



## Ingeniería de vías metabólicas para la sobreproducción de L-tirosina en *Escherichia coli*.

María Inés Chávez, Hezraí López, Alfredo Martínez, Francisco Bolívar y Guillermo Gosset\*  
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM. Apdo. Postal 510-3,  
Cuernavaca, Morelos, CP 62210, México. Tel 3291601. \*[gosset@ibt.unam.mx](mailto:gosset@ibt.unam.mx).

*Palabras clave:* L-tirosina, ciclohexadienil deshidrogenasa, ingeniería de vías metabólicas.

**Introducción.** En la naturaleza existen dos rutas básicas para la biosíntesis de L-tirosina (L-TIR). En estas vías están involucradas un grupo de deshidrogenasas que forman parte de la familia de proteínas TyrA. La ciclohexadienil deshidrogenasa (TyrA<sub>C</sub>) de *Zymomonas mobilis* (*Z. mobilis*), es una proteína de esta familia que puede emplear como sustratos prefenato, arogenato y NAD<sup>+</sup>. Además, esta enzima no es inhibida por L-TIR (1).

Las modificaciones iniciales en la construcción de una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) para sobreproducir L-TIR son eliminar el control que ejerce este aminoácido sobre las enzimas 3-deoxy-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintasa (DAHPS) de la vía del siquimato, y la corismato mutasa-prefenato deshidrogenasa (TyrA<sub>P</sub>) de la vía terminal de síntesis de L-TIR. Mediante la actividad de TyrA<sub>C</sub> de *Z. mobilis* (TyrA<sub>CZm</sub>) sería posible eliminar la regulación en la vía terminal de síntesis ya que no es inhibida por L-TIR. El uso de esta enzima tiene la ventaja que, a diferencia de las enzimas obtenidas por mutagénesis, TyrA<sub>CZm</sub> ya fue seleccionada por la naturaleza para ser una enzima activa y eficiente en la producción de L-TIR en su organismo de origen. Posiblemente, si se sobreexpresa solo el gen *tyrC*, la reacción en la que se sintetiza prefenato a partir de corismato, catalizada por la corismato mutasa (CM), sería limitante. Por esta razón se utilizó una estrategia que consistió en construir un operón con el gen *tyrC*, que codifica para TyrA<sub>CZm</sub>, y con un fragmento del gen *pheA* que codifica para el dominio CM de la enzima corismato mutasa-prefenato deshidratasa (CM-PDT), evaluándose el efecto de la sobreexpresión de ambos genes sobre la capacidad de sobreproducir L-TIR en *E. coli*.

**Metodología.** La construcción de los plásmidos se realizó empleando técnicas estándares de biología molecular. Los ensayos de complementación se realizaron en medio mínimo M9 con 2 g/L glucosa, enriquecido con fenilalanina, triptofano y vitaminas aromáticas. Los ensayos de actividad enzimática se realizaron en extractos crudos añadiendo 1mM de corismato, y 2mM de NAD<sup>+</sup>. Se midió la aparición de NADH a 340nm. Se cuantificó proteína por el método de Bradford. La producción de L-TIR fue evaluada en cultivos en matraz en M9 con 10 g/L de glucosa. Se determinó crecimiento midiendo absorbancia a 600 nm. La L-TIR fue cuantificada por HPLC y la glucosa mediante un método enzimático.

**Resultados y discusión.** El gen *tyrC* fue amplificado por PCR a partir de DNA cromosomal de *Z. mobilis* y clonado para dar origen al plásmido *ptrctyrC*. Para construir el operón *ptrctyrCpheA<sub>CM</sub>*, se amplificó por PCR el fragmento del gen *pheA* que codifica para los aminoácidos 1 al 109 del dominio CM de la enzima bifuncional CM-PDT (*pheA<sub>CM</sub>*) y se clonó en

el plásmido *ptrctyrC*. El plásmido *ptrctyrCpheA<sub>INV</sub>* es una versión del operón donde *pheA<sub>CM</sub>* se clonó con la orientación incorrecta para su expresión. En todos los experimentos se empleó como control la enzima TyrA<sub>P</sub> de *E. coli* (TyrA<sub>PEC</sub>), codificada por el gen *tyrA<sup>WT</sup>*, el cual fue amplificado a partir de DNA cromosomal de *E. coli* JM101 y clonado para originar el plásmido *ptrctyrA<sup>WT</sup>*. Se realizaron ensayos de complementación en la cepa de *E. coli* FA114, que tiene el genotipo *tyrA<sup>-</sup> pheA<sup>-</sup>*, empleando como control la cepa transformada con los plásmidos *ptrc99A*, *ptrctyrA<sup>WT</sup>* y *ptrctyrCpheA<sub>INV</sub>*. Solamente la cepa FA114 transformada con *ptrctyrA<sup>WT</sup>* y *ptrctyrCpheA<sub>CM</sub>* recuperó la capacidad de crecer, demostrando mediante estos experimentos que los genes que forman parte del operón se expresaban adecuadamente y que confieren a FA114 la capacidad metabólica para sintetizar su propia L-TIR. Para evaluar si la expresión del operón tiene un efecto positivo sobre la producción de L-TIR, se realizaron cultivos en la cepa de *E. coli* PB12, la cual fue transformada con los plásmidos *pJLBaroG<sup>fb</sup>* y *ptrctyrCpheA<sub>CM</sub>*. Empleando como control la cepa PB12 que expresaba simultáneamente los genes *aroG<sup>fb</sup>* y *tyrA<sup>WT</sup>*. Cabe señalar que el gen *aroG<sup>fb</sup>* codifica para una DAHPS insensible a inhibición por fenilalanina, y la cepa PB12 tiene el fenotipo PTS<sup>-</sup> glucosa<sup>+</sup>, modificación que le permite sobreproducir aromáticos. La cepa transformada con el operón produjo L-TIR con una velocidad de 19 mg L-TYR.g cél<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> que es 270% superior a la cepa transformada con el gen *tyrA<sup>WT</sup>*, con un rendimiento a partir de glucosa de 65 mg de L-TIR/g glucosa que es 330% superior a la cepa transformada con *tyrA<sup>WT</sup>*, lo cual representa el 11% del rendimiento máximo teórico de producción de L-TIR a partir de glucosa. Se determinó la actividad enzimática total tanto de las proteínas expresadas en el operón como de TyrA<sub>PEC</sub> en extractos crudos de la cepa FA114. La actividad específica de TyrA<sub>PEC</sub> es 17 veces superior a la de las enzimas del operón, sin embargo debido a que está reportado que ambas proteínas del operón no son inhibidas por L-TYR, los datos sugieren que el nivel de actividad detectado para las enzimas del operón es suficiente para sobreproducir el aminoácido. Actualmente se están determinando los niveles de actividad enzimática en presencia de L-TYR y se realizan experimentos en fermentador para evaluar la producción de L-TYR en condiciones más cercanas a las empleadas en la industria.

**Conclusión.** Los resultados obtenidos indican que la expresión de TyrA<sub>C</sub> de *Z. mobilis* es una estrategia efectiva en la producción de L-TIR en *E. coli*.

**Agradecimientos.** Dr. Joel Osuna por proporcionarnos la cepa FA114. Becas de CONACyT y DGEP/UNAM a MIC.

**Bibliografía.** 1. Zhao, G., et al. 1993. Eur. J. Biochem. (212): 157-165.