

# ESTUDIO PARAMETRICO PARA LA PRODUCCIÓN DE MELANINA EN *Escherichia coli* RECOMBINANTE

Victor H. Lagunas, Natividad Cabrera, Francisco Bolívar, Guillermo Gosset y Alfredo Martínez. Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca Mor., México. cp. 62210, Fax: (777) 3172388 correo electrónico: vlagunas@ibt.unam.mx.

Palabras clave: *Escherichia coli*, melanina, tirosinasa.

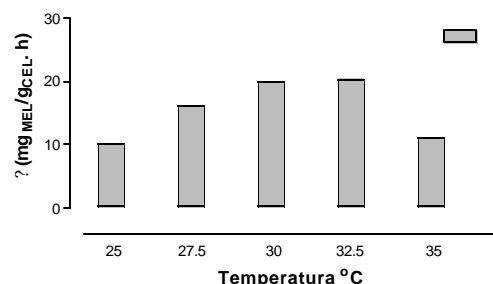
**Introducción.** Las melaninas son heteropolímeros polifenólicos de colores claros, por ejemplo amarillo a rojo, (pheomelaninas) y colores oscuros, por ejemplo café a negro (eumelaninas) (1). Las melaninas absorben luz UV, actúan como intercambiadores catiónicos, semiconductores amorfos, biopolímeros de unión a drogas, protectores de rayos X y gama, además proporcionan actividad antioxidante y antiviral (2). La enzima clave en la síntesis de melanina es la tirosinasa (monofenol oxigenasa), que contiene como cofactor cobre y cataliza la conversión de L-tirosina a dopacromo vía L-DOPA (2), el cual se polimeriza a melanina mediante una serie de reacciones espontáneas. En nuestro laboratorio se transformó la cepa de *E. coli* W3110 con el plásmido pTrcmelA, el cual lleva clonado el gen *melA* que codifica para la tirosinasa de *Rizobium etli* C3.

El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo un estudio de parámetros de cultivo para caracterizar, en fermentador de laboratorio, parámetros cinéticos de crecimiento de *E.coli/pTrcmelA* y de producción de melanina a partir de tirosina.

**Metodología.** Los cultivos se realizaron en medio mínimo (M9) con 2g/l de glucosa y 0.4g/l de L-tirosina en fermentadores con 750 ml de medio, aireación de 0.25 vvm y 600 rpm. Los parámetros y niveles que se estudiaron fueron: a) concentración de cofactor ( $\text{CuSO}_4$ ; 20, 40, 80 y 400  $\mu\text{g/ml}$ ); b) concentración del marcador de resistencia del plásmido (ampicilina; 100 y 200  $\mu\text{g/ml}$ ); c) concentración de inductor (IPTG; 0.01, 0.1 y 1mM); d) temperatura (35, 32.5, 30, 27.5 y 25°C) y e) pH durante la etapa de producción de melanina (5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 y 8.5). La melanina obtenida se caracterizó y cuantificó por espectrofotometría.

**Resultados y discusión.** El espectro de absorción de 200 a 800 nm para la melanina obtenida (color negro) fue similar al de grado reactivo, con coeficiente de extinción de 14.8 y 13.8  $\text{cm}^{-1} (\text{g/l})^{-1}$  a 400 nm, respectivamente. En todas las condiciones evaluadas la melanina se produjo únicamente durante la fase estacionaria y para evaluar los parámetros estudiados se compararon en función de la velocidad específica de formación de producto durante dicha etapa (?). En las concentraciones de ampicilina evaluadas no se observó ningún efecto en ?. En concentraciones de 20 y 40  $\mu\text{g/ml}$  del cofactor, ? fue mayor que a 80  $\mu\text{g/ml}$  y a 400  $\mu\text{g/ml}$  las células se lisan. Concentraciones del inductor por debajo de 0.1 mM ocasionan decrementos drásticos en ?, reduciéndose hasta un 98% para 0.01 mM. La temperatura afecta drásticamente a ? (grafica 1), siendo entre 30 y 32.5°C

la óptima, además a estas temperaturas se alcanza la conversión total de L-tirosina en melanina.



Grafica 1. Velocidad específica de formación de melanina no asociada a crecimiento (?) en *E. coli*W3110/pTrcmelA con ampicilina 200 ?g/ml,  $\text{CuSO}_4$  40 ?g/ml, 0.1 mM de IPTG y pH 7 a diferentes temperaturas.

El cambio de pH en la fase estacionaria afectó drásticamente  $\beta$ , incrementándose al doble (40  $\text{mg MEL/g CEL.h}$ ) a pHs de 7.5-8 respecto a pH 7. Además el tiempo de cultivo se redujo de 70 h para pH 7 a tan solo 30 h para pH 7.5-8 (Fig1).

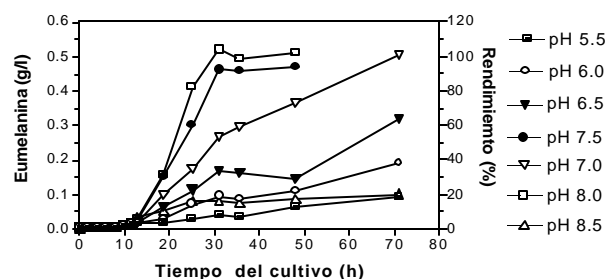


Fig. 1 Efecto del cambio de pH en la fase estacionaria

**Conclusiones.** La melanina producida es una eumelanina. La producción de melanina en *E. coli* W3110/pTrcmelA no esta asociada a crecimiento. Las condiciones favorables para producir melanina son: ampicilina 100-200  $\mu\text{g/ml}$ ,  $\text{CuSO}_4$  20-40  $\mu\text{g/ml}$ , IPTG 0.1mM, temperatura 30°C, pH de crecimiento 7 y cambiar pH a 7.5-8 al llegar a la fase estacionaria. Con estas condiciones el rendimiento de conversión de L-tirosina en melanina fue de 100% respecto al teórico.

**Agradecimiento.** Se agradece el apoyo financiero otorgado por el proyecto CONACYT NC-230.

## Bibliografía.

1. Gilson L.F., George A.M. (1998). Melanin and novel precursors from *Aeromonas media*. *FEMS microbiol Lett.* 169: 261-268.
2. Wang G., Aazaz A., Peng Z., Shen P. (2000). Cloning and overexpression of a tyrosinase gene *mel* from *Pseudomonas maltophilia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 185: 23-27

