and no further enhancement was observed when both *tyrC* and *pheA*_{CM} were expressed. These results showed that expression of a feedback inhibition-insensitive variant of DAHPS is sufficient to cause *E. coli* to overproduce L-Tyr. This capacity was not increased considerably by overexpression of CM-TyrA_p, most likely because it is subject to feedback inhibition by L-Tyr. This regulatory constraint was overcome in the strains expressing feedback inhibition-insensitive TyrC protein,

resulting in a large increase in L-Tyr production. The observed differences in L-Tyr production between PB12A and PB12C indicated that the conversion of PPA to HPP is a limiting step in the pathway that can be overcome by introducing the activity of a feedback inhibition-insensitive TyrA protein, like TyrC.

To further characterize the best L-Tyr-producing strains, PB12C and PB12CP were grown using media and fermentation conditions similar to those employed for biotechnological processes. Cultures were grown in 1-liter bioreactors (BioFlo 110 modular fermentor system; New Brunswick Scientific, New Jersey). Operation parameters were controlled by the AFS-Biocommand bioprocessing software (New Brunswick Scientific, New Jersey). The culture conditions were as follows: working volume, 0.6 liter; temperature, 37°C; airflow rate, 0.6 liter/min; dissolved oxygen level maintained above 30% air saturation by increasing the stirrer speed (500 to 1200 rpm); and pH controlled at 7.0 by addition of 15% NH₄OH. The culture medium contained (per liter) 50 g glucose, 6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 5 g (NH₄)₂SO₄, 2 g sodium citrate · 2H₂O, 10 g yeast extract, 1.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 550 mg CaCl₂, 40 mg thiamine-HCl, 30 μg tetracycline, 100 μg carbenicillin, and 23.83 mg IPTG. A trace element solution contained (per liter) 8.74 μg Na-EDTA · 2H₂O, 1.55 μg CoCl₂ · 6H₂O, 9.30 μg MnCl₂, 0.93 μg CuCl₂, 1.30 μg Na₂MoO₄ · 2H₂O, 20.96 μg zinc acetate · H₂O, 62.49 μg Fe(III) citrate, and 1.86 μg H₃BO₃. The cell glucose, L-Tyr, and L-Phe contents were determined as described above. Acetic acid, 3-dehydroshikimic acid (DHS), and shikimic acid (SHIK) were quantified as described elsewhere (3). L-Tyr is insoluble in water at concentrations above 0.4 g/liter at neutral pH; for this reason, 1-ml portions of fermentation samples were treated with 50 μl of 6 N HCl, mixed, and incubated 30 min at 42°C, samples were centrifuged at 12,000 rpm to remove the cells (Eppendorf 5410), and supernatants were filtered and diluted for high-performance liquid chromatography analysis.

After 21 and 27 h of incubation, strains PB12C and PB12CP reached final biomass concentrations of 13.9 ± 0.8 and 11.1 ± 2.1 g (dry weight)/liter, respectively. Differences in several parameters related to L-Tyr production were observed between these strains (Table 4). PB12CP, which expresses the *tyrC* and *pheA*_{CM} genes, produced an L-Tyr titer that was 46% higher than that of PB12C. For PB12CP the amount of L-Tyr produced per gram (dry weight) of cells and the $Y_{L-Tyr/Glc}$ were 85 and 48% higher than the values for PB12C, respectively. The $Y_{L-Tyr/Glc}$ for PB12C and PB12CP corresponded to 7.7 and 11.9%, respectively, of the maximum theoretical yield (0.553 g/g) (32). Finally, the q_{L-Tyr} for PB12CP was 36% higher than that for PB12C. Under these culture conditions, strain PB12CP displayed the highest L-Tyr yields and titer. Based on these results, it is clear that a strain expressing both *tyrC* and

TABLE 3. Kinetic and stoichiometric parameters determined in shake flask experiments^a

Strain	$Y_{L-Tyr/Glc}$ (mg/g)	q_{L-Tyr} (mg/g/h)
PB12G	6.3 ± 0.32	0.99 ± 0.24
PB12A	10.0 ± 3.0	1.1 ± 0.22
PB12C	66.6 ± 15.8	7.6 ± 0.55
PB12CP	64.3 ± 6.0	6.4 ± 0.82

^a Parameters were calculated from 0 to 52 h.

TABLE 4. Parameters determined from data generated in bioreactor experiments using strains PB12C and PB12CP

Strain	Specific glucose consumption rate (g/g/h)	Final dry wt of cells (g/liter)	Final L-Tyr titer (g/liter)	$Y_{L-Tyr/Glc}$ (mg/g)	Amt of L-Tyr produced (mg/g [dry wt] of cells)	q_{L-Tyr} (mg/g/h)	Final SHIK titer (g/liter)	Final DHS titer (g/liter)
PB12C	0.17 ± 0.01	13.9 ± 0.8	2.0 ± 0.00	44.6 ± 8.1	153.5 ± 10.7	7.30 ± 0.51	1.2 ± 0.04	1.2 ± 0.01
PB12CP	0.14 ± 0.01	11.1 ± 2.1	3.0 ± 0.29	66.0 ± 0.1	284.0 ± 4.8	9.96 ± 0.29	2.5 ± 1.2	1.7 ± 0.04

pheA_{CM} is a better L-Tyr producer than a strain expressing only *tyrC*. However, considering the results observed in shake flask experiments, the positive effect of expressing both *tyrC* and *pheA_{CM}* appears to be dependent on the culture conditions.

Metabolites of L-Phe and common aromatic pathways were also measured (L-Phe, DHS, and SHIK) (Fig. 1 and Table 4). L-Phe was not detected in culture supernatants from either of the two strains (data not shown). On the other hand, accumulation of DHS and SHIK in the culture medium indicated the presence of rate-limiting steps in the common aromatic pathway (3, 16, 30). This suggests that the TyrC and PheA_{CM} enzymes efficiently compete for carbon with the L-Phe pathway. The amounts of L-Tyr produced by PB12C and PB12CP represent 45 and 42%, respectively, of the sum of the amounts of the measured metabolites (DHS, SHIK, and Tyr). Finally, acetic acid was not detected in culture supernatants. Strains with an inactive phosphotransferase system display very low acetic acid production, even with elevated glucose concentrations (28).

Previous studies of microbial production of L-Tyr employed classical mutagenesis methods for the generation of strains that overproduce this amino acid. More recently, mutagenesis of genes encoding specific enzymes that are feedback inhibited by L-Tyr has proven to be a successful approach for generating production strains. Despite the utility of these approaches, their application involves a requirement to generate and screen a large number of mutants to find strains with an increased capacity to overproduce L-Tyr (or L-Phe) or feedback inhibition-resistant enzymes that retain their catalytic activity. In this work, we took advantage of the natural diversity in the TyrA family of enzymes and designed a rational strategy to overcome feedback inhibition regulation in the L-Tyr pathway in *E. coli*. TyrC from *Z. mobilis* is not inhibited by L-Tyr; thus, by expressing TyrC in *E. coli* it was possible to reduce considerably the negative control that L-Tyr exerts in its terminal pathway. Our results showed that this approach greatly increased carbon flow to the L-Tyr pathway. On the other hand, in enzymatic assays it was found that the PheA_{CM} domain of P-protein was weakly inhibited by L-Tyr. In bioreactor cultures it was determined that expression of this domain increases the L-Tyr production capacity in a strain also expressing TyrC. The strains generated in this study are not final production strains; they can be further improved with additional genetic alterations. If all the metabolic bottlenecks in the common aromatic pathway could be alleviated, it would be possible to increase the amount L-Tyr produced by PB12C and PB12CP twofold. The modifications needed to meet this goal are overexpression of the *aroL* and *ydiB* genes in the common aromatic pathway (30; Takai et al., U.S. patent application 20050277179). In addition, it should be possible to further improve these strains

by expression of the *tktA* gene to increase E4P availability (17) and by inactivation of the transcriptional regulator TyrR (32; Takai et al., U.S. patent application 20050277179). The approach described here is one of the strategies that can be used to eliminate the regulation in the L-Tyr biosynthetic pathway, with the purpose of producing L-Tyr and compounds derived from L-Tyr. Finally, the results obtained in this study show that a metabolic engineering strategy, based on the utilization of natural diversity, is a viable rational alternative to approaches based on random mutagenesis.

This work was supported in part by CONACyT grants D432432 and 44126. María I. Chávez-Béjar was supported by fellowships from CONACyT and DGEP/UNAM.

We thank Roy Jensen for critically reading the manuscript and Joel Osuna from Instituto de Biotecnología/Universidad Nacional Autónoma de México for the gift of *E. coli* FA114. We thank Mercedes Enzaldo and Shirley Ainsworth for technical assistance.

REFERENCES

- Amann, E., B. Ochs, and K. J. Abel. 1988. Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69:301–315.
- Báez, J. L., F. Bolívar, and G. Gosset. 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.
- Báez-Viveros, J. L., J. Osuna, G. Hernández-Chávez, X. Soberón, F. Bolívar, and G. Gosset. 2004. Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 87:516–524.
- Barker, J. L., and J. W. Frost. 2001. Microbial synthesis of p-hydroxybenzoic acid from glucose. *Biotechnol. Bioeng.* 76:376–390.
- Bessette, P. H., F. Aslund, J. Beckwith, and G. Georgiou. 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13703–13708.
- Bolívar, F., R. L. Rodríguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, and H. W. Boyer. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2:95–113.
- Bongaerts, J., M. Kramer, U. Muller, L. Raeven, and M. Wubbolts. 2001. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metab. Eng.* 3:289–300.
- Bonner, C. A., T. Disz, K. Hwang, J. Song, V. Vonstein, R. Overbeek, and R. A. Jensen. 2008. Cohesion group approach for evolutionary analysis of TyrA, a protein family with wide-ranging substrate specificities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72:1–42.
- Bonner, C. A., R. A. Jensen, J. E. Gander, and N. O. Keyhani. 2004. A core catalytic domain of the TyrA protein family: arogenate dehydrogenase from *Synechocystis*. *Biochem. J.* 382:279–291.
- Bourke, S. L., and J. Kohn. 2003. Polymers derived from the amino acid L-tyrosine: polycarbonates, polyarilates and copolymers with poly(ethylene glycol). *Adv. Drug Delivery Rev.* 55:447–466.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Cabrera-Valladares, N., A. Martínez, S. Piñero, V. H. Lagunas-Muñoz, R. Tinoco, R. de Anda, R. Vázquez-Duhalt, F. Bolívar, and G. Gosset. 2006. Expression of the *melA* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase. *Enzyme Microb. Technol.* 38:772–779.
- Chávez-Béjar, M. I., G. Gosset, A. Martínez, and F. Bolívar. 2008. Microbial production of L-tyrosine and derived compounds: a review. *In* F. Columbus

- (ed.), Biotechnology and bioengineering trends, in press. Nova Science Publishers, New York, NY.
14. **Chen, S., S. Vincent, D. B. Wilson, and B. Ganem.** 2003. Mapping of chorismate mutase and prephenate dehydrogenase domains in the *Escherichia coli* T-protein. *Eur. J. Biochem.* **270**:757–763.
 15. **Davidson, B. E., and G. S. Hudson.** 1987. Chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **142**:440–450.
 16. **Dell, K. A., and J. W. Frost.** 1993. Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: rate-limiting enzymes in the cimmon pathway of aromatic amino acid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **115**:11581–11589.
 17. **Draths, K. M., D. L. Pompliano, D. L. Conley, J. W. Frost, A. Berry, G. L. Disbrow, R. J. Staversky, and J. C. Lievense.** 1992. Biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: the role of transketolase. *J. Am. Chem. Soc.* **114**:620–623.
 18. **Fazel, A. M., and R. A. Jensen.** 1979. Obligatory biosynthesis of L-tyrosine via the pretyrosine branchlet in coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* **138**:805–815.
 19. **Flores, N., J. Xiao, A. Berry, F. Bolívar, and F. Valle.** 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **14**:620–623.
 20. **Hagino, H., and K. Nakayama.** 1973. L-Tyrosine production by analog-resistant mutants derived from a phenylalanine auxotroph of *Corynebacterium glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.* **39**:2013–2023.
 21. **Hagino, H., and K. Nakayama.** 1975. The biosynthetic control in aromatic amino acid producing mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.* **39**:351–361.
 22. **Hernández-Montalvo, V., F. Valle, F. Bolívar, and G. Gosset.** 2001. Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**:186–191.
 23. **Hudson, G. S., G. J. Howlett, and B. E. Davidson.** 1983. The binding of tyrosine and NAD⁺ to chorismate mutase/prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli* K12 and the effects of these ligands on the activity and self-association of the enzyme. Analysis in terms of a model. *J. Biol. Chem.* **258**:3114–3120.
 24. **Ikedo, M., and R. Katsumata.** 1992. Metabolic engineering to produce tyrosine or phenylalanine in a tryptophan-producing *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:781–785.
 25. **Ito, H., S. Sakurai, and T. Tanaka.** 1990. Genetic breeding of L-tyrosine producer *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* **54**:699–705.
 26. **Kleeb, A. C., M. H. Edalat, M. Gamper, J. Haugstetter, L. Giger, M. Neuenchwander, P. Kast, and D. Hilvert.** 2007. Metabolic engineering of a genetic selection system with tunable stringency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:13907–13912.
 27. **Koch, G. L., D. C. Shaw, and F. Gibson.** 1971. The purification and characterization of chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli* K12. *Biochim. Biophys. Acta* **229**:795–804.
 28. **Lara, A. R., L. Caspeta, G. Gosset, F. Bolívar, and O. T. Ramírez.** 2008. Utility of an *Escherichia coli* strain engineered in the substrate uptake system for improved culture performance at high glucose and cell concentrations: an alternative to fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **99**:893–901.
 29. **Lütke-Eversloh, T., C. N. Santos, and G. Stephanopoulos.** 2007. Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**:751–762.
 30. **Lütke-Eversloh, T., and G. Stephanopoulos.** 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.
 31. **Lütke-Eversloh, T., and G. Stephanopoulos.** 2005. Feedback inhibition of chorismate mutase/prephenate dehydrogenase (TyrA) of *Escherichia coli*: generation and characterization of tyrosine-insensitive mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7224–7228.
 32. **Lütke-Eversloh, T., and G. Stephanopoulos.** 2007. L-Tyrosine production by deregulated strains of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**:103–110.
 33. **Olson, M. M., L. J. Templeton, W. Suh, P. Youderian, F. S. Sariaslani, A. A. Gatenby, and T. K. Van Dyk.** 2007. Production of tyrosine from sucrose or glucose achieved by rapid genetic changes to phenylalanine-producing *Escherichia coli* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**:1031–1040.
 34. **Patnaik, R., R. R. Zolandz, D. A. Green, and D. F. Kraynie.** 2008. L-Tyrosine production by recombinant *Escherichia coli*: fermentation optimization and recovery. *Biotechnol. Bioeng.* **99**:741–752.
 35. **Pittard, A.** 1987. Biosynthesis of aromatic amino acids, vol. 1. ASM, Washington, DC.
 36. **Roy, A., S. K. Murkhopadhyay, and S. P. Chatterjee.** 1997. Production of tyrosine by auxotrophic analogue resistant mutants of *Arthrobacter globiformis*. *J. Sci. Ind. Res.* **56**:727–733.
 37. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 38. **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.
 39. **Seetharam, G., and B. Saville.** 2002. L-DOPA production from tyrosinase immobilized in zeolite. *Enzyme Microb. Technol.* **31**:747–753.
 40. **Song, J., C. A. Bonner, M. Wolinsky, and R. A. Jensen.** 2005. The TyrA family of aromatic-pathway dehydrogenases in phylogenetic context. *BMC Biol.* **3**:13.
 41. **Sprenger, G.** 2006. Aromatic amino acids, p. 94–127. In V. F. Wendisch (ed.), *Microbiology monograph*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
 42. Reference deleted.
 43. **Turnbull, J., and J. F. Morrison.** 1990. Chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli*. 2. Evidence for two different active sites. *Biochemistry* **29**:10255–10261.
 44. **Xie, G., C. A. Bonner, and R. A. Jensen.** 2000. Cyclohexadienyl dehydrogenase from *Pseudomonas stutzeri* exemplifies a widespread type of tyrosine-pathway dehydrogenase in the TyrA protein family. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **125**:65–83.
 45. **Zhang, S., G. Pohnert, P. Kongsaree, D. B. Wilson, J. Clardy, and B. Ganem.** 1998. Chorismate mutase-prephenate dehydratase from *Escherichia coli*. Study of catalytic and regulatory domains using genetically engineered proteins. *J. Biol. Chem.* **273**:6248–6253.
 46. **Zhang, S., D. B. Wilson, and B. Ganem.** 2003. An engineered chorismate mutase with allosteric regulation. *Bioorg. Med. Chem.* **11**:3109–3114.
 47. **Zhao, G., T. Xia, L. O. Ingram, and R. A. Jensen.** 1993. An allosterically insensitive class of cyclohexadienyl dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Biochem.* **212**:157–165.