

SÍNTESIS MICROBIANA DE MOLÉCULAS DE PLANTAS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 La presente invención se encuentra dentro del campo tecnológico de los métodos de síntesis de moléculas en procesos de fabricación de nuevos medicamentos para el tratamiento sintomático de enfermedades.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 10 El potencial terapéutico de los alcaloides de amarilidáceas (AA) abarca desde la inhibición de la colinesterasa, usado en tratamiento sintomático de alzhéimer, hasta actividades anticancerígenas, antimicrobianas y antivirales (M. He et al., 2015; Jayawardena et al., 2024).

- 15 La molécula 4OMN deriva de dos precursores, que son el 3,4-dihidroxibenzaldehido (3,4-DHBA) y la p-tiramina (Desgagné-Penix, 2021). La p-tiramina se puede sintetizar por descarboxilación de tirosina mediante una reacción que cataliza una tirosina descarboxilasa (EC 4.1.1.25). Esta actividad se ha descrito en especies microbianas como, por ejemplo, *Levilactobacillus brevis* (Moreno-Arribas & Lonvaud-Funel, 2001; Zhang & Ni, 2014).

- 20 Así mismo, la producción de p-tiramina se ha implementado en cepas recombinantes de *Escherichia coli* superproductoras de tirosina que incluyen la sobreexpresión de la tirosina descarboxilasa de *L. brevis* (TDC, AFP73381.1, ID SEC No. 12) (Koma et al., 2020).

- 25 A su vez, el 3,4-DHBA es un metabolito vegetal que también deriva de aminoácidos aromáticos, como son la fenilalanina y la tirosina.

- En la literatura de patentes se observa, por ejemplo, el documento US4681852A que divulga un método para producir fenilalanina que comprende el cultivo de cepas de la bacteria *Escherichia coli*, en donde se elimina la inhibición de la enzima DAHP sinteasa por fenilalanina, tirosina o triptófano; se elimina la inhibición de la enzima corismato mutasa P-prefenato deshidratasa por fenilalanina y en las que se logran niveles mejorados de producción de las enzimas DAHP sinteasa, corismato mutasa P-prefenato deshidratasa y shikimato quinasa.
- 30

La patente WO2019030808A1 revela un microorganismo modificado perteneciente al género *Escherichia* en el que se introducen los siguientes

genes siguientes junto con un promotor inducible por expresión en un cromosoma: *aroA*, *aroB*, *aroC*, *aroG* fbr o *aroF* fbr, *pheA* fbr o *tyrA* fbr.

La patente WO2015196100A1 divulga una planta transgénica, que dentro de su genoma, expresa una secuencia de nucleótidos heteróloga, en donde la secuencia de nucleótidos heteróloga codifica una enzima, en donde la enzima se selecciona del grupo que consiste en una O-metiltransferasa de clase I, una P450 y una norbelladina sintasa/reductasa; en donde dicha O-metiltransferasa de clase I es una 4'-O-metiltransferasa; en donde dicha 4'-O-metiltransferasa es una norbelladina 4'-O-metiltransferasa; en donde dicha norbelladina 4'-O-metiltransferasa convierte la norbelladina en 4'-O-metilnorbelladina; en donde dicha norbelladina 4'-O-metiltransferasa se selecciona del grupo que consiste en NpN40MT1 (SEQ ID NO: 15), NpN40MT2 (SEQ ID NO: 17), NpN40MT3 (SEQ ID NO: 19), NpN40MT4 (SEQ ID NO: 21) y NpN40MT5 (SEQ ID NO: 23).

Si bien en el estado de la técnica obran diferentes antecedentes que describen la síntesis de derivados de aminoácidos aromáticos en cepas microbianas (Cao et al., 2020; Koma et al., 2020; Örn et al., 2021; Sakae et al., 2023), como *E. coli*, hasta el momento no se ha reportado la síntesis microbiana de 3,4-DHBA. La actividad antimicrobiana descrita para el componente 3,4-DHBA (Friedman et al., 2003; Wang et al., 2024) supone un cuello de botella para desarrollar un método de síntesis microbiana de 4OMN.

En este contexto, la presente invención proporciona un método para la síntesis de la molécula 4OMN a partir de la síntesis microbiana de la molécula 3,4-DHBA. El método para la producción microbiana del precursor universal de los AA, esto es, la 4'-O-metilnorbelladina (4OMN), servirá de plataforma para desarrollar métodos de producción microbiana específicos para los distintos AA.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona el método para la síntesis de 4'-O-metilnorbelladina (4OMN) a partir de L-tirosina o glucosa, incluyendo la síntesis microbiana de su precursor 3,4-dihidroxibenzaldehído (3,4-DHBA).

El método de síntesis microbiana objeto de la presente invención implementa la ruta metabólica de plantas (Desgagné-Penix, 2021) en chasis microbianos.

Al implementar la ruta metabólica de plantas en chasis microbianos, el método objeto de la presente invención simplifica la extracción y purificación de los AA, al implementar el procedimiento en chasis microbianos que son más fáciles y económicos de cultivar. De esta forma, se logra reducir el impacto ambiental y en la biodiversidad que genera la extracción de AA de fuentes naturales, reduciendo el impacto ecológico y económico que genera el cultivo *in vitro* o la síntesis química de los AA (Koirala et al., 2022), permitiendo la democratización del uso generalizado de estos compuestos, al igual que el estudio, innovación y desarrollo de derivados.

El método de síntesis microbiana de 4OMN comprende tirosina como sustrato y la expresión microbiana de las proteínas tirosina descarboxilasa de *L. brevis* (LbTDC) y norbelladina sintasa, noroxomaritidine/norcraugsodine reductasa y norbelladina 4'-O-metiltransferasa de *N. pseudonarcisus* (NpNBS, NpNR y NpN4OMT) en combinación con la síntesis microbiana de 3,4-DHBA que requiere también el sustrato tirosina y la expresión de las enzimas tirosina amonio liasa de *R. glutinis* (RgTAL), el complejo 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa de *E. coli* (EcHpaBC), 4-cumarato-CoA ligasa de *A. thaliana* (At4CL) y hydroxycinnamoyl-CoA hidratasa/liasa de *P. fluorescens* (PfHCHL), (representado en la caja (a), Figura 1).

En una modalidad de realización, el método de síntesis microbiana de 3,4-DHBA puede utilizar 3-DHS como sustrato y la expresión de las enzimas 3-dihidroshikimato deshidratasa de *P. putida* (PpQuiC) y ácido carboxílico reductasa y fosfopanteteinil transferasa de *N. iowensis* (NiCAR y NiNPT).

El método se implementa en un chasis microbiano que sintetiza tirosina a partir del consumo de fuentes de carbono como la glucosa, proporcionando así el sustrato requerido.

Los objetos anteriormente descritos, al igual que los objetos adicionales a que hubiere lugar, serán expuestos al detalle y con la suficiencia necesaria en el capítulo descriptivo que se divulga a continuación, el cual constituirá el fundamento del capítulo reivindicatorio.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema del método de síntesis de 4OMN objeto de la invención implementado en un chasis microbiano.

Figura 2. Síntesis microbiana de p-cumárico y ácido cafeico con extractos catalíticos. Detección de síntesis de p-cumárico y ácido cafeico por TLC. Se analizaron mezclas de extracto catalítico, de cultivos inducidos, con sustrato L-tirosina 0.5 mM, después de una incubación de 15h a 37°C. (a) con extracto de BL21(DE3)-tal, (b) BL21(DE3)_pETM6-RgTALsyn-HpaBC y (c) BL21(DE3)-tal-BC.

El control negativo (-) corresponde a una muestra de extracto de BL21(DE3)-tal que se incubó sin sustrato. Se muestran estándares de p-cumárico (pC, banda naranja), ácido cafeico (AC, banda negra). Las muestras se movilizaron con T:AE:AF 6:6:1,2 y se reveló la placa con FeCl₃ 0.5% p/v.

- 5 Figura 3. Síntesis microbiana de PCA y 3,4-DHBA en cultivo. Detección de síntesis de PCA y 3,4-DHBA por TLC. Se analizaron muestras de cultivos crecidos hasta fase estacionaria en medio M9M2. Se muestran las cepas (a) M-PAR-241-mquiC-npt crecida con 0,1 mM IPTG, (b) M-PAR-241-mquiC-npt con 0 mM IPTG y (c) M-PAR-241-car-npt con 0,1 mM IPTG, que sirve de control negativo. Se muestran
10 estándares de PCA y 3,4-DHBA (D). Las muestras se movilizaron con C:M:AF 85:10:5 y se reveló la placa con FeCl₃ 0.5% p/v.

- Figura 4. Síntesis microbiana de 3,4-DHBA con extractos catalíticos. Detección de síntesis de 3,4-DHBA por TLC. Se analizaron mezclas de extractos catalíticos, de cultivos inducidos con IPTG, después de una incubación de 15h a 37°C. (I) mezcla
15 de los extractos M-PAR-241-tal-BC, BL21(DE3)-4cl y BL21(DE3)-hchl; (II) mezcla de los extractos BL21(DE3)-4cl y BL21(DE3)-hchl con ácido cafeico 0,5 mM; (III) mezcla del extracto BL21(DE3)-4cl con ácido cafeico 0,5 mM; (IV) mezcla del extracto BL21(DE3)-hchl con ácido cafeico 0,5 mM. Se muestran estándares de ácido cafeico (AC, banda negra), 3,4-DHBA (D, banda negra) y p-cumárico (pC,
20 banda naranja). Las muestras se movilizaron con C:M:AF 85:10:5 y se reveló la placa con FeCl₃ 0.5% p/v.

- Figura 5. Expresión de NBS, NR y N4OMT en las distintas cepas M-PAR-241-3N. (A) SDS-PAGE; (B) transferencia western con el anticuerpo anti-T7tag. Muestras de cultivos inducidos a OD₆₀₀ 0.6 con 0,1 mM IPTG, 3h: (1) M-PAR-241-3N[1]; (1B)
25 M-PAR-241-3N[1B]; (1C) M-PAR-241-3N[1C]; (2) M-PAR-241-3N[2]; (4) M-PAR-241-3N[4]; y (4C) M-PAR-241-3N[4C]. Se analizaron 10 µg de proteína total de cada muestra en (A) y 25 µg en (B).

- Figura 6. Síntesis microbiana de 4OMN con extractos catalíticos. Se analizó por TLC la disminución de 3,4-DHBA en la reacción de síntesis de 4OMN a partir de la
30 incubación a 37°C de la mezcla de extracto catalítico de M-PAR-241-3N[4C], inducido con IPTG, con los sustratos 3,4-DHBA 0,5mM y p-tiramina 0,5mM, después de una incubación de 1 min (a) o 12h (b). Se muestran estándares de 3,4-DHBA (D) y 4OMN. Las muestras se movilizaron con C:M:AF 85:10:5 y se reveló la placa con FeCl₃ 0.5% p/v.

- 35 Figura 7. Representación esquemática de la cepa BABH10. La cepa BABH10 está construida a partir de un chasis M-PAR-241, que es una cepa de E. coli superproductora de L-tirosina y p-tiramina. Contiene la sobreexpresión genómica de la tirosina descarboxilasa de L. brevis (LbTDC). La cepa incorpora un vector (rombo

gris) que aporta los genes para la expresión de las enzimas tirosina amonio liasa de *R. glutinis* (RgTAL), el complejo 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa de *E. coli* (EcHpaBC) y hydroxycinnamoyl-CoA hidratasa/liasa de *P. fluorescens* (PfHCHL) y un segundo vector (rectángulo gris) que aporta los genes de 4-cumarato-CoA ligasa de *A. thaliana* (At4CL), norbelladina sintasa, noroxomaritidine/norcraugsodine reductasa y norbelladina 4'-O-metiltransferasa de *N. pseudonarcisus* (NpNBS, NpNR y NpN4OMT). Se ha incluido una esquematización simplificada de las reacciones enzimáticas relevantes para la síntesis de 4OMN en esta versión del método de la invención.

- 10 Figura 8. Evaluación de la cepa BABH10. (A) Cinéticas de crecimiento. El gráfico muestra la cinética de crecimiento por OD600 de la cepa BABH10 en medio M9M2 con (a) 0 mM IPTG (línea negra); (b) 0,1mM de IPTG aplicado al inicio del crecimiento (línea de puntos gris); y (c) 0,5 mM de IPTG aplicado a mitad de fase exponencial (línea discontinua gris). Se muestran datos correspondientes al promedio de tres réplicas biológicas. Las barras de error representan la desviación estándar. (B) Evaluación de la producción de metabolitos por TLC. Detección de síntesis de 3,4-DHBA por TLC. Se analizaron muestras de cultivos crecidos hasta fase estacionaria en medio M9M2 e inducción con 0,5 mM de IPTG aplicado a mitad de fase exponencial de dos clones de la cepa BABH10 (c1 y c2). (R y R2) muestras control con 3,4-DHBA y ácido cafeico; Las muestras se movilaron con C:M:AF 85:10:5 y se reveló la placa con FeCl3 0.5% p/v.

- Figura 9. Representación esquemática de la cepa BABH8. La cepa BABH8 está construida a partir de un chasis M-PAR-241, que es una cepa de *E. coli* superproductora de L-tirosina y p-tiramina. Contiene la sobreexpresión genómica de la tirosina descarboxilasa de *L. brevis* (LbTDC). La cepa incorpora un vector (rombo gris) que aporta los genes para la expresión de las enzimas 3-dihidrosnikotianamido dehidratasa de *P. putida* (PpQuiC) y fosfopanteteinil transferasa de *N. iowensis* (NiNPT) y un segundo vector (rectángulo gris) que aporta los genes de ácido carboxílico reductasa (NiCAR), norbelladina sintasa, noroxomaritidine/norcraugsodine reductasa y norbelladina 4'-O-metiltransferasa de *N. pseudonarcisus* (NpNBS, NpNR y NpN4OMT). Se ha incluido una esquematización simplificada de las reacciones enzimáticas relevantes para la síntesis de 4OMN en esta versión del método de la invención.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona el método de síntesis de la molécula 4OMN empleando un sustrato seleccionado entre L-tirosina o glucosa, a partir de la síntesis microbiana de la molécula 3,4-DHBA, precursor necesario para la síntesis de 4OMN.

La descripción de la realización de la presente invención no pretende limitar su alcance, sino servir como un ejemplo particular de la misma. Se espera que una persona versada en la materia comprenda que las modalidades equivalentes no se apartan del espíritu y alcance de la presente invención en su forma más amplia.

- 5 Dentro del contexto de la presente descripción, se entiende como síntesis microbiana de la molécula 4OMN y de su precursor 3,4-DHBA la producción a partir de la concatenación de reacciones que catalizan enzimas contenidas en un chasis microbiano en presencia de sustrato.

Se entiende como chasis microbiano una célula procariota que puede incorporar
10 cassettes de expresión de enzimas heterólogas y que proporciona los elementos necesarios para la expresión y/o actividad de dichas enzimas heterólogas. La célula procariota puede ser *E. coli* como, por ejemplo, la cepa BL21(DE3) o una cepa superproductora de tirosina y/o p-tiramina u otras.

Se entiende que un elemento o enzima es heterólogo si no es propio del organismo.

- 15 Se entiende que la célula procariota incorpora cassettes de expresión cuando adquiere vectores que puede replicar y mantener o por inserciones en su genoma que contienen dichos cassettes de expresión.

Se entiende como cassettes de expresión una secuencia de DNA que contiene una secuencia codificante que incluye un gen precedido por una secuencia RBS, que
20 regula su traducción, precedido de una secuencia promotora que regula su transcripción. En algunos casos, la secuencia codificante puede incluir más de un gen. En algunos casos, cada gen incluido va precedido de una secuencia RBS propia.

- Se entiende que el sustrato es la sustancia que se proporciona al inicio de la síntesis
25 microbiana.

Para la síntesis de 4OMN se requieren dos precursores, que son la p-tiramina, que se produce en bacteria por descarboxilación de L-tirosina, y el 3,4-DHBA, que es un metabolito de plantas que no se ha sintetizado en bacteria hasta el momento.

La invención proporciona el método de síntesis microbiana de 3,4-DHBA a partir de
30 tirosina mediante el cultivo e inducción de cepas recombinantes de *E. coli* que sobreexpresan las siguientes cuatro enzimas: tirosina amonio liasa (TAL, EC 4.3.1.23, ID SEC NO. 1) de *Rhodotorula glutinis*, el complejo de 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa (HpaBC, EC 1.14.14, ID SEC NO. 2 y 3) de *E. coli*, 4-cumarato-CoA ligasa (4CL, EC 6.2.1.12, ID SEC NO. 4) de *Arabidopsis thaliana* y
35 hydroxycinnamoyl-CoA hidratasa/liasa (HCHL, ID SEC NO. 5) de *Pseudomonas fluorescens*. Alternativamente, la síntesis microbiana de 3,4-DHBA es a partir de precursores de la síntesis de tirosina, como la molécula 3-dihidroshikimato (3-DHS),

mediante el cultivo e inducción de cepas recombinantes de *E. coli* que sobreexpresan las siguientes tres enzimas: 3-dihidroschikimate deshidratasa de *Pseudomonas putida* (QuiC, ID SEC NO. 6) y ácido carboxílico reductasa (CAR, ID SEC NO. 7) de *Nocardia iowensis*, co-expresada junto a su fosfopanteteinil transferasa (NPT, ID SEC NO. 8) para su activación post-traducciona

El método de la invención, a su vez, combina la síntesis microbiana de 3,4-DHBA con la sobreexpresión de las siguientes cuatro enzimas: TDC de *L. brevis* (ID SEC No. 12), norbelladina sintasa (NBS, ID SEC NO. 9), noroxomaritidina/norcraugsodina reductasa (NR, ID SEC NO. 10) (Kilgore et al., 2016; Singh & Desgagné-Penix, 2017; Singh et al., 2018) y norbelladina 4'-O-metiltransferasa (N4OMT, ID SEC NO. 11) (D'Oelsnitz et al., 2023; Kilgore et al., 2014; Koirala et al., 2024) de *Narcissus pseudonarcissus*.

El método de producción microbiana de 4OMN (Figura 1) a partir de L-tirosina requiere el cultivo de cepas recombinantes de *E. coli* que sobreexpresan las enzimas TAL, HpaBC, 4CL, HCHL, TDC, NBS, NR y N4OMT (ID SEC NO. 1-5 y 9-12). Alternativamente, el método de producción microbiana de 4OMN es a partir de L-tirosina y/o precursores de tirosina, como la molécula 3-DHS, mediante el cultivo de cepas recombinantes de *E. coli* que sobreexpresan las enzimas QuiC, CAR, NPT, TDC, NBS, NR, N4OMT (ID SEC NO. 6-12).

En algunas modalidades de realización, el método de producción microbiana de 4OMN es implementado en cepas recombinantes de *E. coli* superproductoras de tirosina y se utiliza glucosa como fuente de carbono para la síntesis de 3,4-DHBA y, por consiguiente, para la síntesis de 4OMN.

La implementación de este método en cepas microbianas que metabolizan sucrosa permite la síntesis de 3,4-DHBA y, por consiguiente, la síntesis de 4OMN utilizando fuentes de carbono biosostenibles y más económicas como la sucrosa o melazas derivadas del cultivo de caña o similares.

En algunas modalidades de realización, el sustrato para la síntesis de la molécula 3,4-DHBA es la molécula L-tirosina que es deaminada a p-cumárico, que es hidroxilado generando ácido cafeico, que se conjuga con acetil-coA produciendo cafeoyl-coA, que al escindir de nuevo el acetil-coA produce 3,4-DHBA y las cuatro reacciones están catalizadas por las enzimas tirosina amonio liasa (TAL, EC 4.3.1.23, ID SEC NO. 1) de *Rhodotorula glutinis*, el complejo de 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa (HpaBC, EC 1.14.14, ID SEC NO. 2 y 3) de *E. coli*, 4-cumarato-CoA ligasa (4CL, EC 6.2.1.12, ID SEC NO. 4) de *Arabidopsis thaliana* y hydroxycinnamoyl-CoA hidratasa/liasa (HCHL, ID SEC NO. 5) de *Pseudomonas fluorescens*.

En otros casos, el sustrato para la síntesis de 3,4-DHBA es la molécula 3-DHS, que es un metabolito microbiano de la ruta del shikimato para la síntesis de aminoácidos aromáticos como la tirosina, que es deshidratada produciendo ácido protocatechuico (PCA), que se descarboxila generando el aldehído 3,4-DHBA y las
5 dos reacciones están catalizadas por las enzimas 3-dihidroshikimato dehidratasa de *Pseudomonas putida* (QuiC, ID SEC NO. 6) y ácido carboxílico reductasa (CAR, ID SEC NO. 7) de *Nocardia iowensis*, co-expresada junto a su fosfopanteteinil transferasa (NPT, ID SEC NO. 8).

La síntesis microbiana de 4OMN se produce por la reducción y metilación del
10 producto de condensación de dos sustratos, 3,4-DHBA y p-tiramina, que son tres reacciones catalizadas por las enzimas norbelladina sintasa (NBS, ID SEC NO. 9), noroxomaritidine/norcraugsodine reductasa (NR, ID SEC NO. 10) y norbelladina 4'-O-metiltransferasa (N4OMT, ID SEC NO. 11) de *Narcissus pseudonarcissus*.

En algunas modalidades de realización, los sustratos para la síntesis microbiana de
15 4OMN son las moléculas 3,4-DHBA, producida según la síntesis microbiana proporcionada por el método de la invención, y la p-tiramina, generada por descaboxilación de tirosina por la enzima TDC (ID SEC NO. 12).

En otras modalidades, el sustrato es la glucosa presente en el medio de cultivo que metaboliza a L-tirosina y/o 3-DHS el chasis microbiano. En otras modalidades, el
20 sustrato es otra fuente de carbono presente en el medio de cultivo, e.g. sucrosa, que metaboliza a L-tirosina y/o 3-DHS en el chasis microbiano.

En algunas modalidades, el chasis microbiano es una célula recombinante de *E. coli* que contiene cassettes de expresión para todas y cada una de las enzimas del método y la síntesis de 3,4-DHBA y/o 4OMN se produce en el cultivo de la célula
25 microbiana.

En otras modalidades, la producción resulta de la mezcla del sustrato con un extracto catalítico de célula total que se obtiene por cultivo y lisis de uno o más chasis microbianos que en conjunto contienen las enzimas del método.

Será obvio para un experto en la materia que el método no se limita por las enzimas
30 especificadas en esta descripción y que la sustitución de dichas enzimas por otras enzimas homólogas u ortólogas y/o que catalizan reacciones idénticas o similares no se considerará como modificación del método descrito en esta invención.

A continuación, se describen algunos ejemplos a modo ilustrativo de algunos aspectos detallados en la descripción, pero no deben considerarse limitantes en la
35 aplicación de la invención.

Se detalla la síntesis de los metabolitos de interés 3,4-DHBA o 4OMN a partir del cultivo e inducción de cepas recombinantes de *E. coli* y/o preparación de extractos catalíticos que contienen las enzimas (a) TAL, HpaBC, 4CL y HCHL o (b) mQuiC, CAR y NPT o (c) TAL, HpaBC, 4CL, HCHL, TDC, NBS, NR y N4OMT o (d) mQuiC, CAR, NPT, TDC, NBS, NR y N4OMT.

Materiales y métodos.

Se describen los materiales y métodos empleados en los ejemplos detallados debajo a modo ilustrativo, pero no limitan la aplicación de esta invención. Métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos a continuación serán obvios para un experto en la materia y podrán ser usados para el ensayo o implementación de esta invención.

Secuencias.

Las secuencias utilizadas en los ejemplos se desglosan en el capítulo anexo. El anexo incluye las secuencias de los vectores generados en este trabajo.

ID SEC No.	Descripción
1	Tirosina amonio liasa (TAL) de <i>R. glutinis</i>
2	HpaB
3	HpaC
4	4-cumarato-CoA ligasa (4CL) de <i>A. thaliana</i>
5	Hydroxycinnamoyl-CoA hidratasa/liasa (HCHL) de <i>P. fluorescens</i>
6	3-dihidroshikimato desidratasa (QuiC) de <i>P. putida</i>
7	Ácido carboxílico reductasa (CAR) de <i>N. iowensis</i>
8	Fosfopanteteinil transferasa (NPT) de <i>N. iowensis</i>
9	Norbelladina sintasa (NBS) de <i>N. pseudonarcissus</i> King Alfred
10	Noroxomaritidine/norcraugsodine reductasa (NR) de <i>N. pseudonarcissus</i> King Alfred
11	Norbelladina 4'-O-metiltransferasa (N4OMT) de <i>N. pseudonarcissus</i>
12	Tirosina descarboxilasa (TDC) de <i>L. brevis</i>
13	6HtT7-TAL

14	10H-4CL
15	6HT7-HCHL
16	MBP-QuiC
17	mQuiC
18	6HtT7-CAR
19	6HtT7-NPT
20	6HtT7-NBS
21	6HT7-NBS
22	6H-NR
23	NR-6H
24	6Ht-N4OMT
25	6Ht-N4OMTA53M
27	Tag T7
28	Tag 6xHis
29	Tag 10xHis
30	Secuencia polipeptídica que incluye tags de 6xHis, sitio de corte por trombina y T7 (6HtT7)
31	Secuencia polipeptídica que incluye tags de 6xHis y T7 (6HT7)
32	Péptido <i>linker</i> rico en asparagina

Tabla S.I. Secuencias polipeptídicas.

ID NUC No.	Descripción	Origen
1	Secuencia sintética codificante de tirosina amonio liasa (TAL) de <i>R. glutinis</i>	Addgene #100949 (Jones et al., 2017)

2	Secuencia sintética codificante de 4-cumarato-CoA ligasa (4CL) de <i>A. thaliana</i>	Addgene #139798 (Fink et al., 2020)
3	Secuencia sintética codificante de hydroxycinnamoyl-CoA hidratasa/liasa (HCHL) de <i>P. fluorescens</i> con un tag T7 en N-ter	SynBioTech
4	Secuencia sintética codificante de 3-dihidros hikimato dehidratasa (QuiC) de <i>P. putida</i> con un tag de 6xHis en C-ter	SynBioTech
5	Secuencia sintética codificante de una proteína de fusión entre mRFP y 3-dihidros hikimato dehidratasa (QuiC) de <i>P. putida</i> con un linker de 10xN entre las dos proteínas y un tag de 6xHis en C-ter del polipéptido	este trabajo
6	Secuencia sintética codificante de ácido carboxílico reductasa (CAR) de <i>N. iowensis</i>	SynBioTech
7	Secuencia sintética codificante de fosfopanteteinil transferasa (NPT) de <i>N. iowensis</i> con un tag de 6xhis en el extremo N-ter	SynBioTech
8	Secuencia sintética codificante para la fosfopanteteinil transferasa (NPT) de <i>N. iowensis</i> con un tag de 6xhis en el extremo N-ter e incluye una secuencia RBS32 en el extremo 5'	SynBioTech
9	Secuencia sintética codificante de norbelladina sintasa (NBS) de <i>N. pseudonarcissus</i> King Alfred	SynBioTech
10	Secuencia sintética codificante de noroxomaritidine/norcraugsodine reductasa (NR) de <i>N. pseudonarcissus</i> King Alfred	SynBioTech
11	Secuencia sintética codificante de norbelladina 4'-O-metiltransferasa (N4OMT) de <i>N. pseudonarcissus</i>	SynBioTech
12	Secuencia sintética codificante de norbelladina 4'-O-metiltransferasa (N4OMT) de <i>N. pseudonarcissus</i> con la mutación A53M	Addgene #216232 (D'Oelsnitz et al., 2023)

13	Operón codificante del complejo 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa (HpaBC) de <i>E. coli</i>	BL21(DE3) (Prieto & Garcia, 1994)
14	RBSg10L	T7 bacteriophage genoma (Olins & Rangwala, 1989)
15	RBS32	BBa_B0032
16	RBS34	BBa_B0034
17	RBS5000	(Ceroni et al., 2015)
18	RBS9500	(Ceroni et al., 2015)
19	Promotor pT7lac	(Dubendorf & Studier, 1991)
20	Promotor pTac	BBa_K86440 0
21	Vector pET28-tal (ID VEC No. 8)	este trabajo
22	Vector pET28-tal-BC (ID VEC No. 9)	este trabajo
23	Vector pET28-hchl (ID VEC No. 10)	este trabajo
24	Vector pET28-hchl-tal-BC (ID VEC No. 11)	este trabajo
25	Vector pMAL-quiC (ID VEC No. 12)	este trabajo
26	Vector pET28-mquiC (ID VEC No. 13)	este trabajo
27	Vector pET28-car (ID VEC No. 14)	este trabajo
28	Vector pET28-npt (ID VEC No. 15)	este trabajo
29	Vector pET28-car-npt (ID VEC No. 16)	este trabajo
30	Vector pET28-npt-mquiC (ID VEC No. 17)	este trabajo
31	Vector pET28-nbs (ID VEC No. 18)	este trabajo

32	Vector pET28-nr (ID VEC No. 19)	este trabajo
33	Vector pET28-nbs-nr (ID VEC No. 20)	este trabajo
34	Vector pET28-n4omt (ID VEC No. 21)	este trabajo
35	Vector pACYCT-3N[2] (ID VEC No. 22)	este trabajo
36	Vector pACYCT-3N[4] (ID VEC No. 23)	este trabajo
37	Vector pACYCT-3N[4C] (ID VEC No. 24)	este trabajo
38	Vector pACYCT-3N[4D] (ID VEC No. 25)	este trabajo
39	Vector pACYCT-3N[1] (ID VEC No. 26)	este trabajo
40	Vector pACYCT-3N[1B] (ID VEC No. 27)	este trabajo
41	Vector pACYCT-3N[1C] (ID VEC No. 28)	este trabajo
42	Vector pACYCT-3N[4C]-4cl (ID VEC No. 29)	este trabajo
43	Vector pACYCT-3N[4C]-car (ID VEC No. 30)	este trabajo

Tabla S.II. Secuencias nucleotídicas.

Genes, vectores y cepas.

En la tabla S.II se detalla la secuencia de los genes sintéticos con optimización de codón para la expresión en *E. coli* de las enzimas heterólogas TAL (ID SEC No. 11), 4CL (ID SEC No. 14), HCHL (ID SEC No. 15), QuiC (ID SEC No. 16), CAR (ID SEC No. 17), NPT (ID SEC No. 18), NBS (ID SEC No. 19), NR (ID SEC No. 20) y N4OMT (ID SEC No. 21) utilizados en los ejemplos. En la tabla S.II se incluye la secuencia del operón *hpaBC* (ID SEC No. 10) que se aisló del genoma de *E. coli* BL21(DE3) para clonarlo en vectores de expresión (Prieto & Garcia, 1994). Los genes sintéticos se compraron en SynBioTech o se aislaron de vectores adquiridos en Addgene.

Los vectores de expresión utilizados en los ejemplos derivan de pET19b, pET28a o pACYCT y se describen en la tabla M.I. Para generar los distintos vectores de expresión se utilizaron técnicas estándar de PCR (Phusion HS II polimerasa de NEB), clonaje por enzimas de restricción (Thermo Scientific) y la cepa de clonaje DH5 α (Thermo Scientific) de *E. coli*. Para aislar vectores o purificar fragmentos de DNA se usaron kits comerciales de Thermo Scientific.

Todas las cepas de *E. coli* utilizadas en los ejemplos derivan de BL21(DE3) (Thermo Scientific) o de las cepas M-PAR-120, M-PAR-121 y M-PAR-241, que son cepas modificadas genéticamente para la superproducción de fenilalanina o tirosina o p-tiramina, respectivamente (Koma et al., 2020). Los genotipos relevantes se detallan en la tabla M.II. Será obvio para un experto en la materia que cepas con modificaciones similares o equivalentes servirán de chasis alternativo para la aplicación de la invención y que las cepas listadas en la tabla II fueron elegidas ejemplo representativo de cepas que contienen el profago DE3 y/o que son superproductoras de fenilalanina y/o tirosina y/o p-tiramina.

5

10

Las cepas de *E. coli* de los ejemplos de debajo se generaron por transformación por el método de *heat-shock* de células competentes preparadas con el método del Inoue (Green & Sambrook, 2020).

ID VEC No.	nombre vector	descripción	origen
1	pET28a	Vector de expresión de bajo número de copia, con Ori COLE1. Contiene gen de selección por kanamicina. Contiene el gen de LacI con promotor lacIq. Proporciona secuencia promotora pT7lac, dependiente de T7 RNA polimerasa e inducción por IPTG, secuencia RBS, secuencias codificantes de tags para 6xhis o T7 y secuencia terminadora.	Novagen
2	pET19b	Vector de expresión de bajo número de copia, con Ori COLE1. Contiene gen de selección por ampicilina. Contiene el gen de LacI con promotor lacIq. Proporciona secuencia promotora pT7lac, dependiente de T7 RNA polimerasa e inducción por IPTG, secuencia RBS, secuencia codificante de tag de 10xhis y secuencia terminadora.	Novagen
3	pMALc5x	Vector de expresión de alto número de copia, con Ori COLE1 mutado. Contiene gen de selección por ampicilina. Contiene el gen de LacI con promotor lacIq. Proporciona secuencia promotora pTac (ID NUC NO. 20) inducible por IPTG, secuencia RBS, gen de la	New engeland Biolabs (NEB)

		proteína MBP seguida de una secuencia para una <i>linker</i> de asparagina y una secuencia terminadora.	
4	pACYCTduet	Vector similar a pET28a pero con Ori p15A. Este vector contiene dos vectores pT7lac y RBS	Novagen
5	pETM6-RgTALsyn-HpaBC	vector que contiene el gen de TAL (ID SEQ No. 1)	Addgene #100949 (Jones et al., 2017)
6	pET19b_4CL	vector derivado de pET19b, contiene el gen de 4CL (ID NUC No. 2) entre los sitios de restricción NdeI-BamHI, para la expresión de la proteína 4CL con un tag de 10xHis en N-ter	Addgene #139798 (Fink et al., 2020)
7	pNb4OMT-A53M	vector que contiene el gen de N4OMT con la mutación A53M	Addgene #216232 (D'Oelsnitz et al., 2023)
8	pET28-tal	vector derivado de pET28a, contiene el gen de TAL (ID NUC No. 1) entre los sitios de restricción NdeI-HindIII, para la expresión de TAL con tags de 6xHis y T7 en el extremo N-ter	este trabajo (ID SEC 21)
9	pET28-tal-BC	vector derivado de pET28-tal, contiene el operón hpaBC (ID NUC No. 11) clonado HindIII-XhoI	este trabajo (ID SEC 22)
10	pET28-hchl	vector derivado de pET28a, contiene el gen de HCHL (ID NUC No. 3) entre los sitios de restricción NdeI-HindIII, para la expresión de HCHL con tags de 6xHis y T7 en el extremo N-ter	este trabajo (ID SEC 23)
11	pET28-hchl-tal-BC	vector derivado de pET28-tal-BC, contiene el gen hchl (ID NUC No. 3) con RBS32 en extremo 5' y 3' clonado XbaI-HindIII	este trabajo (ID SEC 24)

12	pMAL-quiC	vector derivado de pMALc5x, contiene el gen de QuiC (ID NUC No. 4) entre los sitios de restricción NdeI-BamHI, para la expresión de la proteína de fusión MBP-QuiC con un tag de 6xHis en el extremo C-ter	este trabajo (ID SEC 25)
13	pET28-mquiC	vector derivado de pET28a, contiene el gen de mQuiC (ID SEC No. 5) entre los sitios de restricción NdeI-XhoI, para la expresión de la proteína de fusión mRFP-QuiC con un tag de 6xHis en el extremo C-ter	este trabajo (ID SEC 26)
14	pET28-car	vector derivado de pET28a, contiene el gen de CAR (ID NUC No. 6) entre los sitios de restricción EcoRII-HindIII, para la expresión de CAR con tags de 6xHis y T7 en el extremo N-ter	este trabajo (ID SEC 27)
15	pET28-npt	vector derivado de pET28a, contiene el gen de NPT (ID NUC No. 7) clonado EcoRI-HindIII	este trabajo (ID SEC 28)
16	pET28-car-npt	vector derivado de pET28-car, contiene el gen de NPT con una secuencia que añade 6xHis al extremo N-ter de la proteína (ID NUC No. 7) clonado HindIII-XhoI	este trabajo (ID SEC 29)
17	pET28-npt-mquiC	vector derivado de pET28, contiene el gen de 6HtT7-NPT con un RBS32 sintético en el extremo 5' (ID NUC NO. 8) clonado entre las dianas XbaI y SpeI y el gen sintético mquiC (ID NUC No. 5), con una secuencia de RBS34 sintética (ID NUC No. 14) en el extremo 5', clonado entre las dianas SpeI y XhoI.	este trabajo (ID SEC 30)
18	pET28-nbs	vector derivado de pET28a, contiene el gen de NBS (ID NUC No. 9) entre los sitios de restricción BamHI-HindIII, para la expresión de NBS con tags de 6xHis y T7 en el extremo N-ter	este trabajo (ID SEC 31)
19	pET28-nr	vector derivado de pET28a, contiene el gen de NR (ID NUC No. 10) entre los sitios de	este trabajo (ID SEC 32)

		restricción BamHI-XhoI, para la expresión de NR con un tag de 6xHis en el extremo N-ter	
20	pET28-nbs-nr	vector derivado de pET28-nbs, contiene el gen de NR (ID NUC No. 10) modificado con una secuencia para tag de 6xHis en el extremo 3' y una secuencia de RBS5000 en el extremo 5' clonado entre los sitios de restricción HindIII-XhoI, para la expresión de NR con un tag de 6xHis en el extremo N-ter	este trabajo (ID SEC 33)
21	pET28-n4omt	vector derivado de pET28a, contiene el gen de N4OMT (ID NUC No. 11) entre los sitios de restricción NdeI-NotI, para la expresión de N4OMT con un tag de 6xHis en el extremo N-ter	este trabajo (ID SEC 34)
22	pACYCT-NNN2	vector derivado de pACYCTduet, con cassette de expresión para gen de N4OMT (ID NUC No. 11) del vector pET28-n4omt entre NcoI y NotI y un cassette de expresión para los genes NBS y NR (ID NUC No. 9 y 10) del vector pET28-nbs-nr entre NdeI y XhoI	este trabajo (ID SEC 35)
23	pACYCT-NNN4	vector derivado de pACYCT-NNN2, al que se suprimió el segundo promotor, dejando un único cassette de expresión para los tres genes, con los RBSg10L (ID SEC No. 14), RBS34 (ID SEC No. 16) y RBS5000 (ID SEC No. 17), respectivamente.	este trabajo (ID SEC 36)
24	pACYCT-NNN4C	vector derivado de pACYCT-NNN4. En este caso se sustituyó el RBS asociado al gen de NR por una secuencia de RBS32 (ID SEC No. 15)	este trabajo (ID SEC 37)
25	pACYCT-NNN4D	vector derivado de pACYCT-NNN4. En este caso se sustituyó el gen de N4OMT por una versión que incluye la mutación A53M (ID NUC No. 12)	este trabajo (ID SEC 38)
26	pACYCT-NNN1	vector derivado de pACYCT-NNN4. En este caso se sustituyó el RBS asociado al gen de	este trabajo (ID SEC 39)

		N4OMT por una secuencia de RBS32 (ID SEC No. 15)	
27	pACYCT-NNN1B	vector derivado de pACYCT-NNN1. En este caso se sustituyó el RBS asociado al gen de NR por una secuencia de RBS9500 (ID SEC No. 18)	este trabajo (ID SEC 40)
28	pACYCT-NNN1C	vector derivado de pACYCT-NNN4. En este caso se sustituyó el RBS asociado al gen de NR por una secuencia de RBS32 (ID SEC No. 15)	este trabajo (ID SEC 41)
29	pACYCT-NNN4C-4cl	vector derivado de pACYCT-NNN4C. Se insertó el cassette de expresión de 4cl del vector pEt19b-4cl (ID VEC No. 6) entre los sitios NotI y XhoI	este trabajo (ID SEC 42)
30	pACYCT-NNN4C-car	vector derivado de pACYCT-NNN4C. Se insertó una secuencia con un RBSg10L (ID NUC No. 14) y el gen que codifica 6HtT7-car (ID SEC No. 18) y entre los sitios NotI y XhoI	este trabajo (ID SEC 43)

Tabla M.I. Descripción de los vectores principales usados en los ejemplos.

ID CEPA No.	Nombre cepa	Genotipo y características relevantes	Origen
1	DH5a	Cepa de clonaje. Genotipo: F- 80dlacZM15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44- thi-1 gyrA96 relA1	Thermo Scientific
2	BL21(D E3)	Cepa de sobreexpresión de proteínas dependientes de T7 RNA polimerasa. Genotipo: F- ompT hsdSB(rB-, mB-), dcm, gal, (λclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene1)	Thermo Scientific
3	M-PAR-120	cepa superproductora de fenilalanina, derivada de <i>E. coli</i> MG1655(DE3). Genotipo: M1655(DE3)tyrR::PT7lac-aroGfbr ldhA::PT7lac-	(Koma et al., 2020)

		pheA _{hbr} adhE::PT7lac-ppsA pflDC::PT7lac(-8TC)- tktA pykF::PT7lac-aroALC ascF::PT7lac-aroEDB	
4	M-PAR-121	cepa superproductora de tirosina, derivada de <i>E. coli</i> MG1655(DE3). Genotipo: M1655(DE3)tyrR::PT7lac-aroG _{hbr} IdhA::PT7lac-tyrA _{hbr} adhE::PT7lac-ppsA pflDC::PT7lac(-8TC)-tktA pykF::PT7lac-aroALC ascF::PT7lac-aroEDB	(Koma et al., 2020)
5	M-PAR-241	cepa superproductora de p-tiramina, derivada de <i>E. coli</i> M-PAR-120. Genotipo: M1655(DE3)tyrR::PT7lac-aroG _{hbr} IdhA::PT7lac-tyrA _{hbr} adhE::PT7lac-ppsA pflDC::PT7lac(-8TC)-tktA pykF::PT7lac-aroALC ascF::PT7lac-aroEDB acs::PT7lac-tdc(lb)	(Koma et al., 2020)
6	BL21(D E3)-tal	Cepa BL21(DE3) transformada con el vector pET28-tal (ID VEC No. 8); Resistente a kanamicina	este trabajo
7	BL21(D E3)-tal-BC	Cepa BL21(DE3) transformada con el vector pET28-tal-BC (ID VEC No. 9); Resistente a kanamicina	este trabajo
8	BL21(D E3)-hchl	Cepa BL21(DE3) transformada con el vector pET28-hchl (ID VEC No. 10); Resistente a kanamicina	este trabajo
9	BL21(D E3)-4cl	Cepa BL21(DE3) transformada con el vector pET19b-4cl (ID VEC No. 7); Resistente a ampicilina	este trabajo
10	M-PAR-121-tal	Cepa M-PAR-121 transformada con el vector pET28-tal (ID VEC No. 8); Resistente a kanamicina	este trabajo
11	M-PAR-121-tal-BC	Cepa M-PAR-121 transformada con el vector pET28-tal-BC (ID VEC No. 9); Resistente a kanamicina	este trabajo
12	M-PAR-241-tal	Cepa M-PAR-241 transformada con el vector pET28-tal (ID VEC No. 8); Resistente a kanamicina	este trabajo

13	M-PAR-241-tal-BC	Cepa M-PAR-241 transformada con el vector pET28-tal-BC (ID VEC No. 9); Resistente a kanamicina	este trabajo
14	BL21(DE3)-mbpquiC	Cepa BL21(DE3) transformada con el vector pMAL-quiC (ID VEC No. 12); Resistente a ampicilina	este trabajo
15	BL21(DE3)-car	Cepa BL21(DE3) transformada con el vector pET28-car (ID VEC No. 14); Resistente a kanamicina	este trabajo
16	BL21(DE3)-npt	Cepa BL21(DE3) transformada con el vector pET28-npt (ID VEC No. 15); Resistente a kanamicina	este trabajo
17	M-PAR-241-car-npt	Cepa M-PAR-241 transformada con el vector pET28-car-npt (ID VEC No. 16); Resistente a kanamicina	este trabajo
18	M-PAR-241-mquiC-npt	Cepa M-PAR-241 transformada con el vector pET28-npt-mquiC (ID VEC No. 17); Resistente a kanamicina	este trabajo
19	BL21(DE3)-nbs	Cepa BL21(DE3) transformada con el vector pET28-nbs (ID VEC No. 18); Resistente a kanamicina	este trabajo
20	BL21(DE3)-nr	Cepa BL21(DE3) transformada con el vector pET28-nr (ID VEC No. 19); Resistente a kanamicina	este trabajo
21	BL21(DE3)-n4omt	Cepa BL21(DE3) transformada con el vector pET28-n4omt (ID VEC No. 21); Resistente a kanamicina	este trabajo
22	M-PAR-241-3N[2]	Cepa M-PAR-241 transformada con el vector pACYCT-3N[2] (ID VEC No. 22); Resistente a cloranfenicol	este trabajo
23	M-PAR-241-3N[4]	Cepa M-PAR-241 transformada con el vector pACYCT-3N[4] (ID VEC No. 23); Resistente a cloranfenicol	este trabajo

24	M-PAR-241-3N[4C]	Cepa M-PAR-241 transformada con el vector pACYCT-3N[4C] (ID VEC No. 24); Resistente a cloranfenicol	este trabajo
25	M-PAR-241-3N[4D]	Cepa M-PAR-241 transformada con el vector pACYCT-3N[4D] (ID VEC No. 25); Resistente a cloranfenicol	este trabajo
26	M-PAR-241-3N[1]	Cepa M-PAR-241 transformada con el vector pACYCT-3N[1] (ID VEC No. 26); Resistente a cloranfenicol	este trabajo
27	M-PAR-241-3N[1B]	Cepa M-PAR-241 transformada con el vector pACYCT-3N[1B] (ID VEC No. 27); Resistente a cloranfenicol	este trabajo
28	M-PAR-241-3N[1C]	Cepa M-PAR-241 transformada con el vector pACYCT-3N[1C] (ID VEC No. 28); Resistente a cloranfenicol	este trabajo
29	BABH10	Cepa M-PAR-241 transformada con los vectores pET28-hchl-tal-BC (ID VEC No. 11) y pACYCT-3N[4C]-4cl (ID VEC No. 29); Resistente a kanamicina y cloranfenicol	este trabajo
30	BABH8	Cepa M-PAR-241 transformada con los vectores pET28-npt-mquiC (ID VEC No. 17) y pACYCT-3N[4C]-car (ID VEC No. 30); Resistente a kanamicina y cloranfenicol	este trabajo

Tabla M.II. Genotipos de las cepas de *E. coli* relevantes.

Medios y condiciones de cultivo.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB (Sigma) o medio definido M9 modificado (M9M2) según (Koma et al., 2020) con glucosa 0,4% p/v como fuente de carbono. En algunos casos, el medio se suplementa con otros sustratos: p-tiramina 0,5 mM; 3,4-DHBA 0,5 mM; PCA 0,5 mM.

El medio se suplementa con los antibióticos apropiados según los vectores presentes en la cepa: kanamicina 50 µg/mL; cloranfenicol 25 µg/mL, ampicilina 100 µg/mL. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm.

El medio se suplementa con inductor IPTG 0,01 mM-1mM.

Para cultivo sólido se utilizó LB agar (Sigma), suplementado con los antibióticos pertinentes.

Para la conservación de cepas se prepararon stocks en LB con glicerol 15% v/v que se mantienen a -80°C.

5 Preparación de estándares químicos.

Se usaron químicos comerciales, si no se indica lo contrario.

Se prepararon estándares de L-tirosina (Sigma T-2006) 200 mM en HCL 1M/2mM en agua ultrapura, 4-cumarato (Sigma C9008) 10 mM en etanol, ácido cafeico (sigma C0625) 10 mM en etanol, PCA (HWI group 0393-05-90) 100 mM en etanol, 10 3,4-DHBA (Sigma, D108405-100G) 10 mM en agua ultrapura, p-tiramina (Sigma, T90344-25G) 10 mM en agua ultrapura y 4OMN 100 mM en DMSO. Isovanillin (Sigma, 59940).

El protocolo para la síntesis química de 4OMN se adaptó de protocolos descritos previamente (Carmona-Viglianco et al., 2022; Girard et al., 2022; Park, 2014; Tozzi 15 et al., 2010). Se disolvieron cantidades equimolares (aproximadamente 2 mmol) de isovanillin y p-tiramina en metanol seco y se incubó en atmósfera inerte, con agitación constante. El consumo completo del material de partida se confirmó mediante TLC y la identidad de la imina resultante 4-O'-metilnorcraugsodina (4OMNCS) se verificó mediante 1H-NMR crudo. La reacción se enfrió a 0°C, se 20 añadió un exceso de borohidruro de sodio y se agitó alrededor de 3h. El consumo completo de la imina se confirmó mediante TLC. Después, se evaporó el solvente bajo presión reducida y se resuspendió el sólido resultante en agua, ajustando el pH a 7,8-8,0. El precipitado fue filtrado, recristalizado en etanol y se secó al vacío obteniendo 4OMN en forma de un polvo blanco con una pureza del 83%. Se verificó 25 la identidad de 4OMN por espectroscopia RMN 1H y 13C y por espectrometría GC-MS.

Preparación de extractos catalíticos.

Los extractos catalíticos se prepararon a partir de cultivos de 5 mL de medio, 30 suplementado con los antibióticos pertinentes según los vectores de expresión presentes en la cepa de interés, que se inocularon con un preinóculo fresco, crecido 16h, y se incubaron a 37°C con agitación vigorosa a 200 rpm. Los cultivos se crecen hasta alcanzar una fase exponencial tardía. Una vez alcanzado el nivel de biomasa indicado, se adiciona el inductor IPTG, a una concentración que varía entre 0,1 mM 35 y 1 mM y se incuba 1-3h a 37°C, según el caso. Finalizado el protocolo de inducción, se recupera el pellet de células por centrifugación del cultivo a 10.000g, 10 min. El pellet se puede conservar a -20°C.

Los extractos catalíticos se preparan a partir de los pellets de los cultivos inducidos. Primero, se lava el pellet de células en solución tamponada a pH 7.4, ya sea con Tris 25 mM o PBS 10 mM, y se recupera nuevamente por centrifugación. Finalmente, se resuspende en la solución tamponada con inhibidores de proteasas, *i.e.* cOmplete, EDTA-free (ROCHE #1873580001) en un volumen correspondiente a 1/10 del volumen del cultivo procesado. En concreto, las muestras generadas a partir de 5 mL de cultivo se resuspendieron en 500 µL y se lisaron en frío por sonicación con sonda a una amplitud de 50% durante 2 min, con pulsos de 10 s cada 10 s con Qsonica LLC model Q125. El lisado o extracto catalítico total se centrifuga a 15.000g, 20 min a 4°C para separar el extracto clarificado.

La cantidad de proteína total en los extractos catalíticos se determina por el método de Bradford (Sigma # B6916) usando un estándar de BSA como patrón (Bradford, 1976).

Los extractos se pueden analizar para validar la expresión de las enzimas por electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y transferencia western, aprovechando los tags de histidina o T7 incorporados en las proteínas de interés (Sambrook & Russel, D, 2001). En concreto, las muestras de extractos separadas por tamaño en un gel SDS-PAGE se transfieren a una membrana de PVDF (con poro de 0,2 µm), dónde se realiza la detección de la proteína de interés aprovechando los tags incorporados a uno de sus extremos. Para dicha detección usamos (a) un anticuerpo anti-HisTag conjugado directamente con HRP (proteintech # HRO-66005) o (b) un anticuerpo primario policlonal anti-T7tag(Rb) (invitrogen #PA5119612) y un anticuerpo secundario anti-(IgG)Rb conjugado con HRP (invitrogen #31460).

Síntesis enzimática de metabolitos a partir de extractos catalíticos.

Para la síntesis enzimática de metabolitos se mezclan los extractos catalíticos con el sustrato pertinente y se incuban a 37°C. En concreto, se prepararon mezclas de 200 µL en solución tamponada a pH 7,4 (Tris 25 mM o PBS 10 mM) con inhibidores de proteasas, *i.e.* cOmplete, EDTA-free (ROCHE #1873580001) con 100-500 ng de extracto, según la cuantificación de proteína total por el método de Bradford. En las mezclas con extractos catalíticos generados a partir de cepas derivadas de BL21(DE3) crecidas en LB se añadió sustrato a una concentración de 0,1-0,5 mM. En las mezclas con extractos catalíticos generados a partir de cepas superproductoras crecidas en medio M9M2 con glucosa no es necesario añadir sustrato extra, pues es suficiente con la tirosina o derivados producidos en el cultivo. Como sustrato se utilizó tirosina, pero en algunos casos se ensayaron otros sustratos como p-cumárico, ácido cafeico, PCA o p-tiramina.

Cinética de crecimiento en microcultivos.

Se preparan preinóculos de 3 mL de LB suplementado con los antibióticos pertinentes para cada cepa de interés, crecidos a 37°C, 200 rpm durante 16h. Al día siguiente, se cuantifican los preinóculos midiendo la absorbancia a 600 nm. Se preparan alícuotas de 1 mL de medio, suplementado con antibióticos pertinentes en cada caso, que se inoculan con los preinóculos a una OD₆₀₀ 0,02. De ser pertinente, se añade también inductor IPTG a distintas concentraciones u otros sustratos como PCA o 3,4-DHBA. Para la cinética, se transfieren 200 µL del medio inoculado a tres pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo plano y transparente. La cinética se realiza en un lector de platos SynergyH1 (BioTek) con incubación a 37°C y agitación suave y se realizan lecturas periódicas de absorbancia a 600 nm cada 20 min durante 12-30h, según el caso.

Producción de metabolitos en cultivo.

Para la producción de metabolitos en cultivo se transformaron los vectores de expresión de las enzimas de interés en cepas superproductoras de tirosina y/o p-tiramina. Con las cepas resultantes o biofábricas, se ensayó la producción de metabolitos de interés en microcultivos. En este caso se realizaron ensayos de cinéticas de crecimiento con inducciones por IPTG entre 0-1mM aplicadas al inicio de la cinética o en fase exponencial medio-tardía (OD₆₀₀~0,4). En el protocolo de la cinética, se incluyó la lectura de absorbancia a 310 nm, 323 nm o 343 nm, como medida indirecta de la producción de p-cumárico, ácido cafeico o 3,4-DHBA, respectivamente. Al finalizar la cinética se analizan los sobrenadantes de los microcultivos para detectar los metabolitos de interés producidos durante el cultivo.

Detección de metabolitos de interés por cromatografía de capa fina (TLC).

Para TLC, se aplican las muestras en placas de silica gel 60 F250 (ref). Se ensayaron tres mezclas para la fase móvil: mezcla de cloroformo (CHCl₃):metanol (MeOH):ácido fórmico (AF) 85:10:5; mezcla de tolueno (T):acetato de etilo (AE):ácido fórmico (AF) 6:6:1,2 y mezcla de mezcla de acetato de etilo (AE):ácido acético glacial (AA):ácido fórmico (AF):agua(H₂O) 110:15:15:9. Se utilizaron tres tipos de revelado distintos: (a) se sumerge la placa en solución de 0,3% ninhidrina (2,2-dihidroxiindan-1,3-diona) en n-butanol se seca y se calienta a 120°C, para la detección aminas primarias y secundarias, (b) se sumergen un solución FeCl₃ 0,5% p/v, se seca y se calienta a 60°C, para la detección de compuestos fenólicos (Karthikeyan et al., 2015), o (c) se sumergen en reactivo de productos naturales (NP, 1% p/v diphenylboryloxyethylamine en metanol), se seca y se sumerge nuevamente en solución de 5% p/v polietilenglicol 4000 en etanol (PEG) y se seca, para la detección de flavonoides y ácidos vegetales (Wagner & Bladt, 1996).

Tanto (a) como (b) generan precipitados de color visibles con luz blanca. En el caso de (c) la visualización requiere exposición a UV 256 nm.

Análisis de metabolitos por cromatografía de gases y espectrometría (GC-MS).

El análisis de 4OMN por GC-MS se realizó en un equipo Thermo Scientific GC-MS Trace Serie 1300 y el método fue el siguiente: "Inyección split 10:1, columna ZB-5 (5% difenil - 95% dimetilpolisiloxano), temperatura de inyección 250°C, rampa de calentamiento: 50°C (5 min)-(10°C/min)- 250°C (5 min)."

Ejemplo 1.

Construcción de vectores y cepas para la sobreexpresión de las enzimas TAL, HpaBC, 4CL y HCHL en *E. coli*.

Para la expresión heteróloga de las enzimas tirosina amonio liasa de *Rhodotorula glutinis* (TAL, ID SEC No. 1), 4-cumarato-CoA ligasa de *Arabidopsis thaliana* (4CL, ID SEC No. 4) y hydroxycinnamoyl-CoA hidratasa/liasa de *Pseudomonas fluorescens* (HCHL, ID SEC No. 5) en *E. coli*, se obtuvieron genes sintéticos con optimización de codón para *E. coli*.

El operón *hpaBC* (ID NUC NO. 13) para la expresión del complejo de 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa (HpaBC, ID SEC No. 2 y 3) de *E. coli* (Prieto & Garcia, 1994) se aisló del genoma de BL21(DE3).

Los genes sintéticos se clonaron en vectores de expresión pET19b o pET28a, que permiten la expresión inducible por IPTG y dependiente de T7 RNA polimerasa de las proteínas heterólogas en cepas de *E. coli* modificadas con el profago DE3 para la expresión de T7 RNA polimerasa.

En concreto, se clonó el gen sintético de TAL (ID NUC No. 1) entre los sitios de restricción BamHI y HindIII del vector pET28a obteniendo el vector pET28-tal (ID VEC No. 8), para la expresión la proteína TAL con tags de 6xHis y T7 en el extremo N-ter (ID SEC No. 13).

Para la expresión de HpaBC, se insertó el operón *hpaBC* de BL21(DE3) (ID NUC No. 13) entre los sitios de restricción HindIII y NotI del vector pET28-tal (ID VEC No. 8) obteniendo el vector pET28-tal-BC (ID VEC No. 9). La expresión de los tres genes presentes en este vector está controlada por un único promotor pT7lac (ID NUC No. 19) y cada gen va precedido de una secuencia RBS que controla su traducción.

El gen sintético de HCHL (ID NUC No. 3), con una secuencia que codifica un tag T7 (ID SEC No. 27) en el extremo 5', se clonó entre los sitios de restricción NdeI y HindIII en un pET28a obteniendo el vector pET28-hchl (ID VEC No. 10), para la expresión de HCHL con tags de 6xHis y T7 en el extremo N-ter (ID SEC No. 15).

Para la expresión de 4CL se obtuvo el vector pET19b-4cl (ID VEC No. 6), que contiene el gen sintético de 4CL (ID NUC No. 2) entre las dianas NdeI y BamHI de un pET19b, para la expresión de 4CL con un tag de 10xHis en N-ter (ID SEC No. 14).

- 5 Los vectores pET28-tal (ID VEC No. 8), pET28-tal-BC (ID VEC No. 9), pET28-hchl (ID VEC NO. 10) y pET19b-4cl (ID VEC No. 6) se transformaron en BL21(DE3) generando las cepas BL21(DE3)-tal (ID CEPA No. 6), BL21(DE3)-tal-BC (ID CEPA No. 7); BL21(DE3)-hchl (ID CEPA No. 8) y BL21(DE3)-4cl (ID CEPA No. 9). Con estas cepas se hicieron ensayos de crecimiento e inducción con IPTG a 37°C con
10 las que se prepararon extractos catalíticos para evaluar la expresión de las proteínas TAL, 4CL y HCHL, respectivamente. El análisis de los extractos por SDS-PAGE y transferencia western validó la expresión en *E. coli* de las tres proteínas heterólogas TAL, HCHL y 4CL en inducciones con IPTG 0,1 mM, o superior, a 37°C.

- Con los extractos catalíticos generados con las cepas BL21(DE3)-tal (ID CEPA No. 6) y BL21(DE3)-tal-BC (ID CEPA No. 7) se evaluó la actividad de TAL y la necesidad
15 de sobreexpresar HpaBC en *E. coli*. Se incluyó una muestra de extracto catalítico preparado con una cepa BL21(DE3) con el vector pETM6-RgTALsyn-HpaBC (ID VEC No. 5, Jones et al., 2017).

- Se prepararon reacciones de 100 µL con 180 µg de extracto catalítico (según la
20 cuantificación de proteína total) y 0,5 mM de L-tirosina, en Tris 25 mM, pH7.4. Como control negativo se incluyó una muestra de extracto al que no se incluyó sustrato. Las reacciones se incubaron a 37 °C. Finalizada la incubación se analizaron las muestras por cromatografía de capa fina (TLC). Para la TLC, se aplicaron 10 µL de cada reacción en una placa de silica con 5 cm de recorrido y se movilizaron con una
25 fase móvil compuesta por tolueno:acetato de etilo:ácido fórmico (T:AE:AF) 6:6:1,2 y se reveló la placa por tinción de fenoles con FeCl₃ 0,5% p/v (Karthikeyan et al., 2015). El resultado muestra que en los extractos con TAL se produce p-cumárico si se añade sustrato L-tirosina a la reacción (Figura 2). Ácido cafeico sólo se detectó en la muestra que contiene el vector pET28-tal-BC (ID VEC No. 9), para la
30 sobreexpresión de TAL y HpaBC, indicando que la actividad del operón *hpaBC* nativo de *E. coli* es insuficiente.

- Los vectores pET28-tal (ID VEC No. 8) y pET28-tal-BC (ID VEC No. 9) se transformaron también en cepas superproductoras de tirosina y/o p-tiramina, en este caso se usaron las cepas M-PAR-121 y M-PAR-241 (Koma et al., 2020). Las cepas
35 resultantes M-PAR-121-tal, M-PAR-121-tal-BC, M-PAR-241-tal y M-PAR-241-tal-BC (ID CEPA No. 10-13) se cultivaron en medio M9M2 con glucosa e inducción con IPTG, para validar la síntesis de p-cumárico y/o ácido cafeico. Las muestras analizadas detectaron la síntesis de p-cumárico en todos los cultivos inducidos con IPTG. La síntesis de ácido cafeico se detectó sólo en las muestras inducidas de los

cultivos de las cepas que tienen el vector pET28-tal-BC (ID VEC No. 9). Este resultado confirma la necesidad de incluir la sobreexpresión de HpaBC en el método de esta invención, dado que el ácido cafeico es un intermediario de la síntesis de 3,4-DHBA.

5 Ejemplo 2.

Construcción de vectores y cepas para la expresión de las enzimas QuiC, CAR y NPT en *E. coli*.

Para la expresión heteróloga de las enzimas 3-dihidroshikimato dehidratasa de *Pseudomonas putida* (QuiC, ID SEC No. 6), ácido carboxílico reductasa (CAR, ID
10 SEC No. 7) de *Nocardia iowensis*, y la fosfopanteteinil transferasa NPT de *Nocardia iowensis* (ID SEC No. 8) en *E. coli*, se obtuvieron genes sintéticos con optimización de codón para *E. coli*, de forma similar al ejemplo 1.

En concreto, para la expresión de QuiC en *E. coli* se generó el vector pMAL-quiC (ID VEC No. 12) clonando el gen sintético de QuiC (ID NUC No. 4), que incluye una
15 secuencia para un tag de 6xHis en el extremo 3', entre los sitios NdeI y BamHI de un pMALc5x, para la expresión de una proteína de fusión MBP-QuiC (ID SEC No. 16).

Para la expresión de QuiC también se ensayó la expresión de una proteína de fusión entre la proteína fluorescente mRFP y QuiC, unidas por una secuencia rica en
20 asparagina (ID SEC No. 32) y con un tag de 6xHis en el extremo C-ter. Así, se generó el vector pET28-mquiC (ID VEC No. 13), que tiene el gen *mquiC* (ID NUC No. 5) clonado entre los sitios de restricción BamHI y XhoI de un pET28a, para la expresión de la proteína de fusión mQuiC (ID SEC No. 17) con un tag de 6xHis y uno de T7 en el extremo N-ter.

25 El gen sintético de CAR (ID NUC No. 6) se clonó entre los sitios de restricción EcoRI y HindIII en un pET28a obteniendo el vector pET28-car (ID VEC No. 14), para la expresión de CAR con tags de 6xHis y T7 en el extremo N-ter (ID SEC No. 18).

De forma equivalente, el gen sintético de NPT (ID NUC No. 7) se clonó entre los sitios de restricción EcoRI y HindIII en un pET28a obteniendo el vector pET28-npt
30 (ID VEC No. 15), para la expresión de NPT con tags de 6xHis y T7 en N-ter (ID SEC No. 19).

Los vectores pMAL-quiC (ID VEC No. 12), pET28-car (ID VEC No. 14), pET28-npt (ID VEC No. 15) se transformaron en BL21(DE3), generando las cepas BL21(DE3)-
mbpquiC (ID CEPA No. 14), BL21(DE3)-car (ID CEPA No. 15); BL21(DE3)-npt (ID
35 CEPA No. 16) con las que se validó la expresión heteróloga de las proteínas QuiC, Car y NPT.

No obstante, se constató también que los vectores de expresión para QuiC y CAR generan expresiones basales elevadas, que son detectables por transferencia western. La inducción con IPTG produce dificultades de crecimiento a las cepas con los vectores de QuiC y CAR y se observa por transferencia western una elevada cantidad de fragmentos de degradación de CAR. Estos resultados indican la necesidad de limitar la expresión de estas proteínas en *E. coli*.

Para la co-expresión de las proteínas CAR y NPT de *N. iowensis* en *E. coli*, se preparó el vector pET28-car-npt (ID VEC No. 16), que contiene un gen sintético para CAR clonado entre las dianas EcoRI y HindIII y un gen sintético para NPT (ID NUC No. 8), que incorpora una secuencia sintética en el extremo 5' que contiene un RBS32 sintético (ID NUC No. 15) y una secuencia codificante para tags de 6xHis y T7, clonado entre las dianas HindIII y XhoI. El vector resultante contiene un cassette de expresión policistrónico dirigido de un único promotor pT7lac y un RBS sintético enfrente de cada gen sintético para dirigir las traducciones.

Para reducir el nivel de expresión de QuiC, se preparó el vector pET28-npt-mquiC (ID VEC No. 17), que contiene un gen sintético para 6HtT7-NPT con un RBS32 sintético en el extremo 5' (ID NUC No. 8) clonado entre las dianas XbaI y SpeI y el gen sintético *mquiC* (ID NUC No. 5), con una secuencia de RBS34 sintética (ID NUC No. 16) en el extremo 5', clonado entre las dianas SpeI y XhoI. Como el vector anterior, este también contiene un cassette de expresión policistrónico dirigido de un único promotor pT7lac y un RBS sintético enfrente de cada gen sintético para dirigir las traducciones.

Los vectores pET28-car-npt (ID VEC No. 16) y pET28-npt-mquiC (ID VEC No. 17) se transformaron en cepas superproductoras de tirosina y/o p-tiramina. En concreto, se transformó la cepa M-PAR-241 obteniendo las cepas M-PAR-241-car-npt (ID CEPA No. 17) y M-PAR-241-mquiC-npt (ID CEPA No. 18). Con estas cepas se hicieron ensayos de crecimiento e inducción con IPTG a 37°C con las que se prepararon extractos catalíticos para evaluar la co-expresión de las proteínas CAR y NPT y comprobar la reducción de la expresión de mQuiC. El análisis de los extractos por SDS-PAGE y transferencia western confirmó la co-expresión de las proteínas heterólogas en *E. coli* en inducciones con IPTG 0,1 mM, o superior, a 37°C. Además, se validó la síntesis de PCA a partir del cultivo de la cepa M-PAR-241-mquiC-npt (ID CEPA No. 18) en medio M9M2 con glucosa, incluso sin inducción con IPTG (Figura 3).

Ejemplo 3.

Síntesis microbiana de 3,4-DHBA con las enzimas TAL, HpaBC, 4CL y HCHL (ID SEC No. 1-5) utilizando tirosina o glucosa como sustrato.

Para la síntesis de 3,4-DHBA en *E. coli* se propone una ruta metabólica que se basa en el metabolismo fenilpropanoide de plantas (Singh & Desgagné-Penix, 2014). Partiendo de tirosina como sustrato se proponen cuatro reacciones que involucran las enzimas tirosina amonio liasa (TAL, EC 4.3.1.23, ID SEC No. 1) de *R. glutinis*, el complejo de 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa (HpaBC, EC 1.14.14, ID SEC No. 2 y 3) de *E. coli*, 4-cumarato-CoA ligasa (4CL, EC 6.2.1.12, ID SEC No. 4) de *A. thaliana* y hydroxycinnamoyl-CoA hidratasa/liasa (HCHL, ID SEC No. 5) de *P. fluorescens*. En esta ruta enzimática, la tirosina es deaminada a p-cumárico por TAL, que es a su vez hidroxilado por el complejo HpaBC generando ácido cafeico, que se conjuga con acetil-CoA por la liasa 4CL y, finalmente, la enzima HCHL regenera el acetil-CoA produciendo 3,4-DHBA. Si bien se ha descrito la producción de ácido cafeico en cepas recombinantes de *E. coli* que expresan TAL y HpaBC (Sakae et al., 2023), hasta el momento no se ha descrito la metabolización del ácido cafeico a 3,4-DHBA. En este ejemplo, mostramos la síntesis de 3,4-DHBA a partir de la combinación de una cepa productora de ácido cafeico, que proporciona el sustrato, y cepas que expresan las enzimas 4CL y HCHL.

Para validar la ruta metabólica propuesta para la síntesis de 3,4-DHBA, se prepararon extractos catalíticos a partir del cultivo e inducción de las cepas M-PAR-241-tal-BC (ID CEPA No. 13); BL21(DE3)-hchl (ID CEPA No. 8) y BL21(DE3)-4cl (ID CEPA No. 9). Las tres cepas se cultivaron en paralelo en 3 mL de medio, M9M2 con glucosa para la cepa derivada de M-PAR-241 o LB para las cepas derivadas de BL21(DE3), hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial tardía ($OD_{600} \sim 0,6$) en que se añadió IPTG 0,1 mM en los tres cultivos y se incubaron durante 3h más a 37°C. Al finalizar la inducción, se recuperaron las células por centrifugación a 10.000g, 15 min y se resuspendieron en 300 μ L de solución de Tris 25 mM, pH 7,4, con inhibidores de proteasas. Las suspensiones celulares se lisaron por sonicación y se centrifugaron para aislar el extracto catalítico clarificado. Para la síntesis de 3,4-DHBA se ensayaron mezclas de los extractos que proporcionan en conjunto las enzimas TAL, HpaBC, 4CL y HCHL. Así, se prepararon reacciones enzimáticas de 100 μ L con 100 μ g de proteína total y se incubaron 15h a 37°C. Se ensayaron las mezclas: (I) extractos catalíticos de M-PAR-241-tal-BC y BL21(DE3)-hchl y BL21(DE3)-4cl; (II) extractos catalíticos de BL21(DE3)-hchl y BL21(DE3)-4cl y ácido cafeico 0,5 mM; (III) extracto catalítico de BL21(DE3)-4cl y ácido cafeico 0,5 mM; (IV) extracto catalítico de BL21(DE3)-hchl y ácido cafeico 0,5 mM. Al finalizar la incubación, se evaluó cualitativamente la producción de 3,4-DHBA las reacciones por TLC. Se detectó 3,4-DHBA en las reacciones I y II, pero no en los casos III y IV (Figura 4). Este resultado muestra que la metabolización de ácido cafeico a 3,4-DHBA requiere las dos enzimas 4CL y HCHL. Como se muestra en el ejemplo 1, el cultivo de la cepa M-PAR-241-tal-BC en medio M9M2 con glucosa produce ácido cafeico.

El resultado de la reacción I muestra que el ácido cafeico producido en el cultivo de la cepa M-PAR-241-tal-BC en medio M9M2 con glucosa sirve de sustrato en las reacciones de 4CL y HCHL logrando la síntesis de 3,4-DHBA, sin necesidad de añadir ningún sustrato o cofactor o elemento extra en la reacción. Este resultado demuestra la viabilidad de la producción de 3,4-DHBA a partir del cultivo de cepas recombinantes de *E. coli* que expresan las proteínas TAL, HpaBC, 4CL y HCHL en medio definido con glucosa como única fuente de carbono y sustrato de la síntesis.

Ejemplo 4.

Síntesis microbiana de 3,4-DHBA con las enzimas QuiC, CAR y NPT (ID SEC NO. 6-8) utilizando tirosina o glucosa como sustrato.

Para la síntesis de 3,4-DHBA en *E. coli* se propone una ruta metabólica alternativa a la descrita en el ejemplo 1. En esta ruta se propone como sustrato de partida el 3-dihidroschikimato (3-DHS), que en *E. coli* es un metabolito de la ruta del shikimato para la síntesis de aminoácidos aromáticos, como la tirosina. Partiendo de 3-DHS como sustrato se proponen dos reacciones que involucran las enzimas 3-dihidroschikimato deshidratasa de *P.s putida* (QuiC, ID SEC NO. 6) y ácido carboxílico reductasa (CAR, ID SEC No. 7) de *N. iowensis*, co-expresada junto a su fosfopanteteinil transferasa (NPT, ID SEC No. 8) que modifica y activa CAR post-traduccionalmente (Venkitasubramanian et al., 2007). En esta ruta metabólica, QuiC deshidrata el metabolito 3-DHS produciendo ácido protocatechuico (PCA) (Li & Ye, 2021; Peek et al., 2017), al que CAR, fosfopanteteinilada por NPT, descarboxila generando el aldehído 3,4-DHBA (A. He et al., 2004; Venkitasubramanian et al., 2007). Si bien, se ha descrito la producción de PCA a partir del cultivo de una cepa recombinante de *E. coli* que expresa QuiC (Örn et al., 2021), no se ha demostrado la ruta metabólica aquí propuesta para la producción de 3,4-DHBA en bacteria.

Para validar esta versión de la síntesis microbiana de 3,4-DHBA, se ensayará la síntesis a partir de la mezcla de extractos catalíticos de las cepas M-PAR-241-car-npt y M-PAR-241-mquiC-npt (ID CEPA No. 17 y 18), que en global combinan la expresión de las enzimas mQuiC, CAR y NPT.

Como se muestra en el ejemplo 2, el cultivo de una cepa M-PAR-241 que expresa mQuiC en M9M2 con glucosa produce PCA, detectable por TLC. De forma similar al ejemplo 3, en este caso el cultivo de una cepa con mQuiC proporcionará el sustrato de la reacción que cataliza CAR para la síntesis de 3,4-DHBA.

Ejemplo 5.

Construcción de vectores y cepas para la expresión de las enzimas NBS, NR y N4OMT en *E. coli*.

Para la expresión heteróloga de las enzimas norbelladina sintasa (NBS, ID SEC No. 9), noroxomaritidine/norcraftosodine reductasa (NR, ID SEC No. 10) y norbelladina 4'-O-metiltransferasa (N4OMT, ID SEC No. 11) de *N. pseudonarcissus* en *E. coli*, se obtuvieron genes sintéticos con optimización de codón para *E. coli*, de forma similar al caso del ejemplo 1.

El gen sintético de NBS (ID NUC No. 9) se clonó entre los sitios de restricción BamHI y HindIII en un pET28a obteniendo el vector pET28-nbs (ID VEC No. 18), para la expresión de NBS con tags de 6xHis y T7 en el extremo N-ter (ID SEC No. 20).

De forma equivalente, el gen sintético de NR (ID NUC No. 10) se clonó entre los sitios de restricción BamHI y XhoI en un pET28a obteniendo el vector pET28-nr (ID VEC No. 19), para la expresión de NR con un tag de 6xHis en el extremo N-ter (ID SEC No. 22).

Para la co-expresión de las proteínas NBS y NR en *E. coli*, se insertó entre los sitios HindIII y XhoI del vector pET28-nbs (ID VEC No. 18) el gen sintético de NR (ID NUC No. 10) precedido de una secuencia sintética con un RBS5000 sintético (ID NUC No. 17) y una secuencia codificante para un tag de 6xHis. El vector resultante pET28-nbs-nr (ID VEC No. 20) presenta un cassette de expresión policistónico controlado por pT7lac (ID NUC No. 19) y con un RBS sintético enfrente de cada gen sintético.

El gen sintético de N4OMT (ID NUC No. 11) se clonó entre los sitios de restricción NdeI y NotI en un pET28a obteniendo el vector pET28-n4omt (ID VEC No. 21), para la expresión de N4OMT con un tag de 6xHis en el extremo N-ter (ID SEC No. 24).

Los vectores pET28-nbs (ID VEC No. 18), pET28-nr (ID VEC No. 19) y pET28-n4omt (ID VEC No. 21) se transformaron en BL21(DE3), generando las cepas BL21(DE3)-nbs (ID CEPA No. 19), BL21(DE3)-nr (ID CEPA No. 20); BL21(DE3)-n4omt (ID CEPA No. 21) con las que se validó la expresión heteróloga de las proteínas NBS, NR y N4OMT en inducciones con IPTG 0,1 mM a 37°C.

Para la co-expresión de las tres proteínas NBS, NR y N4OMT en *E. coli*, se prepararon una colección de vectores derivados de pACYCT. Todos estos vectores (pACYCT-3N) comparten cassettes de expresión similares, con la misma secuencia promotora pT7lac (ID NUC No. 19) y los tres genes en el mismo orden: primero el gen de N4OMT (ID NUC No. 11) entre los sitios XbaI y EcoRI, después el gen de NBS (ID NUC No. 9) entre los sitios EcoRI-HindIII y, finalmente, el gen de NR (ID NUC No. 10) entre los sitios HindIII-NotI. La diferencia entre los vectores radica en

el número de promotores y, en especial, en las secuencias RBS asociadas a cada gen. Así, se construyeron los siguientes vectores:

El vector pACYCT-3N[2] (ID VEC No. 22), derivado de un pACYCTduet, que contiene dos cassettes de expresión independientes regulados por secuencias promotoras pT7lac (ID NUC No. 19). Se transfirió el cassette de expresión de 6Ht-N4OMT (ID SEC No. 24) del vector pET28-n4omt (ID VEC No. 22), clonando el fragmento NcoI-NotI junto al primer promotor pT7lac del pACYCTduet. El fragmento NdeI-XhoI con los genes de NBS y NR del vector pET28-nbs-nr (ID VEC No. 21) se insertó en el segundo cassette de expresión del pACYCTduet. En este caso, los genes de N4OMT y NBS están asociados a una secuencia RBSg10L (ID NUC No. 14) y el gen de NR a una secuencia RBS5000 (ID NUC No. 17).

El vector pACYCT-3N[4] (ID VEC No. 23), deriva del vector pACYCT-3N[2] (ID VEC No. 22). En este caso, se suprimió el segundo promotor pT7lac, dejando un solo cassette de expresión para los tres genes. Se modificó el extremo 3' del gen n4omt para incorporar una diana de restricción EcoRI y se clonó entre los sitios EcoRI y HindIII el gen sintético de NBS (ID NUC No. 9) precedido de un RBS34 (ID NUC No. 16) y una secuencia para tags de 6xHis y T7 que se fusiona en el extremo 5' del gen de NBS. En este caso, las secuencias RBS son RBSg10L (ID NUC No. 14) para N4OMT, RBS34 (ID NUC No. 16) para NBS y RBS5000 (ID NUC No. 17) para NR.

El vector pACYCT-3N[4C] (ID VEC No. 24), es equivalente al vector pACYCT-3N[4] (ID VEC No. 23), pero incorpora el gen sintético para NR-6H (ID SEC No. 21) precedido por un RBS32 (ID NUC No. 15).

El vector pACYCT-3N[4D] (ID VEC No. 25), deriva del vector pACYCT-3N[4C] (ID VEC No. 24) al que se ha sustituido el fragmento NdeI-EcoRI por la secuencia sintética n4omtA53M (ID NUC No. 12) que codifica la proteína N4OMT con la mutación A53M (ID SEC No. 25), que se ha descrito que incrementa su actividad (D'Oelsnitz et al., 2023).

El vector pACYCT-3N[1] (ID VEC No. 26), es equivalente a pACYCT-3N[4] (ID VEC No. 23), pero con el gen sintético para 6Ht-N4OMT (ID SEC No. 24) precedido por un RBS32 (ID NUC No. 15).

El vector pACYCT-3N[1B] (ID VEC No. 27), el mismo vector pACYCT-3N[1] (ID VEC No. 26) con el gen sintético para 6H-NR (ID SEC No. 22) precedido por un RBS9500 (ID NUC No. 18).

El vector pACYCT-3N[1C] (ID VEC No. 28), el mismo vector pACYCT-3N[1] (ID VEC No. 26) con el gen sintético para NR-6H (ID SEC No. 21) precedido por un RBS32 (ID NUC No. 15).

La colección de vectores pACYCT-3N (ID VEC No. 22-28) se transformaron en la cepa M-PAR-241, superproductora de tirosina y/o p-tiramina, obteniendo la colección de cepas M-PAR-241-3N (ID CEPA No. 22-28) para evaluar y comparar la co-expresión de las proteínas NBS, NR y N4OMT a partir de los distintos cassettes de expresión diseñados. Las cepas M-PAR-241-3N (ID CEPA No. 22-28) se cultivaron en LB y se indujeron a OD₆₀₀ 0,6 con IPTG 0,1 mM, durante 3h a 37°C. Al terminar la inducción, se prepararon extractos catalíticos de célula total en PBS 10 mM (con inhibidores de proteasas), pH 7,4. Se analizaron 50 µg de cada uno de los extractos catalíticos por SDS-PAGE y transferencia western para comparar el nivel de expresión de las proteínas NBS, NR y N4OMT en cada caso. El resultado de la transferencia western, con un anticuerpo para detectar el tag de 6xHis de las proteínas, muestra perfiles de expresión distintos para cada cepa (Figura 5), mostrando la relevancia de la elección del RBS para la traducción de cada uno de los genes. Así, sólo se detectaron las tres proteínas en la muestra de la cepa M-PAR-241-3N[4C] (ID CEPA No. 24).

Ejemplo 6

Síntesis microbiana de 4OMN con las enzimas NBS, NR y N4OMT (ID SEC No. 9-11) utilizando 3,4-DHBA y p-tiramina como sustrato.

Se ha descrito la síntesis de 4OMN en plantas a partir de la reducción y metilación del producto de condensación de los precursores 3,4-DHBA y p-tiramina. En estas reacciones participarían tres proteínas, que son la norbelladina sintasa (NBS, ID SEC No. 9), noroxomaritidine/norcraftsodine reductasa (NR, ID SEC No. 10) y norbelladina 4'-O-metiltransferasa (N4OMT, ID SEC No. 11) de *N. pseudonarcissus* (Koirala et al., 2024; Majhi et al., 2023).

En el ejemplo 5 se demuestra la co-expresión de las tres proteínas NBS, NR y N4OMT en *E. coli*, por lo menos, en la cepa M-PAR-241-3N[4C] (ID CEPA No. 24).

Con una muestra de extracto catalítico de esta cepa se evaluó la síntesis de 4OMN a partir de los sustratos 3,4-DHBA y p-tiramina. Para ello, se preparó un extracto catalítico con la cepa M-PAR-241-3N[4C] (ID CEPA No. 24), de la misma forma a la descrita en el ejemplo anterior. Para la síntesis de 4OMN se mezcló este extracto con los dos sustratos de la reacción, 3,4-DHBA y p-tiramina. En concreto, se preparó una mezcla de 200 µL en PBS 10 mM, pH 7,4, con 250 µg de extracto catalítico (según la cuantificación de proteína total) y con 0,5 mM de 3,4-DHBA y 0,5 mM de L-tirosina. La mezcla se dividió en dos fracciones de 100 µL que se incubaron a 37°C 1min o 12h, respectivamente.

Se hicieron dos controles, uno para evaluar la condensación espontánea de los dos sustratos, con una mezcla sin extracto catalítico, y otro para evaluar la degradación de 3,4-DHBA en la incubación a 37°C, con 3,4-DHBA 0,5 mM en PBS.

Finalizada la incubación, se analizaron las muestras de forma cualitativa por cromatografía de capa fina (TLC). Para la TLC, se evaluaron 5 µL de las muestras aplicadas en placa de silica y se movilizaron con una fase móvil compuesta por cloroformo:metanol:ácido fórmico 85:10:5 en un recorrido total de 5 cm. La placa se reveló por tinción de fenoles con FeCl₃ 0,5% p/v (Karthikeyan et al., 2015), para evaluar la disminución del sustrato 3,4-DHBA. El resultado de la TLC es cualitativo, pero se observa una disminución importante de la señal de 3,4-DHBA en la muestra de la reacción con extracto de M-PAR-241-3N[4C] después de 12h de incubación a 37°C (Figura 6). No se observa la misma disminución en ninguno de los dos controles evaluados. No obstante, este resultado sólo indica un consumo de 3,4-DHBA. No se detectó 4OMN en las muestras analizadas por TLC, ni con tinción por FeCl₃ ni con ninhidrina. Cabe destacar que en esta técnica el límite de detección de estándar de 4OMN es 5 veces superior al de 3,4-DHBA, así que no se descarta la síntesis de 4OMN.

Ejemplo 7

Construcción de una cepa recombinante de *E. coli* con las enzimas heterólogas TAL, HpaBC, 4CL, HCHL, TDC, NBS, NR y N4OMT (ID SEC No. 1-5 y 9-11) para la producción microbiana de 3,4-DHBA y 4OMN.

En los ejemplos anteriores se ha mostrado la expresión heteróloga de las proteínas del método de la invención en *E. coli*. La mezcla de extractos catalíticos preparados a partir de las distintas cepas que expresan las enzimas del método permite combinar las actividades de todas ellas para producir las moléculas 3,4-DHBA y/o 4OMN. Si bien es posible la aplicación del método de la invención a partir de la generación de mezclas de extractos catalíticos, para simplificar el protocolo, reducir costos y, sobre todo, mejorar la reproducibilidad, se pretende la producción de 3,4-DHBA y/o 4OMN a partir del cultivo de una cepa recombinante de *E. coli* con todas las enzimas del método (Figura 7).

Se diseñaron dos vectores para implementar el método en una sola célula de *E. coli*. Por un lado, se construyó el vector pET28-hchl-tal-BC (ID VEC No. 11), para la co-expresión de HCHL, TAL y HpaBC, insertando entre los sitios XbaI y BamHI del vector pET28-tal-BC (ID VEC No. 9) un fragmento de DNA sintético que incluye el gen de HCHL (ID NUC No. 3) flanqueado, tanto en 5' como en 3', por secuencias que incorporan un RBS32 (ID NUC No. 15) seguido por una secuencia para tags de 6xHis (ID SEC No. 28) y T7 (ID SEC No. 27) que se fusiona en el extremo 5' y en el

marco de lectura del gen que preceden. Este vector contiene todos los genes necesarios para la síntesis de 3,4-DHBA a partir de L-tirosina, excepto uno, el gen de 4CL. Por otro lado, se aisló por PCR el cassette de expresión de 4CL del vector pET19-4cl (ID VEC No. 6) y se clonó entre los sitios NotI y XhoI en el vector pACYCT-3N[4C] (ID VEC No. 24) obteniendo el vector pACYCT-3N[4C]-4cl (ID VEC No. 29).

Los vectores pET28-hchl-tal-BC (ID VEC No. 11) y pACYCT-3N[4C]-4cl (ID VEC No. 29) se transformaron en la cepa superproductora de tirosina y/o p-tiramina M-PAR-241. Esta cepa incorpora modificaciones genómicas que favorecen la metabolización de glucosa a L-tirosina, de forma que proporcionará el sustrato del método. Además, en este caso, la cepa M-PAR-241 proporciona el sistema para la producción p-tiramina por descaboxilación de L-tirosina catalizada por la TDC que contiene. De esta forma, se generó la cepa BABH10 (ID CEPA No. 29), que incorpora la expresión inducible por IPTG de todas las enzimas del método, con la capacidad de síntesis de las moléculas precursoras 3,4-DHBA y p-tiramina y, a partir de estas dos moléculas, producir 4OMN.

Se evaluó la producción de metabolitos de interés en cultivo de la cepa BABH10 (ID CEPA No. 29). En formato de microcultivo, se ensayaron distintos protocolos de crecimiento e inducción con IPTG de la cepa BABH10 en medio mínimo M9M2 con glucosa, como única fuente de carbono. En concreto, se realizaron cinéticas de crecimiento de 20h comparando tres protocolos de inducción: 0 mM IPTG, 0,1mM de IPTG aplicado al inicio del crecimiento y 0,5 mM de IPTG aplicado a mitad de fase exponencial (Figura 8A). El resultado de las cinéticas de crecimiento muestra una clara desaceleración en presencia de IPTG, pero el efecto es menor cuando se aplica la inducción en una fase más tardía del crecimiento. El análisis cualitativo de muestras de los cultivos a punto final reveló la producción de 3,4-DHBA en los casos inducidos por IPTG (Figura 8B). Las muestras se analizarán por GC-MS para detectar la síntesis de 4OMN.

Ejemplo 8

Construcción de una cepa recombinante de *E. coli* con las enzimas heterólogas mQuiC, CAR, NPT, TDC, NBS, NR y N4OMT (ID SEC No. 6-11) para la producción microbiana de 3,4-DHBA y 4OMN.

Como se ha descrito en los ejemplos anteriores, la invención incluye dos alternativas para la síntesis microbiana de la molécula 3,4-DHBA, precursor de 4OMN. En el ejemplo 7 hemos descrito la construcción de una cepa productora de 4OMN que incorpora una de las alternativas de síntesis del precursor 3,4-DHBA a partir de L-tirosina. En este ejemplo, se describe la construcción de una segunda cepa de *E.*

coli con capacidad productora de 4OMN a partir de la síntesis de 3,4-DHBA catalizada por mQuiC y CAR, NPT (Figura 9).

En este caso, se modificó el vector pACYCT-3N[4C] (ID VEC No. 24) insertando entre los sitios NotI y XhoI el gen de CAR, con tags de 6xHis y T7 en N-ter, precedido por una secuencia RBSg10L (ID NUC No. 14), obteniendo el vector pACYCT-3N[4C]-car (ID VEC No. 30). Este vector pACYCT-3N[4C]-car (ID VEC No. 30) junto al vector pET28-npt-mquiC (ID VEC No. 17) se transformaron en la cepa superproductora de tirosina y/o p-tiramina M-PAR-241, obteniendo la cepa BABH8 (ID CEPA No. 30).

10

Aunque la presente invención ha quedado descrita con las realizaciones preferentes mostradas, queda entendido que las modificaciones y variaciones que conserven el espíritu y el alcance de esta invención se entienden dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15

REFERENCIAS.

- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Cao, M., Gao, M., Suástegui, M., Mei, Y., & Shao, Z. (2020). Building microbial factories for the production of aromatic amino acid pathway derivatives: From commodity chemicals to plant-sourced natural products. *Metabolic Engineering*, 58(August 2019), 94–132. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.08.008>
- Carmona-Viglianco, F., Zaragoza-Puchol, D., Feresin, G. E., Bisogno, F. R., Kurina-Sanz, M., & Orden, A. A. (2022). Fungal biotransformations of anticholinesterase norbelladine derivatives to obtain new products and mimic mammalian metabolism. *Phytochemistry Letters*, 51, 5–11. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOL.2022.06.008>
- Ceroni, F., Algar, R., Stan, G.-B., & Ellis, T. (2015). Quantifying cellular capacity identifies gene expression designs with reduced burden. *Nature Methods*, 12(5), 415–418. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3339>
- Desgagné-Penix, I. (2021). Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review. *Phytochemistry Reviews*, 20(2), 409–431. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09678-5>
- D’Oelsnitz, S., Diaz, D., Acosta, D., Schechter, M., Minus, M., Howard, J., Loy, J., Do, H., Alper, H. S., & Ellington, A. D. (2023). Synthetic microbial sensing and biosynthesis of amaryllidaceae alkaloids. *BioRxiv*, 2023.04.05.535710. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.04.05.535710v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.04.05.535710v1.abstract>
- Dubendorf, J. W., & Studier, F. W. (1991). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *Journal of Molecular Biology*, 219(1), 45–59. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90856-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90856-2)
- Fink, T., Stevović, B., Verwaal, R., Roubos, J. A., Gaber, R., Benčina, M., Jerala, R., & Gradišar, H. (2020). Metabolic enzyme clustering by coiled coils improves the biosynthesis of resveratrol and mevalonate. *AMB Express*, 10(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01031-5>
- Friedman, M., Henika, P. R., & Mandrell, R. E. (2003). Antibacterial Activities of Phenolic Benzaldehydes and Benzoic Acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 66(10), 1811–1821. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.10.1811>
- Girard, M. P., Karimzadegan, V., Héneault, M., Cloutier, F., Bérubé, G., Berthoux, L., Mérimol, N., & Desgagné-Penix, I. (2022). Chemical Synthesis and Biological Activities of Amaryllidaceae Alkaloid Norbelladine Derivatives and Precursors. *Molecules*, 27(17), 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules27175621>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *Escherichia coli*: “Ultracompetent” Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(6), 225–231. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot101196>
- He, A., Li, T., Daniels, L., Fotheringham, I., & Rosazza, J. P. N. (2004). *Nocardia* sp. Carboxylic Acid Reductase: Cloning, Expression, and Characterization of a New Aldehyde Oxidoreductase Family.

- He, M., Qu, C., Gao, O., Hu, X., & Hong, X. (2015). Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances*, 5(21), 16562–16574. <https://doi.org/10.1039/c4ra14666b>
- Jayawardena, T. U., Merindol, N., Liyanage, N. S., & Desgagné-Penix, I. (2024). Unveiling Amaryllidaceae alkaloids: from biosynthesis to antiviral potential – a review. *Natural Product Reports*, 41(5), 721–747. <https://doi.org/10.1039/D3NP00044C>
- Jones, J. A., Vernacchio, V. R., Collins, S. M., Shirke, A. N., Xiu, Y., Englaender, J. A., Cress, B. F., McCutcheon, C. C., Linhardt, R. J., Gross, R. A., & Koffas, M. A. G. (2017). Complete Biosynthesis of Anthocyanins Using *E. coli* Polycultures. *MBio*, 8(3), 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.00621-17>
- Karthikeyan, R., Devadasu, C., & Srinivasa Babu, P. (2015). Isolation, characterization, and RP-HPLC estimation of P-coumaric acid from methanolic extract of durva grass (*Cynodon dactylon* Linn.) (Pers.). *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/201386>
- Kilgore, M. B., Augustin, M. M., Starks, C. M., O’Neil-Johnson, M., May, G. D., Crow, J. A., & Kutchan, T. M. (2014). Cloning and Characterization of a Norbelladine 4’-O-Methyltransferase Involved in the Biosynthesis of the Alzheimer’s Drug Galanthamine in *Narcissus* sp. aff. *pseudonarcissus*. *PLoS ONE*, 9(7), e103223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103223>
- Kilgore, M. B., Holland, C. K., Jez, J. M., & Kutchan, T. M. (2016). Identification of a Noroxomaritidine Reductase with Amaryllidaceae Alkaloid Biosynthesis Related Activities. *Journal of Biological Chemistry*, 291(32), 16740–16752. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.717827>
- Koirala, M., Karimzadegan, V., Liyanage, N. S., Méridol, N., & Desgagné-Penix, I. (2022). Biotechnological Approaches to Optimize the Production of Amaryllidaceae Alkaloids. *Biomolecules*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/biom12070893>
- Koirala, M., Merindol, N., Karimzadegan, V., Gélinas, S. E., Liyanage, N. S., Lamichhane, B., Tobón, M. C. G., Lagüe, P., & Desgagné-Penix, I. (2024). Kinetic and in silico structural characterization of norbelladine O-methyltransferase of Amaryllidaceae alkaloids biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 300(9), 107649. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107649>
- Koma, D., Kishida, T., Yoshida, E., Ohashi, H., Yamanaka, H., Moriyoshi, K., Nagamori, E., & Ohmoto, T. (2020). Chromosome Engineering To Generate Plasmid-Free Phenylalanine- and Tyrosine-Overproducing *Escherichia coli* Strains That Can Be Applied in the Generation of Aromatic-Compound-Producing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(14), 1–24. <https://doi.org/10.1128/AEM.00525-20>
- Li, J., & Ye, B.-C. (2021). Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for high-yield production of protocatechuic acid. *Bioresource Technology*, 319, 124239. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124239>
- Majhi, B. B., Gélinas, S.-E., Méridol, N., Ricard, S., & Desgagné-Penix, I. (2023). Characterization of norbelladine synthase and noroxomaritidine/norcraugsodine reductase reveals a novel catalytic route for the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids including the Alzheimer’s drug galanthamine. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1231809. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1231809>
- Moreno-Arribas, V., & Lonvaud-Funel, A. (2001). Purification and characterization of tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine. *FEMS Microbiology Letters*, 195(1), 103–107. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10505.x>
- Olins, P. O., & Rangwala, S. H. (1989). A Novel Sequence Element Derived from Bacteriophage T7 mRNA Acts as an Enhancer of Translation of the *lacZ* Gene in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 264(29), 16973–16976. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71444-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71444-0)

- Örn, O. E., Sacchetto, S., van Niel, E. W. J., & Hatti-Kaul, R. (2021). Enhanced Protocatechuic Acid Production From Glucose Using *Pseudomonas putida* 3-Dehydroshikimate Dehydratase Expressed in a Phenylalanine-Overproducing Mutant of *Escherichia coli*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(June), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.695704>
- Bark, J. B. (2014). Synthesis and characterization of norbelladine, a precursor of Amaryllidaceae alkaloid, as an anti-inflammatory/anti-COX compound. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(23), 5381–5384. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.10.051>
- Peek, J., Roman, J., Moran, G. R., & Christendat, D. (2017). Structurally diverse dehydroshikimate dehydratase variants participate in microbial quinate catabolism. *Molecular Microbiology*, 103(1), 39–54. <https://doi.org/10.1111/mmi.13542>
- Prieto, M. A., & Garcia, J. L. (1994). Molecular characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase of *Escherichia coli*. A two-protein component enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 269(36), 22823–22829. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)31719-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31719-2)
- Sakae, K., Nonaka, D., Kishida, M., Hirata, Y., Fujiwara, R., Kondo, A., Noda, S., & Tanaka, T. (2023). Caffeic acid production from glucose using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 164, 110193. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2023.110193>
- Sambrook, J., & Russel, D. W. (2001). Molecular Cloning, 3-Volume Set : A Laboratory Manual. In *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Singh, A., & Desgagné-Penix, I. (2014). Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloids. *Plant Science Today*, 1(3), 114–120. <https://doi.org/10.14719/pst.2014.1.3.41>
- Singh, A., & Desgagné-Penix, I. (2017). Transcriptome and metabolome profiling of *Narcissus pseudonarcissus* ‘King Alfred’ reveal components of Amaryllidaceae alkaloid metabolism. *Scientific Reports*, 7(1), 17356. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17724-0>
- Singh, A., Massicotte, M. A., Garand, A., Tousignant, L., Ouellette, V., Bérubé, G., & Desgagné-Penix, I. (2018). Cloning and characterization of norbelladine synthase catalyzing the first committed reaction in Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis. *BMC Plant Biology*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1570-4>
- Tozzi, F., Ley, S. V., Kitching, M. O., & Baxendale, I. R. (2010). Enzymatic oxidative cyclisation reactions leading to dibenzozocanes. *Synlett*, 2010(13), 1919–1922. <https://doi.org/10.1055/S-0030-1258486/ID/8/BIB>
- Venkatasubramanian, P., Daniels, L., & Rosazza, J. P. N. (2007). Reduction of Carboxylic Acids by *Nocardia* Aldehyde Oxidoreductase Requires a Phosphopantetheinylated Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 478–485. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607980200>
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). Plant Drug Analysis. *Plant Drug Analysis*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-00574-9>
- Wang, Y., Liu, X., Song, L., Chen, K., Shi, C., Peng, C., Yang, Q., & Li, Z. (2024). Antibacterial and antibiofilm activities of protocatechualdehyde and its synergy with ampicillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1366400. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1366400>
- Zhang, K., & Ni, Y. (2014). Tyrosine decarboxylase from *Lactobacillus brevis*: Soluble expression and characterization. *Protein Expression and Purification*, 94, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.10.018>

5

10