



Centro de Investigación Científica de Yucatán,  
A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE DOS CCDs DE *Bixa*  
*orellana* L. POTENCIALMENTE INVOLUCRADAS  
EN LA SÍNTESIS DE BIXINA**

Tesis que presenta

**JUANA GUADALUPE HERNÁNDEZ RESÉNDIZ**

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México  
2021

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*  
*POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Juana Guadalupe Hernández Reséndiz titulado “**Expresión heteróloga de dos CCDs de *Bixa orellana* L. potencialmente involucradas en la síntesis de bixina**” fue realizado en el laboratorio No. 27 de la unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en la línea de Metabolismo secundario e ingeniería metabólica, del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección del **Dra. Renata Rivera Madrid**, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 27 de Enero de 2021

## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: JUANA GUADALUPE HERNÁNDEZ RESÉNDIZ

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Determinación de la función de los Tres Genes de la Ruta de Biosíntesis de Bixina en Organismos Heterólogos” número FC 2016 No 1716 bajo la dirección de la Dra. RENATA RIVERA MADRID.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada número 907213

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por haberme brindado la oportunidad de pertenecer a su equipo.

A mi comité de evaluación:

Dra. Renata Rivera Madrid; Dra. Georgina Estrada Tapia; Dra. Alba Adriana Vallejo Cardona, Dra. Luisa López Ochoa, Dr. Ignacio Islas Flores. A todos ustedes, les agradezco su acompañamiento y todas las sugerencias y comentarios para conducirme a la conclusión de este proyecto.

A la Dra. Rosa Yazmin Us Camas por toda su infinita paciencia y entusiasmo en cada enseñanza.

A la maestra Lucila Aurelia Sánchez Cach por su asesoría técnica; su apoyo y empeño por fijar cada nuevo conocimiento en mi persona.

A la Mtra. Margarita de Lourdes Aguilar Espinosa por su acompañamiento, sugerencias y aportaciones en mi trabajo.

Al Mtro. Luis Carlos Gutiérrez Pacheco por todo el apoyo incondicional recibido en el día a día de labores.

A cada uno de mis compañeros de laboratorio por su apoyo y dosis de alegría en cada actividad.

A la vida: “por haberme dado tanto” (Violeta Parra)

## DEDICATORIAS

Al Prof. Ricardo Ariel Barrera Acosta:

¡Alalaído!

A la M. en C. Miroslava Zepeda Aguilar por su amistad y apoyo en todo momento.

A la Dra. Renata Rivera Madrid por haber confiado en mí desde el primer momento de conocernos.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	7
CAPÍTULO I.....	8
ANTECEDENTES.....	8
1.1 CAROTENOIDES .....	8
1.2 RUTA DE LOS CAROTENOIDES .....	8
1.3 APOCAROTENOIDES.....	10
1.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA BIXINA.....	10
1.5 VÍAS DE BIOSÍNTESIS DE LA BIXINA.....	11
1.6 DIOXIGENASAS DE CAROTENOIDES CCDs.....	15
1.7 CLASIFICACIÓN Y EL PAPEL DE LAS CCDs EN LA BIOLOGÍA VEGETAL.....	17
1.8 ENFOQUES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS CCDs.....	20
1.9.ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LAS CCDs.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	24
OBJETIVO GENERAL .....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	26
CAPÍTULO II.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	27

2.2 AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE LOS ORF .....	27
2.3 REACCIÓN DE RECOMBINACIÓN GATEWAY .....	28
2.4 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO .....	29
2.5 CONSTRUCCIÓN DE MAPAS DE VECTORES .....	29
2.6 INDUCCIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....	30
2.7 SDS PAGE .....	31
CAPÍTULO III .....	32
RESULTADOS .....	32
3.1 AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE LOS ORF .....	32
3.2 CLONACIÓN AL VECTOR DE ENTRADA PCR8/GW/TOPO .....	33
3.3 CLONACIÓN AL VECTOR DE EXPRESIÓN pDEST17 .....	36
3.4 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO .....	38
3.5 ANÁLISIS DDE EXPRESIÓN PROTEICA .....	41
CAPÍTULO IV .....	43
DISCUSIÓN .....	43
CAPÍTULO V .....	45
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	45
5.1 CONCLUSIONES .....	45
5.2 PERSPECTIVAS .....	45
BIBLIOGRAFÍA .....	46

**LISTADO DE FIGURAS**

Figura 1.1. ....9

Figura 1.2. ....11

Figura 1.3. ....13

Figura 1.4. ....15

Figura 1.5. ....16

Figura 1.6. ....18

Figura 1.7. ....19

Figura 1.8. .... 23

Figura 3.1. .... 32

Figura 3.2. .... 33

Figura 3.3. .... 34

Figura 3.4. .... 34

Figura 3.5. .... 35

Figura 3.6. .... 36

Figura 3.7. .... 37

Figura 3.8. .... 42

## **ABREVIATURAS**

**ABA:** Ácido abscísico

**ACO:** Oxigenasa de Escisión de Apocarotenoides

**$\beta$ (CHXB):** caroteno hidroxilasa de anillo  $\beta$

**$\beta$ -LYC:** Beta-ciclasa

**BoBADH:** Bixina aldehído deshidrogenasa

**BoALDH:** Aldehído deshidrogenasa

**BoLCD:** Dioxigenasa de escisión de licopeno

**BonBMT:** Norbixina metiltransferasa

**BSC:** Células de almacenamiento de bixina

**CCD:** Dioxigenasa de escisión de carotenoides

**cDNA:** DNA de cadena complementaria

**CHXB:** Caroteno hidroxilasa de anillo  $\beta$

**CHXE:** Caroteno hidroxilasa de anillo  $\epsilon$

**CRTISO:** Caroteno *cis-trans* isomerasa

**$\epsilon$ -LYC:** Épsilon-ciclasa

**GGPP:** Geranil geranil difosfato

**MEP:** Metileritritol fosfato

**NCED:** 9-cis epoxicarotenoide dioxigenasa

**ORF:** Open reading frame

**PDS:** Fitoeno desaturasa

**PSY:** Fitoeno sintasa

**RPE:** Epitelio pigmentario de la retina

**SABATH:** Metiltransferasa

**ZDS:** Zetacaroteno desaturasa

**Z-IZO:**  $\zeta$ -caroteno isomerasa, Z-IZO

## RESUMEN

Los compuestos apocarotenoides son derivados de la escisión enzimática de los carotenos y son moléculas ampliamente utilizadas en la industria alimenticia, textil, cosmética y farmacéutica, entre otras. Estas moléculas pueden clasificarse como hormonas, compuestos de señalización, cromóforos, aromas o colorantes; dentro de estos últimos se encuentran el azafrán y la bixina, entre otros. La bixina presenta un color rojo-anaranjado cuya fuente principal es el arilo de las semillas de la especie *Bixa orellana*, la cual es conocida en México como achiote. Si bien ya se ha caracterizado la vía de biosíntesis de la bixina en *Escherichia coli*, se continúa estudiando la posibilidad de participación de enzimas alternas en su biosíntesis. Es por esto, que se han propuesto modelos donde diversas enzimas dioxigenasas de carotenoides (CCDs) que pudieran estar involucradas en la biosíntesis de este apocarotenoide. Dentro de estas enzimas, en nuestro grupo de trabajo se proponen las enzimas CCD1-1 y CCD4-1. En el presente trabajo se describen los resultados de la expresión heteróloga de dos proteínas que potencialmente se encuentran implicadas en la ruta de biosíntesis de bixina: CCD4-1 y CCD1-1, las proteínas recombinantes mostraron un peso molecular esperado de 67.98kDa (CCD4-1) y 60.96kDa (CCD1-1). Así mismo, los alineamientos de secuencias permitieron encontrar motivos conservados con los residuos de aminoácidos implicados directamente en la reacción catalítica de las CCDs.

## **ABSTRACT**

Apocarotenoid compounds are derived from the enzymatic cleavage of carotenes and are molecules widely used in the food, textile, cosmetic and pharmaceutical industries, among others. These molecules can be classified as hormones, signaling compounds, chromophores, flavors or colorants; within the latter are saffron and bixin, among others. Bixin has a red-orange color whose main source is the aril of the seeds of the species *Bixa orellana*, which is known in Mexico as achiote. Although the bixin biosynthesis pathway in *Escherichia coli* has already been characterized, the possibility of the participation of alternative enzymes in its biosynthesis continues to be studied. For this reason, models have been proposed where various carotenoid dioxygenase enzymes (CCDs) that could be involved in the biosynthesis of this apocarotenoid. Among these enzymes, our working group proposes the enzymes CCD1-1 and CCD4-1. In the present work we describe the results of the heterologous expression of two proteins that are potentially involved in the bixin biosynthesis pathway: CCD4-1 and CCD1-1, the recombinant proteins showed an expected molecular weight of 67.98kDa (CCD4- 1) and 60.96kDa (CCD1-1). Likewise, the sequence alignments made it possible to find conserved motifs with the amino acid residues directly involved in the catalytic reaction of the CCDs.

## INTRODUCCIÓN

Económicamente, los apocarotenoides son valorados comercialmente como colorantes y especias; dentro de los ejemplos más conocidos y estudiados, se encuentra la bixina: un pigmento color rojo-anaranjado de naturaleza apocarotenoide derivado de la escisión enzimática del licopeno que es utilizado ampliamente en la industria alimenticia, textil, cosmética, como colorante natural. La fuente principal de este compuesto es el arilo de las semillas de la planta *Bixa orellana* la cual es conocida como achiote en México. Se ha reportado que el arilo contiene el 30% de bixina, y el 70% restante comprende principalmente lípidos, carbohidratos y proteínas. Se han propuesto modelos para las vías de biosíntesis de bixina donde diversas enzimas dioxigenasas de carotenoides pueden estar involucradas en la síntesis de bixina. Dentro de estas enzimas, se proponen las enzimas CCD1-1 y CCD4-1, las cuales ya han sido caracterizadas bajo diferentes enfoques en diversos estudios. Estos enfoques incluyen caracterizaciones a nivel funcional, estructural y molecular. En este trabajo, se realizaron los primeros pasos metodológicos hacia una caracterización bioquímica con un enfoque hacia la actividad catalítica como perspectiva. Para la caracterización bioquímica, se necesita contar con una metodología que permita de manera eficiente una reducción en los tiempos de extracción y purificación de proteínas, por lo que el método de proteínas recombinantes puede contribuir en este tipo de procesos. Dichos estudios permitirán a futuro, conocer más acerca de estas enzimas y permitirán determinar de una manera más precisa su papel en la ruta de síntesis de la bixina.

# **CAPÍTULO I**

## **ANTECEDENTES**

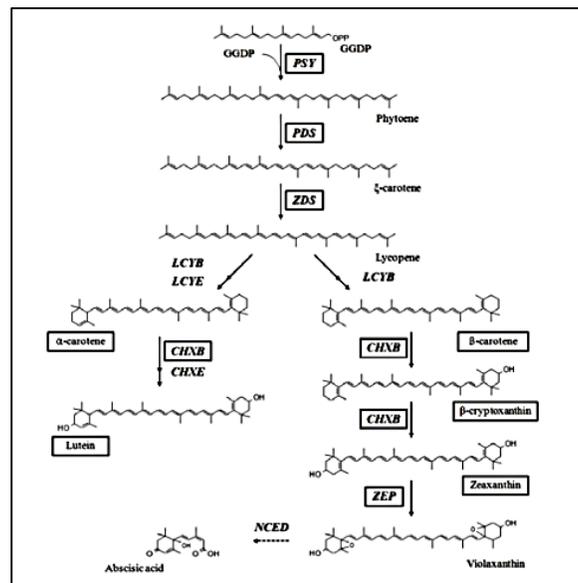
### **1.1 CAROTENOIDES**

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides en su mayoría formados por 40 átomos de carbono (C40) de naturaleza hidrófoba (Lashbroke et al., 2013; Rivera-Madrid et al., 2013) que van desde el amarillo al rojo y son sintetizados por microorganismos y plantas (Rivera-Madrid et al., 2013; Anh et al., 2015; Cárdenas-Conejo et al., 2015; Sankari et al., 2016). Los carotenoides presentan una amplia distribución con más de 600 miembros identificados (Schwartz et al., 2001; Vogel et al., 2008; Anh et al., 2014). Dentro de las funciones que desempeñan, se encuentran aquellas como antioxidantes en todos los organismos, incluidos animales y hongos (Anh et al., 2014; Cárdenas-Conejo et al., 2015); en los cloroplastos, los carotenoides actúan principalmente como pigmentos accesorios en los complejos de antenas de captación de luz y también ayudan en la fotoprotección al atrapar los radicales libres y prevenir el daño fotooxidativo a la célula. Generalmente no se encuentran "libres" dentro del estroma acuoso, sino que se unen en distintos complejos de antenas de proteínas pigmentadas dentro de las membranas de los tilacoides (grana) (Lashbroke et al., 2013). Como precursores de los apocarotenoides, pueden actuar como hormonas, compuestos de señalización, cromóforos o constituyentes de aroma (Anh et al., 2014). La localización y composición de los carotenoides cambian durante el estrés (por ejemplo, el ciclo de las xantofilas) y durante las transiciones/diferenciaciones de los plastos: cloroplastos a cromoplastos (como ocurre en algunos frutos y flores) o cloroplastos a gerontoplastos (como ocurre durante la senescencia) (Lashbroke et al., 2013; Louro y Santiago 2016). Los carotenoides son la principal fuente de vitamina A (retinol) en animales y el fitorregulador ácido abscísico (ABA) en plantas (Auldridge et al, 2006; Anh et al., 2014; Cárdenas-Conejo et al., 2015). En humanos pueden prevenir enfermedades degenerativas y reducir el riesgo de ciertas formas de cáncer (Anh et al., 2014).

### **1.2 RUTA DE LOS CAROTENOIDES**

Las enzimas responsables de la biosíntesis de carotenoides se encuentran dentro de los plastidios (cromoplastos) de flores y frutos, como plastoglóbulos o como estructuras cristalinas, fibrosas o membranosas que se sumergen en el estroma y mantienen esta

organización estructural hasta las etapas finales de la vida del cromoplasto, esto ocurre en gran parte debido a su naturaleza hidrofóbica (Auldridge et al., 2006; Lashbroke et al., 2013; Cárdenas-Conejo et al., 2015). El primer paso en la biosíntesis de carotenoides es la condensación de dos moléculas de geranylgeranyl difosfato (GGDP) para producir fitoeno, catalizado por la fitoeno sintasa (PSY). Posteriormente, cuatro enzimas convierten el fitoeno en licopeno a través de fitoflueno, beta-caroteno y neurosporano: dos desaturasas introducen cuatro enlaces dobles (fitoeno desaturasa (PDS) y zetacaroteno desaturasa (ZDS) y dos isomerasas que actúan, respectivamente, en el doble enlace 7/9-7'/9' (caroteno cis-trans isomerasa, CRTISO) y el doble enlace C15-15'(ζ-caroteno isomerasa, Z-IZO). A partir del licopeno hay un punto de ramificación central en la ruta en el cual, la actividad relativa de la épsilon-ciclasa (ε-LYC) frente a la beta-ciclasa (β-LYC) puede determinar el flujo de carotenoides del licopeno a cualquiera de los α-carotenos o β-carotenos (Cárdenas-Conejo et al, 2015). Posteriormente, el α-caroteno y el β-caroteno se hidroxilan para producir luteína y zeaxantina, esta reacción es catalizada por la caroteno hidroxilasa de anillo β(CHXB) y la caroteno hidroxilasa de anillo ε(CHXE), respectivamente; finalmente, a través de la zeaxantina epoxidasa se produce violaxantina que se utiliza para sintetizar ácido abscísico (ABA) a través de la escisión oxidativa catalizada por la 9-cis epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) (Rivera-Madrid, 2013; Anh et al., 2014; Cárdenas-Conejo et al., 2015) (Fig. 1.1).



**Figura 1.1** Esquema de la vía de los carotenoides. (Tuan *et al.*, 2015)

### 1.3 APOCAROTENOIDES

Los apocarotenoides son una clase de compuestos terpenoides generados por la escisión oxidativa de los carotenoides (Schwartz et al., 2001; Auldridge et al., 2006; Vogel et al., 2008; Rivera-Madrid et al., 2013). Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Vogel et al., 2008). Forman parte de diversos procesos biológicos esenciales en plantas, animales y bacterias fotosintéticas entre las cuales se pueden mencionar aquellas en las que participan como parte de la regulación de la expresión génica (Rivera-Madrid et al., 2013); procesos de pigmentación, fotosíntesis, fotoprotección, atrayentes de polinizadores (Schwartz et al., 2001; Vogel et al., 2008; Rivera-Madrid et al., 2013; Sankari et al., 2016; Ahrazem et al., 2015). Como respuesta a estrés forma parte de la ruta del ácido abscísico (ABA); fitohormona que participa en procesos del desarrollo de la planta y la adaptación ambiental. Se ha reportado ampliamente la importancia de ABA en diversos tipos de estrés (mecanismos de defensa, tolerancia a la sequía, crecimiento de las semillas y la detección de azúcar) (Schwartz et al., 2001; Rivera-Madrid et al., 2013; Sankari et al., 2016). En animales, el retinol (vitamina A), es un apocarotenoide esencial del ciclo visual en los animales (Auldridge et al., 2006; Ahrazem et al., 2015). Económicamente, los apocarotenoides son valorados comercialmente como colorantes y especias; dentro de los ejemplos más conocidos y estudiados, se encuentra la bixina: un pigmento color rojo-anaranjado de naturaleza apocarotenoide derivado de la escisión enzimática del licopeno, ubicado principalmente en las semillas y que es utilizado como colorante en la industria alimenticia, textil, cosmética, entre otros (Cárdenas-Conejo et al., 2015; Carballo-Uicab et al., 2019).

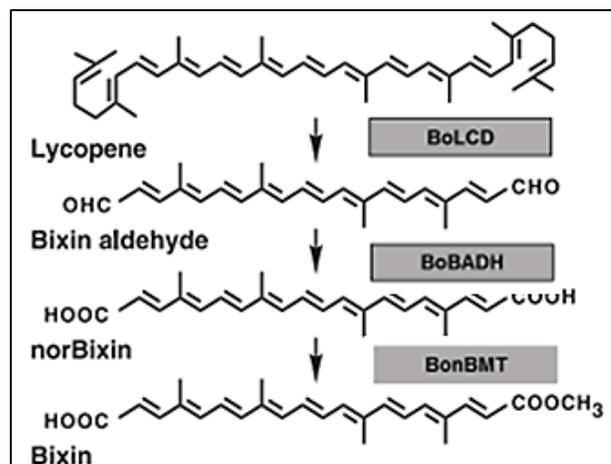
### 1.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA BIXINA

La bixina es un apocarotenoide lineal de 25 átomos de carbono con 9 enlaces dobles y un peso molecular de 394.5 g/mol; su fórmula empírica molecular es  $C_{25}H_{30}O_4$ , y su nombre científico es metil hidrógeno 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno- 6,6'-dioato éster (Rivera-Madrid et al., 2016), pertenece al grupo de pigmentos apocarotenoides, que se forma a partir de la descomposición oxidativa de licopeno catalizada por las enzimas de escisión de carotenoides (CCE) (Rivera-Madrid et al., 2016; Carballo-Uicab et al., 2019). La bixina tiene dos configuraciones estereoquímicas diferentes: *cis* y *trans*. La configuración *cis* es soluble en la mayoría de los solventes orgánicos polares, a los que imparte un color naranja y es

en gran parte insoluble en aceite vegetal. La trans-bixina es un isómero más estable, exhibe un color rojo en solución y es soluble en aceite vegetal (Rivera-Madrid et al., 2016). Es sensible a la luz, la temperatura, el aire, los antioxidantes y el pH. Sus isómeros tienen una absorción máxima con 500 y 470 nm utilizando cloroformo. Su punto de fusión es 189.5–198.5°C (Benítez et al., 2010; Rivera-Madrid et al., 2016). La fuente principal de bixina es el arilo de las semillas de la planta *B. orellana*, especie comúnmente conocida como achiote en México. Estudios realizados por Louro y Santiago (2016) reportan que el 30% del arilo está compuesto de bixina, el 70% restante comprende principalmente lípidos, carbohidratos y proteínas. La concentración de bixina va en aumento de forma continua durante el desarrollo de semillas inmaduras hasta que alcanzan el tamaño máximo (Cárdenas-Conejo et al., 2015).

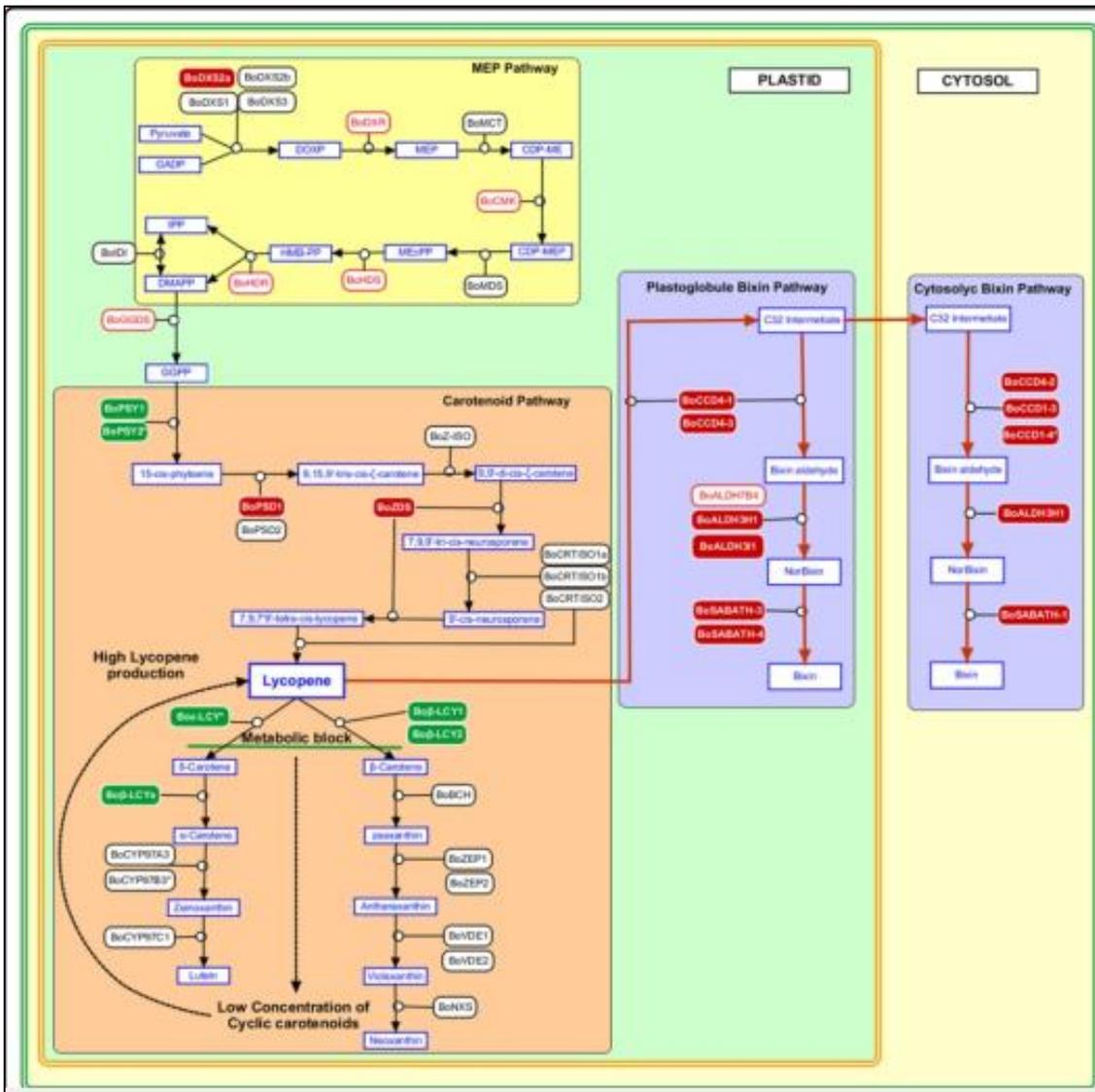
### 1.5 VÍAS DE BIOSÍNTESIS DE BIXINA

En el 2003, Bouvier y colaboradores registraron un sistema de expresión heterólogo para la ruta biosintética de la bixina; en este sistema se co-expresaron tres genes clonados: dioxigenasa de escisión de licopeno (BoLCD), bixina aldehído deshidrogenasa (BoBADH) y norbixina metiltransferasa (BonBMT) donde a partir de bacterias transformadas de *Escherichia coli* productoras de licopeno, se logró la producción de bixina (Fig. 1.2).



**Figura 1.2** Vía generada por Bouvier et al (2003) para la biosíntesis de bixina en bacterias.

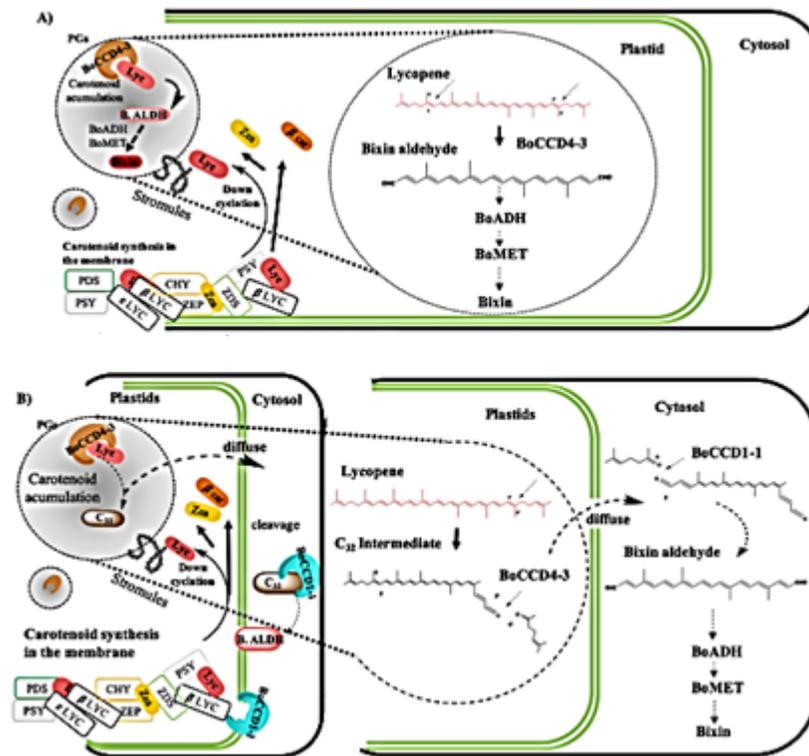
En 2015, Cárdenas-Conejo y colaboradores reportaron el transcriptoma de *Bixa orellana*; en ese trabajo, los genes propuestos por Bouvier et al. (2003) para la ruta de biosíntesis de bixina no se encontraron presentes; sin embargo, en sus resultados presentaron la posible participación de otras enzimas y los genes involucrados en la ruta de carotenoides, aquellos que pertenecen a la vía Metileritritol fosfato (MEP); y genes candidatos en la biosíntesis de bixina: dioxigenasas de carotenoides (BoCCDs); aldehído deshidrogenasas (BoALDH) y metiltransferasas (SABATH) los cuales fueron propuestos como un nuevo conjunto de productos génicos que pueden ser candidatos para la ruta de biosíntesis de bixina. El paso inicial sugerido es la escisión oxidativa de los enlaces 5-6/5'-6' de licopeno catalizada por una dioxigenasa de carotenoides (CCDs) para producir bixina aldehído (Fig. 1.3).



**Figura 1.3** Esquema de la ruta de bixina propuesta por Cárdenas-Conejo et al. (2015) señalada en recuadros azules.

En 2019, Carballo-Uicab y colaboradores reportaron estudios con diferentes enfoques para identificar las enzimas BoCCD candidatas a ser partícipes en la síntesis de bixina a partir de la selección de ocho genes previamente identificados del transcriptoma de semillas de *B. orellana*. En dicho trabajo, los investigadores concluyeron que dos genes candidatos BoCCD1-1 y BoCCD4-3, parecen tener la misma actividad de escisión del licopeno. En ensayos *in vitro*, se ha descrito que las enzimas se encuentran en diferentes compartimentos celulares (BoCCD1-1, en citosol; BoCCD4-3 en plastidio) sin embargo los

resultados sugieren que ambas clases de enzimas pueden ser responsables del metabolismo de los carotenoides y biosíntesis de bixina. Los miembros de la familia de CCD4 han sido reportados para cortar al licopeno simétricamente y asimétricamente, formando bixina aldehído en un corte simétrico y el licopenoato de metilo 9' Z-apo-6' o el 6-metil-5-hepten-2 por un corte asimétrico. Esta hipótesis se sustenta debido a que BoCCD-1 se localiza en el citosol, lo que le impide tener acceso al sustrato licopeno que se acumula en los plastidios. Para esta propuesta se tomó en consideración la evidencia bioquímica de la presencia de un complejo plastídico asociado a las membranas, que sugiere que las enzimas carotenogénicas interactúan entre ellas formando complejos asociados a las membranas de los plastidios por lo que los posibles complejos enzimáticos en la membrana de los plastidios pudieran estar participando en la biosíntesis de bixina. En la figura 1.4 se muestra el modelo propuesto que consiste brevemente en A: la biosíntesis de bixina es llevada a cabo en los plastidios por la enzima BoCCD4 que corta al licopeno en la posición 5,6 (5',6') para producir bixina. En este caso, una vez terminada la síntesis de bixina, ésta sería transportada por los estrómulos plastídicos hacia las células de almacenamiento de bixina (BSC). En B: la síntesis de bixina se lleva a cabo parcialmente en los plástidos y finaliza en el citosol. Primero, BoCCD4-3 escinde el licopeno asimétricamente en la posición 5,6 o (5', 6') y el producto resultante (C32) se difunde fuera del plastidio y es utilizado por BoCCD1-1 para formar bixina aldehído.

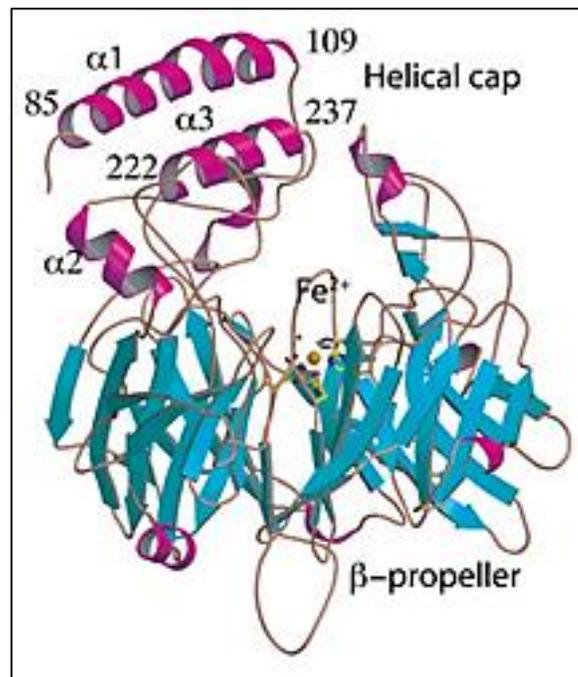


**Figura 1.4** Modelos propuestos para la ruta de bixina (Carballo-Uicab et al., 2019).

En general, la biosíntesis de apocarotenoides en las plantas puede ocurrir de forma enzimática o no enzimática, pero el mecanismo predominante es enzimático a través de la actividad de la familia de CCDs (Auldridge et al., 2006; Ahrazem et al., 2015).

### 1.6 DIOXIGENASAS DE CAROTEOIDES (CCDs)

Las dioxigenasas de carotenoides son enzimas de acción específica (CCE), los miembros de la superfamilia de oxigenasas de cadena de polieno las cuales se encuentran distribuidas en todos los taxones y han sido clasificadas según sus sustratos y la posición del enlace escindible (Carballo-Uicab et al., 2019). A partir del genoma de *Arabidopsis thaliana*, fueron identificadas nueve dioxigenasas de carotenoides putativas con base en la homología de secuencia de la dioxigenasa VP14 aislada a partir del genoma del maíz (*Zea mays*) (Messing et al., 2010) y que se encuentra involucrada en la biosíntesis del ácido abscísico ABA (Fig. 1.5).



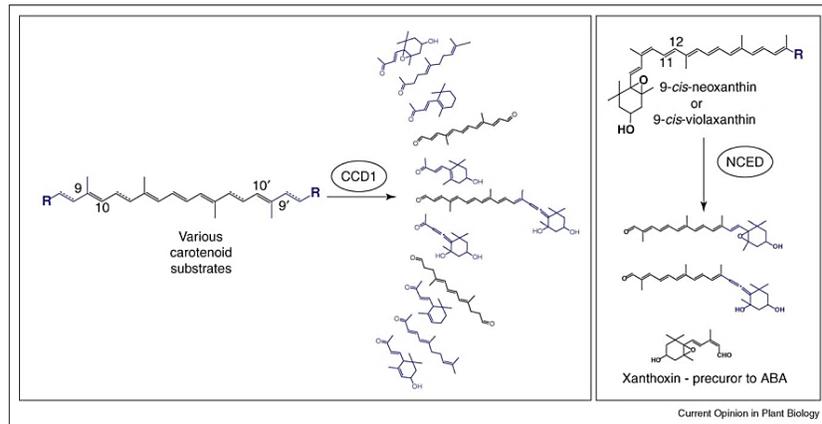
**Figura 1.5** Modelo de la enzima dioxigenasa VP14. En magenta, se muestra  $\alpha$ -hélices; en azul, siete hojas  $\beta$  plegadas; bucles en color café (Messing et al., 2010).

Estas nueve enzimas fueron agrupadas en dos familias de acuerdo a su actividad de escisión: en el primer grupo se encuentran cuatro de ellas denominadas NCED (9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasas) (NCED2, NCED3, NCED6 y NCED9) las cuales presentan la misma actividad que VP14, la dioxigenasa NCED5 tiene similitud con VP14, aunque su actividad no ha sido determinada. Las cuatro proteínas restantes divergen de las NCED y se les ha dado la designación genérica de dioxigenasas de escisión de carotenoides (CCD); estas incluyen CCD1, CCD4, CCD7 y CCD8 (Auldrige et al., 2006; Dzib-Cauich et al., 2020; Rivera-Madrid y Ramamoorthy, 2020). La característica común de estas enzimas es un requisito de cofactor de hierro no hemo (Ahrazem et al, 2015) que pueden escindir uno o ambos enlaces dobles, y de acuerdo a su especificidad, ésta podría ser del tipo estricto o preferencial hacia sus sustratos carotenoides o apocarotenoides (Carballo-Uicab et. al., 2019). Además de este requisito, estructuralmente todas las CCDs presentan hélices tipo  $\alpha$  y siete láminas tipo  $\beta$ , en cuyo eje se ubica el átomo de  $\text{Fe}^{2+}$  como cofactor (Frusciante, et al., 2014). Cuentan con cuatro residuos de histidina estrictamente conservados

implicados en la unión de hierro y oxígeno (Frusciante, et al., 2014; Ahrazem et al., 2015) y residuos de glutamato y aspartato que fijan las posiciones de las histidinas (Ahrazem et al., 2015). También contienen una secuencia peptídica conservada en su extremo carboxilo terminal (Auldrige et al., 2016). Los genes y enzimas CCD se han estudiado en varias especies, como *B. orellana*, azafrán o *Crocus sativus*, o *Chrysanthemum morifolium* y papa (*Solanum tuberosum*) (Rivera-Madrid et al., 2016 y Sankari et al., 2016). La estructura tridimensional homóloga a VP14 se ha podido observar a través de técnicas de cristalografía, dentro de las cuales se encuentran la oxigenasa apocarotenoide 15,15' (ACO) de la cianobacteria *Synechocystis* (Kloer et al., 2005) y RPE65 quien cataliza la conversión de ésteres de todos los *trans* retinoles en 11-*cis*-retinol en el epitelio pigmentario de la retina (RPE) (Kiser et al., 2009).

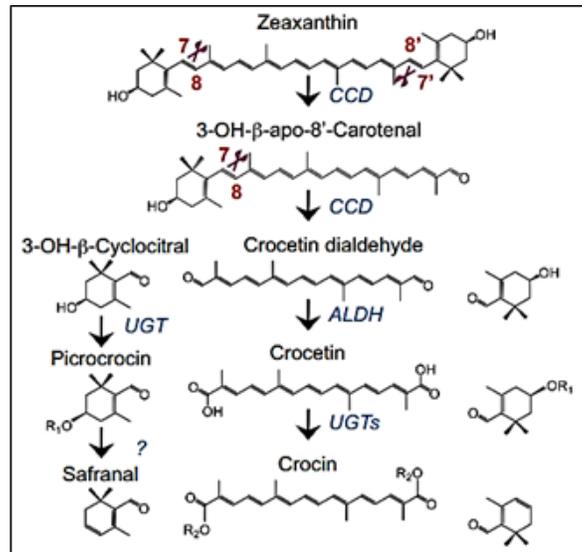
### **1.7 CLASIFICACIÓN Y EL PAPEL DE LAS CCDs EN LA BIOLOGÍA VEGETAL**

Los miembros de la subfamilia CCD se encuentran involucrados en diversos procesos biológicos dentro de los cuales se encuentran la síntesis de sabor, aromas volátiles, procesos de síntesis de fitohormonas como las estrigolactonas (SL) entre otros. También participan en las respuestas a estrés abiótico, en pigmentación, fotosíntesis y fotoprotección (Zhou et al., 2019). Las CCD de plantas se dividen en cinco clases, CCD1, CCD2, CCD4, CCD7 y CCD8, que difieren en sus especificidades de sustrato y sitios de escisión (Auldrige et al., 2006; Frusciante et al., 2014; Ahrazem et al., 2015; Carballo-Uicab et al., 2019). De acuerdo a este orden, a partir de la identificación de la enzima CCD1 de *Arabidopsis thaliana* (AtCCD1) se pudo comprobar que ésta puede escindir carotenoides lineales y cíclicos en las posiciones 9,10 y 9',10' en apocarotenoides volátiles (Schwartz et al., 2001) (Figura 1.6).



**Figura 1.6** Comparación de la actividad de escisión de CCD1 y NCED (Auldrige et al., 2016).

Por ejemplo, cuando el  $\beta$ -caroteno sirve como sustrato, AtCCD1 genera dos productos C13 (ambos  $\beta$ -ionona) y un dialdehído C14 central. La escisión simétrica del sustrato carotenoides sugiere que CCD1 podría actuar como un dímero. Los mutantes con pérdida de función de AtCCD1 mostraron un incremento en el contenido de carotenoides en semillas maduras, lo que indica un papel de CCD1 en el catabolismo de carotenoides. Los homólogos de CCD1 se han identificado genéticamente o bioquímicamente en uva (*Vitis vinifera*), nectarina, tomate, petunia, azafrán y fruta de estrella (Auldrige et al., 2016). En 2015, Auldrige y colaboradores determinaron su localización subcelular en el citosol después de realizar estudios *in vitro*. En cuanto a las enzimas CCD2, Frusciante y colaboradores en 2014, encontraron que las enzimas de la familia CCD2 son las responsables de la producción de apocarotenoides en los estigmas de la especie *Crocus sativus* (azafrán) donde es expresada de manera temprana durante el desarrollo del estigma. Reportaron que estas enzimas escinden secuencialmente los dobles enlaces 7,8 y 7',8' adyacentes a un anillo de 3-OH- $\beta$ -ionona lo que convierte la zeaxantina en crocetina dialdehído, que es precursor de los apocarotenoides de esta especie. También informaron sobre su localización citosólica, y sugirieron que puede escindir carotenoides localizados en la envoltura externa del cromoplasto (Fig. 1.7).



**Figura 1.7** Esquema de la vía de los apocarotenoides del azafrán. Frusciante et al., 2014.

Ahrazem y colaboradores (2015) reportaron el aislamiento de un homólogo de CsCCD2 cuya localización fue comprobada en los plastidios y relacionada con la acumulación de crocetina en el estigma y tépalos de *C. sativus* durante el desarrollo. En cuanto a las enzimas CCD4, las plantas producen dos isoformas: CCD4a y CCD4b que tienen diferentes funciones químicas y biológicas (Ates, 2018). Estas enzimas catalizan la escisión de carotenoides formando compuestos pigmentarios y de aroma; las posiciones reportadas en las que escinden en sus sustratos son: 9',10' o 7', 8' de los sustratos β-caroteno o β-apo-8'-caroteno; β-caroteno, β-criptoxantina y zeaxantina (Frusciante et al., 2014; Ahrazem et al., 2015). Los miembros de esta subfamilia fueron reportados por primera vez en plantas de crisantemo y su actividad enzimática en azafrán, manzana, crisantemo, rosa y *Arabidopsis thaliana* (Ates, 2018) entre otros, expresándose preferentemente en flores y localizándose en los plastidios (Frusciante et al., 2014; Ahrazem et al., 2016). En el estudio realizado por Cárdenas-Conejo, et al (2015) reportaron que CCD4 tiene la capacidad de escindir el licopeno, un carotenoide formado por 40 átomos de carbono en la posición de doble enlace 5,6/5',6' cuya actividad enzimática está asociada de manera específica a los plastoglobulos dentro de los plastidios donde tiene acceso a sus sustratos carotenoides. Como parte de la subfamilia CCD, CCD4 participa en respuestas a diversos tipos de estrés

abiótico. Se ha informado, en el caso de la especie *Crocus sativus*, que CsCCD4b es altamente sensible a NaCl y deshidratación (Zhou et al., 2019). Las enzimas CCD7 y CCD8 se encuentran reportadas formando parte de la biosíntesis de estrigolactona (SL), hormona involucrada en la inhibición de brotes ramificados y son localizadas en el plastidio (Frusciante et al., 2014; Ahrazem et al., 2015; Ates, 2018). CCD7 presenta actividad asimétrica en el enlace 9,10 de su sustrato carotenoides y dentro de los productos generados por esta enzima se encuentra las  $\beta$ -iononas (Auldrige et al., 2006) compuesto con alta demanda en la industria de la perfumería. Las CCD exhiben especificidad por el doble enlace que escinden, sin embargo, muchas son promiscuas en su elección de sustrato (Auldrige et al., 2016) a diferencia de las 9-cis-epoxycarotenoides dioxigenasas (NCED) que escinden solamente enlaces dobles 11,12. También se ha reportado otras CCD como la CsZCD de *Crocus sativus* (una monocotiledónea) que escindió en el doble enlace 7,8 de zeaxantina (Auldrige et al., 2016).

### **1.8 ENFOQUES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS CCDs**

La identificación y caracterización funcional de dos dioxigenasas carotenoides (VvCCD4a y VvCCD4b) en *Vitis vinífera* fue llevada a cabo por Lashbroke y colaboradores (2013) con el objetivo de dilucidar el papel biológico de estos genes y sus enzimas respectivas en la vida a partir de su descripción y análisis de los apocarotenoides volátiles formados después de la escisión de carotenoides en un sistema heterólogo en *Escherichia coli*. Los resultados les permitieron sugerir que estas enzimas son las principales responsables de catalizar la escisión de los carotenoides en los plastidios. En el 2019, Carballo-Uicab y colaboradores realizaron un trabajo en el cual a partir de un análisis del transcriptoma de *B. orellana* aíslan y caracterizan de manera funcional a dos dioxigenasas putativas (BoCCD4 y BoCCD1) potencialmente involucradas en la síntesis de bixina. En su estudio confirmaron por medio de alineamientos y modelos por homología que estas enzimas están conservadas y pertenecen a la familia de CCDs. Para comprobar que las dos CCDs seleccionadas tenían actividad enzimática, primero se expresaron en *Escherichia coli* y después, la actividad fue determinada identificando sus productos en el extracto crudo usando UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS. Nawade et al., (2020) reportan la identificación basada en transcriptoma y la caracterización funcional de los genes de la dioxigenasa de escisión de carotenoides del fruto de *Ficus carica* (FcCCD). Estos genes se sobreexpresaron en cepas de *Escherichia coli* previamente diseñadas para producir diferentes carotenoides. La enzima FcCCD1A

recombinante mostró especificidad por la posición de doble enlace 9,10 (9',10') de los carotenoides cíclicos para generar  $\alpha$ -ionona y  $\beta$ -ionona, mientras que FcCCD1B escindió licopeno y un resto acíclico de  $\delta$ -caroteno, produciendo 6- metil-5-hepten-2-ona. Sus resultados sugieren un papel para los genes FcCCD1 en la biosíntesis de apocarotenoides en higos. El mecanismo de acción de las CCDs implica la incorporación de oxígeno entre átomos de carbono adyacentes a lo largo de la cadena principal de carotenoides. Cuando los CCD actúan sobre los carotenoides bicíclicos, una sola escisión céntrica o lateral produce dos estructuras monocíclicas; sin embargo, una escisión doble simétrica produce diapocarotenoides. Por otra parte, cuando existen dobles enlaces conjugados dentro de la cadena principal de carotenoides éstos representan sitios potenciales en las que pueden actuar las CCD (Rivera-Madrid et al, 2020).

### **1.9 ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LAS CCDs**

Las enzimas dioxigenasas de carotenoides se encuentran distribuidas en células animales y vegetales, sin embargo, su clasificación para determinar su actividad catalítica depende del  $O_2$  atmosférico que pueda ser incorporado a sus productos. De esta manera, el grupo de las dioxigenasas que incorporan ambos átomos de oxígeno, se pueden separar del grupo de las monooxigenasas que pueden incorporar solo un átomo a sus productos (Auldrige et al., 2016). En 1984, los investigadores Creelman y Zeevaart realizaron experimentos de marcado con  $^{18}O_2$  los cuales mostraron un marcado completo de la xantoxina precursora de ABA, lo que indica que la síntesis implica un mecanismo de dioxigenasa. Sin embargo, cuando usaron  $H_2^{18}O$  y  $^{17}O_2$  en reacciones con el  $\alpha$ -caroteno asimétrico y la escisión en 15,15' por la oxigenasa de pollo, no se encontró una incorporación igual de  $^{18}O$  y  $^{17}O$  dentro de los productos de escisión. Observaron que el patrón de incorporación de oxígeno, (tanto del oxígeno, como del agua), mostraba un mecanismo de monooxigenasa. Su conclusión fue cuestionada y se propuso un mecanismo de dioxigenasa en el que se agrega  $O^2$  atmosférico a través del doble enlace para formar un dioxetano intermediario. Ese intermediario posteriormente se descompondría en los productos de escisión. En ensayos con CCD1 de *Arabidopsis* y  $\beta$ -apo-8-carotenal, se encontró el etiquetado consistente con el mecanismo de dioxigenasa propuesto (Auldrige et al., 2016). En el 2005, Kloer y colaboradores reportaron la estructura tridimensional de la oxigenasa apocarotenoide 15,15' (ACO) de la cianobacteria *Synechocystis*. ACO escinde

el doble enlace 15,15' y sus sustratos preferidos son apocarotenales de longitud de cadena C27-C30 con anillos de ionona hidroxilada en ensayos *in vitro*. ACO presenta una estructura terciaria de hélice  $\beta$  de siete laminas, así como las cuatro histidinas conservadas, que son características de la familia CCD, éstas residen en el eje de la hélice y coordinan un solo ion ferroso. Los autores atribuyeron la especificidad de la escisión de doble enlace a un efecto de anclaje del anillo de ionona. El sustrato agregado se reportó en una conformación totalmente trans, pero se informó que estaba dentro del cristal con enlaces dobles cis 13,14 y 13',14'. De ser así, las CCD podrían poseer actividad intrínseca de isomerasa, al igual que RPE65 como sugiere Auldridge et al. (2016), sin embargo, aún no se ha aislado ninguna CCD vegetal que posea actividad isomerasa. Prya et al., 2017 propusieron un análisis *in silico* para estudiar las proteínas CCD en *Arabidopsis thaliana*, con el objetivo de generar un modelo de estructura tridimensional (3D) para las proteínas CCD1 de *Bixa orellana* y *Crocus sativus* con el objetivo de observar diferencias estructurales entre las proteínas AtCCD. Construyeron un modelo para cada una de las proteínas AtCCD1, AtCCD4, AtCCD7, AtCCD8, BoCCD1 y CsCCD1 utilizando ACO como plantilla. Los seis modelos construidos exhibieron una estructura secundaria conservada como en todas las proteínas de la familia CCD, la cual consistía en hélices  $\alpha$ , hojas  $\beta$  y giros que fueron similares a la proteína molde. También encontraron los cuatro residuos de His ubicados al interior del centro catalítico y se mostraron en una alineación estructural (His-95, His-222, His-270 e His-336). Los resultados generales del análisis de dinámica molecular predijeron que BoCCD1, CsCCD1 y AtCCD1 mostraban características estructurales similares. En el 2019, Zhou y colaboradores llevaron a cabo la identificación y expresión de los genes que codifican para las dioxigenasas de carotenoides (CCDs) en plantas de tabaco. En este estudio, se reportaron las longitudes de proteína deducidas de 489 a 650 aminoácidos, el peso molecular fue de 55.733 a 73.341 kDa y el pI de 4.60 a 8.18. Encontraron que todas las proteínas CCD comprendían un dominio RPE65 (proteína de membrana epitelial de pigmento retiniano) reportada en la base de datos de CDBI de NCBI, por lo que al investigar las características de los motivos de las proteínas CCD en estudio, comprobaron que todos los grupos de las subfamilias de proteínas CCD y NCED compartían los mismos motivos, lo cual les sugería que estos motivos podrían ser importantes y responsables de sus principales funciones (Fig 1.8).



**Figura 1.8** Los motivos conservados de las proteínas CCD1 y CCD4 de *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* y *Capsicum annuum*. Zhou et al., 2019.

## JUSTIFICACIÓN

*Bixa orellana* es considerada la segunda especie como fuente principal del pigmento apocarotenoide bixina, el cual tiene una alta demanda comercial debido a que es utilizado como colorante natural en la industria alimenticia, textil, cosmética, entre otras. Dentro de los avances reportados para dilucidar la ruta de biosíntesis se encuentra el ensamble y análisis del transcriptoma donde se identificó un nuevo conjunto de ocho miembros de enzimas CCD (BoCCD4s y BoCCD1s) potencialmente involucrados en la síntesis de bixina por Cárdenas-Conejo y colaboradores (2015); en el 2019, Carballo-Uicab y colaboradores utilizaron diversos enfoques para discriminar a los mejores candidatos con genes CCD como análisis de expresión, alineamientos y modelos de homología de proteínas; dos CCD fueron seleccionadas para estudiar su actividad enzimática (BoCCD4-3 y BoCCD1-1) por lo que fueron expresadas en *Escherichia coli* y la actividad se determinó identificando sus productos en el extracto crudo usando UHPLC-ESI-QTOF-MS /MS. Por otra parte, en el presente trabajo se plantea el de caracterizar de manera bioquímica las CCDs candidatas con el fin de conocer su actividad catalítica. La expresión génica heteróloga en *E. coli* ha sido uno de los métodos más utilizados para desarrollar con mayor certidumbre otros procesos relacionados con mecanismos que conduzcan hacia el aumento de la producción de bixina en *B. orellana* o en microorganismos a escala industrial. De esta manera, el presente trabajo describe el análisis de la expresión heteróloga llevada a cabo para dos enzimas propuestas como candidatas del paso inicial de bixina: BoCCD1-1 y BoCCD4-1.

## **OBJETIVO GENERAL**

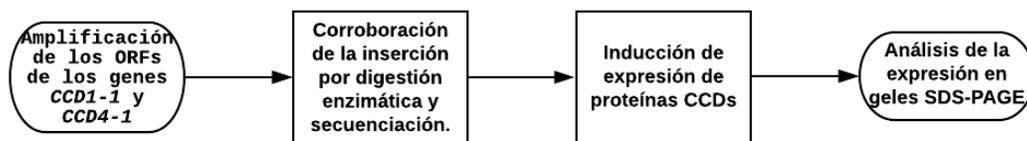
Analizar la expresión heteróloga de dos enzimas dioxigenasas de carotenoides (CCDs): CCD-1 y CCD4-1 reportadas como candidatas relacionadas en la ruta de biosíntesis de bixina.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Generar los constructos para la expresión heteróloga de las proteínas recombinantes CCD1-1, CCD4-1
- Inducir la expresión de las proteínas CCD1-1, CCD4-1 en *E. coli*
- Corroborar la expresión de las proteínas CCD1-1, CCD4-1 en geles SDS-PAGE

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Uno de los métodos más utilizados para generar proteínas recombinantes ha sido la expresión génica heteróloga en *E. coli*. En este trabajo, la estrategia consistió en clonar fragmentos de ADN generados por PCR en un vector de entrada de acuerdo con la tecnología pCR8/GW/TOPO y después en un vector de expresión de acuerdo a la tecnología Gateway Recombination Cloning. Cada una de las construcciones generadas fueron digeridas con enzimas de restricción específicas para corroborar la inserción de los ORF de los genes de interés y posteriormente las secuencias en nucleótidos y aminoácidos fueron analizadas con herramientas bioinformáticas. Colonias de *E. coli* BL21 (DE3) que contenían las construcciones con los genes recombinantes fueron tratadas con IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) para inducir la expresión de las proteínas CCDs y ser analizadas por medio de geles SDS-PAGE.



## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

El cDNA utilizado para este proyecto, proviene de la hoja de *Bixa orellana*, el cual fue proporcionado por el laboratorio de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY) como parte de la reserva de germoplasma. La calidad de su pureza fue verificada en un espectrofotómetro en un NanoDrop ND-1000 estimada en un rango óptimo (1.8-2.0).

#### 2.2 AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE LOS ORF

Utilizando el cDNA como templado, el método de amplificación se llevó a cabo por PCR punto final. La mezcla para cada reacción contenía un volumen final de 15 µl: H<sub>2</sub>O (9.8 µl), amortiguador 10x (1.5 µl), G. Rich (1.50 µl), dNTPs (0.30 µl), cebadores (1.0 µl) (F-*CCD1-1*: CTGGCACTTAACGAGGGT, R- *CCD1-1*: CAACCTTAGGATGAGCAGTG) (F-*CCD4-1*: AGCTTCCACCGTCTCTCCA, R- *CCD4-1*: AATGATCGCAGCTCCTCTGC) (Cárdenas-Conejo et al, 2015), cDNA (0.5 µl), FastStart Taq Polimerasa (0.12 µl). Se realizó una estandarización de la temperatura para conocer el óptimo por el cual se llevaría a cabo una mejor amplificación en el caso del marco de lectura del gen *CCD4-1*, el programa fue el siguiente: 95°C, 4min; 95°C, 30 s; 53-60°C, 30 s; 72°C, 1.50 min.; 72°C, 20 min; 35 ciclos, 4°C ∞. Para el caso del gen *CCD1-1*, el programa fue: 95°C, 4 min.; 95°C, 30 s; 60°C, 30 s; 72°C, 2 min.; 35 ciclos, 72°C, 20 min., 4°C∞. Una vez realizada la amplificación, las muestras se corrieron en una cámara de electroforesis con un gel de agarosa al 1% teñido con 0.3 µl de GelRed, marcador Kb Plus, 2.5 µl, a 85 volts por 40 minutos. El resultado fue visualizado por medio del transilluminator, modelo M-20E de la marca UVP. Los fragmentos observados que coincidían con el tamaño de los ORF de interés fueron diseccionados con un bisturí estéril #23 de la marca RIBBEL para después ser purificados de acuerdo a las instrucciones del fabricante de los paquetes comerciales (QIAGEN QIAquik Miniprep kit 250, cat. No. 27106 y QIAquik Gel Extraction kit, cat. No. 28704). Posteriormente, cada uno de los productos purificados (ORFs) fue clonado a un vector de entrada de acuerdo con la tecnología pCR8/GW/TOPO™ (Cat. No. K2500-20; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Posteriormente, alrededor de 100 µl de bacterias *E. coli* (DH5α) químicamente competentes obtenidas por el método de cloruro de calcio fueron transformadas con 3 µl de la reacción

de clonación dejando reposar en hielo durante 30 minutos e inmediatamente fueron sometidas a un choque térmico (42°C/50 s) y terminado el tiempo, nuevamente se regresaron al hielo para reposar por 10 minutos más. Se añadió 250 µl de medio de cultivo SOC a cada transformación y posteriormente fueron incubadas a 37°C, 200 rpm/1h. Terminado el tiempo de incubación, fueron sembradas en placas con medio de cultivo Luria-Bertani con antibiótico espectomicina como método de selección (100 mg/ml de medio de cultivo) y fueron incubadas durante la noche a una temperatura de 37°C. Después, se picaron colonias con un palillo estéril en tubos Falcon con 4ml de medio LB + antibiótico espectomicina (10 mg/ml) y se incubaron nuevamente a 37°C a 200 rpm durante la noche. La extracción de plásmidos se realizó empleando el paquete comercial QIAprep Spin Miniprep de la marca QUIAGEN catálogo 27104 siguiendo el protocolo del fabricante. La cuantificación y pureza fue llevada a cabo por espectrofotometría en un equipo NanoDrop ND-1000. A continuación, los plásmidos extraídos fueron analizados por digestión, con ayuda de enzimas de restricción. El volumen de cada reacción de digestión fue 10 µl y contenía: enzima (0.5 µl), DNA plasmídico (2.0 µl), amortiguador 10x (1.0 µl), H<sub>2</sub>O (6.5 µl). Una vez confirmados los fragmentos clonados en sentido 5'3', las muestras fueron enviadas a secuenciar para aumentar la confianza y continuar con los objetivos siguientes.

### **2.3 REACCIÓN DE RECOMBINACIÓN GATEWAY**

Los ORF ligados a pCR8/GW/TOPO fueron fusionados a un vector de expresión (pDEST17) bajo la tecnología Gateway Recombination Cloning Technology; Cat. No. 11803-012; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. La mezcla contenía el ORF ligado al vector pCR8/GW/TOPO (6µl), pDEST17 (1µl), TE (1 µl), Clonasa (2 µl). La reacción se llevó a cabo por 1 h a temperatura ambiente (~25°C), transcurrido el tiempo, se agregó 1 µl de Proteinasa K a la mezcla e inmediatamente fue puesta en una placa de calentamiento a 37°C por 10 min. Células de *E. coli* (BL21) químicamente competentes fueron transformadas con 3.0 µl de la reacción. Para verificar la orientación y posición de los genes, se evaluaron y seleccionaron enzimas de restricción específicas en los sitios que flanquean los insertos y aquellas que cortan el gen de interés. La reacción de digestión para el gen recombinante *CCD1-1* contenía: plásmido con la construcción *CCD1-1-pDEST17* (5µl), enzima HindIII (1 µl), amortiguador (1.5 µl), H<sub>2</sub>O (7.5 µl) para un volumen final de 15.0 µl. En el caso del gen recombinante *CCD4-1*, la reacción de digestión consistió de plásmido

con la construcción CCD4-1-pDEST17 (5µl), la enzima HindIII (1µl), enzima NcoI (1µl), amortiguador (1.5µl), H<sub>2</sub>O (6.5µl) para un volumen final de 15 µl. Los productos de digestión fueron separados en un gel de agarosa al 1% y sometidos a electroforesis a 85 Volts. Los fragmentos digeridos fueron visualizados por tinción con Bromuro de etidio (o Texas red) a través del transiluminador, modelo M-20E de la marca UVP. Se comprobó que los insertos se encontraban en el sentido correcto 5´3´y se prepararon las muestras para enviar a secuenciar.

## **2.4 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO**

Cada una de las secuencias obtenidas tanto de las construcciones del vector de entrada (pCR8/GW/TOPO) como de las construcciones de los vectores de expresión (pDEST17), fueron analizadas de la siguiente manera: primero, se consultó el porcentaje de identidad con *B. orellana* por medio de la herramienta BLAST de la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) donde se pudo descargar los alineamientos de cada una de las secuencias comparadas con las ya reportadas para armar posteriormente cada uno de los ORF de interés por medio de la localización de codones de inicio y de paro, todo esto con el fin de confirmar que se encontraran completos y en la orientación correcta cada uno de los genes insertos en el vector. Enseguida, estas secuencias de nucleótidos fueron convertidas a secuencias de aminoácidos utilizando la herramienta Expsy translate. Estas secuencias fueron alineadas y comparadas utilizando la secuencias reportadas de CCD de diferentes especies para su posterior análisis. La herramienta bioinformática utilizada fue Clustal Omega.

## **2.5 CONSTRUCCIÓN DE MAPAS DE VECTORES**

Se diseñaron mapas de las construcciones de entrada y de expresión de los genes de interés de acuerdo con la tecnología combinada TOPO® Cloning y Gateway®. pCR™ 8/GW/TOPO® incluye sitios attL1 y attL2 para la transferencia basada en recombinación del gen de interés en cualquier vector de destino Gateway®; un gen de resistencia a la espectinomicina para la selección en *E. coli*; un sitio de origen pUC para la replicación de alto número de copias del plásmido en *E. coli*. Con la ayuda del programa SnapGene versión 5.2.3 se analizaron los sitios de restricción para el gen de interés como aquellos que escindían el vector con el fin de evaluar las condiciones de orientación e inserción completa de los ORF. Debido a que cada enzima de restricción puede ser específica para

escindir un sitio en el plásmido y/o el gen; de esta forma se pudo predecir el tamaño de los fragmentos una vez digeridos, lo cual indica que el fragmento de interés fue clonado de en sentido escrito correcto 5'3'. La figura 3.5 describe los mapas con las construcciones correspondientes: pCR8/GW/TOPO-CCD1-1 fue digerida con la enzima XbaI, la cual es capaz de cortar en el nucleótido 1,263 del gen y en el 924 del plásmido. El fragmento de interés esperado en este caso fue de 597pb (Fig. 3.3). pCR8/GW/TOPO-CCD4-1 fue digerida con las enzimas EcoRV y PstI. EcoRV tiene la capacidad de digerir en el sitio 1,283 del gen y el sitio 808 del plásmido mientras que PstI digiere en el sitio 269 del gen; los fragmentos esperados y observados tuvieron una longitud aproximada de 699pb y 1,104pb (Fig. 3.4). Para realizar la recombinación en el sistema Gateway, fue utilizado el plásmido de expresión pDEST™17, el cual es descrito como un vector de fusión N-terminal que contiene un codón de iniciación ATG corriente arriba de la etiqueta 6XHis la cual permite la purificación por afinidad de la proteína recombinante; un promotor T7 que permite la expresión de la proteína recombinante en cepas de *E. coli* BL21 (DE3) que expresan la ARN polimerasa T7; sitios attR1 y attR2 que son secuencias de recombinación de ADN derivadas de bacteriófagos λ que permiten la clonación para la recombinación del gen de interés a partir de un clon de entrada Gateway®; genes selectivos a antibióticos; un origen de replicación pBR322 (ori) y ROP ORF los cuales interactúan en la regulación de replicación de copias en *E. coli*. Por lo tanto, las enzimas de restricción se eligieron de acuerdo con estas características mostradas en el programa SnapGene versión 5.2.3 para evaluar nuevamente las condiciones de orientación e inserción completa de los genes. La construcción pDEST17CCD1-1 fue digerida con la enzima HindIII la cual escinde el sitio de restricción 2,328 del plásmido, así como los sitios 1,108 y 1,166 del gen obteniendo como resultado, dos fragmentos: uno de 1,162pb y uno más de 58pb respectivamente y la construcción pDEST17CCD4-1 fue digerida con las enzimas HindIII y NcoI. HindIII escinde el sitio 2,328 del plásmido y NcoI en 880 del gen, por lo que el fragmento liberado tuvo una longitud de 1,572pb (Fig. 3.6 y 3.7).

## **2.6 INDUCCIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA**

Se picaron colonias de *E. coli* BL21(DE3) que contenía las construcciones con los genes recombinantes y se sembraron en tubos falcon con 5 ml de LB + antibiótico ampicilina (200 µg/ml) como medio selectivo y fueron puestos en agitación durante la noche a 37°C/200 rpm. Posteriormente un matraz estéril con 100ml de LB + antibiótico ampicilina (200 µg/ml)

fue inoculado con 1ml del crecimiento microbiano de la noche anterior, se dejó en agitación a 37°C y se comenzó a medir la densidad óptica (O.D) a 600 nm hasta alcanzar un valor de 0.5-0.8. Se tomaron muestras antes de la inducción con IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a 0.5 mM. El tiempo de inducción transcurrido fue de 16h. Las muestras inducidas y no inducidas fueron centrifugadas por 3min a 10,000 rpm y lavadas y resuspendidas en una solución Tris-HCl al 50 mM pH 8.0 con dos repeticiones desechando el sobrenadante; el pellet se volvió a resuspender una vez más con Tris-HCl 50 mM dejando las muestras en reposo por 10 minutos. Posteriormente las muestras fueron lisadas en un equipo Sonic Fisher bajo el programa siguiente: tiempo de lisado 2 min, impulso on de 15 s con 20 s de descanso, amplitud 30%, impulso off 20 s.

## **2.7 SDS-PAGE**

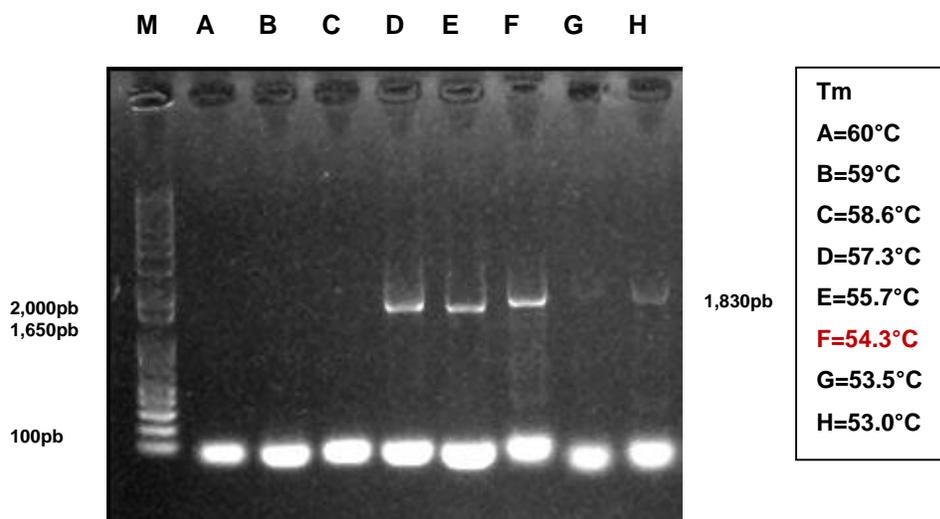
Para determinar la masa molecular de las proteínas, se prepararon mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 12 % donde las muestras con las fracciones inducidas (I), no inducidas (NI), fase sólida (FS) y fase líquida (FL) fueron inyectadas. A cada tubo etiquetado se le añadieron 20 µl de la muestra lisada y 5 µl de amortiguador de carga (Laemmli). Las muestras se desnaturalizaron a 95° C por 5 min. Terminado el tiempo, las muestras se colocaron en hielo y enseguida se aplicaron en la cámara de electroforesis de proteínas. La cantidad de marcador (Bio-Rad de amplio rango) utilizado fue de 6 µl. Se corrió a 120 Volts por 90 min y terminado el tiempo, el gel fue teñido con azul de Coomassie.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

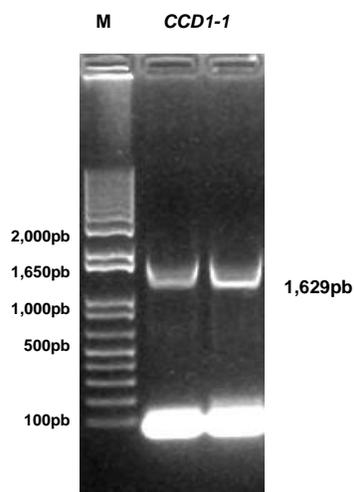
#### 3. 1 AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE LOS ORFS

Partiendo de cDNA de la hoja de *Bixa orellana*, se llevó a cabo la amplificación de los genes de interés *CCD1-1* y *CCD4-1*. En la Fig. 3.1, se muestra la amplificación del gen *CCD4-1* para el cual, se realizó una estandarización de la temperatura de amplificación. En los carriles A, B y C no se observa la separación de ácidos nucleicos, mientras que en los carriles D, E y F, visiblemente se observan unas bandas que señalan un tamaño de acuerdo a una temperatura dada de los fragmentos. En los carriles G y H, el fragmento amplificado es poco observable. La muestra del carril F fue la que se eligió para seguir adelante en los estudios posteriores, ya que presentó una mejor amplificación del gen a una temperatura de 54.3°C. El tamaño del fragmento reportado coincide con el que se observa en la imagen con 1,830pb aproximadamente. Hacia el polo positivo de la matriz del gel se observa productos de dimerización.



**Figura. 3.1** Gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red. M: marcador Kb Plus. Carriles: A, B y C, sin amplificación observable, mientras que D, E, F, G y H: se muestra la amplificación del gen **CCD4-1**.

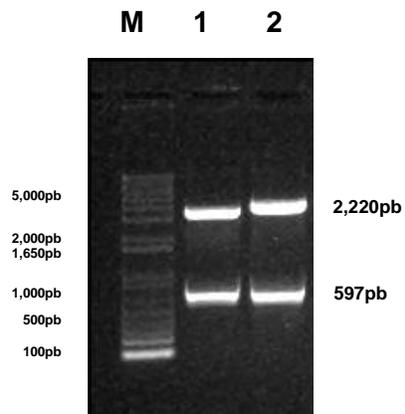
El gen *CCD1-1* fue amplificado a una temperatura de 60°C con un tamaño que coincide con el reportado en la base de datos de NCBI de 1,629pb (Fig. 3.2). En ambos genes, los primers utilizados fueron diseñados por Cárdenas-Conejo et al, (2015), los cuales contemplan el ORF completo cuya secuencia es necesaria para expresar y obtener la proteína recombinante.



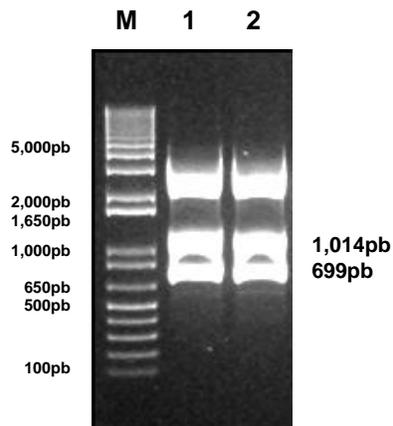
**Figura. 3.2** Gel Agarosa al 1%. Teñido con Gel Red. M: Marcador 1 Kb Plus. Se observa la amplificación del gen *CCD1-1*. Tm 60°C.

### 3.2 CLONACIÓN AL VECTOR DE ENTRADA pCR8/GW/TOPO

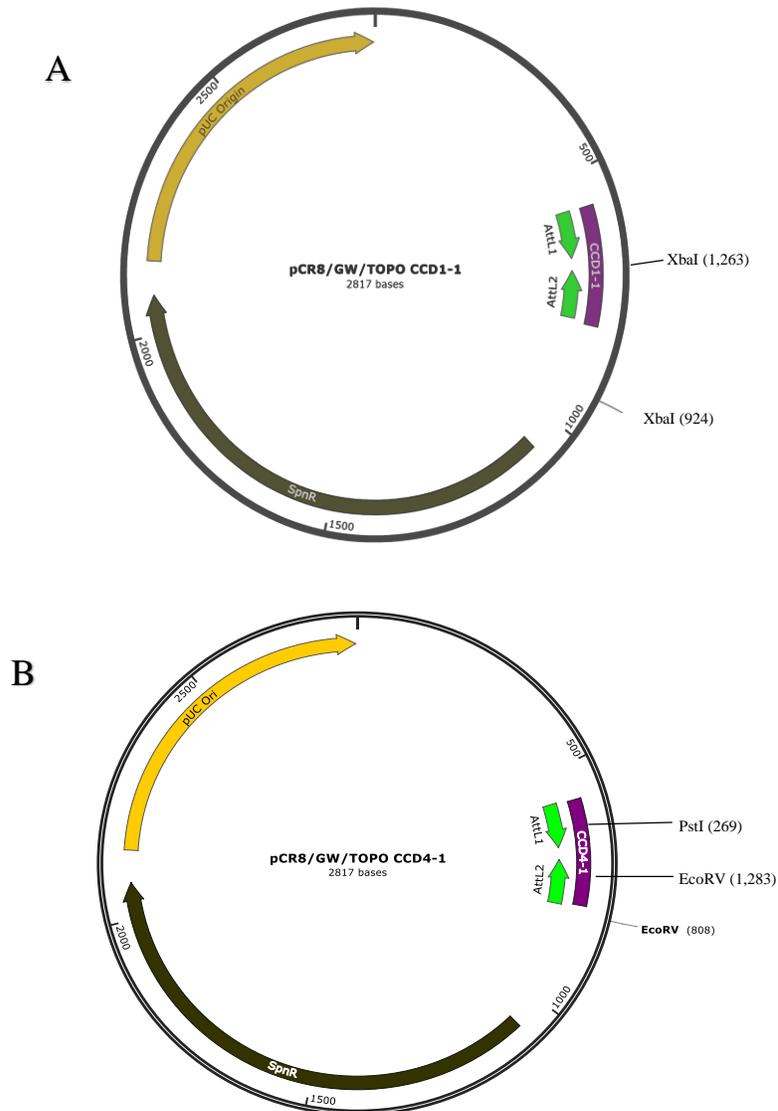
Una vez verificada la amplificación del ORF de los genes *CCD1-1* y *CCD4-1*, se transfirieron al vector de expresión en *E. coli*, pCR8/GW/TOPO. Se obtuvieron pCR8/GW/TOPO/CCD1-1 y pCR8/GW/TOPO/CCD4-1 clonas para cada gen. En las figuras 3.3 y 3.4 se muestran los fragmentos esperados digeridos con enzimas de restricción seleccionadas descritas en la metodología.



**Figura. 3.3.** Gel agarosa al 1%. Teñido con Gel Red. M: marcador Kb Plus. Carriles 1 y 2: *CCD1-1* en pCR8/GW/TOPO digerido con la enzima de restricción *XbaI*.



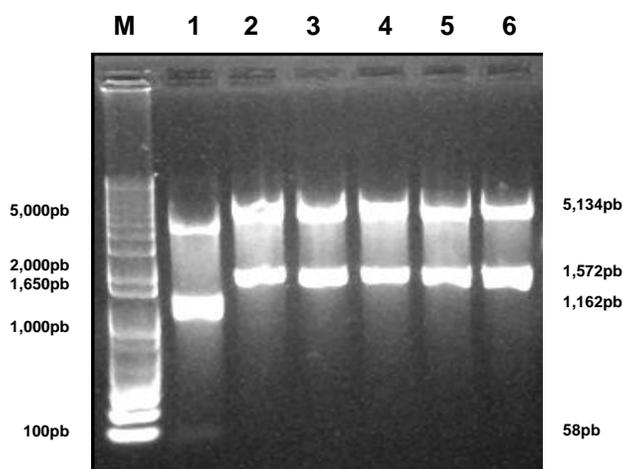
**Figura. 3.4.** Gel de agarosa al 1%. Teñido con Gel Red. M: marcador 1 Kb Plus. Carriles 1 y 2: *CCD4-1* en pCR8/GW/TOPO. Digerido con las enzimas de restricción *EcoRV* y *PstI*.



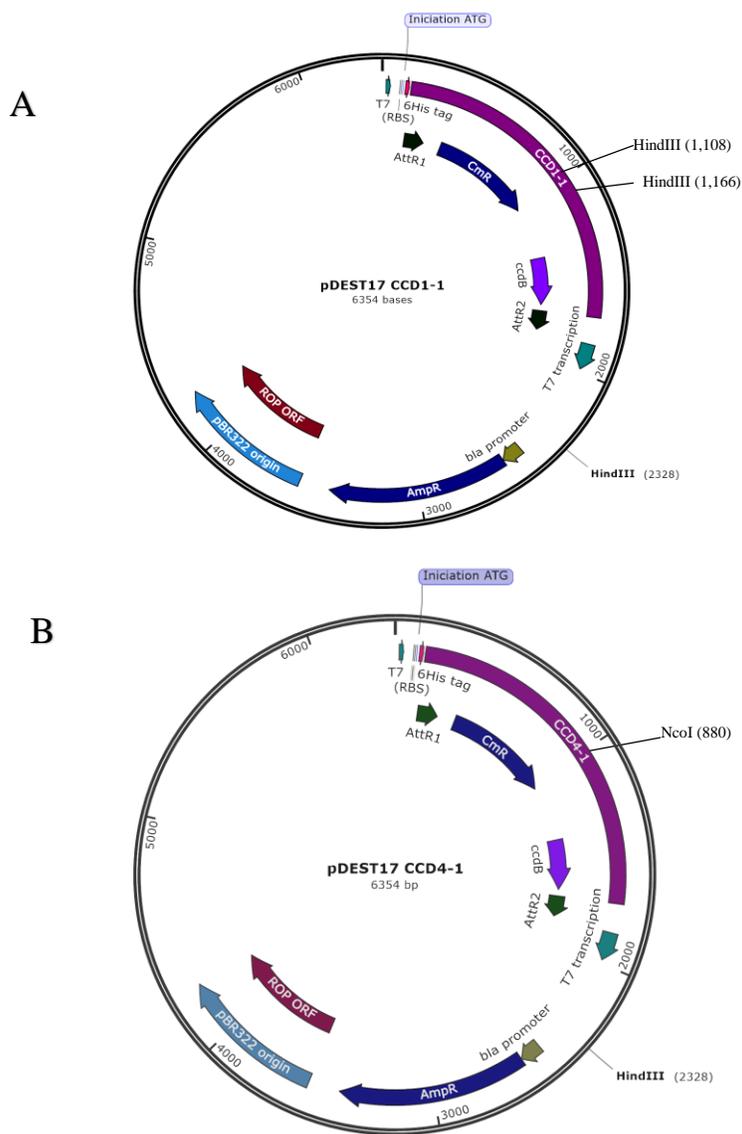
**Figura. 3.5 Construcciones realizadas con plásmidos de entrada pCR8/GW/TOPO con el programa SnapGene versión 5.2.3** Se muestra el inserto del gen color violeta señalado por sitios de restricción de las enzimas utilizadas. A) Construcción pCR8/GW/TOPO-CCD1-1 digerida con la enzima XbaI. B) Construcción pCR8/GW/TOPO-CCD4-1 digeridas con las enzimas EcoRV y PstI.

### 3.3 CLONACIÓN AL VECTOR DE EXPRESIÓN pDEST17

Después de haber generado clonas de entrada y verificada su inserción correcta, se realizó la transferencia los genes de interés al vector pDEST™17 para crear clonas de expresión en *E. coli* obteniéndose pDEST17-CCD1-1 y pDEST17-CCD4-1. En la figura 3.6 se muestran los fragmentos esperados digeridos con enzimas de restricción seleccionadas descritas en la metodología, lo cual permitió verificar la orientación y posición de los genes y posteriormente enviar a secuenciar.



**Figura. 3.6.** Gel de agarosa al 1%. Teñido con Gel Red. M: Marcador Kb plus; **Carri1 1: CCD1-1**, pDEST17 digerido con la enzima restricción HindIII; **Carriles 2-6 CCD4-1** en pDEST17 digerido con las enzimas de restricción **HindIII y NcoI**.

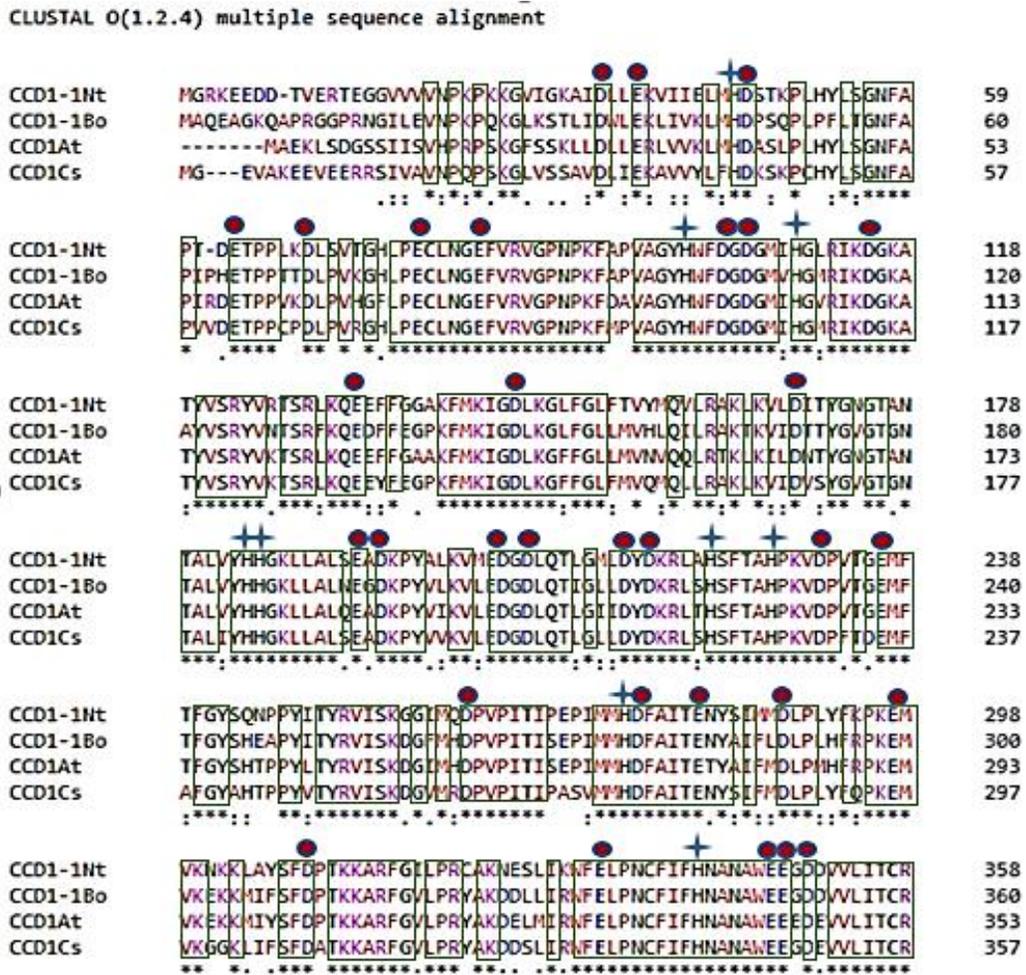


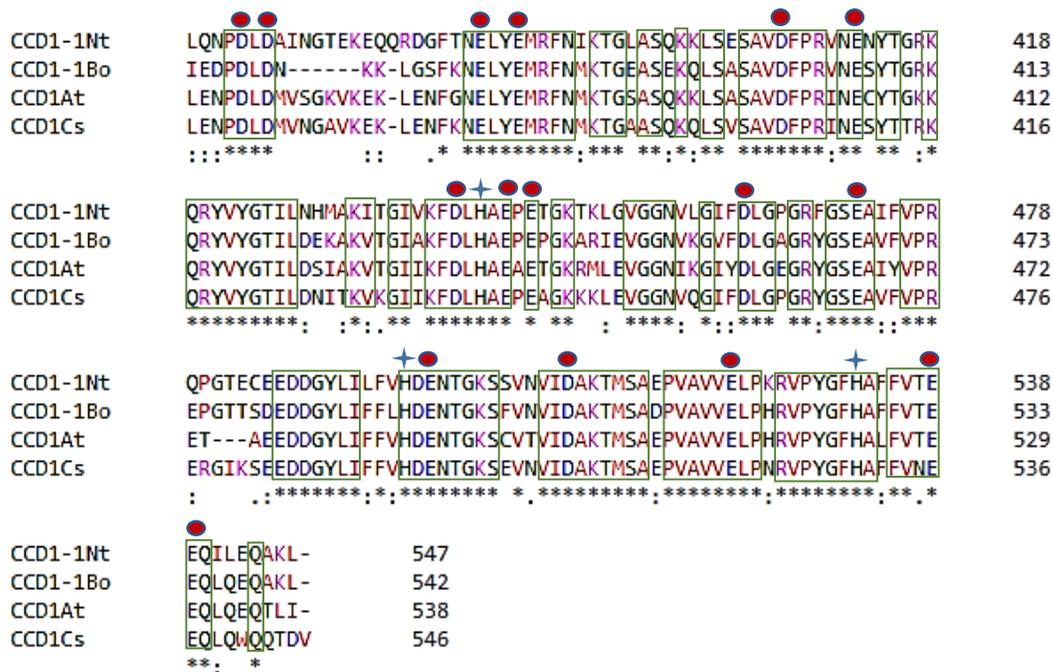
**Figura 3.7.** Construcciones realizadas con plásmidos de expresión tecnología Gateway con el programa SnapGene versión 5.2.3. Se muestra el sitio de recombinación ocupado por el inserto del gen de interés en color violeta y los sitios de restricción de las enzimas utilizadas. A), esquema de la construcción pDEST17CCD1-1 digerida con la enzima HindIII. B). Esquema de la construcción pDEST17CCD4-1 digeridas con las enzimas HindIII y NcoI.





Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las enzimas CCD4-1 por medio de la herramienta bioinformática CLUSTAL OMEGA. En color amarillo se indica los residuos de histidina altamente conservados como cofactor de ligadura de hierro; en color violeta se indican las secuencias con residuos de glutamato o aspartatos conservados para la fijación de los residuos de histidina como coordinadores de hierro.

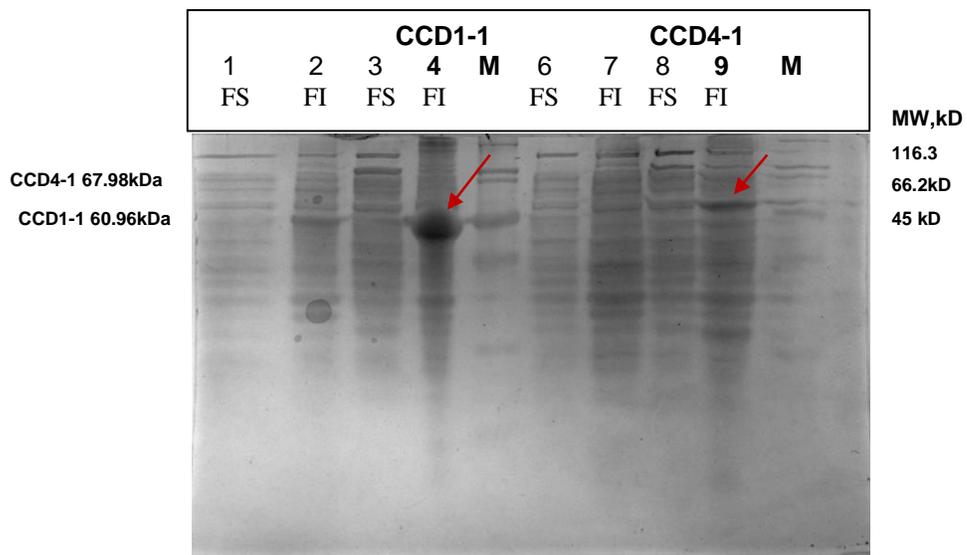




Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las enzimas CCD1-1 por medio de la herramienta bioinformática CLUSTAL OMEGA. El símbolo (\*) en color azul indica los residuos de histidina altamente conservados como cofactor de ligadura de hierro; los círculos rojos se indican las secuencias con residuos de glutamato o aspartatos conservados para la fijación de los residuos de histidina como coordinadores de hierro.

### 3.5 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA

Para determinar la masa molecular de las proteínas, se preparó una electroforesis en gel de 12% de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) donde las muestras con las fracciones inducidas (I), no inducidas (NI), fase sólida (FS) y fase líquida (FL) fueron cargadas. En la figura 3.8 se muestra el resultado de la expresión de las enzimas recombinantes. Se observa una banda consistente en el carril número 4 de la fracción soluble mientras que en el carril 9 se visualiza una banda un poco más tenue también de la fracción soluble. Ambas coinciden con el peso calculado. CCD4-1 tiene un peso de 67.98kDa y CCD1-1 tiene un peso de 60.96kDa.



**Figura 3.8.** Gel poliacrilamida-SDS al 12% sometido a electroforesis de acuerdo al método de Laemmli teñido con azul de Coomassie. Después de la inducción con IPTG, se muestra en el carril 4 la fracción insoluble *CCD1-1* y en el carril 9, la fracción insoluble *CCD4-1*.

## CAPÍTULO IV

### DISCUSIÓN

Para impulsar la expresión de genes recombinantes de alta eficiencia, se requiere de promotores fuertes y un elevado número de copias de genes, pero además se necesita que este proceso implique el crecimiento de células en ausencia de expresión que posteriormente sea inducida a través de elementos reguladores de la transcripción o por infección o activación de virus. Los vectores de expresión se desarrollaron con base en una pequeña cantidad de sistemas promotores de genes bien estudiados que siguen siendo populares hasta el día de hoy. Estos vectores tienen la ventaja de incluir etiquetas de purificación, las cuales tienen la capacidad para fusionarse genéticamente a la proteína de interés y ésta ser purificada por afinidad. Por lo tanto, el método de expresión heteróloga en *E. coli* ha sido de los más utilizados para generar proteínas recombinantes para realizar análisis científicos en la mayoría de los laboratorios de todo el mundo (Burguess-Brown et al, 2017). En este trabajo se reproduce este método para analizar proteínas recombinantes CCD1-1 y CCD4-1. Los resultados de secuenciación de nucleótidos de estas CCDs permitieron realizar la traducción de aminoácidos *in silico* y realizar los alineamientos de estas secuencias. Las características principales para que las proteínas miembros de la familia CCDs puedan realizar su actividad catalítica consiste en tener un juego de cuatro histidinas, además de residuos de glutamato y aspartato para coordinar un ion de hierro al centro de la proteína. Tan, *et al* (1997) muestran los alineamientos en su trabajo sobre control genético de la biosíntesis del ácido abscísico en maíz y compara la proteína VP14 con la lignostilbeno dioxigenasa (LSD) de *Pseudomonas paucimobilis*, RPE65 humano y dos secuencias en el genoma completo de *Synechocystis cyanobacterium*; y las características conservadas de aminoácidos, se encuentran presentes. También encontraron una secuencia putativa de un péptido de tránsito dirigido al cloroplasto ubicado en la extensión N-terminal de VP14, el cual es localizable en el alineamiento con CCD4-1 de este trabajo. Han *et al.*, 2019, realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de BoCCD4 comparada con otras cuatro CCD4 funcionalmente caracterizadas provenientes de *Arabidopsis thaliana*, *Osmanthus fragrans*, *Crisantemo x morifolium*, *Prunus persica*, en la cual muestra también los cuatro residuos de histidina, altamente conservados, así como los residuos de glutamatos o aspartatos y mencionan que todos las CCD4 contienen un péptido transitorio de cloroplasto, lo cual contribuye al papel

conservado de estas proteínas en el metabolismo de los carotenoides, sin embargo no señalan las secuencias en los alineamientos de estos péptidos. Desde el punto de vista de su localización, ha sido propuesto un modelo para la vía de síntesis de bixina en *B. orellana*, en el que se describe a una CCD4 localizada en el plastidio donde puede llevar a cabo la escisión de licopeno para producir bixinaldehído y continuar con la ruta o bien, una BoCCD4-3 puede cortar el licopeno de forma asimétrica en la posición 5,6 o (5',6') y el producto resultante (C32) se difunde fuera del plástido y BoCCD1-1 lo utiliza para formar bixina aldehído, en este caso quedaría explicada por qué CCD1-1 no cuenta con un péptido de tránsito ya que se encuentra localizado en el citosol. En cuanto al resultado de la expresión génica, el producto observado coincide con los pesos moleculares esperados para ambas proteínas, lo cual indica que pueden ser candidatas para poder continuar con el proceso de purificación y llevar a cabo posteriormente otros estudios con enfoques bioquímicos.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 5.1 CONCLUSIONES

Los ORFs de CCD1-1 y CCD4-1 fueron amplificados y clonados utilizando plásmidos con tecnología diseñada para optimizar la expresión de las proteínas recombinantes en *E. coli*. Los resultados mostraron cada uno de los fragmentos digeridos esperados por lo que se concluye que los insertos se encontraban ligados en el plásmido en la orientación correcta comprobado por digestión enzimática específica en los sitios de escisión. Los resultados de los análisis de secuenciación permitieron corroborar por medio de las herramientas bioinformáticas BLAST y ExPASy Translate que los marcos de lectura abiertos (ORF) de cada gen se encontraban completos y que coincidían con un porcentaje de similitud significativo con *Bixa orellana*. Los análisis bioinformáticos mostraron las secuencias altamente conservadas de los aminoácidos relacionados con la actividad catalítica (histidina, glutamato y aspartato) en las pruebas de alineamientos, lo cual indica que, las secuencias de interés sí corresponden a las ya reportadas en la base de datos del NCBI. Finalmente, en el gel de poliacrilamida se puede distinguir claramente dos bandas que concuerdan con el peso molecular esperado por lo que eso permite inferir que muy probablemente puedan corresponder a las proteínas de interés.

#### 5.2 PERSPECTIVAS

CCD1-1 y CCD4-1 son enzimas que se encuentran como candidatas en la ruta de biosíntesis de bixina en la especie *B. orellana*. El enfoque en este trabajo consistió en llevar a cabo estudios con un sistema de expresión heterólogo que permitirá posteriormente realizar un protocolo de investigación relacionado con técnicas de caracterización bioquímica lo cual permitirá conocer mejor la manera en la que estas enzimas se encuentran actuando y participando en la síntesis de bixina. La presencia de la etiqueta 6XHis N-terminal en pDEST™ 17 permitirá realizar el siguiente paso que es la purificación por afinidad de la proteína de fusión recombinante utilizando una resina quelante de níquel o Ni-NTA.

## **BIBLIOGRAFIA**

Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Berman, J., Capell, T., Christou, P., Zhu, Ch. Gómez-Gómez. L. 2016. *The carotenoid cleavage dioxygenase CCD2 catalysing the synthesis of crocetin in spring crocuses and saffron is a plastidial enzyme*. New Phytologist. 209: 650-663pp

Anh, P., Bok, Y., Kwang, J., Valan, M., Al-Dhabi, N., Un, S. 2015. Molecular characterization of carotenoid biosynthetic genes and carotenoid accumulation in scutellaria *Baicalensis georgi*. EXCLI Journal. 14:146-157pp

Ates, D., 2018. Field Crops Research. *Linkage mapping of carotenoid cleavage dioxygenase-4 family in lentil genome*.23(2):167-172pp

Auldridge, M., Block, A., Vogel, J., Dabney-Smith, C., Mila, I., Bouzayen, M., Magallanes-Lundback, M., DellaPena, D., McCarty, D., Klee, H. 2006. *Characterization of three members of the Arabidopsis carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family*. The Plant Journal. 45:982-993pp

Auldridge, M., McCarty, D., Klee, H. 2016. *Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products*. Current Opinion in Plant Biology 2006, 9:315–321pp

Benítez, R., Lenis, L., Paz, J. 2010. Incremento de la estabilidad de bixina, norbixina y geraniol por acomplejamiento con B-cyclodextrina. El Hombre y la Máquina, 34: 94-99pp

Burguess-Brown, N. 2017. Heterologous Gene Expression in *E. coli*. Methods and Protocols. Humana Press. 3-429pp

Carballo-Uicab, V., Cárdenas-Conejo, Y., Vallejo-Cardona, A., Aguilar-Espinosa, M., Rodríguez-Campos, J., Serrano-Posada, H., Narváez-Zapata, J., Vázquez-Flota, F., Rivera-

Madrid, R. 2019. *Isolation and functional characterization of two dioxygenases putatively involved in bixin biosynthesis in annatto (Bixa orellana L.)*. Peer, J. 1-29pp

Cárdenas-Conejo, Y., Carballo-Uicab, V., Lieberman, M., Aguilar-Espinosa, M., Comai, L., Rivera-Madrid, R. 2015. De novo transcriptome sequencing in *Bixa orellana* to identify genes involved in methylerythritol phosphate, carotenoid and bixin biosynthesis. BMC Genomics. 16(877): 1-18pp

Dzib-Cauich J., Us-Camas R, Rivera-Madrid R. 2020. Natural Sources of Apocarotenoids and Their Applications in: Chemistry, Biology and Applications of Apocarotenoids. 11-30pp

Frusciante, S., Direcciona, G., Brunoc, M., Ferrantea, P., Pietrellaa, M., Prado-Cabrero, A., Rubio-Moraga, A., Beyerc, P., Gomez-Gomez, L., Al-Babilic, S., Giulianoa, G. 2014. *Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis*. PNAS. 111(33): 12246-12251PP

Han, Z., Ding, S. 2019. *Map-based cloning and characterization of BoCCD4, a gene responsible for white/yellow petal color in B. oleracea*. BMC Genomics. 20(242): 1-11pp

Kiser, P., Golczak, M., Lodowski, D., Chance, M., Palczewski, K. 2009. *Crystal structure of native RPE65, the retinoid isomerase of the visual cycle*. PNAS. 106(41): 17325-17330pp

Kloer, D., Ruch, S., Al-Babili, S., Beyer, P., Schulz, G. 2005. *The Structure of a Retinal-Forming Carotenoid Oxygenase*. Science. 308: 267-269pp

Lashbrooke, J., Young, P., Dockrall, S., Vasanth, K., Vivier, M. 2013. *Functional characterisation of three members of the Vitis vinifera L. carotenoid cleavage dioxygenase gene family*. BMC Plant Biology. 13:156

Louro, R., Santiago, L. 2016. *Development of carotenoid storage cells in Bixa orellana L. seed arils*. Protoplasma. 253:77-86pp

Moreira, P., Lins, J., Dequigiovanni, G., Veasey, E., Clement, Ch. 2015. *The Domestication of Annatto (Bixa orellana) from Bixa urucurana in Amazonia*. Economic Botany. 1-9pp

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Beta-Ionone, CID=638014, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Ionone> (accessed on Jan. 2, 2020)

Narváez, J., Flores-Pérez, P., Herrera-Valencia, V., Castillo, F., Ku-Cauich, R., Canto-Canché, B., Santana, N., Rivera-Madrid, R. 2001. *Development of Molecular Techniques for Studying the Metabolism of Carotenoids in Bixa orellana L.* HortScience. 36(5):982-986pp

Rivera-Madrid R. and Siva Ramamoorthy 2020. *Apocarotenoid Molecules Are Continuously Being Discovered in All Taxa. in: Chemistry, Biology and Applications of Apocarotenoids*.41-52pp.

Rivera-Madrid, M., Us-Camas, R., Dzib-Cauich, J. 2020. *Natural Sources of Apocarotenoids and Their Applications. En: Biology, Chemistry, and Applications of Apocarotenoids*. (1st ed.). CRC Press. 2-29pp

Rivera-Madrid, R., Burnell, J., Aguilar-Espinosa, M., Rodríguez-Ávila, N., Lugo-Cervantes, E., Sáenz-Carbonell, L. 2013. *Control of Carotenoid Gene Expression in Bixa orellana L. Leaves Treated with Norflurazon*. Plant Molecular Biology. Springer Science.

Rivera-Madrid, R., Aguilar-Espinosa, M., Cárdenas-Conejo, Y., Garza-Caligaris, L. 2016. *Carotenoid Derivates in Achiote (Bixa orellana) Seeds: Synthesis a Health Promoting Properties*. Frontiers in Plant Science. 7(1406).

Sankari, M., Hemachandran, H., Anantharaman, A., Babu, S., Rivera-Madrid, R., Priya, G., Fulzele, D., Siva, R. 2016. *Identifying a Carotenoid Cleavage Dioxygenase 4a Gene and Its*

*Efficient Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation in Bixa orellana L.* Applied Biochemistry and Biotechnology. 179: 697-714pp

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2018). Blog. *Achiote: principal productor de bixina*. En: <https://www.gob.mx/siap/articulos/achiote-principal-productor-de-bixina?idiom=es>

Schwartz, S., Qin, X., Zeevaart, J. 2001. *Characterization of a Novel Carotenoid Cleavage Dioxygenase from Plants*. The Journal of Biological Chemistry. 276(27): 25208-25211pp

Tan, B., Schwartz, S., Zeevaart, J., McCarty, D. 1997. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. Plant Biology. Proc Nat Acad Sci USA 94:12235-12240pp

Vogel, J., Bao-Cai, T., McCarty, D., Klee, H. 2008. *The Carotenoid Cleavage Dioxygenase 1 Enzyme Has Broad Substrate Specificity, Cleaving Multiple Carotenoids at Two Different Bond Positions*. The Journal of Biological Chemistry. 17:11364-11373pp