

**EXPRESIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA  
TIROSINA DESCARBOXILASA (TYDC) EN *E. coli* BL21 (DE3) PARA LA  
BIOSÍNTESIS DE P-TIRAMINA A PARTIR DE L-TIROSINA**

KEVIN STIVEN CUERO MONTALVO

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

QUÍMICA CON ÉNFASIS EN BIOQUÍMICA

Santiago de Cali

2022

**EXPRESIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA  
TIROSINA DESCARBOXILASA (TYDC) EN *E. coli* BL21 (DE3) PARA LA  
BIOSÍNTESIS DE P-TIRAMINA A PARTIR DE L-TIROSINA**

KEVIN STIVEN CUERO MONTALVO

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE  
QUÍMICO

Paola Andrea Caicedo Burbano, PhD. Tutora

Álvaro Andrés Barrera Ocampo, PhD. Tutor

Santiago de Cali

2022



**CARTA DE AVAL PARA PDG II**

*Paola Andrea Caicedo Burbano*

---

Paola Andrea Caicedo Burbano, PhD.

Tutora del Proyecto

*Álvaro Andrés Barrera Ocampo*

---

Álvaro Andrés Barrera Ocampo, PhD.

Tutor del Proyecto

*Kevin Stiven Cuero Montalvo*

---

Kevin Stiven Cuero Montalvo

Estudiante

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mi familia (madre, padre y hermano) por apoyarme incondicionalmente durante mi proceso de formación como químico, han sido mi motor impulsor cada vez que creí no lograrlo. A mis tutores: la Dra. Paola Caicedo y el Dr. Álvaro Barrera por sus indicaciones, compromiso, enseñanzas y por brindarme la oportunidad de hacer parte de este proyecto. A Maru, Ana y Steven por sus enseñanzas, entrenamiento, consejos e incondicionalidad para conmigo. Por último y no menos importante al “Team Biofábricas”: Mateo, María I y Majo por hacer parte directa e indirecta de este proceso, de ellos me llevo los más gratos recuerdos, infinitas gracias por su apoyo constante en el laboratorio y durante mi carrera.

## CONTENIDO

1.	RESUMEN .....	6
2.	INTRODUCCIÓN.....	7
3.	METODOLOGÍA.....	15
3.1.	Competencia de células bacterianas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	16
3.2.	Transformación genética de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	16
3.2.1.	Identificación del gen <i>tdcA</i> por PCR y Secuenciación Automatizada de Sanger 17	
3.3.	Expresión genética de TyDC en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) .....	18
3.3.1.	Determinación de los parámetros de expresión genética de TyDCr.....	18
3.4.	Determinación de la actividad enzimática de TyDCr en los extractos bacterianos .	20
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	21
4.1.	Competencia y Transformación genética de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	21
4.2.	Expresión Genética de TyDCr en <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	24
4.3.	Determinación de los parámetros cinéticos de TyDCr.....	30
5.	CONCLUSIONES .....	38
6.	RECOMENDACIONES .....	39
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39
8.	ANEXOS .....	43

## **LISTADO DE ABREVIACIONES**

**TyDC:** Tirosina Descarboxilasa

**TyDCr:** Tirosina Descarboxilasa recombinante

**EA:** Enfermedad de Alzheimer

**AChE:** Acetilcolinesterasa

**IP TG:** isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

**M:** Medio de cultivo

**ETP:** Extracto Total de Proteína

**LC:** Lisado Clarificado

**CI:** Cuerpos de Inclusión

**T1:** Tratamiento 1

**T2:** Tratamiento 2

**SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Gel de Electroforesis de Dodecil Sulfato de Poliacrilamida)

**PLP:** Piridoxal – 5'- fostato

**HPLC-DAD:** Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada Arreglo de Diodos.

**L-Tyr:** L-Tirosina

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers, termoperfil para la PCR y condiciones electroforéticas para la identificación del transgén. ....	17
Tabla 2. Parámetros y tratamientos para determinar la concentración, temperatura y tiempo de expresión de TyDCr. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla 3. Parámetros cromatográficos empleados en la determinación de la actividad biológica de TyDCr.....	20
Tabla 4. Cuantificación del ADN plasmídico (pM20-tdcA) obtenidos en el fluorímetro.....	23
Tabla 5. Resultados obtenidos en la curva de calibración del estándar de BSA para la cuantificación proteica mediante el ensayo de Bradford. ....	26
Tabla 6. Resultados de la cuantificación por el método de Bradford del ensayo final de expresión genética.....	29
Tabla 7. Datos de área bajo el pico cromatográfico de cada nivel de calibración y de las muestras de actividad enzimática a diferentes tiempos de actividad enzimática.....	31
Tabla 8. Resultados obtenidos en la cuantificación de consumo de sustrato en la actividad biológica de TyDCr.....	33
Tabla 9. Datos obtenidos en la determinación experimental de los parámetros cinéticos de TyDCr en el extracto bacteriano .....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas de algunos de los alcaloides de la Familia de las Amarilidáceas. Tomado de Takos A., Rook F. <sup>9</sup> .....	9
Figura 2. Estructura química de la licorina, donde R=OH es la molécula mencionada. <sup>10</sup> ...	10
Figura 3. Modificada de Georgiev, <i>et. al.</i> , donde se esquematiza la ruta propuesta de biosíntesis de la licorina y otros alcaloides en la que se aprecia algunas enzimas involucradas en este proceso bioquímico. <sup>1</sup> .....	11
Figura 4. Obtención de la Tiramina a partir de la L-Tirosina catalizada por la Tirosina Descarboxilasa (TyDC), tomado de Zhang K., y Ni Y. <sup>12</sup> .....	12
Figura 5. Estructura molecular de la enzima, donde se aprecia el dominio de unión al PLP, los extremos terminales de este y el cambio conformacional de la enzima por la unión de la coenzima mencionada. Tomado de Zhu H, <i>et.al.</i> <sup>17</sup> .....	13
Figura 6. Estructuras químicas de derivados de la p-tiramina de interés bioquímico. A) Benzafibrato, B) octopamina, C) dopamina, D) sinefrina y E) norcaugsodina. Imagen de autoría propia. ....	14
Figura 7. Resultados obtenidos en la transformación genética de <i>E. coli</i> BL321 (DE3). A) Mapa genético del clúster que contiene el gen “tdcA” que codifica para TyDC. B) Colonias bacterianas BL21 (DE3) de <i>E. coli</i> obtenidas en la transformación genética por choque térmico, a) bacterias en Ampicilina y Kanamicina, b), c) y d) bacterias transformadas en Ampicilina, Kanamicina y sin antibiótico respectivamente, e) bacterias competentes en los antibióticos en cuestión y f) control de esterilidad. C) Geles de electroforesis correspondientes a la temperatura de alineamiento de los primers a) 1 b) 1A c) 2 y d) 3. Códigos de los pozos: 1: (-); 2: 67 °C; 3: 66.2 °C; 4: 64.7 °C; 5: 62.5 °C; 6: 59.8 °C; 7: 57.8 °C, 8: 56.1 °C; 9: 55 °C, M: marcador de peso molecular. D) Alineamiento genómico realizado con el programa “Water-Emboss” donde se contrasta el gen del plásmido con la secuencia obtenida. E) y F) Secuencia obtenida para TYDC amplificada con el primer R1, correspondiente a 390 pb y B) resultado de la secuenciación con el primer F1.....	22
Figura 8. Geles de SDS-PAGE producto de la expresión genética de TyDCr en <i>E. coli</i> (DE3) a diferentes concentraciones de IPTG durante 6h a 37°C. A) CI, B) LC, C) M y D) ETP. Se	

esquematiza la zona cercana a 70 kDa (peso molecular de la enzima) y los porcentajes de banda obtenidos por densitometría.....	25
Figura 9. Curva de calibración obtenida para la cuantificación por el método de Bradford empleando como estándar Albúmina de Suero bovino (BSA) y el promedio de las absorbancias a 595 nm de las réplicas realizadas.....	26
Figura 10. Geles de SDS-PAGE producto de la expresión genética de TyDCr en <i>E. coli</i> (DE3) a diferentes tiempos, 37°C y 0.3 mM IPTG. A) CI, B) LC, C) ETP y D) ensayo a 21 h. Se esquematiza la zona cercana a 70 kDa (peso molecular de la enzima) y los porcentajes de banda obtenidos por densitometría.....	27
Figura 11. Geles de SDS-PAGE producto de la expresión genética de TyDCr en <i>E. coli</i> (DE3) a diferentes temperaturas, 0.3 mM IPTG a 6h. A) ETP, B) CI, C) LC y D) ensayo final de expresión genética (6h, 0.3 mM IPTG, 14°C). Se esquematiza la zona cercana a 70 kDa (peso molecular de la enzima).....	28
Figura 12. A) Curva de calibración donde se muestra la concentración de sustrato (mM) con respecto al área de pico cromatográfico. Se exhibe el coeficiente de correlación obtenido en este proceso analítico. B) Cromatograma de la curva de calibración. C) Cromatograma de la evaluación biológica de la enzima a tres tiempos de actividad (0h en verde, 1h en rojo, 3h en azul) en contraste con el estándar de sustrato (rojo vivo). D) Control negativo, donde se emplea bacteria sin plásmido y sometida a un tiempo 1h de actividad enzimática.....	32
Figura 13. A) Espectro de absorción de L-Tirosina (1.0 mM) en metanol donde se aprecia una absorción máxima de 224 nm. B) Cinética enzimática de TyDCr en extractos bacterianos donde se grafica la velocidad inicial en función de la concentración de sustrato. C) Linealización de “Weaver-Burk” asociada a la cinética de la enzima en cuestión.....	35

## 1. RESUMEN

La Tirosina Descarboxilasa (TyDC) constituye una enzima de gran relevancia en la biosíntesis de alcaloides en plantas de la familia de las Amarilidáceas, entre estos tenemos la licorina. Con ello, se lleva a cabo la expresión genética y determinación de los parámetros cinéticos de la Tirosina Descarboxilasa en *E. coli* BL21 (DE3) de manera *in vitro*, para la biosíntesis de p-tiramina. Inicialmente, se empleó el clúster genético pM20-tdcA, que, en principio, tiene el gen codificante de la enzima. Se transformó genéticamente a *E. coli* BL21 (DE3). Se validó la presencia del gen mediante la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y Secuenciación Automatizada de Sanger.

Con lo anterior, se hipotetiza que las condiciones de expresión génica de dicha enzima, podría corresponder a 0.3 mM de IPTG, 14°C a 6h. Igualmente, se estima que la concentración de enzima en los extractos bacterianos de 0.0367, 0.0343 y 0.0218 mg/mL para las fracciones correspondiente al Extracto Total de Proteínas (ETP), Lisado Clarificado (LC) y Cuerpos de Inclusión (CI) respectivamente. Así se obtiene una constante catalítica ( $K_{cat}$ ) de  $0.397\text{ s}^{-1}$ , una velocidad máxima ( $V_{max}$ ) de  $0.00197\text{ mM s}^{-1}$ , una constante de Michaelis-Menten de 14.6 mM y una Unidad de Actividad Específico del extracto bacteriano (U/mg) de 0.00937. La gran mayoría de estos parámetros, podrían estar asociados a la enzima en la célula y no de manera pura. Lo mencionado, permite obtener resultados experimentales de carácter bioquímico y molecular de dicha enzima, para su posterior implementación en una fábrica biológica funcional.

**PALABRAS CLAVES:** Tirosina Descarboxilasa, PLP, proteínas recombinantes, alcaloides, L-tirosina y p-tiramina

## 2. INTRODUCCIÓN

Las *Amarilidáceas* son una familia de plantas capaces de biosintetizar metabolitos secundarios tales como los alcaloides<sup>1</sup>. Estos, cobran un rol importante como potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento de patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer<sup>1</sup>. Cuentan con una amplia gama de actividades biológicas tales como anticancerígena, inhibidor de la acetilcolinesterasa, antiviral, antiinflamatoria y entre otras. Una ejemplificación de lo mencionado corresponde a la licorina, cuyo precursor químico común en la ruta metabólica es la norbeladina<sup>2</sup>. Hasta ahora, se conoce que dicha ruta de síntesis parte de aminoácidos fenólicos como la L-tirosina y la L-fenilalanina<sup>1</sup>, donde, una de las etapas en la ruta metabólica para la síntesis biológica de este alcaloide, corresponde a la transformación química de la L-tirosina en p-tiramina, catalizada por la Tirosina Descarboxilasa (TyDC)<sup>1,3</sup>.

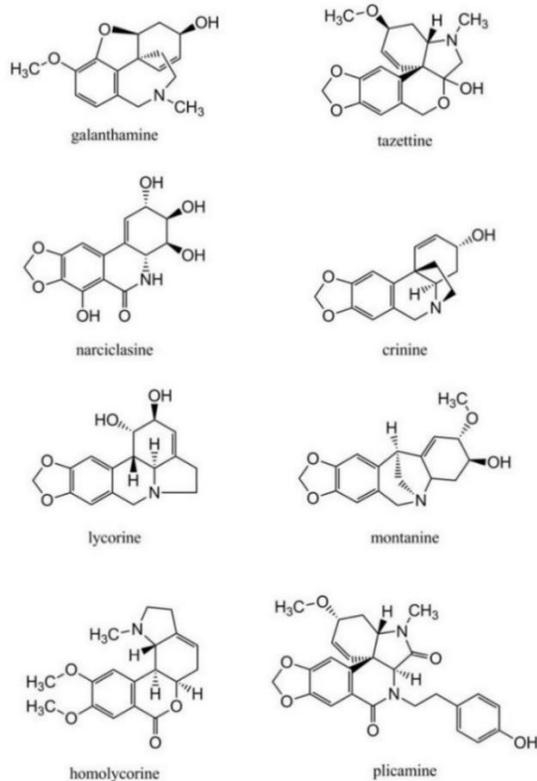
Una de las principales problemáticas en la producción de alcaloides es su estereoquímica, donde en la síntesis química resulta altamente complejo ensamblar ciertos núcleos fitoquímicos estereoespecíficos, a la par de que se necesitan grandes cantidades de solventes poco ecológicos y en ocasiones, se obtienen rendimientos bajos<sup>4</sup>. Asimismo, la extracción de alcaloides supone un desafío a escala comercial, pues son producidos en bajas concentraciones en respuesta al estrés del medio. Entonces, se hace indispensable una cantidad considerable de material vegetal para llevar a cabo estos procesos de extracción, generando así una explotación de la vegetación regional<sup>4</sup>. De igual manera, la transformación genética transitoria de plantas podría ser una opción viable, pero el crecimiento y acondicionamiento de estos organismos puede durar hasta meses para dicho cometido<sup>5</sup>.

Con ello, la reconstrucción *in silico* de rutas metabólicas de plantas en microorganismos como *Escherichia coli* es una alternativa plausible capaz de mitigar inconvenientes que se presentan en la transformación genética de plantas, la síntesis química y extracción de alcaloides como la licorina<sup>5</sup>. Esto, ya que se tiene la ventaja de que las bacterias presentan una alta tasa de crecimiento en condiciones de laboratorio y con capacidad de ser

genéticamente transformadas con múltiples genes provenientes de organismos ampliamente diversos<sup>6</sup>. Lo anterior, gracias al desarrollo de la Biotecnología y con ella, la generación de la tecnología del ADN recombinante, la cual, por medio de la manipulación genómica, ha hecho posible la fabricación a gran escala de moléculas de interés biológico<sup>7</sup>. De esta forma, ensamblar una ruta metabólica para la producción de la licorina empleando la síntesis biológica, constituirá una elección efectiva y económicamente viable en términos escalables a futuro. Esto, cobra una gran relevancia a nivel regional, ya que generaría un potencial desarrollo científico, farmacológico, tecnológico y comercial en nuestro país.

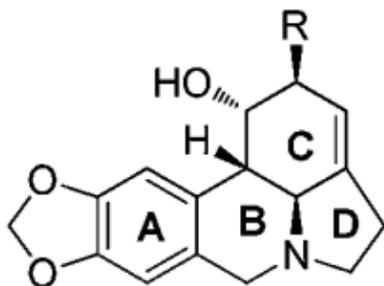
Así, los alcaloides son sustancias orgánicas nitrogenadas producidas principalmente por plantas, algunos microorganismos terrestres y marinos y en menor medida por ciertos anfibios e insectos<sup>8</sup>. Estos metabolitos secundarios, presentan clasificaciones estructurales y funcionales diversas<sup>8</sup>. Entre las clasificaciones más generales se encuentran los alcaloides verdaderos, los protoalcaloides y pseudoalcaloides<sup>9</sup>. Los primeros, se caracterizan por tener aminas intracíclicas, presentar un pH básico y provenir de aminoácidos aromáticos (como la licorina, p.ej.)<sup>9</sup>. Los segundos, tienen todas las características de los primeros a excepción que presentan aminas extracíclicas en cadenas laterales<sup>9</sup>. Los terceros, tienen las cualidades de los primeros salvo que estos no provienen de aminoácidos aromáticos<sup>9</sup>.

Se han identificado alrededor de 300 ejemplares de dichos compuestos en la familia de las Amarilidáceas, en donde se le ha atribuido este potencial generador de alcaloides gracias a la capacidad que posean estas de generar, biosintéticamente, la norbeladina, la cual constituye un precursor químico común de biosíntesis de estas sustancias químicas y que se abordará en apartados posteriores<sup>10</sup>. De los alcaloides descritos en esta familia de plantas, los principales son la galantamina, licorina, tazetina, montanina, plicamina, homolicorina, narclicasina, entre otros<sup>10</sup>. Este interés alrededor de los alcaloides de esta familia se debe, en parte, a sus actividades biológicas tales como: inhibidores de la Acetilcolinesterasa (AChE, por sus siglas en inglés), antitumoral, antiviral y antibacteriana<sup>11</sup>. Algunos de los alcaloides más representativos de esta familia se ilustran en la **Figura 1**<sup>10</sup>.



**Figura 1.** Estructuras químicas de algunos de los alcaloides de la Familia de las Amarilidáceas. Tomado de Takos A., Rook F<sup>10</sup>.

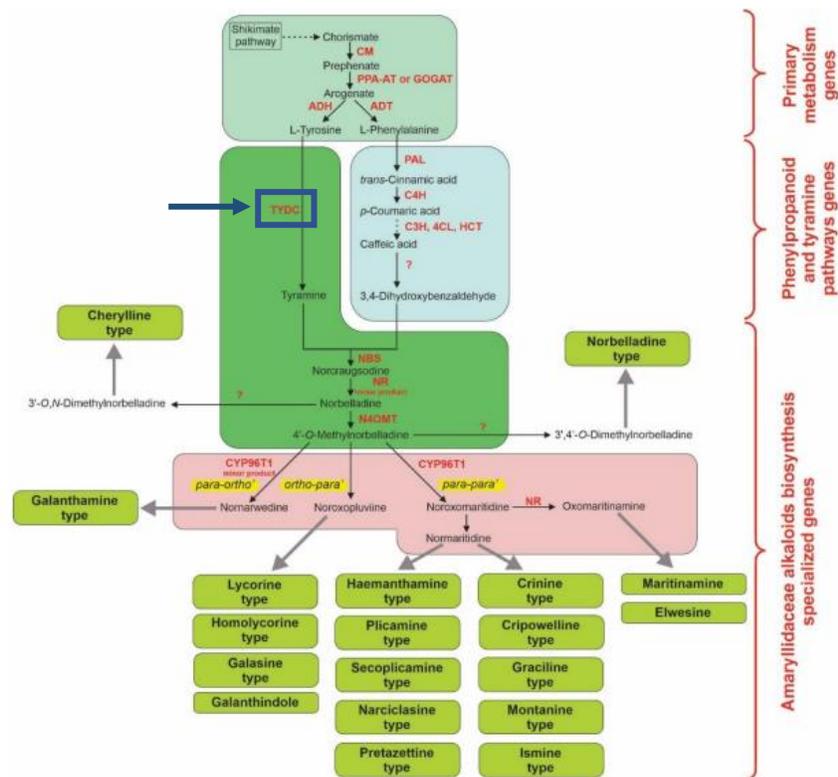
Por su parte, la licorina ha incentivado el interés científico en las últimas décadas, gracias a la actividad antitumoral que esta ha presentado<sup>11</sup>. Se le atribuye actividades farmacológicas de carácter anticancerígeno, destacándose esencialmente como un agente químico anti proliferativo a bajas concentraciones, en contra de células en estadio cancerígeno resistentes a medicamentos de tipo apoptóticos<sup>11</sup>. Con ello, se han reportado varias especies vegetales productoras de dicha especie química, sin embargo, se destaca la especie *Lycoris urea*<sup>1</sup>. A nivel estructural, el alcaloide en cuestión se caracteriza por presentar cuatro anillos fusionados, nombrados de A-D y un anillo de tipo metilendioxi como se esquematiza en la **Figura 2**<sup>11</sup>. Diversos estudios de relación-estructura-actividad (“Structure-Activity-Relationship”, SAR en inglés) han propuesto que la estereoquímica de los anillos C-D, la libertad conformacional del anillo C y la funcionalidad del diol de este mismo anillo constituyen los principales responsables de la actividad antitumoral que esta presenta<sup>11</sup>.



**Figura 2.** Estructura química de la licorina, donde R=OH es la molécula mencionada<sup>11</sup>.

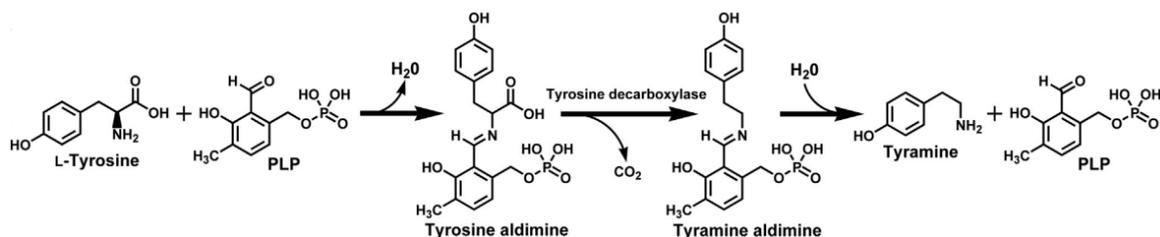
En los últimos años, el conocimiento científico alrededor de la química de alcaloides de la familia de las Amarilidáceas y sus actividades farmacológicas ha aumentado exponencialmente. No obstante, poco se sabe de la ruta de biosíntesis de dichos alcaloides y, por ende, el de la licorina en tanto que la ruta de síntesis biológica de dicho compuesto no se encuentra bioquímicamente caracterizada en su totalidad<sup>1</sup>. Igualmente, la regulación génica de las enzimas presentes en dicho proceso aún no se ha esclarecido con completa certeza, tratándose entonces, en gran parte, de un proceso de biogénesis<sup>1</sup>. Así y gracias al advenimiento de las ciencias ómicas se ha podido elucidar gran parte de la dicha ruta y algunas de las enzimas involucradas en este proceso<sup>1</sup>.

De este modo, la biosíntesis de estos alcaloides se puede agrupar en una serie de reacciones bioquímicas de varias etapas que se presentan a continuación en la **Figura 3**. De manera general, se da primero la biosíntesis de aminoácidos aromáticos proveniente de la ruta del ácido shikímico como la L-fenilalanina y la L-tirosina, que son en últimas los bloques químicos de construcción de los alcaloides. Luego, la biosíntesis de tiramina, en donde se destaca la presencia de la **Tirosina Descarboxilasa**, cuya actividad enzimática es crucial para la obtención de este metabolito, que, gracias a esta se puede biosintetizar el precursor químico común denominado 4'-O-metilnorbeladina. Por último, la biosíntesis especializada de alcaloides de esta familia de plantas<sup>1</sup>.



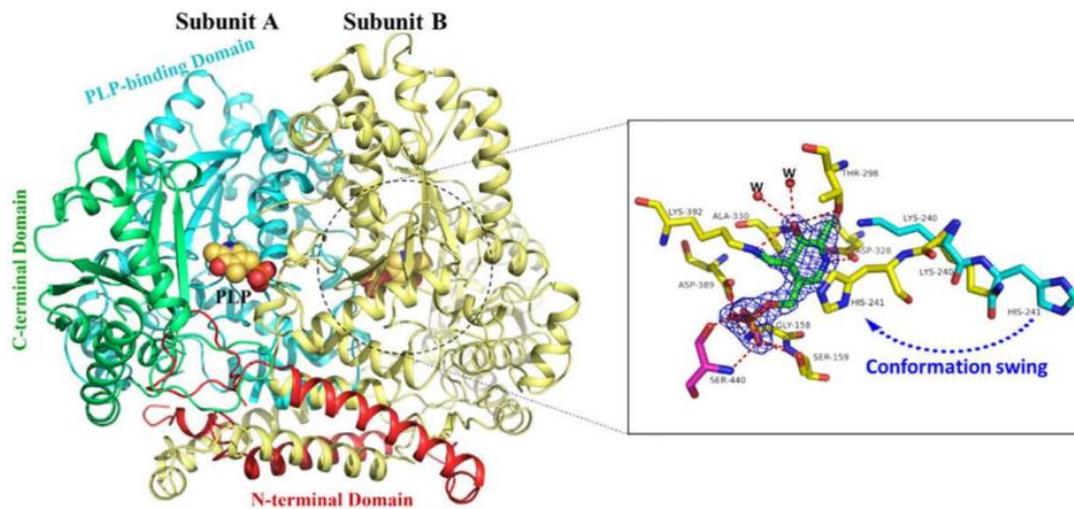
**Figura 3.** Modificada de Georgiev, *et. al.*, donde se esquematiza la ruta propuesta de biosíntesis de la licorina y otros alcaloides en la que se aprecia algunas enzimas involucradas en este proceso bioquímico<sup>1</sup>.

Con lo anterior, la Tirosina Descarboxilasa (EC. 4.1.1.25)<sup>12</sup>, comúnmente abreviada como TYDC, TyDC o TDC pertenece a una familia de enzimas dependientes de la coenzima Piridoxal-5'-fosfato (PLP, en inglés)<sup>13</sup>. La anterior, es una enzima carboxilo-liasa que cataliza la transformación de la L-tirosina en p-tiramina (**Figura 4**)<sup>13</sup>. A nivel catalítico, se da la formación del complejo tirosina aldimina por acoplamiento del PLP con el sustrato y la respectiva deshidratación. Después, la biomolécula remueve el grupo carboxilo del complejo formado mediante una reacción de descarboxilación para producir el complejo tiramina aldimina. Por último, una hidratación conlleva a la formación de la tiramina y la renovación de la coenzima<sup>13</sup>.



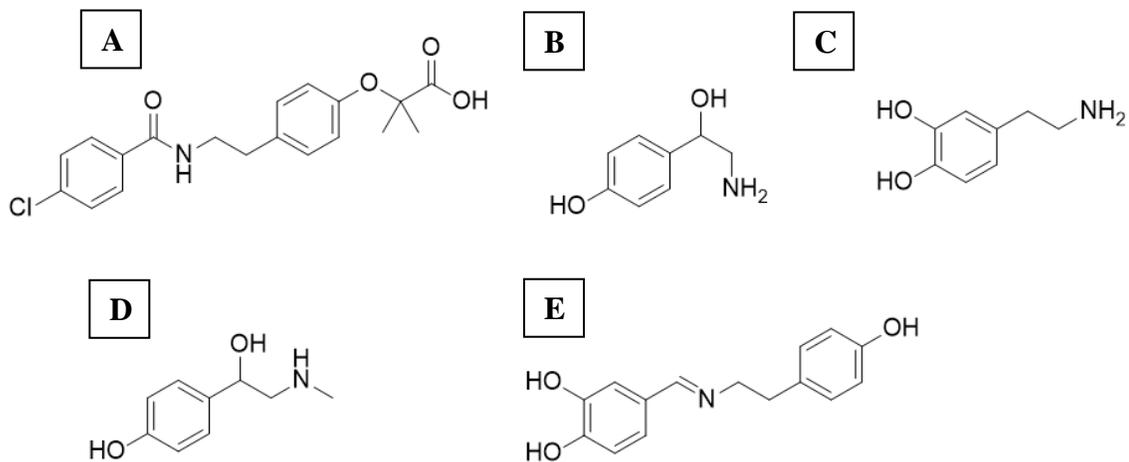
**Figura 4.** Obtención de la Tiramina a partir de la L-Tirosina catalizada por la Tirosina Descarboxilasa (TyDC), tomado de Zhang K., y Ni Y<sup>13</sup>.

La enzima está presente en organismos como plantas, insectos, bacterias y mamíferos<sup>14</sup>. Así, la tiramina es un precursor bioquímico de algunos neurotransmisores como la sinefrina, epinefrina, octopamina y la hordenina<sup>13</sup>. Asimismo, el gen que codifica para esta es denominado “tdc” y existen dos: tdcA y tdcB, en donde el primer gen presenta una alta afinidad por el sustrato en cuestión mientras que el segundo por la L-DOPA para la formación de L-Dopamina<sup>15</sup>. A nivel genómico, ha sido ampliamente caracterizada en microorganismos como *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus brevis* IOEB 9809<sup>15</sup>. De este modo, la estructura de esta es variada presentándose en forma de heterodímero en *E. faecalis* (74.5 y 76 kDa respectivamente) y como homodímero en *Lb. brevis* de 70 kDa, un sitio de unión específico al PLP, que le ocasiona cambios conformacionales a esta y desata, en últimas, su actividad enzimática tal y como se muestra en la **Figura 5**<sup>15-18</sup>. La organización genómica de esta se presenta en forma de cluster, conformado por genes tales como tirosil tyr-ARNt sintetasa, tdc, transportador (*tyrP*) y un antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup><sup>15,19</sup>.



**Figura 5.** Estructura molecular de la enzima, donde se aprecia el dominio de unión al PLP, los extremos terminales de este y el cambio conformacional de la enzima por la unión de la coenzima mencionada. Tomado de Zhu H, *et.al*<sup>18</sup>.

De esta manera, la tiramina es una amina biogénica y uno de los principales metabolitos de L-tirosina y, presenta un gran interés en medicina, salud alimentaria y en la producción de alcaloides en plantas como ya se mencionó<sup>20</sup>. Así, algunos derivados de este metabolito como el bezafibrato se han empleado para la hiperlipidemia, la octopamina como un fármaco simpaticomimético, la dopamina para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la sinefrina para la prevención de la diabetes tipo II, entre otros (**Figura 6**)<sup>20</sup>. Igualmente, se ha reportado que trazas de este en alimentos, principalmente lácteos, puede acarrear problemáticas digestivas severas<sup>20</sup>. Asimismo, es un intermediario químico crucial en el metabolismo secundario de plantas para la biosíntesis de intermediarios en la ruta de biosíntesis de alcaloides de la familia de las Amarilidáceas, en tanto que se condensa con la 3,4-dihidroxibenzaldehído para formar la norcraugsodina<sup>1</sup>.



**Figura 6.** Estructuras químicas de derivados de la p-tiramina de interés bioquímico. A) Benzfibrato, B) octopamina, C) dopamina, D) sinefrina y E) norcaugsodina. Imagen de autoría propia.

De esta forma, la llegada de la Biotecnología marca un antes y un después en la ciencia y la tecnología. Con ella, la Tecnología del ADN Recombinante ha sido una poderosa herramienta para la clonación de genes diversos que codifican para una amplia gama de enzimas con aplicaciones biotecnológicas variadas<sup>21</sup>. Dicha tecnología, se basa en la inserción de un gen exógeno a un vector (ADN plasmídico) para la correspondiente transformación genética de un microorganismo hospedero y generar un vector recombinante<sup>21</sup>. Estos vectores recombinantes presentan estructuras genéticas sumamente variadas como por ejemplo sitios únicos de replicación (ORI), resistencia antibióticos, fluorescencias, entre otros<sup>21</sup>. Se han descrito varios microorganismos hospederos siendo *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae* los más empleados. Pero, *E. coli* se ha establecido como el microorganismo modelo para tal cometido, con ventajas como la alta y rápida tasa de crecimiento celular, elevada densidad óptica en medio de cultivo y las cepas tienden a ser económicas<sup>21</sup>.

La cepa BL21 (DE3) posee características que hacen de esta un modelo ejemplar para la expresión de enzimas recombinantes<sup>22</sup>. Esta, carece de proteasas y del gen *OmpT* que codifica para una enzima que degrada enzimas extracelulares<sup>22</sup>. A su vez, contiene del

profago  $\lambda$ DE3 en el cromosoma de la bacteria, lo que adiciona el gen de T7 ARN polimerasa y el promotor *lacUV5* para la inducción de la expresión genética por el análogo químico de la alolactosa: isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)<sup>22</sup>. Este análogo químico cobra un rol relevante, puesto que este se une físicamente con el represor de la T7 ARN polimerasa, lo que se desencadena que, al promotor “*lac*” no estar reprimido, la enzima pueda ejecutar su acción catalítica, la cual es la transcripción del gen heterólogo y en últimas, la traducción de *tdcA* a la enzima recombinante (TyDCr)<sup>23</sup>.

Con el objetivo de contribuir con información experimental que pueda aportar a la generación de una biofábrica capaz de biosintetizar licorina, el presente proyecto tiene la finalidad, para el 2022, expresar la Tirosina Descarboxilasa (TyDC) de *Lactococcus lactis* (IPLA 655) en *E. coli* cepa BL21 (DE3), para la producción de p-tiramina. Ello, en aras de obtener una cepa bacteriana con la capacidad de biosintetizar, el metabolito secundario mencionado para su integración en la ruta metabólica de producción del alcaloide en cuestión.

### 3. METODOLOGÍA

Para este proyecto se siguieron principalmente los Planes Operativos Estándar (POE), los cuales son un compendio de protocolos estandarizados para el proyecto de Bioeconomía de la Universidad ICESI, elaborado por el MSc. Steven A. David Jiménez, revisado por la PhD. Paola A. Caicedo y la PhD. María F. Villegas. De la misma manera, se usarán artículos reportados en la literatura asociado a la enzima en cuestión. De manera general, se transformaron genéticamente células bacterianas de *E. coli* BL21 (DE3) con el gen *tdcA* contenido en el plásmido pM20-*tdcA*. Se identificó el transgén mediante Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) y Secuenciación Automatizada de Sanger. Luego, se expresó dicho gen empleando el inductor IPTG a diferentes concentraciones y se evaluaron distintos tiempos y temperaturas. Asimismo, se realizaron dos tratamientos que permitieran verificar la solubilidad de la enzima heteróloga. La presencia de enzima recombinante se evaluó por SDS-PAGE al 10% del gel de corrida. Por último, se evaluó la actividad enzimática de los extractos bacterianos y se contrastaron con lo reportado en la literatura.

### 3.1. Competencia de células bacterianas de *E. coli* BL21 (DE3)

Se descongeló lentamente en hielo un stock de glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$  de *E. coli* BL21 (DE3). Después, se inoculó en un tubo de ensayo estéril un medio LB con el fin de obtener una dilución 1:100. Seguidamente, se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$ , 300 rpm durante 14-16 h. Pasado este tiempo, se agregaron 5-10  $\mu\text{L}$  del inóculo y se sembró en cajas Petri con agar LB. Estas placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por 14-16 h. Culminado este tiempo, se verificó la presencia de colonias aisladas y directamente de la caja se inocularon 4-5 colonias a tubos de ensayo con 2 mL con medio LB. Nuevamente, se incubó a las condiciones descritas en este apartado. Al día siguiente, se inoculó 1 mL a 4-5 recipientes con 100 mL de medio LB, los cuales se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$ , 300 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) entre 0.25-0.3. Alcanzado este valor, se dejaron los recipientes en hielo por 15 min. Seguido, se centrifugaron las células a 4000 rpm, 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se descartó el sobrenadante y el pellet se suspendió en 40 mL de una solución estéril de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M para ser incubada en hielo por 30 min. Otra vez, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 6 mL de solución estéril de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M + 15% de glicerol. Finalmente, se adicionaron alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  a tubos de 1.5 mL y se sumergió en nitrógeno líquido para su almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2. Transformación genética de *E. coli* BL21 (DE3)

Las bacterias de la cepa en cuestión se transformaron genéticamente con el plásmido pM20-tdcA. El plásmido fue donado por Miguel A. Álvarez, *et. al.*, del trabajo científico titulado: “Sequencing of the Tyrosine Decarboxylase Cluster of *Lactococcus lactis* IPLA 655 and the Development of a PCR Method for Detecting Tyrosine Decarboxylating Lactic Acid Bacteria”. *Journal of Food Protection*, Vol. 67, No. 11, 2004, pags. 2521-2529<sup>19</sup>. Se adicionó cada colonia del apartado anterior a 50 mL de medio LB suplementado con los antibióticos de selección (Kanamicina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y Ampicilina 100 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), con el fin de realizar stocks de glicerol. Se incubaron los medios ( $37^{\circ}\text{C}$ , 225 rpm) hasta alcanzar un  $\text{OD}_{600}$  entre 0.25-0.3. Seguidamente, se mezclaron 800  $\mu\text{L}$  de bacterias con 200  $\mu\text{L}$  de glicerol en tubos de 1.5 mL. Por último, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su criopreservación.

### 3.2.1. Identificación del gen *tdcA* por PCR y Secuenciación Automatizada de Sanger

A partir de estos stocks de glicerol, se extrajeron de un alícuota de 2 mL, el ADN bacteriano empleando el kit comercial PureLink™ Quick Plasmid Miniprep de Invitrogen mediante las instrucciones del fabricante. Luego, el ADN extraído se cuantificó en el fluorímetro Qubit4 de esta misma casa comercial y su concentración se halló usando los estándares de este Kit, los cuales corresponden a los límites de cuantificación. Para identificar el gen de interés se empleó la PCR usando cuatro juegos de primers diseñados *in silico* para este proyecto (1, 1A,2 y 3) que codifican secciones diferentes del gen, el perfil térmico, la enzima Taq-polimerasa, dNTPs, y agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) libre de ribonucleasas (**Tabla 1**). Los amplicones productos de la PCR, se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Finalmente, se obtuvo la secuencia nucleotídica del inserto mediante el método de Secuenciación Automatizada de Sanger del laboratorio de Medicina Genómica de la Universidad ICESI.

**Tabla 1.** Primers, termoperfil para la PCR y condiciones electroforéticas para la identificación del transgén.

Pimers para PCR		
Tipo de primer	Tamaño amplicón (pb) Tm (°C)   %GC	Secuencia Nucleotídica (5'-3')
1-F <sup>a</sup>	631 56.6 45	TTCCGTACCATGGCATAATG
1-R	631 59.9 53	AACTACACCGACAACACCC
1A-F	1900 54.1 44	TTAGGAGGGTTTCACATG
1A-R	1900 53.4 36	CCACCTTATTTCGATTATTTTGC
2-F	1884 54 36	CACATGGAATCATTGTCAAATG
2-R	1884 53.2 35	CTTATTTCGATTATTTTGCTTCGC
3-F	1874 52.4 35	TTTCACATGGAATCATTGTC
3-R	1874 51.8 37	ATTATTTTGCTTCGCTTGC
Termoperfil		
Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
95	5 min	
95	31 s	
95	30 s	
62.5 <sup>b</sup>	30 s	35X
68	1 min	
68	5 min	
4	∞	

<b>Gel de agarosa (%)</b>	1.5	100 mL de buffer TAE 1X
<b>Voltaje (V)</b>		120
<b>Tiempo (min)</b>		120
<b>Buffer de corrida</b>		TAE 1X

<sup>a</sup>F corresponde a Forward y R a Reverse. <sup>b</sup>Determinada de manera experimental

### 3.3. Expresión genética de TyDC en *E. coli* BL21 (DE3)

Se evaluaron dos tratamientos (T1 y T2) en aras de expresar y establecer la solubilidad de la enzima recombinante. Estos tratamientos se denominan como: Medio (M), Extracto total de proteína (ETP), Clarificado (C) y Cuerpos de Inclusión (CI). Estas denominaciones serán asociados a cada tratamiento tal y como se muestra en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Parámetros y tratamientos para determinar la concentración, temperatura y tiempo de expresión de TyDCr.

<b>Solubilidad enzimática</b>		
<b>Parámetro de solubilidad enzimática</b>	<b>Rótulo de parámetro de solubilidad enzimática</b>	<b>Tratamiento (T)</b>
Medio de cultivo	M	T1
Extracto total de proteína	ETP	
Lisado Clarificado	LC	T2
Cuerpos de Inclusión	CI	
<b>Parámetros de expresión genética</b>		
<b>[IPTG] mM</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
0	1	25
0.1	2	18
0.3	3	14
0.7	4	37
1.0	5	-
-	6	-
-	21	-

#### 3.3.1. Determinación de los parámetros de expresión genética de TyDCr

Se evaluó un rango de concentraciones de IPTG: 0.1, 0.3, 0.7, y 1.0 mM y 6 h de expresión. Se descongeló lentamente un stock de glicerol con bacterias genéticamente transformadas

con el plásmido, para su inoculación en un medio LB suplementado con los antibióticos de selección en una relación 1:100. Dichos inóculos, se incubaron (37°C, 225 rpm, 12-14 h). Al día siguiente, se inoculó 5 recipientes con 62.5 mL de medio LB suplementado con los antibióticos en cuestión y se adicionó 625 µL de bacteria incubada. Se incubaron los recipientes (37°C, 225 rpm) hasta alcanzar un OD<sub>600</sub> entre 0.5-0.7. Se tomó de cada tratamiento una alícuota de 2 mL, se centrifugó a 11000 rpm, 10 min y estas muestras fueron los controles a las 0 h de expresión genética. Luego, se añadió el volumen correspondiente de inductor en aras de que estén presentes en el medio de cultivo a la concentración indicada. En todos los procesos se tuvo un control de esterilidad que corresponde a medio de cultivo sin inocular.

Una vez añadido el inductor, se incubaron los recipientes (37°C, 225 rpm, 5 h). Después, se tomó nuevamente una alícuota de 2 mL de cada tratamiento y se centrifugó (11000 rpm, 10 min, 4°C) y estas muestras fueron los controles a 5 h de expresión. El sobrenadante se añadió a un tubo de 1.5 µL previamente rotulado (este corresponde a M de T1) y a cada pellet se le adicionaron 4 µL/mg de este de buffer de lisis bacteriano para extracción proteica (Thermo Fisher Scientific®). El proceso mencionado también se aplicó a los controles a las 0 h de expresión. Se sonicó la muestra (15 s ON, 15 s OFF, 40% Amplitud, 1 min) y alícuotas de 20 µL de estos son ETP de T1. Para el tratamiento 2, se tomó el material restante del sonicado, se centrifugó (11000 rpm, 20 min, 4°C), se recuperó el sobrenadante que es (C) y el pellet (CI). Todo el material se almacenó a -20°C para su visualización mediante SDS-PAGE.

Una vez determinada la concentración mínima a la que se expresa la enzima, y su solubilidad, se siguió exactamente el mismo protocolo del ítem anterior, salvo que se hizo seguimiento en rangos de tiempo de 1 h durante 5 h. Las muestras obtenidas se almacenaron a -20°C para visualizarlas por SDS-PAGE. Con el tiempo y la concentración mínima requerida para la expresión genética de TyDCr, se procedió a evaluar la temperatura requerida para tal proceso. Lo anterior, siguiendo el protocolo descrito en apartadas anteriores para cada tratamiento a temperaturas: 14, 28 y 25°C. Las muestras obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE.

### 3.4. Determinación de la actividad enzimática de TyDCr en los extractos bacterianos

En primer lugar, se cuantificó la enzima presente en los extractos bacterianos, empleando para ello la técnica de Bradford. En segundo lugar, se determinó la absorbancia máxima de L-tirosina en 1 mL de metanol. En tercer lugar, se evaluó la disminución del sustrato a diferentes tiempos, empleando buffer de lisis, L-tirosina (5.5 mM), PLP (0.2 Mm) y TyDCr en el lisado clarificado (0.343 mg/mL) a 0, 1 y 3h de actividad. Los experimentos fueron llevados a cabo con 586.9 mg de pellet bacteriano disueltos en 5 mL de buffer de lisis. Para la determinación, se empleó Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplado a foto arreglo de diodos (HPLC-DAD, por sus silgas en inglés), una curva de calibración empleando estándar de L-tirosina (Sgima Aldrich) de 0.05, 1.0, 2.0, 3.0 y 6.0 mM, donde dichas condiciones de cromatográficas se presentan en la **Tabla 3**, como control negativo se empleó bacteria sin transformar sometida a las mismas condiciones a un tiempo de 1h. En cuarto lugar, se determinaron los parámetros cinéticos por Espectrofotometría UV-Vis, usando el sistema mencionado y como control todo este sistema a excepción del extracto bacteriano con la enzima recombinante, tal y como lo reportan Phan, *et. al*<sup>24</sup>. Las mediciones se realizaron por triplicado a diferentes concentraciones de sustrato (200, 150, 100, 50 y 10 mM), con respecto al tiempo (10 min), midiendo la absorbancia a 388 nm. Se linealizó la información obtenida, con el objetivo de obtener dichos parámetros enzimáticos.

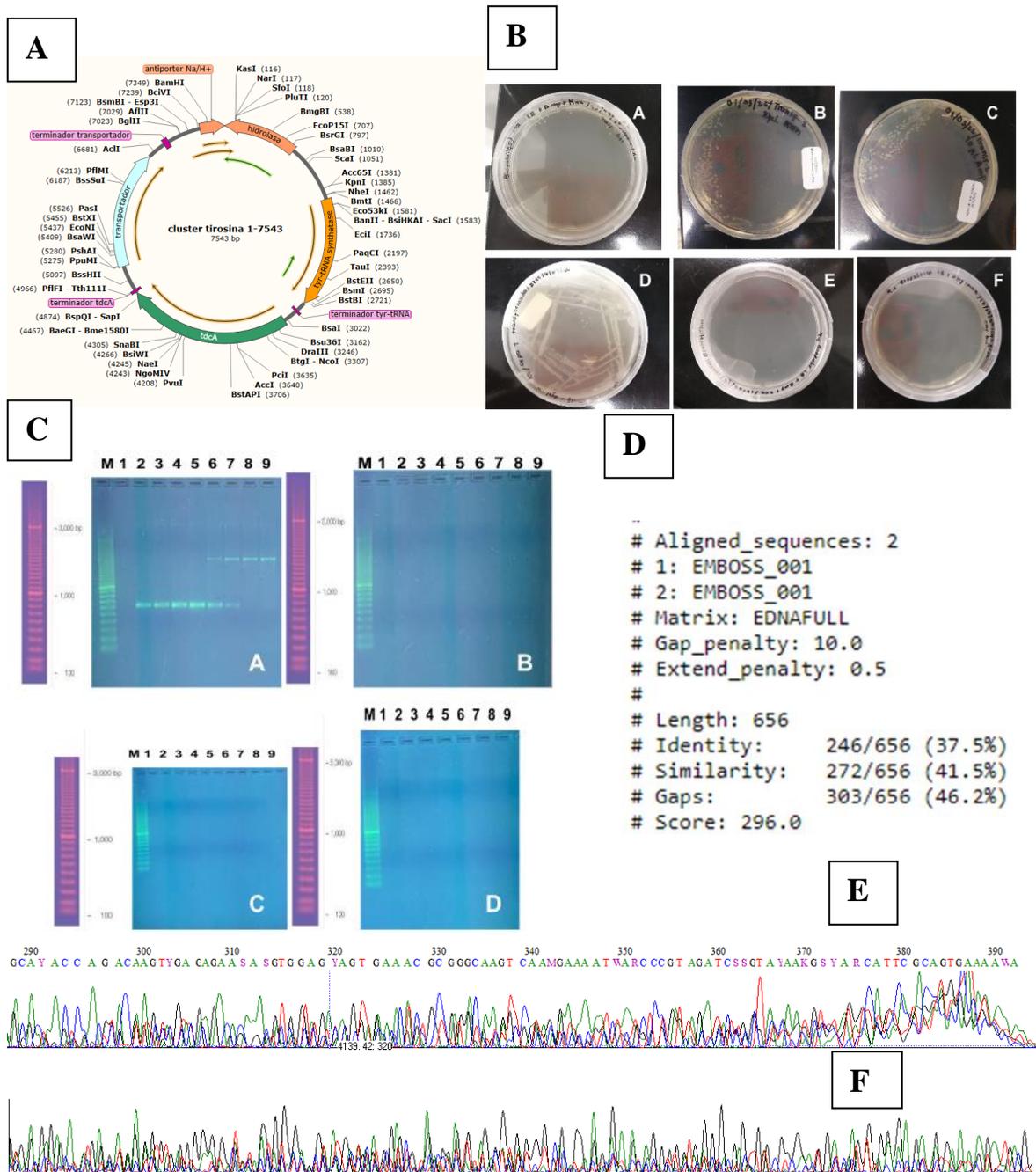
**Tabla 3.** Parámetros cromatográficos empleados en la determinación de la actividad biológica de TyDCr.

<b>SISTEMA CROMATOGRÁFICO</b>	
<b>Tipo de separación</b>	Fase reversa isocrático
<b>Columna</b>	ZORBAX SB-C18 4.6x75 mm. 3.5 $\mu$ m
<b>Fase móvil A</b>	Agua HPLC + 0.1 % ácido trifluoroacético
<b>Fase móvil B</b>	Metanol HPLC
<b>Detección</b>	PDA $\lambda$ =210, 220, 280 nm
<b>Flujo</b>	1 mL/ min
<b>Volumen de inyección</b>	10 $\mu$ L
<b>Tiempo de corrida</b>	10 min

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Competencia y Transformación genética de *E. coli* BL21 (DE3)

Partiendo del plásmido extraído, cuya pureza y concentración se denotan en la **Tabla 4**, en primera instancia, se llevó a cabo la transformación genética de células bacterias de *E. coli* BL21 (DE3), con el clúster de tirosina (pM20-tdcA) que se aprecia en la **Figura 7A**). En segunda instancia, la presencia de dichas colonias transformadas se evidencia en la **Figura 7 B)** donde el éxito de dicho proceso de transformación radicó, en gran medida, por el cultivo de estas bacterias en medio LB con los antibióticos de selección (Ampicilina y Kanamicina para ser precisos). En tercera instancia, se llevó a cabo la verificación del transgén en cuestión empleando los primers de la **Tabla 1** con las respectivas condiciones descritas. De este modo, se estandarizó la temperatura de fusión ( $T_m$ ) realizando un mapeo a distintas temperaturas del termoperfil empleado para esta técnica molecular. En última instancia, se obtuvo la secuencia nucleotídica de producto de PCR, el cual se secuenció en conjunto con el set de primers (“Reverse” y “forward”) que se obtuvo amplificación, es decir, el primer 1F y 1R. Esta secuencia experimental, se alineó con el gen presente en el mapa genético, empleando la herramienta bioinformática “Water-EMBOSS”, donde se obtuvieron los respectivos parámetros de alineamiento de secuencias nucleotídicas: porcentaje de identidad, de similitud, número de gaps y un puntaje de secuenciación. La información mencionada en este apartado se expone en la **Figura 7**.



**Figura 7.** Resultados obtenidos en la transformación genética de *E. coli* BL321 (DE3). **A)** Mapa genético del clúster que contiene el gen “*tdcA*” que codifica para TyDC. **B)** Colonias bacterianas BL21 (DE3) de *E. coli* obtenidas en la transformación genética por choque térmico, a) bacterias en Ampicilina y Kanamicina, b), c) y d) bacterias transformadas en Ampicilina, Kanamicina y sin antibiótico respectivamente, e) bacterias competentes en los antibióticos en cuestión y f) control de esterilidad. **C)** Geles de electroforesis correspondientes a la temperatura de alineamiento de los primers a) 1 b) 1A c) 2 y d) 3.

Códigos de los pozos: 1: (-); 2: 67 °C; 3: 66.2 °C; 4: 64.7 °C; 5: 62.5 °C; 6: 59.8 °C; 7: 57.8 °C, 8: 56.1 °C; 9: 55 °C, M: marcador de peso molecular. **D)** Alineamiento genómico realizado con el programa “Water-Emboss” donde se contrasta el gen del plásmido con la secuencia obtenida. **E)** y **F)** Secuencia obtenida para TYDC amplificada con el primer R1, correspondiente a 390 pb y **B)** resultado de la secuenciación con el primer F1.

**Tabla 4.** Cuantificación del ADN plasmídico (pM20-tdcA) obtenidos en el fluorímetro.

Plásmido extraído	Concentración (ng/μL)
Clúster de tirosina (pM20-tdcA)	119.0

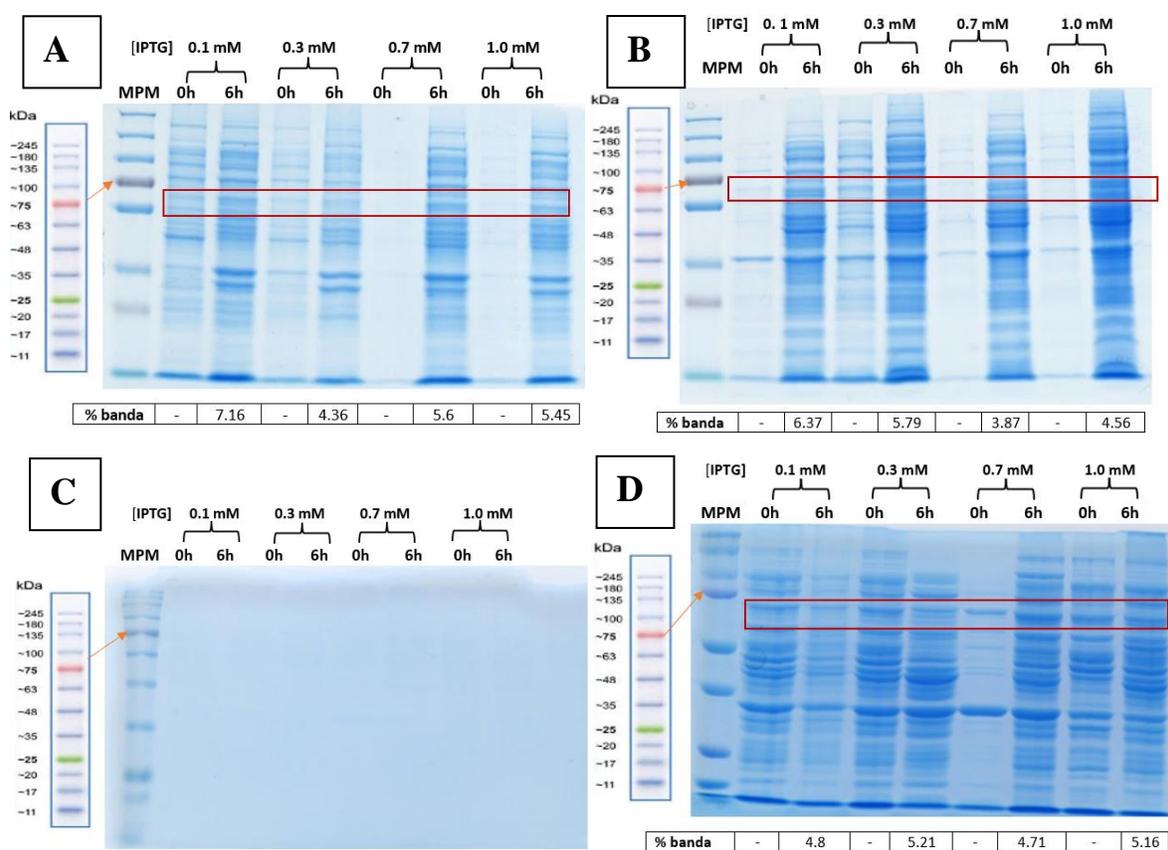
De acuerdo con lo reportado en el artículo guía, emplean un fragmento interno de 820 pb del gen *tdcA* de *L. lactis* IPLA 655 directamente del ADN genómico por amplificación por PCR con los primers 5'-GAYATIATIGGIATIGGIYTIGAYCARG-3' y 5'-CCRTARTCIGGIATIGCRAARTCIGTRTG-3', donde Y es C o T, R es A o G e I es inosina. Dicho amplicón, fue clonado en el plásmido pCR2.1 para generar el mapa genético en cuestión que se muestra en la **Fig. 7A**<sup>19</sup>. Con respecto a las bacterias competentes, se puede aseverar una correcta generación de estas, como se aprecia en la **Fig. 7B** estas crecen en agar LB sin antibiótico y no en aquellos que están suplementados con los antibióticos de selección. Lo anterior, permite conocer dos genes de resistencia que tiene dicho mapa genético. Dicho proceso es de gran relevancia, ya que este permite convertir, químicamente a la cepa bacteriana más susceptible a captar ADN foráneo, en tanto que el tratamiento con los iones Ca<sup>2+</sup> polariza a la membrana celular de estas y permite una mayor interacción con el ADN foráneo, que está cargado negativamente.<sup>25</sup> En segundo lugar y según lo reportado por los autores del artículo del cual el plásmido fue obsequiado, este se encuentra diseñado para clonarse en DH5α más no reportan clonación molecular en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). No obstante, sí se presentan ciertas colonias en la transformación genética de las bacterias químicamente competentes de BL21-DE3 como se muestra en la **Fig. 7B**. Igualmente, se corrobora una correcta manipulación de los microorganismos y una nula variabilidad de la cepa, en tanto que en el control negativo de esterilidad no se encuentra presencia de ninguna colonia bacteriana.

La temperatura de alineamiento de los primers ( $T_m$ ) se define como la temperatura en la que se ha hibridado el 50% de las hebras con los primers en el proceso de PCR<sup>26</sup>. Con esto, se estima que para el juego de primers funcional (**1F-1R**) una temperatura de alineamiento cercano a los 62.5°C, puesto que por debajo de esta se presenta una alta especificidad en los primers como se aprecia en la **Fig. 7C-A**. Lo anterior, en tanto que se genera el amplicón de alrededor de 631 pb como se muestra en la **Tabla 1** y en la **Fig. 7C-A**. Ahora bien, el resto de primers no generaron amplicones. Esto, se pudo haber presentado por diversos factores, entre ellos la integridad del ADN donado puede que no sea la adecuada, así como su estructura genómica, o incluso su posible degradación. La posibilidad de ciertos inhibidores, a pesar de emplear agua libre de DNAsas<sup>27</sup>. En términos generales, los parámetros de %GC (porcentaje de Citocinas y Guaninas) y las  $T_m$  de los primers son correctas a nivel *in silico*, esto es que el % GC se encuentra entre 40-60%, unas  $T_m$  no superiores a 5°C y estos no superan una longitud de 30 ni menor a 18 pb tal y como se muestra en la **Tabla 1**<sup>26</sup>. Igualmente, en la secuenciación automatizada no se obtuvo un alto porcentaje de identidad (**Fig. 7D**), lo que se puede asociar a que el gen en cuestión no se encuentra de manera íntegra de dicho clúster. Asimismo, hay que tener en cuenta que para la secuenciación se partió del producto de PCR y no del gen aislado del gel. Entonces, al ser la PCR una reacción química, puede quedar sustrato sin reaccionar (plásmido), dímeros de primers y otras estructuras genéticas. También, la técnica de Sanger empleado sólo permitía la secuenciación de fragmentos cortos, generando así una gran limitante en términos genómicos. Todo lo anterior, puede acarrear en bajos porcentajes de identidad y similitud, altos “gaps” (nucleótidos sin detectar) e incluso, electroferogramas con picos poco definidos como se muestra en la **Fig. 7E-F**.

#### **4.2. Expresión Genética de TyDCr en *E. coli* BL21 (DE3)**

Como primera medida, se llevó a cabo a la expresión génica de la enzima en cuestión y los resultados en este proceso fueron visualizados mediante SDS-PAGE como se exhibe en la **Figura 8**. Así, se observaron las diferentes solubilidades posibles de la enzima a las condiciones descritas en ítems anteriores. Con todo esto, se tiene que la enzima no se

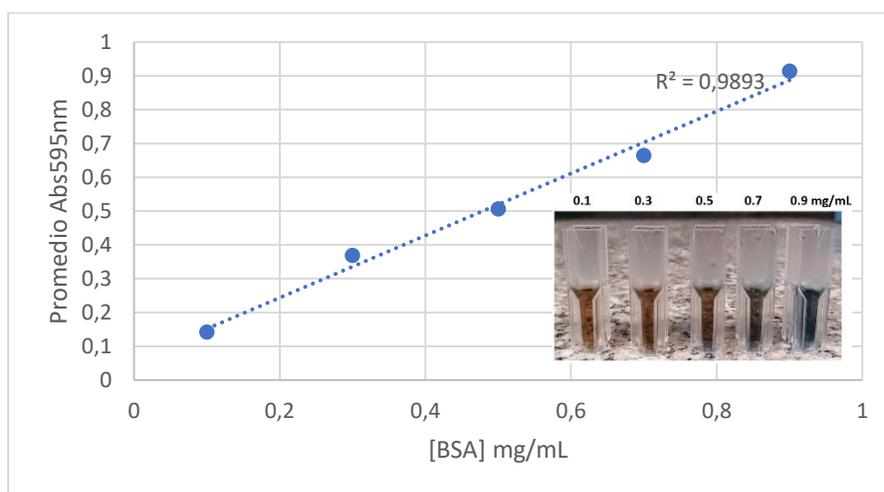
encuentra presente en el medio de cultivo como se ilustra en la **Figura 8C**. En este sentido, las figuras **8A**, **8B** y **8D** representan los cuerpos de inclusión (CI), lisado clarificado (LC) y el extracto total de proteínas (ETP) respectivamente. Los resultados del análisis por densitometría y cuantificación por Bradford se muestran en la **Tabla 5**, la ecuación (1) y en la **Figura 9**. Luego, las ecuaciones posteriores describen el proceso matemático para calcular la concentración de la enzima en cuestión a partir de la curva de calibración obtenida en el ensayo de Bradford. Se determina una concentración de 0.3 mM de IPTG. En la sección de **ANEXOS** se presentan los datos crudos de este proceso.



**Figura 8.** Geles de SDS-PAGE producto de la expresión genética de TyDCr en *E. coli* (DE3) a diferentes concentraciones de IPTG durante 6h a 37°C. A) CI, B) LC, C) M y D) ETP. Se esquematiza la zona cercana a 70 kDa (peso molecular de la enzima) y los porcentajes de banda obtenidos por densitometría.

**Tabla 5.** Resultados obtenidos en la curva de calibración del estándar de BSA para la cuantificación proteica mediante el ensayo de Bradford.

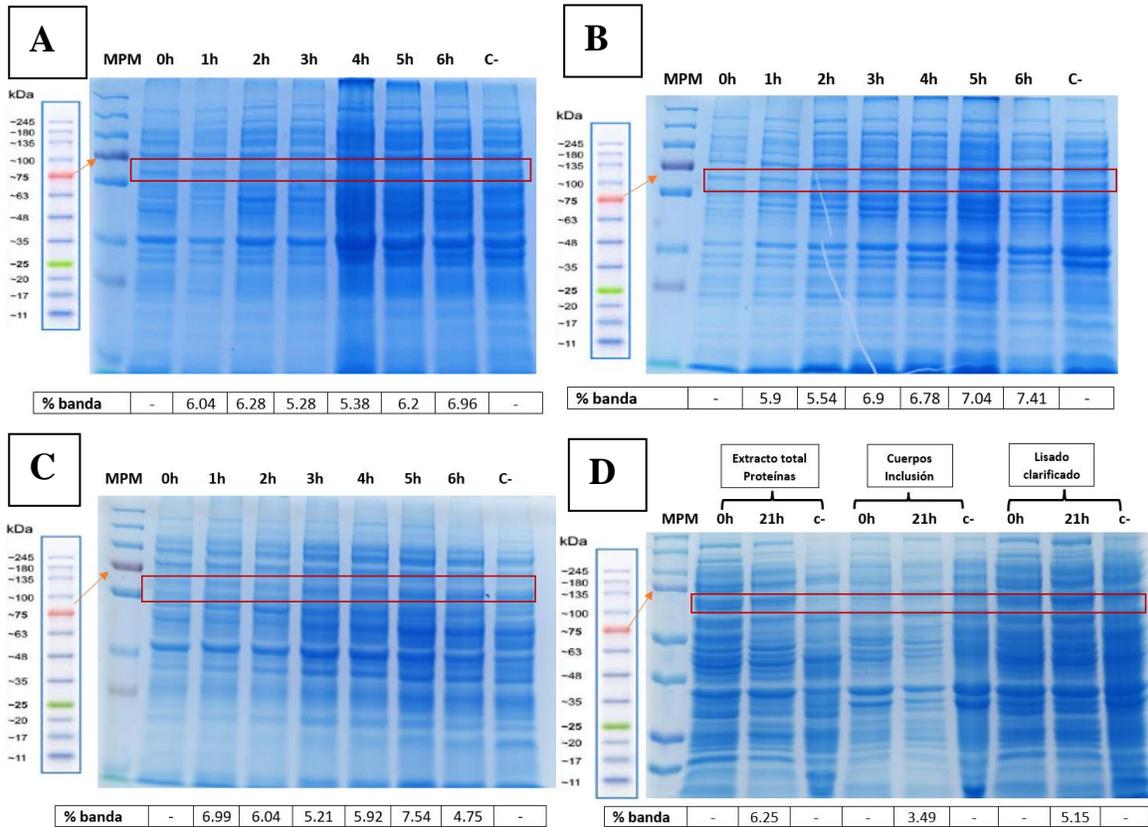
[BSA] mg/mL	Promedio (595nm)	Abs
0.1	0.142±0.0174	
0.3	0.370±0.0355	
0.5	0.506±0.0264	
0.7	0.664±0.0350	
0.9	0.914±0.0137	



**Figura 9.** Curva de calibración obtenida para la cuantificación por el método de Bradford empleando como estándar Albúmina de Suero bovino (BSA) y el promedio de las absorbancias a 595 nm de las réplicas realizadas.

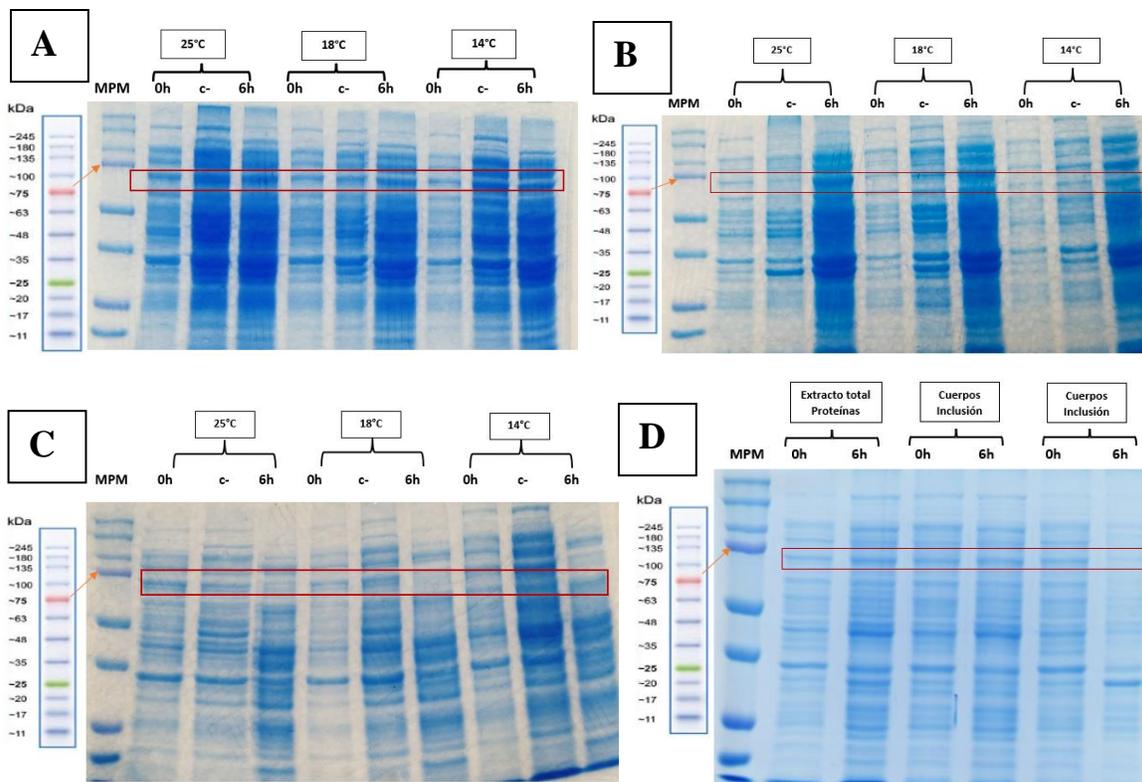
$$Abs_{595} = 0.9194 \times [TyDCr] + 0.0596 \quad (1)$$

De manera similar, la **Figura 10** ilustra los resultados obtenidos en la variación del tiempo de expresión de la enzima en cuestión. Así, se exhiben los geles de SDS-PAGE asociados a la solubilidad de TyDCr. Con esto, se determina un tiempo de expresión de 6h. En la sección de **ANEXOS** se presenta la información detallada con respecto a la cuantificación proteica.



**Figura 10.** Geles de SDS-PAGE producto de la expresión genética de TyDCr en *E. coli* (DE3) a diferentes tiempos, 37°C y 0.3 mM IPTG. A) CI, B) LC, C) ETP y D) ensayo a 21 h. Se esquematiza la zona cercana a 70 kDa (peso molecular de la enzima) y los porcentajes de banda obtenidos por densitometría.

En aras de visualizar algún cambio en la expresión de la enzima, se realizó el experimento a las temperaturas mencionadas. En la **Figura 11** se esquematiza los resultados obtenidos en este experimento, en donde se determina una posible temperatura de 14°C de expresión. La información detallada acerca de la cuantificación por el método de Bradford se encuentra en la sección de **ANEXOS**. Por último, se realiza la expresión empleando las condiciones mencionadas anteriormente y en la **Tabla 6** se reúne la información obtenida en la cuantificación proteica de este ensayo, empleando la curva obtenida en la **Figura 9** y la ecuación (1).



**Figura 11.** Geles de SDS-PAGE producto de la expresión genética de TyDCr en *E. coli* (DE3) a diferentes temperaturas, 0.3 mM IPTG a 6h. A) ETP, B) CI, C) LC y D) ensayo final de expresión genética (6h, 0.3 mM IPTG, 14°C). Se esquematiza la zona cercana a 70 kDa (peso molecular de la enzima).

Con respecto a la **Fig. 8C**, se puede observar la poca solubilidad de la enzima en tanto que no se encuentra en el medio de cultivo. Con esta figura se puede notar que la enzima no se sobre-expresa en el resto de las secciones de la célula (extracto total de proteínas, lisado clarificado y cuerpos de inclusión), representado en el bajo porcentaje de banda asociada a la enzima, en la zona que debería estar (alrededor de 70 kDa). De forma similar, en la **Fig. 10-11**, no se aprecia sobre-expresión alguna de la enzima de estudio. Lo mencionado, se podría deber, en parte al desconocimiento del mapa genético completo y la presencia del operón “lac” (promotor, operador y represor) en conjunto con la ARN polimerasa y promotor T7 o T5, según sea el caso<sup>28</sup>. Ello, gracias a que el IPTG en el medio de cultivo con la bacteria genéticamente transformada, se une con el represor y permite que al ARN polimerasa de *E. coli* transcriba el gen que codifica para la ARN polimerasa T7 o T5. Luego, la ARN

polimerasa T7 se une con el promotor T7 y permite, en últimas, la transcripción y traducción del gen recombinante de interés<sup>28</sup>.

**Tabla 6.** Resultados de la cuantificación por el método de Bradford del ensayo final de expresión genética

<b>Solubilidad Enzimática</b>	<b>Promedio Abs (595 nm)</b>	<b>Concentración proteína total (mg/mL)</b>	<b>% banda</b>	<b>Dilución (mL/mL)</b>	<b>Concentración TYDC (mg/mL)</b>
ETP	0.587	0.587	6.25	1/10	0.367
LC	0.667	0.667	5.15	1/10	0.343
CI	0.624	0.624	3.50	1/10	0.218

En el proceso de clonación molecular del artículo guía, no se menciona qué enzimas de restricción usaron para este proceso, pues se desconoce el sitio de corte de este, si se preserva o no el operón “lac” ni mucho menos si el gen se encuentra optimizado con respecto al porcentaje de GC<sup>19</sup>. Lo mencionado, es información sumamente valiosa ya que en términos genómicos, constituye dos de las pautas principales para una correcta expresión de una enzima recombinante en *E. coli*<sup>29</sup>. Esto debido a que el objetivo principal de los autores no es llevar a cabo la expresión genética de la enzima en *E. coli* sino más bien, determinar el contenido de tiramina en cepas ácido-lácticas por cuestiones de seguridad alimentaria<sup>19</sup>. Así, otros autores han reportado la expresión genética en cepas de *E. coli* de TyDC de manera exitosa, siguiendo las pautas dichas en este apartado: preservación de las estructuras genéticas de la maquinaria molecular “lac” en la clonación molecular y porcentaje de GC, empleando IPTG como inductor e incluso usando marcadores terminales de purificación como lo es la cola de polihistidina<sup>13,20</sup>. En contraste, en el artículo del cual fue donado el plásmido, no reportan expresión genética de la enzima en dicho microorganismo<sup>19</sup>.

En términos generales, se empleó la densitometría, que es una técnica óptica que permite determinar el porcentaje de banda específico dentro de todo un conjunto de bandas cuando un haz de luz que incide sobre todo un gel<sup>30</sup>. Con todo lo anterior, se pudo determinar la

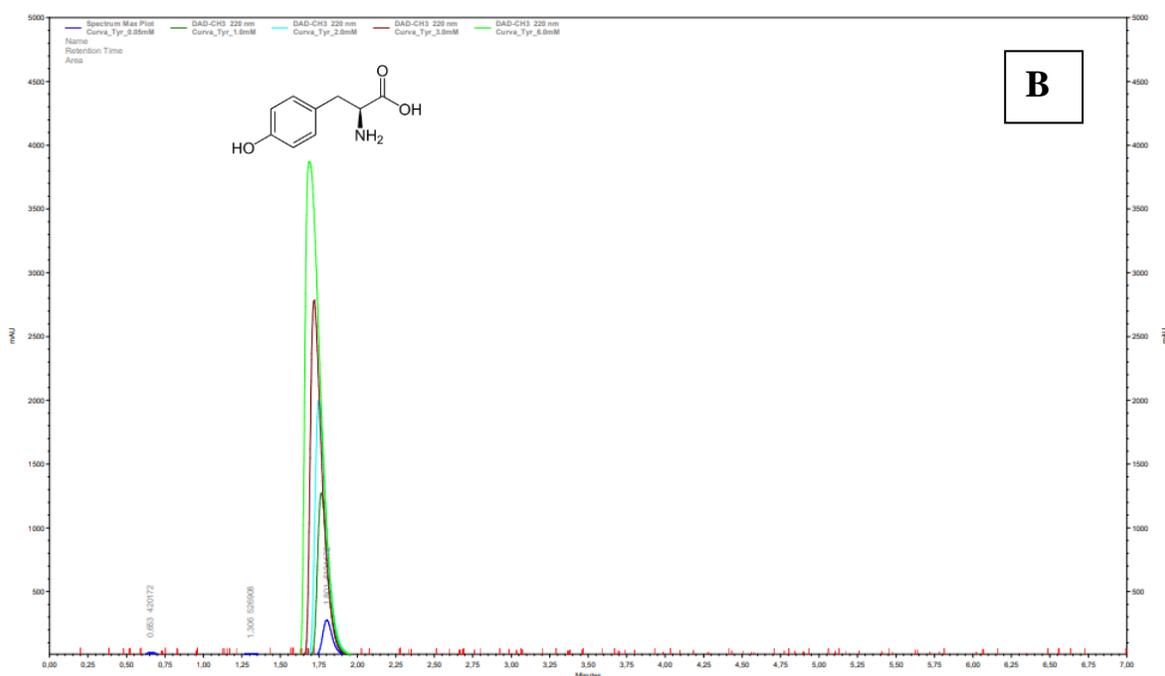
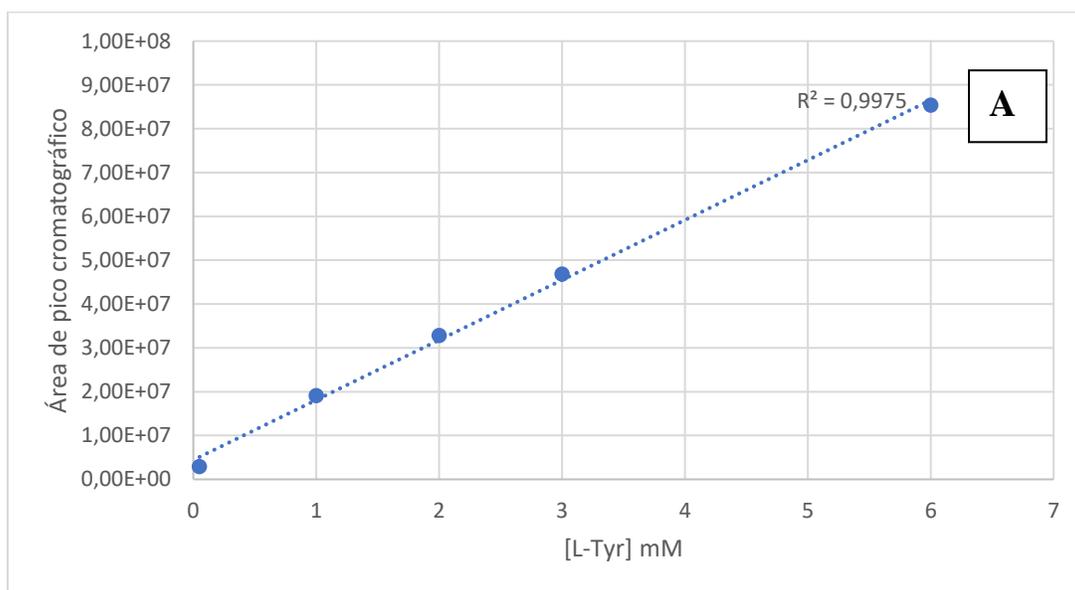
concentración asociada a una banda correspondiente, posiblemente, a la enzima en cuestión (**Tabla 6**). Esto, ya que la técnica de cuantificación de Bradford determina proteínas totales en una muestra problema y, con dicho porcentaje asociado a cada banda es posible la correlación de la concentración de la proteína particular. Asimismo, se empleó la respectiva curva de calibración (ecuación **(1)** y **Fig. 9**), la cual arrojó un coeficiente de correlación cercano a 1.0. Lo anterior, supone una correlación directa (positiva) de las variables de estudio: concentración del estándar de albúmina de suero bovino y la absorbancia a 595 nm<sup>31</sup>. Las mediciones se realizaron a esta longitud de onda específicamente, pues es la que presenta una mayor absorción en la química asociada de este método. En términos químicos, el reactivo de Bradford (Coomassie G-250) absorbe a máximo 465 nm, cuando hay presencia de proteínas en el medio genera un complejo azul que absorbe en un rango de 595-610 nm, siendo el mencionado el óptimo en términos espectroscópicos para mezclas de tonos azules, como la generada en este análisis colorimétrico<sup>32</sup>.

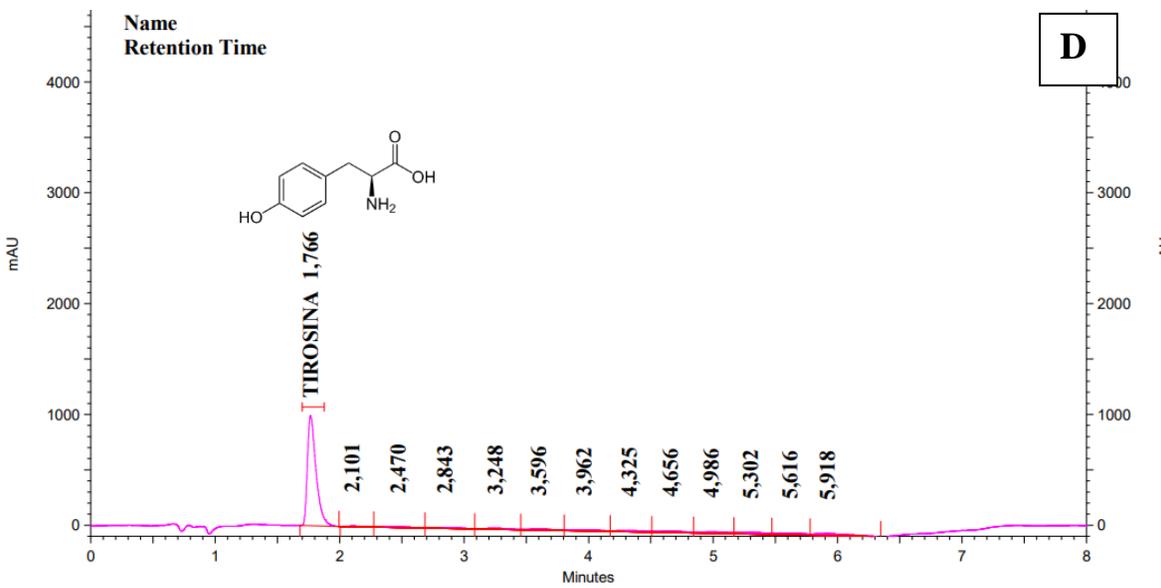
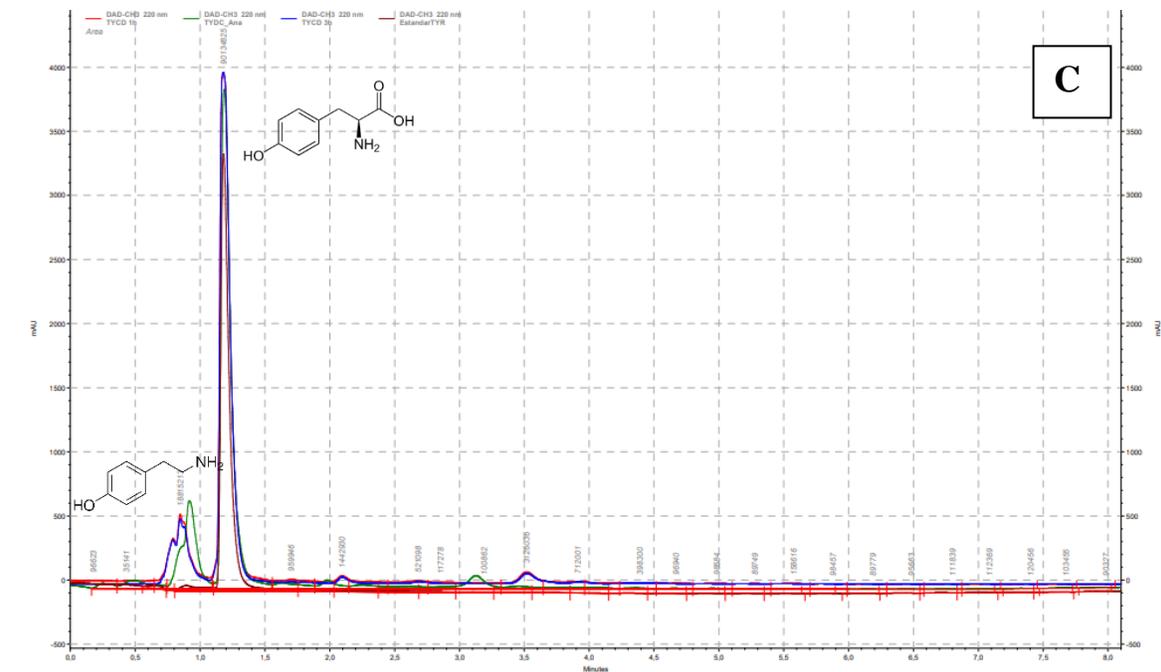
#### **4.3.Determinación de los parámetros cinéticos de TyDCr**

En primer lugar, se visualiza y cuantifica la presencia del sustrato empleando sistema cromatográfico descrito en la **Tabla 3**. En este orden de ideas, se realiza la respectiva curva de calibración y en la **Tabla 7**, ecuación **(2)** y **Figura 12** se reúne la información obtenida en este proceso. En segundo lugar, se cuantificó el consumo del sustrato empleando la curva obtenida y el área de pico cromatográfico obtenida para cada tiempo. Los cromatogramas obtenidos se presentan en la **Figura 12B-D** y se realiza una muestra de cálculo para la determinación de la concentración de sustrato en las muestras a diferentes tiempos, empleando como ejemplo el área de pico obtenida a 0h. Esta última información se expone en la **Tabla 8**.

**Tabla 7.** Datos de área bajo el pico cromatográfico de cada nivel de calibración y de las muestras de actividad enzimática a diferentes tiempos de actividad enzimática.

Concentración estándar L-Tyr (mM)	Área de pico cromatográfico
0.05	2.918E+06
1.0	1.910E+07
2.0	3.281E+07
3.0	4.682E+07
6.0	8.538E+07





**Figura 12.** A) Curva de calibración donde se muestra la concentración de sustrato (mM) con respecto al área de pico cromatográfico. Se exhibe el coeficiente de correlación obtenido en este proceso analítico. B) Cromatograma de la curva de calibración. C) Cromatograma de la evaluación biológica de la enzima a tres tiempos de actividad (0h en verde, 1h en rojo, 3h en azul) en contraste con el estándar de sustrato (rojo vivo). D) Control negativo, donde se emplea bacteria sin plásmido y sometida a un tiempo 1h de actividad enzimática.

$$\text{Área de pico cromatográfico} = 1.369 \times 10^7 [L - Tyr] + 4.424 \times 10^6 \quad (2)$$

$$[L - Tyr] = \frac{(8.499 \times 10^7) - (4.424 \times 10^6)}{1.369 \times 10^7 / \text{mM}} \times \frac{1 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} = 1.177 \text{ mM} \quad (2.1)$$

**Tabla 8.** Resultados obtenidos en la cuantificación de consumo de sustrato en la actividad biológica de TyDCr.

Muestra	Área de pico cromatográfico	[L-Tyr] mM
Muestra 0h*	8.499E+07	1.177
Muestra 1h*	9.013E+07	1.253
Muestra 3h*	9.100E+07	1.265

\*En todos los casos se empleó una dilución 1/5 (ml/ml).

En aras de realizar una aproximación a la actividad enzimática de la posible enzima en cuestión, se cuantificó un posible consumo del sustrato (L-Tirosina) y se visualizó en HPLC-DAD con las condiciones de la **Tabla 3**. En primer lugar, se obtuvo un coeficiente de correlación cercano a 1.0, indicando así una correcta elaboración de la curva de calibración y, por ende, una relación positiva entre las variables medidas en la **Fig. 12A**. Así, la **Fig. 12B** expone un aumento paulatino a medida que la concentración del analito aumenta, corroborando nuevamente una correcta elaboración de la curva de calibración. Con respecto a la **Fig. 12C** y la **Tabla 8**, se aprecia a las 0h de actividad enzimática una concentración menor de 5.5 mM de sustrato y<sup>13</sup>, a medida que el tiempo transcurre dicho compuesto se metaboliza muy poco, posiblemente por la bacteria y/o generando el compuesto de interés (p-tiramina).

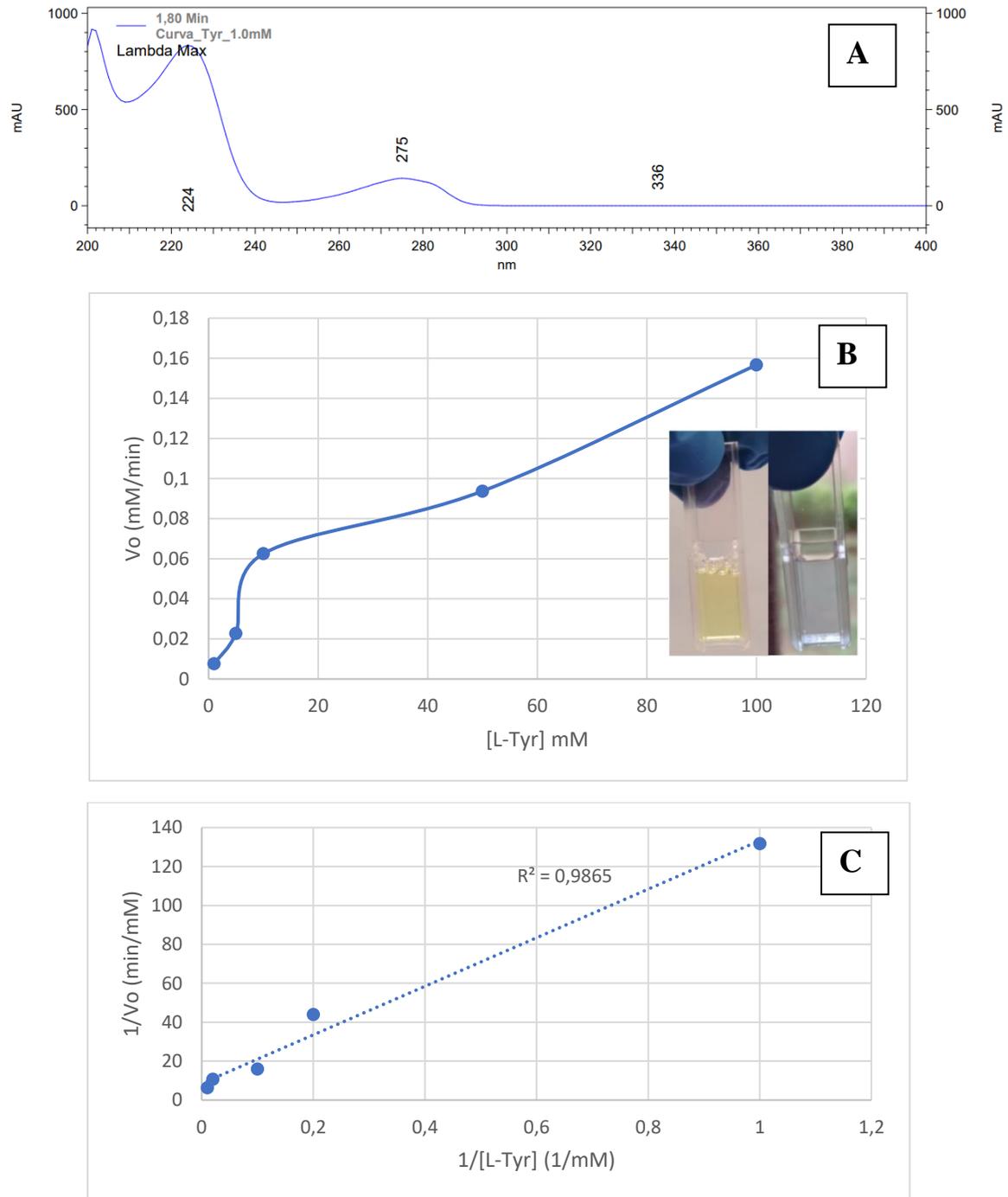
Con ello, a 220 nm es posible visualizar la presencia del sustrato a tiempo de retención cercano 1.2 y el producto de catálisis (p-tiramina) a un tiempo menor de 1.0, puesto que ambos compuestos absorben en dicha longitud de onda<sup>20</sup>. Según lo reportado por otros autores, la tiramina suele invertir su polaridad en presencia de agua, lo que hace que se retenga menos y eluya rápidamente con la fase móvil compuesta mayoritariamente por este solvente<sup>13,20</sup>. No obstante, no se puede aseverar que el pico co-eluido que se aprecia antes de la tirosina corresponde a la p-tiramina, pues se requiere un estándar de este compuesto tal y

como se tiene con la tirosina. Por otro lado, el cromatograma obtenido es similar a los que han obtenido otros autores, empleando exactamente las mismas condiciones utilizadas para este primer ensayo<sup>13,20</sup>. Lo anterior, se corrobora que el control negativo (bacteria sin plásmido a 1h de actividad) no presenta un pico antes del sustrato, lo que podría generar un posible indicio de que la bacteria está generando un compuesto químico en particular. Estos ensayos, podrían mejorarse empleando otras técnicas analíticas como HPLC acoplado a Espectrometría de Masa e incluso Cromatografía de Gases acoplado a un detector de flama para aseverar que el pico co-eluido antes del sustrato podría ser p-tiramina y no otro compuesto químico interferente. A nivel cromatográfico, se podría mejorar la corrida empleando un buffer, puesto que como se aprecia en las figuras anteriores, dichos compuestos químicos presentan picos no muy definidos y algunos, co-eluidos.

Se determinó el espectro de absorción del sustrato a 1 mM de concentración, como se muestra en la **Figura 13A**. Luego, a una concentración de 150 mM de sustrato, con la absorbancia máxima obtenida y usando la Ley de Beer-Lambert (ecuación **(3)**), se determinó el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de este compuesto químico (ver **Tabla 9**). En tercer lugar y empleando dicha ley y el coeficiente hallado, se halló la velocidad inicial de cada concentración de sustrato con la Abs388nm/min arrojado por el instrumento, donde la **Figura 13B** se grafica dicha cinética y en la **Tabla 9** se recopilan los datos. Se determinaron los parámetros cinéticos asociados a la enzima en los extractos bacterianos, los cuales se encuentran en la **Tabla 9**. Por último, se linealizó la información para obtener el respectivo gráfico de Michaelis-Menten (**Figura 13C**) y en las ecuaciones **(4-4.5)** de la sección de **ANEXOS** se obtienen estos parámetros.

$$Abs_{max} = C \times l \times \epsilon \quad (3)$$

$$\epsilon = \frac{224}{150mM \times 1cm} = 1.49mM^{-1}cm^{-1} \quad (3.1)$$



**Figura 13.** A) Espectro de absorción de L-Tirosina (1.0 mM) en metanol donde se aprecia una absorción máxima de 224 nm. B) Cinética enzimática de TyDCr en extractos bacterianos donde se grafica la velocidad inicial en función de la concentración de sustrato. C) Linealización de “Weaver-Burk” asociada a la cinética de la enzima en cuestión.

$$\frac{1}{v_o} = 124.73 \times \frac{1}{[L-Tyr]} + 8.5684 \quad (4)$$

**Tabla 9.** Datos obtenidos en la determinación experimental de los parámetros cinéticos de TyDCr en el extracto bacteriano

[Tyr] mM	Abs388nm/min	Vo (mM/min)	1/Vo (min/mM)	1/[Tyr] (1/mM)
100	0.234 ±0.0061	0.157	6.38	0.0100
50	0.14 ±0.024	0.0938	10.7	0.020
10	0.0933 ±0.010	0.0625	16.0	0.10
5.0	0.034±0.00058	0.0228	43.9	0.20
1.0	0.0113±0.00058	0.00759	132	1.0
Coeficiente de extinción molar L-Tyr (mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )		1.49		
% Error		6.05		
Parámetros Cinéticos de TyDCr en la célula				
Parámetro		Valor obtenido		
K <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )		0.397		
K <sub>M</sub> (mM)		14.6		
V <sub>max</sub> (mM s <sup>-1</sup> )		0.00195		
K <sub>cat</sub> / K <sub>M</sub> (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )		0.0273		
U/mg		0.0937		

Con respecto a la **Fig. 13A**, se obtiene un espectro de absorción del sustrato similar al reportado presenta dos transiciones electrónicas a 225 y 275 nm, siendo el primero el de mayor absorción ( $\lambda_{\text{máx.}}$ )<sup>33</sup>. Este valor, se asoció con la Ley de Beer-Lambert para determinar ( $\epsilon$ ) del sustrato y en últimas, los parámetros cinéticos de la enzima en la célula. Así, esta ley propone que la absorbancia de un analito es proporcional a su concentración, dicha proporcionalidad es entonces ( $\epsilon$ ) y el campo óptico (de 1 cm para celdas empleadas)<sup>34</sup>. Con esto, se obtuvo un ( $\epsilon$ ) cercano a lo reportado (1.405mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), esto indica un porcentaje de error bajo (**Tabla 9**) con respecto al reportado<sup>35</sup>.

Con respecto a la cinética enzimática que se aprecia en la **Fig. 13B**, se observa una curva típica de este proceso. Esto es, un incremento exponencial de la velocidad inicial de reacción con respecto a la concentración de sustrato, hasta llegar a un punto de “saturación”, donde ya la enzima efectúa una actividad constante<sup>36</sup>. El seguimiento de la biocatálisis fue realizado a 388 nm, donde absorbe el PLP<sup>37</sup>, tal y como se ve en la **Fig. 13B**, la reacción inicia de un tono amarillo característico de este compuesto y se torna turbio, característico de un extracto bacteriano, indicando así que el PLP se condensa químicamente con el sustrato (**Fig. 4**). Lo anterior, es ventajoso en tanto que no es necesario la derivatización química para seguir dicha reacción. Si bien, las reacciones catalizadas por enzimas son específicas y quimio-selectivas, al tratarse de un extracto bacteriano y no de una enzima libre, aseverar con una alta fidelidad de que la coenzima está reaccionando únicamente con el sustrato para ser catalizado por TyDCr es poco preciso (ver **Fig. 4**). Lo mencionado, en tanto que el PLP es capaz de reaccionar con otros aminoácidos como L-arginina, L-Asparagina y demás que pueden estar presentes en dicho extracto<sup>37</sup>.

Los parámetros cinéticos son poco contrastables con los reportados, ya que son asociados a enzimas puras. Mientras que la cinética realizada corresponde a la posible enzima presente en el extracto lisado de *E. coli*. No obstante, corresponde a un acercamiento a nivel de biosíntesis, pues sí se puede asegurar que existe una relación de proporcionalidad entre el inverso de la velocidad de reacción con respecto al inverso de la concentración del sustrato como se ve en la **Fig. 13B**<sup>36</sup>. Lo que quiere decir que, podría responder al modelo cinético propuesto por Weaver y Burk (ecuación (5))<sup>36</sup>.

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M}{v_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (5)$$

La anterior ecuación, propone entonces que el inverso del corte con el eje “Y” corresponde a la velocidad máxima (Vmax). Este parámetro se define, teóricamente, como la velocidad inicial de reacción cuando la concentración de sustrato tiende al infinito<sup>36</sup>. Por su parte, la constante de Michaelis-Menten (K<sub>M</sub>), es la concentración de sustrato a la cual la velocidad

de reacción alcanza la mitad de  $V_{max}$ , para este caso, se podría hipotetizar que a 14.6 mM de L-Tyr, la velocidad de reacción alcanzaría la mitad de  $V_{max}$ <sup>36</sup>. Por otro lado, la constante catalítica ( $K_{cat}$ ) corresponde al número de moléculas convertidas en sustrato en dicha reacción, lo que quiere decir que, TyDCr en el extracto podría convertir, químicamente, 0.397 moléculas de L-Tyr en p-tiramina<sup>36</sup>. Por otro lado, la eficiencia catalítica ( $K_m/K_{cat}$ ) provee información de cuán específica u eficiente es la enzima en cuestión y es útil si, a futuro, se desea evaluar la especificidad a diferentes sustratos, fenómeno conocido como promiscuidad enzimática<sup>36</sup>. Para finalizar, la actividad específica (U) es la medida internacional de la cantidad de enzima que puede transformar 1  $\mu$ mol de sustrato por unidad de tiempo en producto<sup>36,38</sup>. Cuando se expresa esta cantidad por mg de célula empleado, revela información de la actividad catalítica de una enzima inmersa en la célula, de gran relevancia en construcción de biofábricas bacterianas<sup>39</sup>. Así, se puede hipotetizar que, si la enzima se encuentra realmente en el extracto bacteriano, podría llegar a transformar químicamente, alrededor de 0.0937  $\mu$ mol de L-Tyr en p-tiramina por cada mg de bacteria por unidad de tiempo.

## 5. CONCLUSIONES

En conclusión y con respecto al primer objetivo específico, no se logra aseverar, de manera 100% confiable la obtención de la Tirosina Descarboxilasa recombinante (TyDCr) de *Lactococcus lactis* (IPLA 655) expresada en la cepa de BL21 (DE3) de *E. coli*. No obstante, se obtienen cepas bacterias resistente a Ampicilina y Kanamicina, coherente al plásmido donado. En términos genómicos, se amplifica alrededor de 631 pb del gen *tdcA* que codifica para la enzima en cuestión, con una temperatura de alineamiento determinada de alrededor 62.5°C para el juego de primers diseñados para este proceso. Igualmente, se logra una secuenciación con bajo porcentaje de identidad (37.5%) y de similitud (41.5%). A nivel proteómico, no se aprecia una sobre-expresión de TyDCr en los geles de SDS-PAGE a 70kDa, sin embargo, se hipotetiza que los parámetros posibles de expresión genética de la enzima podrían ser 14°C, 0.3 mM de IPTG y alrededor de 6h.

Con respecto al segundo objetivo específico, se realiza un posible acercamiento a la forma en la que se podrían determinar los parámetros cinéticos asociados a la enzima. Así, los parámetros de actividad enzimática obtenidos son poco contrastables, al estar la enzima inmersa en la célula y no de su forma pura. Sin embargo, se propone una forma sencilla de determinar dicha actividad enzimática, empleando un ensayo colorimétrico a una absorbancia de 388nm, siguiendo la reacción química por el aumento de la absorbancia de la misma coenzima (PLP). En términos metabólicos, se cuantifica por medio del HPLC la concentración de sustrato a diferentes tiempos de actividad biológica, donde no se aprecia un consumo significativo de dicho sustrato en tres tiempos evaluados (0, 1 y 3h) de actividad.

## 6. RECOMENDACIONES

- Emplear un plásmido que esté diseñado para expresarse *E. coli* u otro microorganismo de interés biotecnológico o en su defecto, generarlo empleando un plásmido como pET, pUC u otro vector, en conjunto con el gen optimizado y de origen sintético.
- Si se desea seguir usando el clúster, se debe aislar y purificar el gen *tdcA* y realizar la clonación molecular en un plásmido como los mencionados.
- Contrastar el ensayo de actividad biológica con un estándar de p-tiramina para aseverar la posible presencia de este compuesto químico. Igualmente, emplear un gradiente y una fase móvil con búfer en el HPLC-DAD, en tanto que los compuestos químicos se pueden protonar y desprotonar con facilidad, lo que podría mejorar la resolución de los picos cromatográficos. Asimismo, estos ensayos metabólicos podrían complementarse con instrumentación química de mayor precisión como lo podría ser la Espectrometría de Masas, como por ejemplo UPLC-MS en aras de obtener datos más acertados.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Georgiev, V., Ivanov, I. & Pavlov, A. Recent progress in amaryllidaceae biotechnology. *Molecules* vol. 25 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules25204670> (2020).
2. Lamoral-Theys, D. *et al.* *Lycorine and its Derivatives for Anticancer Drug Design. Reviews in Medicinal Chemistry* vol. 10 (2010).

3. Tan, X., Song, W., Chen, X., Liu, L. & Wu, J. Recent advances in biocatalytic derivatization of l-tyrosine. *Appl Microbiol Biotechnol* **104**, 9907–9920 (2020).
4. Courdavault, V., O'Connor, S. E., Jensen, M. K. & Papon, N. Metabolic engineering for plant natural products biosynthesis: New procedures, concrete achievements and remaining limits. *Nat Prod Rep* **38**, 2145–2153 (2021).
5. Ahmad, S., Garg, M., Tamboli, E., Abdin, M. & Ansari, S. In vitro production of alkaloids: Factors, approaches, challenges and prospects. *Pharmacognosy Reviews* vol. 7 27–33 Preprint at <https://doi.org/10.4103/0973-7847.112837> (2013).
6. Duman-Özdamar, Z. E. & Binay, B. Production of Industrial Enzymes via *Pichia pastoris* as a Cell Factory in Bioreactor: Current Status and Future Aspects. *Protein Journal* vol. 40 367–376 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s10930-021-09968-7> (2021).
7. Khan, S. *et al.* Role of recombinant DNA technology to improve life. *International Journal of Genomics* vol. 2016 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2016/2405954> (2016).
8. Kurek, J. Introductory Chapter: Alkaloids - Their Importance in Nature and for Human Life. *Alkaloids - Their Importance in Nature and Human Life* (2019) doi:10.5772/INTECHOPEN.85400.
9. De, F., Ringuélet, J. & Viña, S. Productos Naturales Vegetales Libros de Cátedra. (2013).
10. Takos, A. M. & Rook, F. Towards a Molecular Understanding of the Biosynthesis of Amaryllidaceae Alkaloids in Support of Their Expanding Medical Use. *Int J Mol Sci* **14**, 11713 (2013).
11. He, M., Qu, C., Gao, O., Hu, X. & Hong, X. Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances* vol. 5 16562–16574 Preprint at <https://doi.org/10.1039/c4ra14666b> (2015).
12. Information on EC 4.1.1.25 - tyrosine decarboxylase - BRENDA Enzyme Database. <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=4.1.1.25>.
13. Zhang, K. & Ni, Y. Tyrosine decarboxylase from *Lactobacillus brevis*: Soluble expression and characterization. *Protein Expr Purif* **94**, 33–39 (2014).
14. Kezmarsky, N. D., Xu, H., Graham, D. E. & White, R. H. Identification and characterization of a L-tyrosine decarboxylase in *Methanocaldococcus jannaschii*. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1722**, 175–182 (2005).
15. Linares, D. M., Martín, M. C., Ladero, V., Alvarez, M. A. & Fernández, M. Biogenic Amines in Dairy Products. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.582813> **51**, 691–703 (2011).

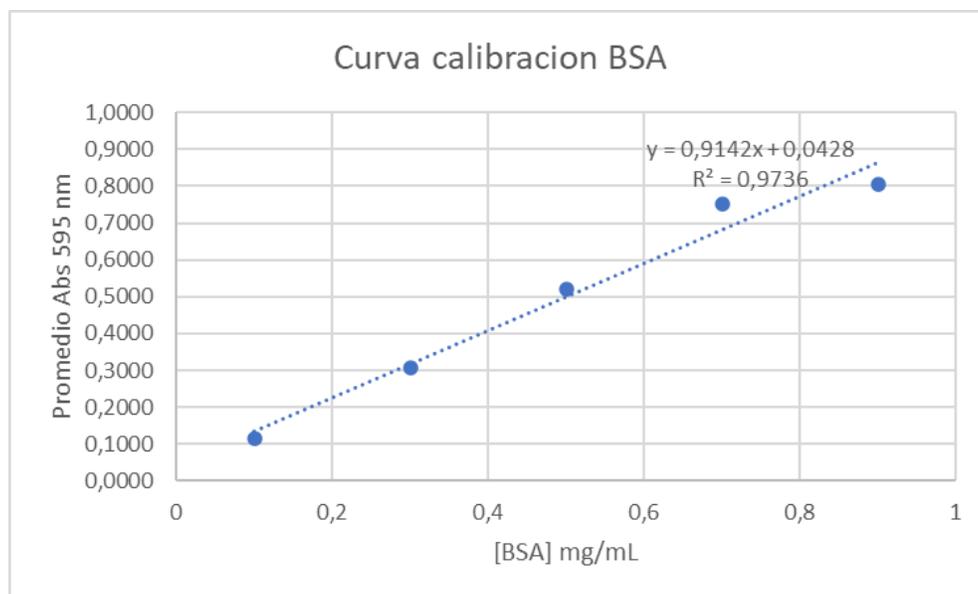
16. Wang, R. *et al.* Cloning and characterization of a tyrosine decarboxylase involved in the biosynthesis of galanthamine in *Lycoris aurea*. (2019) doi:10.7717/peerj.6729.
17. Designed Research; M, J.-K. W. P. Structural basis for divergent and convergent evolution of catalytic machineries in plant aromatic amino acid decarboxylase proteins. doi:10.1073/pnas.1920097117/-/DCSupplemental.
18. Zhu, H. *et al.* Crystal structure of tyrosine decarboxylase and identification of key residues involved in conformational swing and substrate binding. *Sci Rep* **6**, 27779 (2016).
19. Mari', M., Ferná'ndez, M., Ferná'ndez, F., Linares, D. M. & Alvarez, M. A. *Sequencing of the Tyrosine Decarboxylase Cluster of Lactococcus lactis IPLA 655 and the Development of a PCR Method for Detecting Tyrosine Decarboxylating Lactic Acid Bacteria. Journal of Food Protection* vol. 67 [http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/67/11/2521/1674402/0362-028x-67\\_11\\_2521.pdf](http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/67/11/2521/1674402/0362-028x-67_11_2521.pdf) (2004).
20. Jiang, M. *et al.* Improving Soluble Expression of Tyrosine Decarboxylase from *Lactobacillus brevis* for Tyramine Synthesis with High Total Turnover Number. *Appl Biochem Biotechnol* **188**, 436–449 (2019).
21. Vipra, M., Patil, N. & Sivaram, A. Applications of Recombinant DNA Technology. 143–157 (2022) doi:10.1007/978-3-030-96851-9\_9.
22. Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* **5**, (2014).
23. Faust, G., Stand, A. & Weuster-Botz, D. IPTG can replace lactose in auto-induction media to enhance protein expression in batch-cultured *Escherichia coli*. *Eng Life Sci* **15**, 824–829 (2015).
24. Phan, A. P. H., Noo, T. T. & Lenhoff, H. M. *Tyrosine Decarboxylase Spectrophotometric Assay and Application in Determining Pyridoxal-5'-Phosphate. APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY* vol. 8 (1983).
25. Sambrook, J. & Russell, D. W. Preparation and Transformation of Competent *E. coli* Using Calcium Chloride. *Cold Spring Harb Protoc* **2006**, pdb.prot3932 (2006).
26. Salazar Montes, Adriana., Sandoval Rodríguez, Ana. & Armendáriz Borunda, Juan. *Biología molecular : fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud.* (McGraw-Hill Interamericana, 2013).
27. Obayes, H. PCR Troubleshooting. (2016).

28. Ravishankar, S. *et al.* An IPTG Inducible Conditional Expression System for Mycobacteria. *PLoS One* **10**, e0134562 (2015).
29. Zylicz-Stachula, A., Zolnierkiewicz, O., Sliwinska, K., Jezewska-Frackowiak, J. & Skowron, P. M. Modified ‘one amino acid-one codon’ engineering of high GC content TaqII-coding gene from thermophilic *Thermus aquaticus* results in radical expression increase. *Microb Cell Fact* **13**, 7 (2014).
30. Tan, H. Y. & Ng, T. W. Accurate step wedge calibration for densitometry of electrophoresis gels. *Opt Commun* **281**, 3013–3017 (2008).
31. Asuero, A. G., Sayago, A. & González, A. G. The Correlation Coefficient: An Overview. *Crit Rev Anal Chem* **36**, 41–59 (2006).
32. Kruger, N. J. The Bradford Method For Protein Quantitation. in 17–24 (2009). doi:10.1007/978-1-59745-198-7\_4.
33. Fornander, L. H., Feng, B., Beke-Somfai, T. & Nordén, B. UV Transition Moments of Tyrosine. *J Phys Chem B* **118**, 9247–9257 (2014).
34. Skoog, D., Holler, J. & Crouch, S. *Principios de Análisis Instrumental*. (Cengage Learning Editores, 2008).
35. Michaelian, K. & Simeonov, A. Fundamental molecules of life are pigments which arose and co-evolved as a response to the thermodynamic imperative of dissipating the prevailing solar spectrum. *Biogeosciences* **12**, 4913–4937 (2015).
36. Marngoni, A. *Enzyme Kinetics A Modern Approach*. (Wiley Interscience, 2003).
37. Liang, J., Han, Q., Tan, Y., Ding, H. & Li, J. Current Advances on Structure-Function Relationships of Pyridoxal 5'-Phosphate-Dependent Enzymes. *Front Mol Biosci* **6**, (2019).
38. Bell, E. L. *et al.* Biocatalysis. *Nature Reviews Methods Primers* **1**, 46 (2021).
39. Lin, B. & Tao, Y. Whole-cell biocatalysts by design. *Microb Cell Fact* **16**, 106 (2017).



**Anexo 2.** Datos de la cuantificación por Bradford de TyDCr en los extractos bacterianos en el proceso de expresión genética, evaluando diferentes concentraciones de IPTG.

TRATAMIENTO (6h)	MUESTRA EXTRACTO [IPTG]	MEDICIÓN 1	MEDICIÓN 2	MEDICIÓN 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN (%)	Concentración proteína total (mg/mL)	% banda	Concentración TYDC (mg/mL)
1 (Pellet- Extracto total)	0.1	0.083	0.172	0.132	0.1290	4.4576	0.0943	4.8	0.004526089 333
	0.3	0.512	0.148	0.152	0.2707	20.9010	0.2493	5.21	0.012986530 53
	0.7	0.512	0.566	0.605	0.5610	4.6701	0.5669	4.71	0.026698873 28
	1	1.316	0.929	1.055	1.1000	19.7385	1.1565	5.16	0.059673494 96
2 (Sobrenadante- Lisado)	0.1	0.959	0.669	0.423	0.6837	26.8301	0.7010	6.37	0.044656196 88
	0.3	0.513	0.518	0.528	0.5197	0.7638	0.5216	5.79	0.030203004 55
	0.7	0.151	0.095	0.011	0.0857	7.0465	0.0469	3.87	0.001814701 914
	1	1.113	0.9	0.752	0.9217	18.1473	0.9614	4.56	0.043839183 21
2 (Pellet- Cuerpo Inclusión)	0.1	1.197	0.725	0.74	0.8873333 333	26.8284	0.9238286 232	7.16	0.066146129 42
	0.3	0.561	0.492	0.54	0.531	3.5369	0.5340382 86	4.36	0.023284069 27
	0.7	0.293	0.183	0.547	0.341	18.6687	0.3261987 237	5.6	0.018267128 53
	1	0.474	0.397	0.673	0.5146666 667	14.2423	0.5161713 763	5.45	0.028131340 01

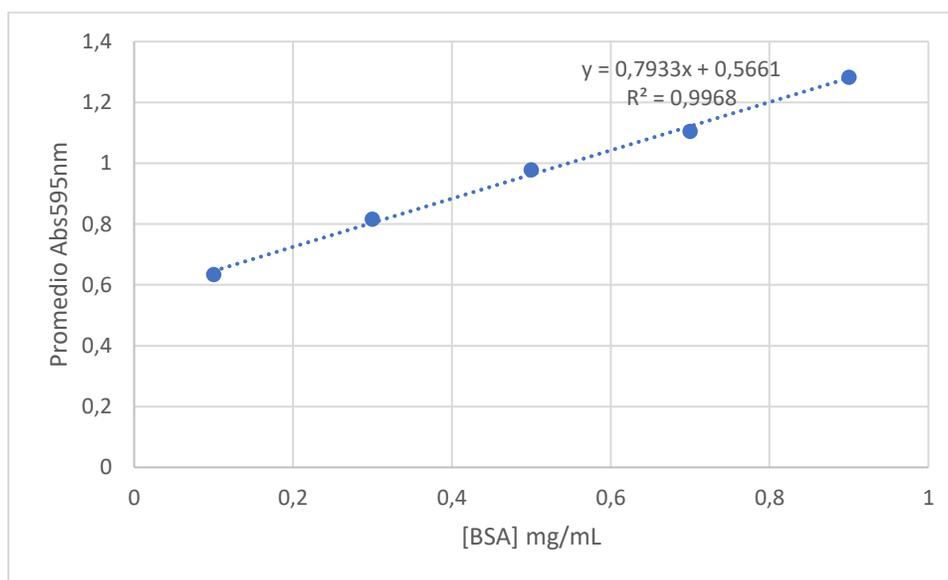


**Anexo 3.** Curva de calibración empleada en la cuantificación por Bradford de TyDCr en los extractos bacterianos en el proceso de expresión genética, evaluando diferentes concentraciones de IPTG.

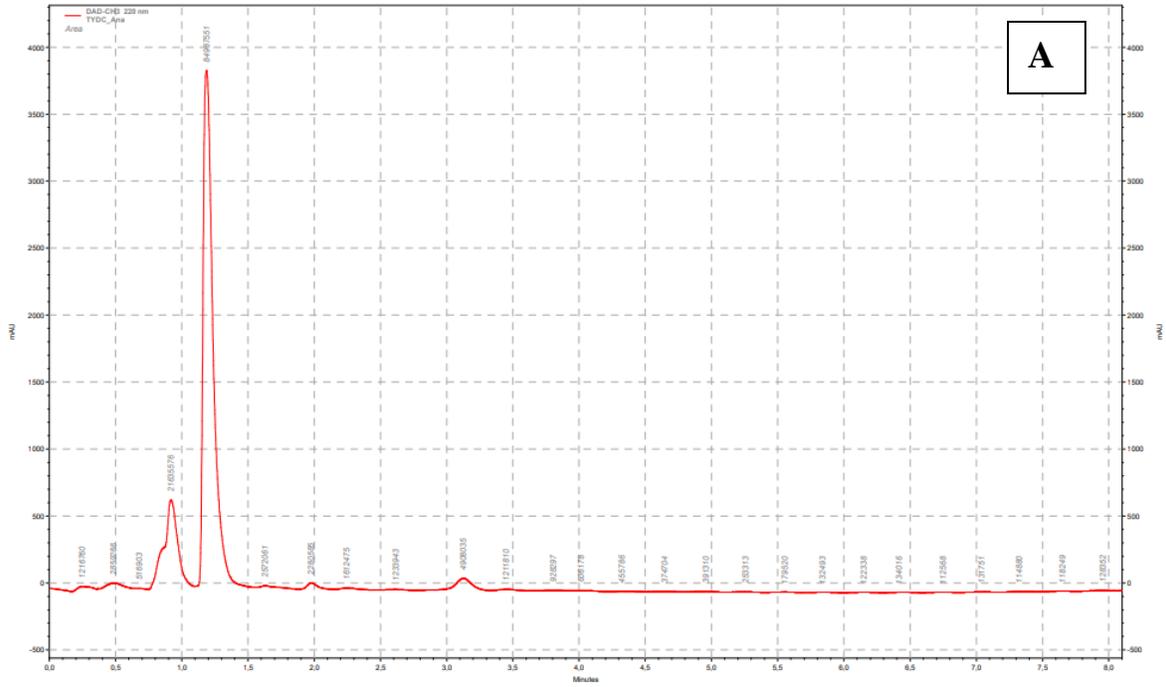
**Anexo 4.** Datos de la cuantificación por Bradford de TyDCr en los extractos bacterianos en el proceso de expresión genética, evaluando diferentes tiempos de expresión.

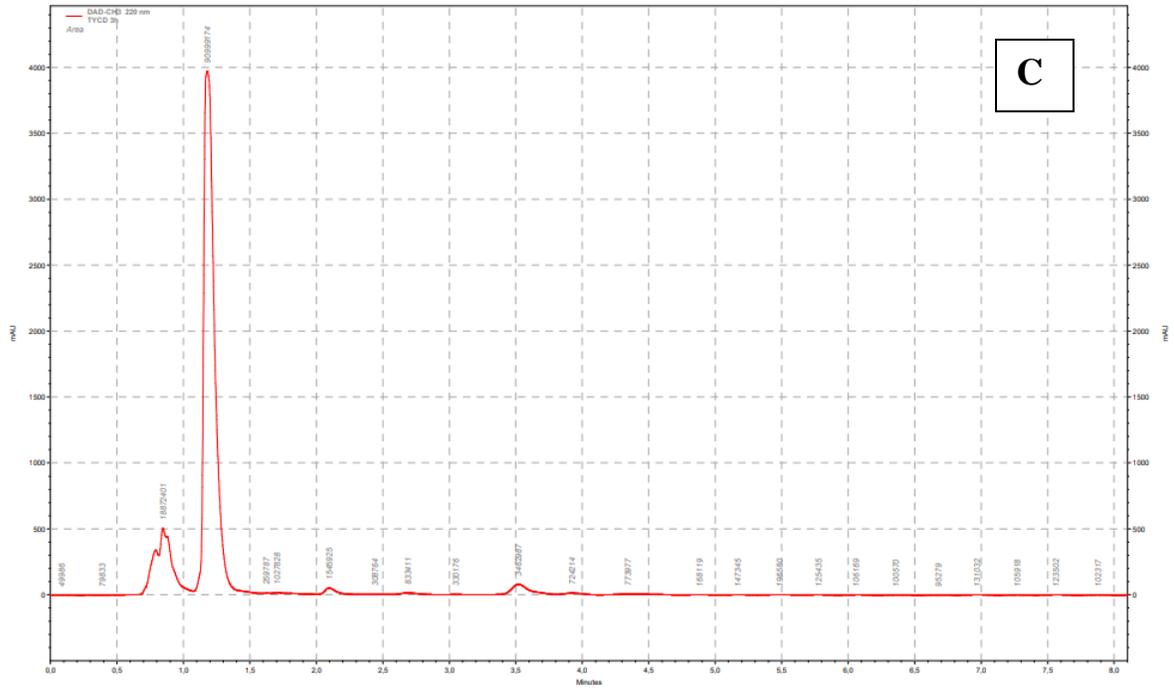
TRATAMIENTO (6h)	MUESTRA	EXTRACTO [h]	MEDICIÓN 1	MEDICIÓN 2	MEDICIÓN 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN (%)	Concentración proteína total (mg/mL)	% banda	Concentración TYCD (mg/mL)
1 (Pellet-Extracto total)	1	1	0.825	0.822	0.823	0.8233	0.1528	1.0791	6.04	0.065
	2	0.94	0.934	0.93	0.9347	0.5033	1.2250	6.28	0.077	
	3	1.027	1.254	0.902	1.0610	17.8446	1.3906	5.28	0.073	
	4	1.256	0.948	1.016	1.0733	16.1806	1.4067	5.38	0.076	
	5	1.072	0.981	1.324	1.1257	17.7686	1.4753	6.2	0.091	
	6	0.905	1.034	1.348	1.0957	22.7847	1.4360	6.96	0.100	
2 (Sobrenadante-Lisado)	1	1	0.466	1.015	1.047	0.8427	32.6595	1.1044	5.9	0.065
	2	1.47	1.591	0.698	1.2530	48.4437	1.6422	5.54	0.091	
	3	0.477	1.052	1.1	0.8763	34.6665	1.1485	6.9	0.079	
	4	0.705	0.762	0.686	0.7177	3.9552	0.9406	6.78	0.064	
	5	0.744	0.572	1.666	0.9940	58.8289	1.3028	7.04	0.092	

2 (Pellet-Cuerpo Inclusión)	6	0.938	0.945	1.889	1.2573	54.7051	1.6479	7.41	0.122
	1	1.18	1.169	1.175	1.1747	0.5508	1.5395	6.99	0.108
	2	0.499	0.545	1.159	0.7343	36.8491	0.9624	6.04	0.058
	3	0.614	0.656	1.475	0.9150	48.5429	1.1992	5.21	0.062
	4	0.659	1.49	1.391	1.1800	45.3906	1.5465	5.92	0.092
	5	0.769	1.62	1.461	1.2833	45.2465	1.6820	7.54	0.127
	6	0.543	0.549	0.97	0.6873	24.4815	0.9008	4.75	0.043



**Anexo 5.** Curva de calibración empleada en la cuantificación por Bradford de TyDCr en los extractos bacterianos en el proceso de expresión genética, evaluando diferentes tiempos.





**Anexo 6.** Cromatogramas obtenidos en la evaluación biológica de TyDCr a A) 0h, B) 1h y C) 3h.

## Calibration Report

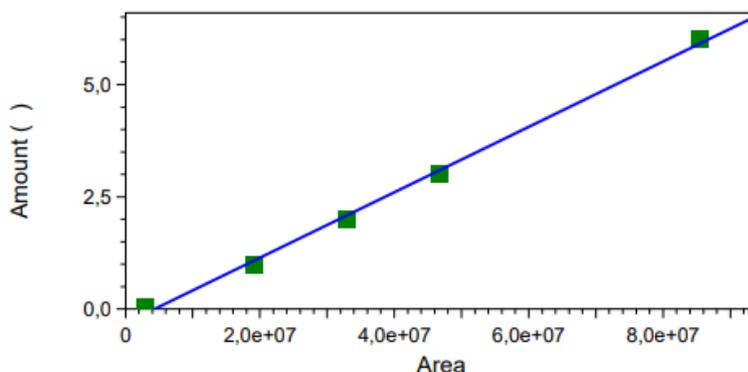
A

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Liquid\_Chrome\Method\Ana\_Tydc.met  
 Print Time: 10/10/2022 12:46:37 p.m.  
 User: SYSTEM  
 Instrument: LCU - 2

### TIROSINA (DAD-CH1)

Average RF: 5,29592e-008 RF StDev: 2,10429e-008 RF %RSD: 39,7342  
 Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off  
 Replicate Mode: Replace  
 Fit Type: Linear  
 $y = 7,28892e-008x - 0,316437$   
 Goodness of fit ( $r^2$ ): 0,997475

Peak: TIROSINA -- ESTD -- DAD-CH1



B

	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Amount	0,05	1	2	3	6
Area	2918049	19102113	32810657	46815728	85379628
RF	1,713473625 69991e-008	5,23502295269 639e-008	6,095580469479 78e-008	6,408102849538 09e-008	7,0274375053 4964e-008
Last Area					
Residual	0,153743	-0,0759005	-0,075105	-0,0959231	0,093186
Rep StDev					
Rep %RSD					
Rep 1 Area	2918049	19102113	32810657	46815728	85379628
Rep 1 User	SYSTEM	SYSTEM	SYSTEM	SYSTEM	SYSTEM
Rep 1 Data File	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Derivatizacion\PT\Kevin\Curva_Tyr_0.05mM012.dat	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Derivatizacion\PT\Kevin\Curva_Tyr_1.0mM013.dat	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Derivatizacion\PT\Kevin\Curva_Tyr_2.0mM014.dat	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Derivatizacion\PT\Kevin\Curva_Tyr_3.0mM015.dat	C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Derivatizacion\PT\Kevin\Curva_Tyr_6.0mM016.dat
Rep 1 Sample ID	Curva_Tyr_0.05mM	Curva_Tyr_1.0mM	Curva_Tyr_2.0mM	Curva_Tyr_3.0mM	Curva_Tyr_6.0mM
Rep 1 Calib. Time	10/10/2022 12:18:47 p.m.	10/10/2022 12:19:31 p.m.	10/10/2022 12:20:06 p.m.	10/10/2022 12:20:37 p.m.	10/10/2022 12:46:11 p.m.

**Anexo 7.** A) Curva de calibración obtenida por el sistema de HPLC-DAD para la cuantificación de L-Tyr en los extractos bacterianos durante la evaluación biológica de TyDCr. B) Datos recopilados por el equipo en este proceso analítico.

## Anexo 8. Cálculo de los Parámetros de Actividad Enzimática

$$V_{max} = \frac{1mM}{8.5684min} \times \frac{1min}{60s} = 1.9451 \times 10^{-3} mM s^{-1} \quad (4.1)$$

$$K_M = 124.73min \times 1.9451 \times 10^{-3} mM s^{-1} \times \frac{60s}{1min} = 14.557mM \quad (4.2)$$

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[TyDCr]} = \frac{1.9451 \times 10^{-3} mM s^{-1}}{\frac{0.343gTyDCr}{L} \times \frac{1molTyDCr}{70000gTyDCr} \times \frac{1000milimol}{1mol}} = 0.397s^{-1} \quad (4.3)$$

$$Eficiencia\ catalítica = \frac{K_{cat}}{K_M} = \frac{0.397s^{-1}}{14.557mM} = 0.02727s^{-1}mM^{-1} \quad (4.4)$$

$$U = \frac{mol\ L-Tyr}{mg\ bacteria \times min} = \frac{5.5 \times 10^4 \mu mol\ L-Tyr}{1000mL} \times 5mL \times \frac{1}{586.9mg \times 5min} = 9.3712 \times 10^{-3} U/mg \quad (4.5)$$

