



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Expresión heteróloga y caracterización funcional de
una aldehído deshidrogenasa de *Bixa orellana*
(BoALDH3H1-1) potencialmente implicada en la
biosíntesis de bixina**

Tesis que presenta

GABRIELA DEL CARMEN VÁZQUEZ GÓMEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología
Molecular)

Mérida, Yucatán, México **2023**

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 **Gabriela del Carmen Vázquez Gómez** titulado “**Expresión heteróloga y caracterización funcional de una aldehído deshidrogenasa de *Bixa orellana* (BoALDH3H1-1) potencialmente involucrada en la biosíntesis de bixina**”, fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas ,en la línea de investigación metabolismo secundario, en el laboratorio 27 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la **Dra Renata Lourdes Bárbara Rivera Madrid** y la Codirección del **Dr. Yair Cárdenas Conejo**, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular , perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

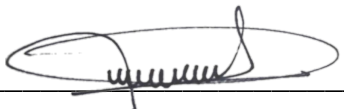


Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 20 de septiembre de 2023

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación 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 registrarán 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: Gabriela del Carmen Vázquez Gómez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de **Bioquímica y Biología molecular de plantas** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “**Determinación de la función de los tres genes de la ruta de biosíntesis de bixina en organismos heterólogos**” en el proyecto **fronteras de la ciencia No.1716** bajo la dirección de **Dra. Renata Rivera Madrid y Dr. Yair Cárdenas Conejo**.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada (800639).

Al CICY por brindarme el acceso a sus instalaciones para llevar a cabo mis estudios de posgrado en el programa de maestría en ciencias biológicas opción bioquímica y biología molecular de plantas.

A la Dra. Renata Rivera Madrid por brindarme su apoyo y asesoría durante la realización del trabajo.

Al Dr Yair Cárdenas Conejo por su asesoría y aportaciones para mejorar este trabajo.

A la M.C Margarita Aguilar Espinosa por su apoyo técnico durante la realización de este trabajo.

A los Dres. Jacobo Rodríguez Campos y Alba Adriana Vallejo Cardona por su valiosa colaboración y apoyo en los análisis de LC-ESI-QTOF-MS durante mi estancia en CIATEJ.

Al comité tutorial y revisores de tesis integrado por el Dr Yair Cárdenas Conejo, Dra Luisa López Ochoa, Dr. Víctor Manuel Aguilar Hernández, Dr. José Narvárez Zapata, por su apoyo, recomendaciones y tiempo otorgado.

A mis compañeros de Laboratorio 27 por su amistad y apoyo.

DEDICATORIAS

A mis padres, Marlenis Gómez y Juan Vázquez por sus consejos de vida y amor incondicional.

A la Familia Tzec Carballo por su muestra de afecto y hacerme sentir parte de su familia durante mi estancia.

Gracias.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1. <i>BIXA ORELLANA</i> L.....	3
1.2. USOS Y PROPIEDADES DEL ACHIOTE	4
1.4 BIOSÍNTESIS DE BIXINA Y GENES IMPLICADOS.....	7
1.4.2 BIOSÍNTESIS DE BIXINA	8
1.4.3 DESCRIPCIÓN GENERAL Y CLASIFICACIÓN DE LAS CAROTENO DIOXIGENASAS (CCDS) ...	12
1.4.3.1 CCD1	12
1.4.3.2 CCD4	13
1.4.3.3 CCD7 Y CCD8	13
1.4.4 ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS	14
1.4.4.1 ALDH3	15
1.4.5 METILTRANSFERASA (SABATH)	16
1.5 USO DE CODONES OPTIMIZADOS PARA EXPRESAR PROTEÍNAS EN SISTEMAS HETERÓLOGOS.	17
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20

CAPÍTULO II	21
MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1. SECUENCIAS SINTETIZADAS DE BoCCD4-3, BoALDH3H1-1	21
2.2. CÉLULAS COMPETENTES (CL2Rb).....	21
2.3 CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS PETDUET_CCD4-3, PETDUET_CCD4-3_ALDH3H1-1	21
2.4 EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS Y VERIFICACIÓN DE INSERTOS EN CÉLULAS TRANSFORMADAS	23
2.5 SECUENCIACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES PETDUET+CCD4-3, PETDUET+CCD4-3+ALDH3H1-1	23
2.6 EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN CEPAS DE <i>E. COLI</i> PRODUCTORA DE LICOPENO Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	23
2.7 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN GELES SDS-PAGE 10%.....	25
2.8 EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS EN SEDIMENTOS BACTERIANOS	25
2.9 ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS POR UHPLC-ESI QTOF-MS/MS	25
CAPÍTULO III.....	27
RESULTADOS	27
3.1. OBTENCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES.....	27
3.2.2 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN PETDUET+CCD4-3+ALDH3H1-1.....	29
3.3 SECUENCIACIÓN DE CONSTRUCTOS PETDUET+CCD4-3 Y PETDUET+CCD4-3+ALDH3H1-1	32
3.4 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PROTEÍNAS BoCCD4-3 Y ALDH3H1-1	35
3.5 EXPRESIÓN DE CCD4-3 Y ALDH3H1-1 RECOMBINANTE.....	37
3.6 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA ENZIMA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA	39

3.7 IDENTIFICACIÓN DE NORBIXINA POR UHPLC-ESI- QTOF-MS	40
.....	43
CAPÍTULO IV	45
DISCUSIÓN GENERAL	45
CAPÍTULO V	49
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	49
BIBLIOGRAFÍA	51

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Flores y frutos de achiote	4
Figura 1.2 Ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas	6
Figura 1.3 Rutas metabólicas para la biosíntesis de bixina en <i>Bixa orellana</i> L (Cárdenas-Conejo et al., 2015).....	9
Figura 1.4 Modelos de biosíntesis de bixina. Tomada de Carballo-Uicab et al. (2019).....	11
FIGURA 2.1 Mapa y regiones del vector de clonación/expresión pETDuet-1, este vector porta el gen de resistencia a ampicilina y dos sitios de clonación múltiple.....	24
FIGURA 3.1 Clonación de ORF CCD4-3 en el vector pETDuet-1.....	27
Figura 3.2 Clonación de ORF ALDH3H1-1 en el vector pETDuet-1.....	28
Figura 3.3 Mapa del vector de expresión pETDuet+CCD4-3+ALDH3H1-1 con los insertos CCD4-3 y ALDH3H1-1 clonados en los sitios MCS-1, MCS-2 respectivamente.....	29
Figura 3.4 Clonación y construcción del plásmido pETDuet_CCD4-3_ALDH3H1-1 .MM; marcador de peso molecular kb plus, carril 1; Amplificación de ORF de ALDH3H1-1, carril 2; plásmido pETDuet+CCD4-3 lineal, carril 3; Plásmido pETDuet+CCD4-3 sin digerir.	30
Figura 3.5 Digestión de clonas obtenidas del producto de ligación de pETDuet-CCD4-3 y ALDH3H1-1.	31
FIGURA 3.5 Digestión de clonas obtenidas del producto de ligación de pETDuet-CCD4-3 y ALDH3H1-1.MM; Marcador de peso molecular 1Kb plus; Carril 2-3; Producto de digestión con SpeI y KpnI; Carril 4; Plásmido no digerido	31
Figura 3.6 Alineamiento de la secuencia de ALDH3H1-1 obtenida de la secuenciación (Query) y secuencia de ORF ALDH3H1-1 con codón optimizado.....	33
Figura 3.7 Alineamiento de la secuencia de CCD4-3 obtenida de la secuenciación (Query) y secuencia de CCD4-3 con codones optimizados.	34
Figura 3.8 Análisis de expresión de proteínas de CCD4-3 y ALDH3H1-1 recombinantes por SDS	

PAGE 10%.38

Figura 3.9 Cepas de *E. coli* productoras de licopeno co-trasformadas con **A)** pACCRT-EIB **B)** pETDuet-1 **C)** pETDuet+CCD4-3 **D)** pETDuet+CCD4-3+ALDH3H1-1.....39

Figura 3.10 Espectros de masas (280-600 m/z) de licopeno comercial y licopeno obtenido por celulas transformadas con el plásmido pACCRT-EIB (control positivo).....41

Figura 3.11 Espectro de masas derivados de la actividad enzimática BoCCD4-3 en *E.coli* que acumulan licopeno42

Figura 3.12 Espectro de masas derivados de la actividad enzimática de BoCCD4-3 y ALDH3H1-1 en *E.coli* que acumulan licopeno.....43

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Cebadores diseñados con sitios de restricción para la amplificación de BoCCD4-3 y BoALDH3H1-1.	21
Tabla 2.2 Condiciones de termociclador para los ciclos de PCR	22
Tabla 3.1 Características fisicoquímicas y composición de aminoácidos.....	36

ABREVIATURAS

aa: aminoácidos

ABA: ácido abscísico

ALDH: Aldehído deshidrogenasa

CCD: Carotenoide dioxigenasa

GGPP: geranil geranil difosfato

IPTG: Isopropil β -D-tiogalactopiranosido

MEP: 2c-metil-d-eritritol-4- fosfato

MTH: Metiltransferasa

NCED: 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa

ORF: Marco de lectura abierto (por sus siglas en inglés, Open Reading Frame)

PDS: Fitoeno Desaturasa

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide Gel electrophoresis.

ZDS: ζ -caroteno desaturasa

ZISO: ζ -caroteno isomerasa

RESUMEN

Bixa orellana L. es una planta cultivada en zonas tropicales de América del Sur, sureste de México, África y las indias occidentales; tiene importancia comercial en diversas industrias (farmacéutica, alimentaria, textil). Este estudio se centra en la biosíntesis de la bixina, un colorante natural presente principalmente en las semillas de *Bixa orellana* o achiote. Esta biosíntesis consiste en la reacción secuencial de tres enzimas; un caroteno dioxigenasa (CCD), un aldehído deshidrogenasa (ALDH) y una metiltransferasa (MET) (Bouvier *et al.*, 2003). Así la primera reacción enzimática es una escisión oxidativa del licopeno en la posición 5-6/5'-6' catalizada por la CCD, dando lugar al compuesto aldehído de bixina. Sin embargo, poco se sabe acerca de la segunda reacción de síntesis de bixina que involucra un ALDH para producir norbixina.

Investigaciones recientes por Cárdenas-Conejo y colaboradores (2015) a partir del análisis de los transcriptomas de *Bixa orellana* permitieron identificar los genes que codifican las enzimas de las familias CCD, ALDH, SABATH donde varios de ellos están potencialmente involucrados en la síntesis de bixina. Adicionalmente Carballo-Uicab y colaboradores (2019) y Us-Camas y colaboradores (2022) demostraron que BoCCD4-3 está involucrado en la síntesis de bixina aldehído que es una CCD diferente a la reportada por Bouvier y colaboradores (2023). Con la finalidad de ahondar más en este estudio de la segunda reacción de los genes implicados en la síntesis de la bixina. En este estudio, se utilizaron las secuencias codificantes de *BoCCD4-3* y *BoALDH3H1-1* del transcriptoma de *B. orellana* optimizadas en sus codones y coexpresadas en *E. coli*. Los resultados mostraron que la enzima BoALDH3H1-1 es capaz de convertir la bixina aldehído en norbixina, ya que se observaron cambios en la coloración en las células bacterianas que expresaban las proteínas recombinantes, sugiriendo así su participación en el segundo paso de la biosíntesis de la bixina. Esto confirma la actividad funcional de ambas enzimas. Así también la optimización de codones resultó en una mayor expresión proteica. Finalmente se pudo observar que la proteína BoALDH3H1-1 tuvo una tendencia a formar agregados insolubles en *E. coli*, aunque esto no afectó su función y BoALDH3H1-1 se comportó estable y soluble en agua.

ABSTRACT

Bixa orellana L. is a plant grown in tropical areas of South America, southeastern Mexico, Africa and the western Indies; it is of commercial importance in various industries (pharmaceutical, food, textile). This study focuses on the biosynthesis of bixin, a natural dye found mainly in the seeds of *Bixa orellana* or achiote. This biosynthesis consists of the sequential reaction of three enzymes; one carotene dioxygenase (CCD), one aldehyde dehydrogenase (ALDH) and one methyltransferase (MET) (Bouvier et al., 2003). Thus, the first enzymatic reaction is an oxidative cleavage of lycopene at the 5-6/5'-6' position catalyzed by CCD, giving rise to the bixin aldehyde compound.

Recent research by Cárdenas-Conejo et al., (2015) from the analysis of the transcriptomes of *Bixa orellana* allowed to identify the genes that encode the enzymes of the families CCD, ALDH, SABATH where several of them are potentially involved in the synthesis of bixin. Additionally, Carballo-Uicab and contributors (2019) and Us-Camas and collaborators (2022) demonstrated that BoCCD4-3 is involved in bixin aldehyde synthesis which is a CCD different from the one already by Bouvier *et al.* (2023). In order to deepen further in this study of the second reaction of the genes involved in the synthesis of bixin. In this study, the coding sequences of BoCCD4-3 and ALDH3H1-1 obtained from the of *B. orellana* transcriptome were codon optimized, cloned into an expression vector and co-expressed in *E. coli*. The results showed that the enzyme BoALDH3H1-1 is able to convert bixin aldehyde to norbixin, as changes in coloring in bacterial cells expressing the recombinant proteins were observed, thus suggesting their involvement in the second step of biosynthesis of bixin. This confirms the functional activity of both enzymes. Thus, also codon optimization resulted in greater protein expression. Finally, it was observed that the protein BoALDH3H1-1 was observed that the protein BoALDH3H1-1 had a tendency to form insoluble aggregates in *E. coli*, although this did not necessarily affect its function. In addition, the BoALDH3H1-1 protein was found to be stable and water-soluble

INTRODUCCIÓN

Los apocarotenoides son productos que resultan de la degradación de carotenoides la cual puede ocurrir a través de la fotooxidación u oxidación enzimática en enlaces específicos catalizada por las enzimas dioxigenasas de carotenoides (CCDs por sus siglas en inglés) (Giuliano, Al-Babili, y von Lintig 2003; Felemban *et al.*, 2019). Dichas enzimas poseen funciones importantes en el desarrollo de reguladores de crecimiento en los tejidos vegetales y son los responsables de facilitar la atracción de los polinizadores, debido a que, poseen ser compuesto de tipo aromas, sabor y pigmentación en las flores (Ohmiya 2009; Beltran y Stange 2016).

Debido a la naturaleza de compuestos como agentes pigmentantes en los últimos años, se ha desarrollado un interés de emplearlos para la elaboración de productos en las industrias farmacéutica, alimenticia, textil y cosmética. Por lo anterior, entre las razones de su uso se debe a la nula toxicidad que brindan para la salud humana (Raddatz-Mota *et al.*, 2017; Vilar *et al.*, 2014). Entre los colorantes naturales, se encuentra la bixina, extraído de las semillas de *Bixa orellana* o achiote.

A pesar de la importancia del uso de la bixina, la ruta biosintética no se ha dilucidado de manera certera. En el 2003, Bouvier y colaboradores demostraron la síntesis de este compuesto, usando un sistema de expresión heterólogo en *Escherichia coli*, que involucraba tres genes que codifican para las enzimas; dioxigenasa (BoLCD) que cortan al licopeno en los sitios 5,6 (5',6'), aldehído deshidrogenasa (BoBADH) y finalmente la norbixin metiltransferasa (BonMT) (Bouvier *et al.*, 2003). Sin embargo, otros grupos de investigación han demostrado dificultades al intentar replicar esta vía biosintética utilizando los genes propuestos por Bouvier y colaboradores. Más aun, estos genes no han sido identificados en los transcriptomas de *Bixa orellana* (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015a; 2023; Rodríguez-Ávila *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2011).

En el informe del análisis del transcriptoma de *Bixa orellana*, los transcritos ensamblados revelaron varios genes que codifican a las enzimas carotenoides dioxigenasas (BoCCDs), aldehído deshidrogenasas (BoALDH) y metiltransferasas (BoSABATH) potencialmente involucradas en la síntesis de bixina (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015a; 2023b).

Recientemente se ha caracterizado *in vitro* e *in vivo* la función de la BoCCD4-3 como potencialmente involucrada en el primer paso de la ruta dando como resultado la síntesis de bixina aldehído (Carballo-Uicab *et al.*, 2019; Us-Camas *et al.*, 2022), sin embargo, aún se

desconoce cual de las ALDH es responsable del segundo paso de la biosíntesis de bixina. Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo determinar experimentalmente la función de manera conjunta de la BoCCD4-3 y BoALDH3H-1 (descritas como potencialmente involucrados en los dos primeros pasos de la biosíntesis de bixina). Los genes *BoCCD-3* y *BoALDH3H1-1* fueron clonados en el vector de expresión pETDuet-1 y se coexpresaron en la cepa de *Escherichia coli* BL21 DE3 modificada para producir licopeno (Misawa *et al.*, 1995). Los resultados de la expresión demostraron que el cambio de color producido por la actividad de ALDH3H1-1 confirma su actividad funcional para eliminar los grupos dialdehídos de bixina aldehído y producir norbixina.

CAPÍTULO I ANTECEDENTES

1.1. *Bixa orellana* L

La planta de *B. orellana* es conocida comúnmente como achiote, bija, urucú, annatto, urucum, latkan, olean, es miembro de la familia bixácea y del género *Bixa*, nativa de América del Sur, central e islas del Caribe (Teixeira da Silva *et al.*, 2018, Pandey *et al.*, 2019). Son plantas arbustivas de copa baja extendida que pueden alcanzar una altura entre los 3-10 m. Las hojas de esta planta perenne pueden presentarse en una forma acorazonada u ovadas de textura cartácea, poseen; arreglo alterno, simples, de borde liso, con peciolo largo, pubescente, y contienen savia rojiza (Rivera y Flores, 1988, Leal y Michelangeli de Clavijo, 2010).

Las flores son usualmente grandes, hermafroditas con inflorescencias paniculares, se presentan en tonalidades rosas a blancas, conformadas por cinco pétalos imbricados de 25 mm largo y 12 mm ancho, (de Clavijo *et al.*, 2003). El fruto es una cápsula de 1.5-4.5 cm de largo, presenta características variantes respecto a su forma, (ovoide, hemisférico, epsiloide o cónico) y tonalidad (roja a verde, según su morfotipo) y cuando se encuentra en su estado maduro tiende a cambiar a un color marrón (Blair y Madrigal, 2005; Trujillo-Hdz *et al.*, 2016) (Figura 1.1.). Los frutos también presentan espinas y albergan alrededor de 30-60 semillas (Leal y Michelangeli de Clavijo 2010). Las semillas son ovaladas y angulares, que miden entre 3-4 mm de largo y 2-3 mm de diámetro, contienen un embrión grande rodeado por un endospermo granular, con almidón abundante (Leal y Michelangeli de Clavijo 2010; Vilar *et al.*, 2014).



Figura 1.1 Flores y frutos de *Bixa orellana* L. Foto: Rodolfo Pech-Hoil

1.2. Usos y propiedades de *Bixa orellana*

Las semillas de *Bixa orellana* se consideran de gran importancia económica, debido a la producción de un alto contenido de bixina, el interés en el uso de la bixina como colorante natural resulta imprescindible en las industrias, por ejemplo, en la alimenticia es empleado para brindar un mayor atractivo visual y sustituir los colorantes sintéticos en los productos lácteos (mantequillas, margarinas, quesos), productos cárnicos, aceites, helados. Además de no ser tóxica, no afecta el sabor de los productos (Devia y Saldarriaga 2003, Vilar *et al.*, 2014, Raddatz-Mota *et al.*, 2017). Si bien, la bixina ha sido utilizado desde tiempos precolombinos como pintura corporal durante rituales religiosos y como protección ante la picadura de insectos (Leal y Michelangeli de Clavijo, 2010).

En cuanto al uso terapéutico de *Bixa orellana*, también se remonta desde la antigüedad en la medicina tradicional; utilizado las infusiones de hojas y semillas para tratar dolencias e inflamaciones estomacales (Raddatz-Mota *et al.*, 2017). Así mismo, a las hojas se les han atribuido actividad antimicrobiana contra cepas gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*) (Chandel, Begum, y Syedy 2014) Adicionalmente, se ha comprobado que las semillas poseen actividad antioxidante, por lo que, su uso se asocia a la inhibición de la proliferación de células cancerosas de melanoma cutáneo (de Oliveira Júnior *et al.*, 2019).

1.3 Carotenoides y biosíntesis.

Los carotenoides son un grupo de metabolitos hidrófobos que exhiben pigmentos naturales de tonalidades rojos, naranjas y amarillos (Maoka, 2020). Su estructura consiste en 40 átomos de carbonos integrado por ocho unidades de isoprenoides y están distribuidos ampliamente en la naturaleza, principalmente en todos los organismos fotosintéticos (plantas, algas, cianobacterias) así como en algunas bacterias y hongos no fotosintéticos (Mezzomo y Ferreira, 2016). Los carotenoides poseen funciones importantes para la supervivencia, foto-protección, interacción con animales polinizadores, dispersores de semillas y precursores de fitohormonas como el ácido abscísico (ABA) y las estrigolactonas (SL) (Hermanns *et al.*, 2020; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2018). En la actualidad, se conocen alrededor de 850 tipos de carotenoides, de los cuales, se dividen en dos categorías según su estructura química y propiedades funcionales; carotenoides hidrocarbonados o no oxigenados (como el β -caroteno, α -caroteno, licopeno); y los oxigenados, denominados xantofilas (zeaxantina, luteína, violaxantina) (Walter y Strack 2011, Honda *et al.*, 2020).

La síntesis de *Novo* de carotenoides en plantas superiores ocurre en los plastidios a través de la ruta MEP (metileritrol 4-fosfato), iniciando con la condensación de dos moléculas de geranil geranil difosfato (GGPP) catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY) para generar fitoeno (Ampomah-Dwamena *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2015a). El fitoeno es modificado secuencialmente por fitoeno desaturasa (PDS), ζ -caroteno isomerasa (ZISO) y carotenoides isomerasa (CRTISO), que dan lugar como producto all-trans licopeno. Posteriormente, ocurren reacciones de ciclación de ambos extremos de la molécula del licopeno por la actividad de las enzimas ciclasas; la ϵ -licopeno (ϵ -LCY) y β -licopeno ciclasa (β -LCY), este es un paso clave importante en el metabolismo de los carotenoides, debido a que, la introducción de anillos beta (β), ϵ (ϵ) en la cadena lineal de licopeno se generan α -caroteno y β -caroteno, respectivamente (Yuan *et al.*, 2015; Swapnil *et al.*, 2021; Fraser Paul y Bramley Peter, 2004) Finalmente, ocurre la formación de las xantofilas por reacciones de hidroxilación en α -caroteno y β -caroteno que dan lugar a la síntesis de luteína y zeaxantina por la acción de hidrolasas (CHY ϵ y CHY β) (Cunningham *et al.*, 1996; Dautermann y Lohr, 2017). La zeaxantina se epoxida a violaxantina en un proceso que consiste en dos pasos catalizados por la zeaxantina epoxidasa (ZEP); como primer paso la zeaxantina es convertida en anteraxantina, mientras que, en el segundo paso, la anteraxantina es convertida en violaxantina, cuya molécula puede volver a convertirse en zeaxantina por una reacción reversible por acción de la violaxantina de-epoxidasa (Swapnil *et al.*, 2021) (Figura 1.2).

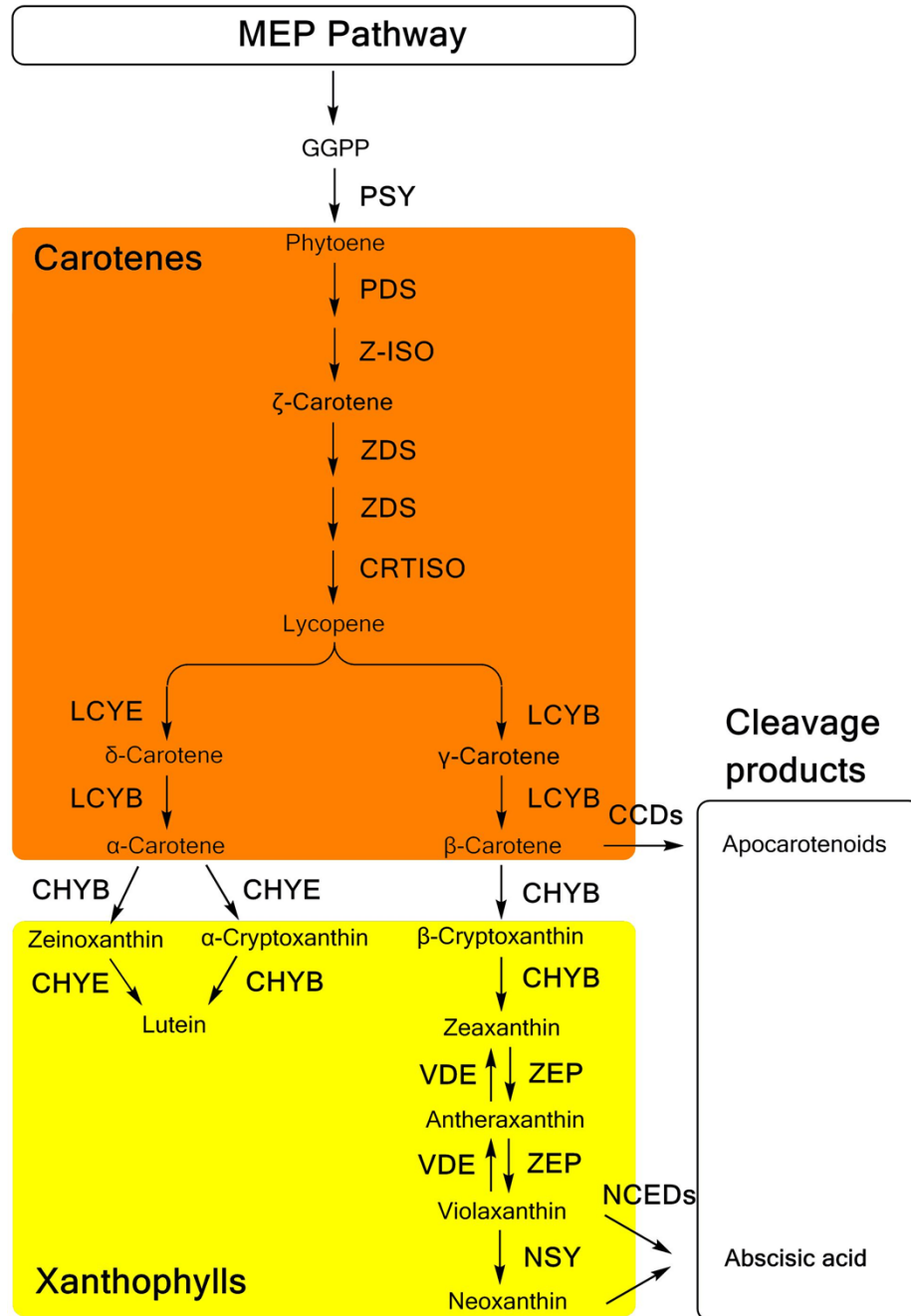


Figura 1.2 Ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas (Wang *et al.*, 2018)

1.4 BIOSÍNTESIS DE BIXINA Y GENES IMPLICADOS

1.4.1 Bixina

La bixina es un apocarotenoide que consta de una estructura de 25 átomos de carbono cuya fórmula química es $C_{25}H_{30}O_4$, en los extremos de la cadena presenta un grupo de ácido carboxílico y un éster metílico que le permiten conferir funciones de ácido orgánico (Rivera-Madrid *et al.*, 2016).

La bixina es aceptada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) y otras organizaciones como compuesto inocuo e identificado como aditivo alimenticio por la unión europea de los colorantes con el código E160b (da Silva, Dobránszki, y Rivera-Madrid, 2018). Este apocarotenoide se acumula principalmente en el arilo, tejido tegumentario externo de la semilla, y representa más del 80 % de los carotenoides totales (Rodríguez-Ávila *et al.*, 2011).

La solubilidad de este pigmento depende de su tipo de configuración, por lo que, posee dos configuraciones estereoquímicas; *cis* y *trans*. La *cis*-bixina es soluble en solventes orgánicos a los que les confiere un color naranja, mientras que la *trans*-bixina es un isómero más estable, pero tiene la particularidad de exhibir un color rojo en solución y es soluble en aceite (Scotter, 2009; Rivera-Madrid *et al.*, 2016).

1.4.2 Biosíntesis de bixina

La primera ruta de biosíntesis de bixina se consolidó hipotéticamente en un trabajo realizado por Jako y colaboradores en el (2002). Este grupo de investigación planteó a partir del análisis de una biblioteca de ESTs (Etiquetas de Secuencias Expresadas), de semillas inmaduras de *Bixa orellana* al licopeno como el principal precursor de esta vía. Este análisis arrojó la identificación de un grupo de genes que codifican CCDs, ADHs y MTH.

Posteriormente, Bouvier y colaboradores en el (2003), publicaron la síntesis de bixina en un sistema heterólogo, usando células de *E. coli* modificadas para producir licopeno. La reacción enzimática involucró a las enzimas; Licopeno dioxigenasa (LCD) o CCD, bixina aldehído deshidrogenasa (BoBADH) o ADH y la norbixina metiltransferasa (BoMT) o MTH, misma secuencia de enzimas propuesta por Jako *et al* (2002). De esta manera, los autores demostraron la conversión del licopeno a bixina.

Años más tarde, el empleo de la secuenciación masiva de nueva generación (NGS) permitió obtener el transcriptoma de tejidos; hoja joven, semilla inmadura y madura de *Bixa orellana* (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015). En el análisis del transcriptoma fueron identificados nuevos genes relacionados en la ruta MEP, carotenoides, bixina, en donde la ruta MEP proporciona los principales precursores (IPP y DMAPP) en la biosíntesis de carotenoides, siendo el licopeno el producto final, un pigmento carotenoide rojo, descrito como el principal precursor de la bixina.

Así, Cárdenas-conejo y colaboradores en el 2015 proponen modelos hipotéticos sobre la formación de bixina a partir del licopeno. En la primera propuesta, la acumulación de licopeno, resultado de un bloqueo en la vía de carotenoides río abajo, conduce a que las enzimas BoCCD4-1 o BoCCD4-3 accedan al licopeno, realizando cortes en los sitios 5,6 y (5',6'), lo que da como resultado la generación de bixina aldehído dentro del plastidio. Posteriormente, las enzimas BoALDH3H1-1, BoALDH3I1 y BoALDH7B4 transforman la bixina aldehído en norbixina. El último paso de esta ruta en los plastidios implica la metilación de los grupos carboxílicos de la norbixina, mediada por las enzimas BoSABATH3 y BoSABATH4, dando como resultado la formación de bixina. La segunda hipótesis plantea que el proceso comienza con un corte inicial del licopeno en el plastidio a través de la enzima CCD4-3. El producto resultante se libera al citosol a través de un intermediario de C32. Luego, en el citosol, una de las enzimas BoCCD4-2, BoCCD1-3 o BoCCD1-4 lleva a cabo un segundo corte, finalizando con la producción de bixina aldehído. En la tercera propuesta, se sugiere que la formación de bixina podría estar siendo el resultado de la

combinación de ambas rutas previamente mencionadas. En este escenario, la bixina aldehído podría generarse a través de la acción de la enzima ALDH3H1 en conjunto con SABATH1 citosólica, lo que sería responsable de la producción de norbixina y bixina en el citosol (Figura 1.3)

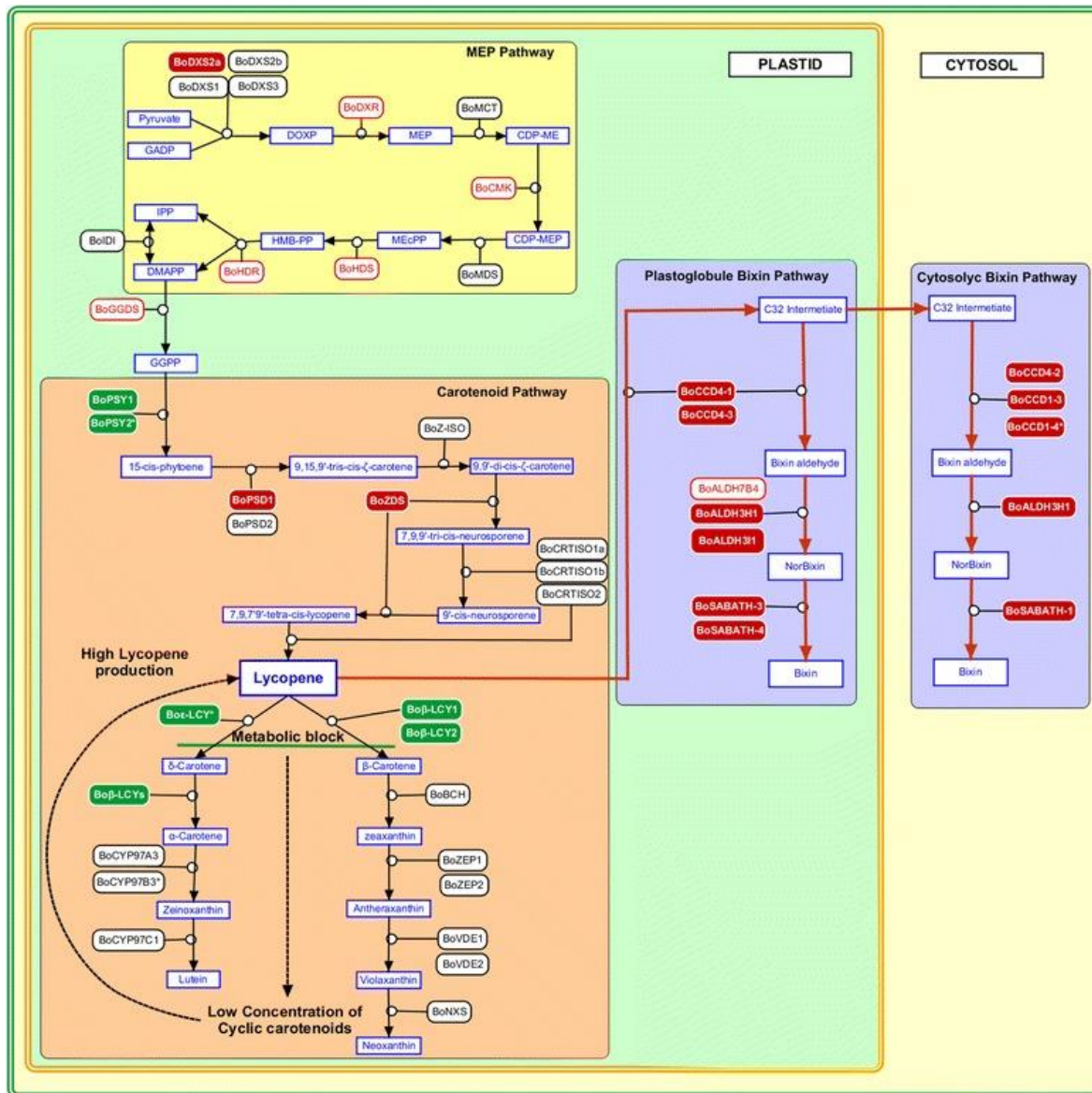


Figura 1.3 Rutas metabólicas para la biosíntesis de bixina en *Bixa orellana* L (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015).

Posteriormente, de acuerdo a los análisis de transcriptoma realizados por Cárdenas–Conejo 2015, Carballo-Uicab y colaboradores en el (2019), analizaron la expresión por RT-qPCR de los ocho miembros de la familia de CCDs, en diferentes estadios de desarrollo de las semillas de dos morfotipos de achiote cuya producción de bixina era contrastante. El resultado de esta expresión mostró que la BoCCD1-1 y BoCCD4-3 como posibles candidatas para el primer paso de la síntesis de bixina, por lo que su funcionalidad fue evaluada en un sistema heterólogo en bacterias productoras de licopeno. Los resultados de la actividad enzimática de BoCCD1-1 y BoCCD4-3 mostraron que estas enzimas cortan los enlaces 5,6 (5' / 6') de licopeno para producir bixina aldehído (Carballo-Uicab et al., 2019). En base a estos resultados, los autores proponen tres modelos hipotéticos para la síntesis de bixina ; 1) La síntesis de bixina se lleva a cabo en los plastidios y por acción de BoCCD4-3 corta en la posición 5,6 (5' / 6') de licopeno y se produce la bixina aldehído; 2) La síntesis de bixina comienza en los plastidios, la actividad de *BoCCD4-3* corta en 5,6 (5' / 6') de licopeno y el producto intermedio resultante de C32 se transporta al citosol por difusión, un segundo corte por *BoCCD1-1* podría usar como sustrato al C32 para formar bixina aldehído 3) La síntesis de bixina se lleva a cabo al mismo tiempo en los plastidios y en el citosol (Figura 1.4).

Recientemente, Us-Camas y colaboradores (2022) evaluaron la función de ocho genes BoCCD utilizando una cepa de *E. coli* modificada para la producción de licopeno. Además, se realizaron ensayos *in vitro* para determinar la participación de estos genes en la biosíntesis de bixina. Los resultados de este estudio demostraron que los genes *BoCCD1-3*, *BoCCD1-4*, *BoCCD4-1*, *BoCCD4-2*, *BoCCD4-3* y *BoCCD4-4* presentan actividad de escisión en la posición 5,6 (5' / 6') de licopeno. Como resultado de la actividad de escisión, se generó bixina aldehído, cuyo pico correspondiente de (*m/z* 349.1) fue identificado por LC-ESI-QTOF-MS/MS.

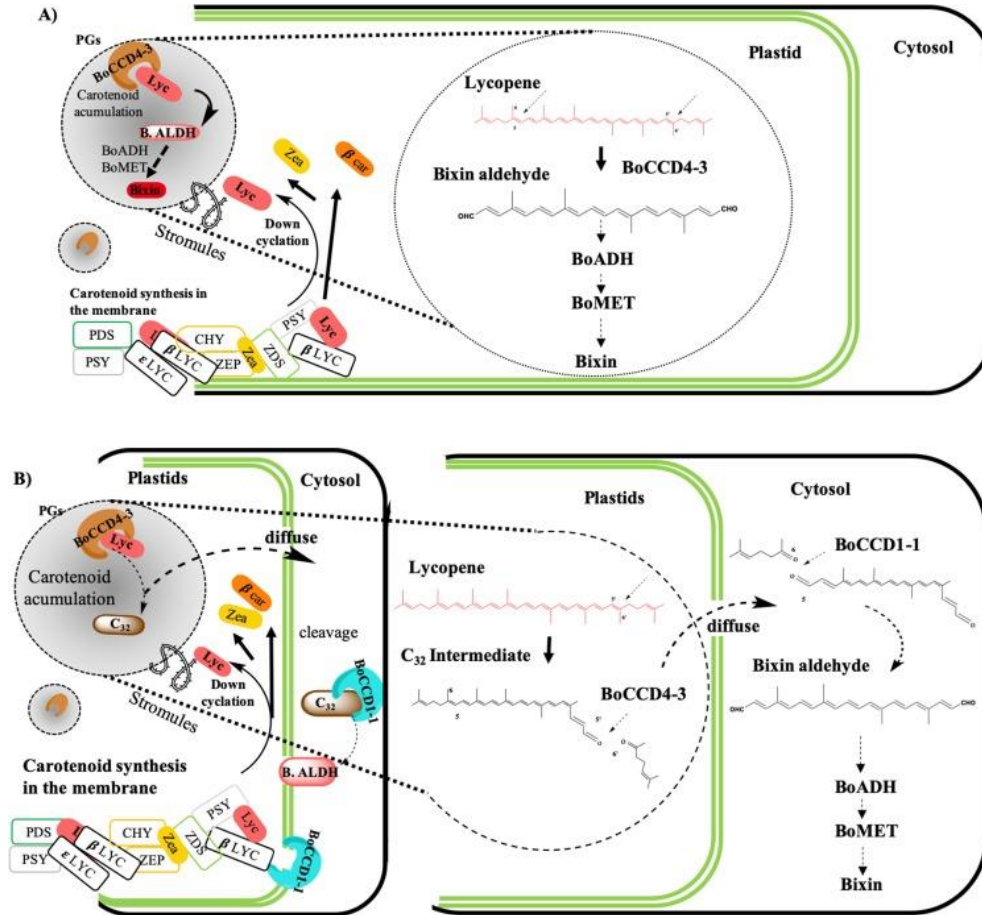


Figura 1.4 Modelos de biosíntesis de bixina. Tomada de (Carballo-Uicab *et al.*, 2019).

1.4.3 Descripción general y clasificación de las Caroteno dioxigenasas (CCDs)

El primer paso de la biosíntesis de bixina está dado por la acción de estas enzimas (CCDs) en los enlaces 5,6 (5'/6') de licopeno para producir bixina aldehído (Jako *et al.*, 2002; Bouvier *et al.*, 2003; Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015). Este grupo de enzimas son caracterizadas por conservar una estructura secundaria constituida por siete brazos de β -hélice, cuatro residuos de histidina y residuos de glutamato que interactúan con el ion Fe^{2+} . El ion de hierro permite introducir átomos de oxígeno para catalizar la escisión oxidativa en carotenoides para la producción de apocarotenoides (Frusciante *et al.*, 2014; Harrison y Bugg 2014).

En plantas superiores las CCDs se han estudiado ampliamente y clasificado en dos subfamilias (NCED y CCDs), por ejemplo, en el análisis del genoma de *Arabidopsis thaliana* se identificaron nueve miembros clasificados en dos subfamilias, entre ellos cinco miembros que pertenecen a las denominadas nueve-*cis*-epoxicarotenoides dioxigenasas (NECD) implicadas en la biosíntesis de la hormona vegetal ABA, en la que su actividad de corte ocurre en los enlaces 11, 12 (11', 12') de 9-*cis*-violoxantina o 9-*cis*-neoxantina (Tan *et al.*, 2003) y cuatro miembros restantes pertenecen a las CCDs (AtCCD1, AtCCD4, AtCCD7, AtCCD8) (Auldrige, McCarty, y Klee, 2006).

1.4.3.1 CCD1

Los miembros de esta subfamilia suelen tener localización citoplasmática y a menudo muestran un alto grado de promiscuidad hacia los sustratos carotenoides cíclicos y lineales, cortando en los sitios 9,10 (9',10'),5,6 o 5',6', 7,8 (7',8') (Auldrige *et al.*, 2006; Dhar *et al.*, 2020; Vogel *et al.*, 2008). Estas enzimas generalmente están involucradas en la síntesis de apocarotenoides volátiles como las iononas (β , α), β -damascenona, relacionadas con el desarrollo del aroma y sabor de las flores y frutos, por lo que, han sido caracterizadas en varias especies de plantas en particular en *vitis vinífera* (Mathieu *et al.*, 2005), *Solanum lycopersicum* (Ilg *et al.*, 2014; Simkin *et al.*, 2004), *Zea mays* (Vogel *et al.*, 2008) *Rosa damascena* (Huang, Molnár, y Schwab 2009), *Cucumis melo* (Jiang *et al.*, 2019), y *Capsicum annuum* (Cheng *et al.*, 2021).

1.4.3.2 CCD4

Estas enzimas de manera similar a las CCD1 participan en la síntesis de componentes volátiles al realizar cortes en los carotenoides en las posiciones 9,10(9'10), 7,8(7'8'). También se ha reportado que las CCD4 contribuyen en la pigmentación de flores en crisantemo y lirio (Hai *et al.*, 2012; Ohmiya, 2009) y en la diversificación de color amarillo y blanco de pulpas de frutos de melocotón (Falchi *et al.*, 2013).

En el género citrus, se ha informado que el corte en los sitios 7,8 (7'8') en zeaxantina y β -criptoxantina contribuyen en la formación de apocarotenoides de C₃₀ como la β -citraurina, un apo-8'- β -caroteno, implicado en la pigmentación de la piel de los cítricos (Rodrigo *et al.*, 2013). Mientras que la actividad enzimática de CCD4 de *Chrysanthemum morifolium*, *Crocus sativus* y *Malus domestica* ha sido reportada en experimentos empleando sistemas heterólogos en la que su actividad de corte en las posiciones 9,10 (9'10) en β -caroteno producen β -ionona (Huang *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2008). Sin embargo, existe un reporte que las CCD4 de *Vitis vinífera* y *Bixa orellana* también pueden tener actividad de 5,6 (5',6') en licopeno (Carballo-Uicab *et al.*, 2019; Lashbrooke *et al.*, 2013).

1.4.3.3 CCD7 y CCD8

Estas enzimas se han identificado de mutantes de brotes axiliares en *Arabidopsis*, actúan secuencialmente en la síntesis de estrigolactonas (SL). La CCD7 ha sido reportada que corta asimétricamente β -caroteno en la posición 9,10 para producir β -ionona y β -apo-10'-carotenal, este último es usado por la CCD8 para convertirlo en el compuesto de C18 (β -apo-13-carotenona) el cual es el precursor de la estrigolactona (Auldrige *et al.*, 2006; Seto y Yamaguchi 2014).

1.4.4 Aldehído deshidrogenasas

La reacción secuencial de la biosíntesis de bixina es catalizada por la enzima aldehído deshidrogenasa, la cual, convierte los grupos aldehídos de la bixina aldehído en ácidos carboxílicos (Bouvier *et al.*, 2003; Jako *et al.*, 2002; Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015).

Las aldehído deshidrogenasas (ALDH) son una familia de enzimas ampliamente distribuidas en organismos eucariontes, procarionte y estructuralmente están constituidas por tres dominios: el dominio catalítico, dominio de unión al cofactor NAD (P)⁺ que comprende un pliegue de Rossmann para la acción del sitio activo y por último un domino de oligomerización (Hayes *et al.*, 2018).

Estas familias se clasifican de acuerdo a los criterios establecidos por el comité de Nomenclatura Genética de ALDH (AGNC) (Vasiliou *et al.*, 1999). Hasta la fecha, se han identificado veinticuatro familias distintas basándose en su distribución de secuencia, abarcando una amplia variedad de taxones, que incluyen plantas, animales, humanos, musgos y organismos unicelulares (Wood y Doff, 2009; Brocker, *et al.*, 2013). Dentro de estas veinticuatro familias, en el caso de los humanos se agrupan en un total de 10 familias: ALDHA1, ALDH4A1, ALDH8A1, ALDH91, ALDH13A1, ALDH15A1, ALDH16A1, ALDH20. Por otro lado, en las especies vegetales se han descrito catorce familias de proteínas ALDH (ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7, ALDH10, ALDH11, ALDH12, ALDH18, ALDH19, ALDH21, ALDH22, ALDH23 y ALDH24) de las cuales las ALDH1, ALDH12, ALDH19, ALDH21, ALDH22, ALDH23 y ALDH24 son exclusivamente de plantas, cuyos miembros han sido ampliamente estudiadas en plantas superiores como *Arabidopsis* (Kirch *et al.*, 2004), *Oriza sativa* (Gao y Han 2009), *Zea mays* (Jimenez-Lopez *et al.*, 2010), *Vitis vinífera* (Zhang *et al.*, 2012), *Solanum lycopersicum* (Jimenez-Lopez *et al.*, 2016).

Además de su distribución y clasificación, estas enzimas juegan un papel importante como “captadores de aldehídos” al eliminar los aldehídos reactivos producidos como resultado de la degradación de la oxidación de las membranas lipídica, por lo tanto, contribuyen en la adaptación al estrés abiótico, crecimiento, desarrollo de semillas, y fertilidad masculina en plantas (Brocker *et al.*, 2013; Shin *et al.*, 2009). Por ejemplo, el primer miembro de familia ADLH2 de maíz fue identificado como un restaurador de la fertilidad (RF2A) e involucrado en el desarrollo de las anteras (Liu *et al.*, 2001; Tola *et al.*, 2021) mientras que en plantas transgénicas de tabaco mostraron mayor tolerancia al estrés debido a la sobreexpresión de la ALDH22A1 de maíz (Huang *et al.*, 2008).

1.4.4.1 ALDH3

La familia ALDH3 están compuesta por enzimas que oxidan compuestos aldehídos aromáticos y alifáticos de cadena larga. Estas enzimas son las más diversas en plantas, conocidas como enzimas homodiméricas y se localizan principalmente en el citosol, cloroplasto y mitocondrias (Brocker *et al.*, 2013; Jimenez-Lopez *et al.*, 2010). Estudios previos en plantas modelos han identificado homólogos de ALDH3 distribuidas en las subfamilias ALDH3E, ALDH3F, ALDH3H, ALDH3I, ALDH3J, ALDH3K. Entre ellos; *A. thaliana* reportada por contener tres homólogos (AtALDH3f1, AtALDH3H1, AtALDH3I) (Kirch *et al.*, 2005); *Z. mays* (ZmALDH3E1, ZmALDH3E2, ZmALDH3H1, ZmALDH3H2, ZmALDH3H3) (Jimenez-Lopez *et al.*, 2010); *S. lycopersicum* (SIALDH3F1C, SIALDH3F1D) (Jimenez-Lopez *et al.*, 2016). Entre las funciones reportadas se encuentran las respuestas al estrés como la deshidratación, aumento de salinidad, baja temperatura y radiación ultravioleta (Kirch *et al.*, 2005; Kotchoni *et al.*, 2006; Zarei, Trobacher, y Shelp, 2016).

Por otro lado, los ALDH3 son precursores de pigmentos como crocetina y bixina en *Crocus sativus* y *Bixa orellana*, respectivamente. CsALDH3I1, un aldehído deshidrogenasa de *C. sativus*, permite la oxidación de crocetina dialdehído a crocetina (Demurtas *et al.*, 2018) . En *Bixa orellana* la identificación de la ALDH responsable en catalizar la oxidación de los grupos aldehídos de bixina aldehído a norbixina sigue siendo desconocida, por lo que, los datos obtenidos del transcriptoma sugieren que dos miembros de la familia ALDH3 (BoALDH3H1-1, BoALDH3I1) están involucradas en el segundo paso de síntesis (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015). Se ha sugerido que los altos niveles de expresión de *BoALDH3H1-1* en tejidos de semillas inmaduras, se relacionan con la mayor acumulación de bixina. Además, la secuencia del gen *BoALDH3H1-1* mostró mayor coincidencia con la biblioteca de ETS propuesta por Jako y colaboradores (2002).

1.4.5 Metiltransferasa (SABATH)

El paso final de biosíntesis de bixina implica la transferencia de un grupo metilo al grupo carboxílico de la norbixina, esta reacción es catalizada por la enzima metiltransferasa. Las metiltransferasas estructuralmente son caracterizadas por presentar una lámina β plegada, paralela, con un dominio helicoidal α que cubre el sitio activo. El sitio activo está constituido por múltiples residuos apolares con enlaces de hidrógeno entre el ácido carboxílico del sustrato y los grupos amina de Gln-25 y Trp-151 que orientan el sitio activo hacia el grupo metilo (D Auria *et al.*, 2003; Zubieta *et al.*, 2003; Westfall *et al.*, 2013).

La familia SABATH en varias especies de plantas, por ejemplo, en *Arabidopsis*, se logró la identificación de los primeros 24 genes de esta familia (D Auria *et al.* 2003). Posteriormente, en *Oriza sativa* se identificaron un total de 41 miembros (Zhao *et al.*, 2008) y en *Solanum lycopersicum* un total de 20 SABATH (Wei *et al.*, 2021). En plantas, la metilación contribuye en la formación de moléculas en su forma éster metilado o N-metilados, como la bixina y la cafeína respectivamente (D Auria *et al.*, 2003), además, las SABATH a menudo contribuyen en procesos biológicos por ejemplo el ácido jasmonico carboxilo metiltransferasa se ha descrito que juega un papel importante en la defensa contra hongos e insectos (Qi *et al.*, 2016; Seo *et al.*, 2001) , mientras que la carboxil metiltransferasa del ácido giberélico comprende una función en la regulación de germinación de semillas, crecimiento de raíces, (Varbanova *et al.*, 2007) y por último la carboxil metiltransferasa del ácido indol-3-acético están implicadas en la regulación del desarrollo de hojas de las plantas y homeostasis de auxinas (Ljung *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2005).

1.5 Uso de codones optimizados para expresar proteínas en sistemas heterólogos.

El código genético se define como el lenguaje universal organizado en 64 tripletes de nucleótidos (codones) de los cuales 61 son codificados por veinte letras de aminoácidos (aa) durante la síntesis proteica. El código genético es común en los organismos y es descrito como “degenerado” porque dentro de los 20 aminoácidos (aa) el triptófano y la metionina son codificados por un solo codón, mientras que dieciocho aa están codificados por más de un codón y por lo tanto se les denomina “codones sinónimos” (Quax *et al.*, 2015).

La lectura del código genético es mediada por moléculas adaptadoras denominados RNA de transferencia (tRNA), portadores del anticodón de la secuencia complementaria del RNA mensajero situado en el sitio A (aceptor) del ribosoma para llevar a cabo el suministro de los aminoácidos a la secuencia peptídica creciente (Cannarrozzi *et al.*, 2010). En todos los organismos los 61 tRNA que codifican para un codón o codón sinónimo difieren debido al fenómeno descrito como el uso preferencial de codones sinónimos de poca frecuencia denominado sesgo de codones (CUB, por sus siglas en inglés) (Mauro y Chappell, 2014; Liu, 2020; Parvathy *et al.*, 2022).

Este fenómeno ha demostrado tener implicaciones para lograr la expresión de genes en hospederos distintos por causa de la presencia de codones no óptimos o poco frecuentes para la célula heteróloga, por ejemplo, el sesgo de codones en organismos como *E. coli* origina que los tRNA correspondientes a la secuencia complementaria se agoten y por lo tanto tardan en llegar al sitio A del ribosoma provocando una translocación del ribosoma sobre el codón a fin, lo que conlleva a una mala traducción de proteína, incorporaciones erróneas y proteínas truncas (McNulty *et al.*, 2003; Lipinszki *et al.*, 2018). Considerando este panorama, para maximizar la expresión de proteínas heterólogas se recurren a herramientas de la biología sintética para la optimización de codones (Plotkin y Kudla, 2010; Liu, 2020). La optimización de codones, consiste en modificar la secuencia de genes, es decir, seleccionar los codones de alta frecuencia para sistemas eucariotas, y procariontas, así como eliminar la presencia de codones raros (Elena *et al.*, 2014).

JUSTIFICACIÓN

Dado que la bixina es el segundo apocarotenoide de importancia económica por su uso como pigmento natural en la industria alimenticia, textil y cosmética. En las últimas décadas, ha surgido el interés de conocer su ruta de biosíntesis. Previamente se han expresado los genes BoLCD, BoBADH, BoBMT de forma heteróloga en cepas de *E. coli* productoras de licopeno (Bouvier *et al.*, 2003). Sin embargo, los experimentos publicados por estos autores aún no han podido ser reproducidos; así también los genes publicados en este trabajo no se han identificado en transcriptomas de *Bixa orellana*. Por las evidencias expuestas anteriormente, recientemente en nuestro grupo de investigación se ha descrito la actividad funcional de BoCCD4-3 sobre licopeno para la biosíntesis de bixina aldehído. Sin embargo, se desconoce acerca de la segunda reacción de síntesis de bixina, que involucra una ALDH para producir norbixina. Es por ello que, en el presente trabajo se desea conocer la función de la enzima BoALDH3H1-1 en presencia de BoCCD4-3 con codones optimizados con la finalidad de mejorar su expresión en *E. coli* y así más adelante poder obtener construcciones de los genes de la ruta de bixina en vectores de expresión para la producción de bixina en sistemas de expresión heteróloga.

HIPÓTESIS

La BoALDH3H1-1 es capaz de realizar la conversión de bixina aldehído a norbixina

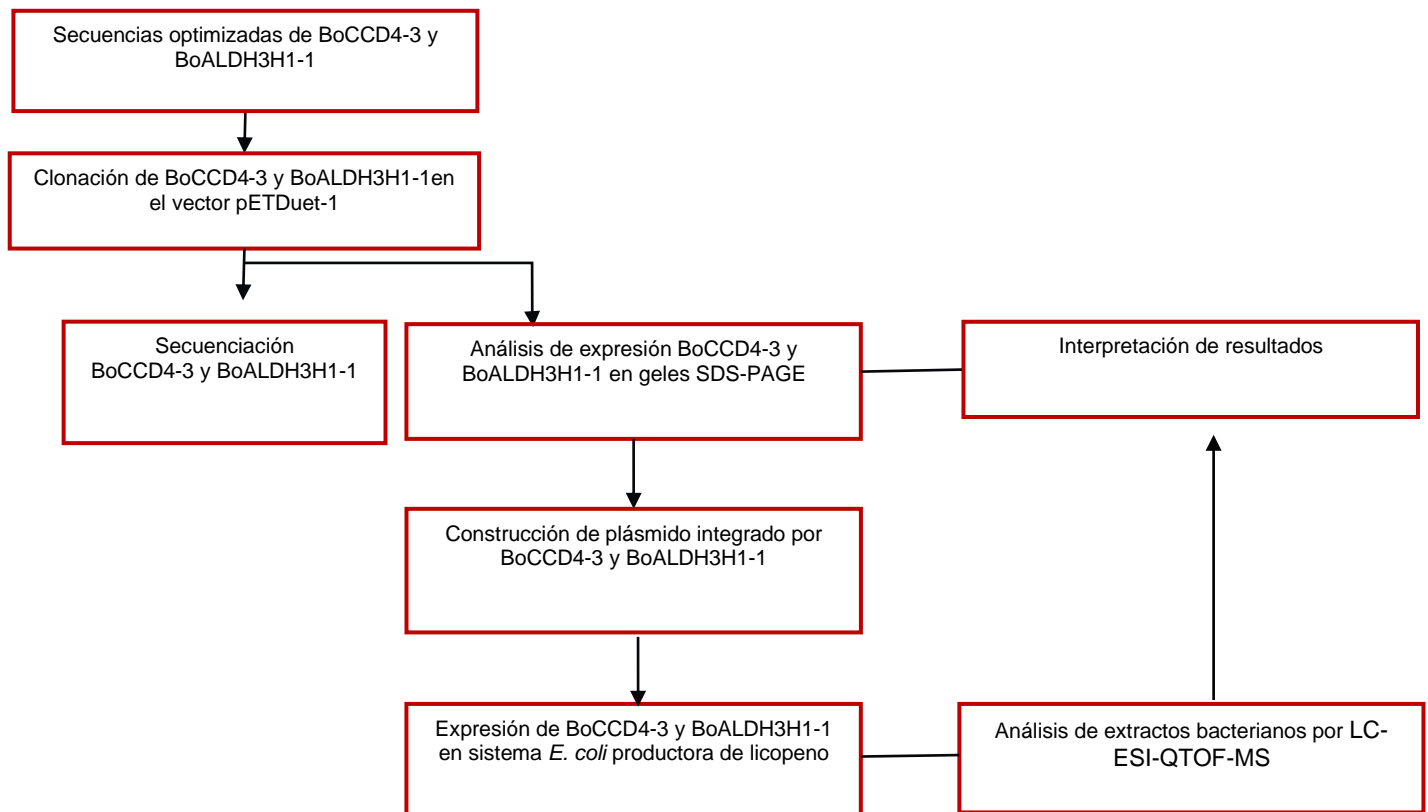
OBJETIVO GENERAL

Demostrar la actividad funcional en *E. coli* de una aldehído deshidrogenasa (BoALDH3H1-1) potencialmente involucrada en la conversión de bixina aldehído a norbixina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la expresión de BoCCD4-3 y BoALDH3H1-1 en *E. coli* por SDS-PAGE.
2. Analizar la función de BoALDH3H1-1 en presencia de BoCCD4-3 por el cambio de color en las bacterias.
3. Analizar los extractos de *E. coli* transformadas con BoCCD4-3 y BoALDH3H1-1 por LC-ESI-QTOF-MS

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Secuencias sintetizadas de BoCCD4-3, BoALDH3H1-1

Los marcos de lectura de los genes con codones optimizados de *BoCCD4-3*, *BoALDH3H1-1* se obtuvieron de la construcción pJET1.2_BoCCD4-3, pJET1.2_BoALDH3H1-1 previamente obtenidos por el M.C Jonathan Dzib Cauich.

2.2. Células competentes (Cl2Rb)

Se utilizó la cepa bacteriana de *E. coli* BL21 (DE3) para generar células competentes. Las bacterias se pusieron a crecer en medio LB a 37°C hasta una $OD_{600} \approx 0.6$, el cultivo bacteriano fue transferido a tubos de centrifuga de fondo redondo, y se incubaron en hielo por 1h, posteriormente, las pastillas celulares fueron recuperadas por centrifugación a 4000 rpm por 15 min a 4°C. A la pastilla bacteriana recuperada se resuspendió en los amortiguadores RF1 y RF2, siguiendo el protocolo descrito por Green R. y Rogers (2013).

2.3 Construcción de plásmidos pETDUET_CCD4-3, pETDUET_CCD4-3_ALDH3H1-1

Las secuencias codificantes de *BoCCD4-3* y *BoALDH3H1-1* se amplificaron por PCR a partir de la construcción pJET1.2_BoCCD4-3, pJET1.2_BoALDH3H1-1, respectivamente. Se utilizó la DNA polimerasa Phusion high Fidelity y cebadores con sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción en sus extremos 5' y 3', Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Cebadores diseñados con sitios de restricción para la amplificación de BoCCD4-3 y BoALDH3H1-1.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Especificaciones
Forward-CCD4-3- <i>NcoI</i>	CatgccATGGGTTTGAGTGCGTTGGCTTC	Cebadores para clonar BoCCD4-3 en el sitio MCS1 de pETDuet-1
Reverse-CCD4-3- <i>HindIII</i>	GggaagcttCTAAAGCTCCTCCTTGAAAGG	
Forward-ALDH3H1-1- <i>NdeI</i>	GgaattccatgGCCTCGTCATTACCCATGAAG	Cebadores para clonar BoALDH3H1-1 en el sitio MCS2 de pETDuet-1
Reverse-ALDH3H1-1- <i>KpnI</i>	ccggtaccCTAGTACTTACTCAAACCGGC	

Las reacciones de PCR se llevaron de la siguiente manera; En un tubo de PCR se añadieron los siguientes componentes: 4 μL de amortiguador 5x phusion buffer, 0.4 μL dNTP 's (10 Mm), 1 μL de 10mM de ambos cebadores (F', R'), 1 μL de plásmido, 0.6 μL de DMSO, 0.2 μL de la polimerasa DNA polimerasa de alta fidelidad Phusion (2 U/ μL) (Cat No. F-549S). Posteriormente, se ajustó con agua estéril a un volumen final de 20 μL . Las condiciones del termociclador se llevaron a cabo empleando el programa descrito en la Tabla 2.2. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con 0.45 μL de gel red a 75 v por 45 min, para la visualización y aislamiento de la banda correspondiente, se empleó un transiluminador de UV (Modelo M-20E, UVP) y con ayuda de un bisturí se cortó la banda y posteriormente se purificó de acuerdo a las instrucciones del fabricante de kit "QIAquick Gel Extraction" de Qiagen (Cat No.28704).

Tabla 2.2 Condiciones del termociclador para la amplificación por PCR

Pasos del termociclador	Tiempo (min)	Temperatura(°C)	N° ciclos
Desnaturalización inicial	0:30	98	1
Desnaturalización	0:15	98	34
Hibridación	0:30	65	
Extensión	0:30	72	
Extensión final	10:00	72	1

Para dar lugar a los vectores de expresión pETDuet+CCD4-3 y pETDuet+CCD4-3+ALDH3H1-1, los plásmidos pETDuet-1 (Novagen, Cat, No 71146-3) y pETDuet+CCD4-3 fueron linealizados con las respectivas enzimas (Tabla 2.1.) y posteriormente purificados empleando el Kit "QIAquick Gel Extraction" de Qiagen. Una vez purificados los plásmidos y el inserto, se procedió a la ligación 5:1 de la relación inserto: vector con la enzima T4 ligasa (Thermo Scientific™ Cat, No EL0016). La reacción de ligación se realizó de acuerdo a las recomendaciones del proveedor, en un volumen final de 20 μL . Los productos de ligación se transformaron en cepas bacterianas de *E. coli* DH5 α químicamente competentes, por el método choque térmico a 42°C por 50 s y 5 minutos en hielo. Después, se agregó 400 μL de medio LB y se incubó en agitación a 37 °C por una hora a 200 rpm. Las células fueron cultivadas en medio solido LB suplementado con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina, para la selección de las células transformadas.

2.4 Extracción de plásmidos y verificación de insertos en células transformadas

La extracción de DNA plasmídico de las células DH5 α transformadas se realizó por el método de lisis alcalina siguiendo el protocolo del Kit comercial “QIAprep® Spiny Miniprep de QIAGEN (250) (Cat. No. 27104). Posteriormente, para corroborar la inserción de los ORFs en el vector pETDuet-1 se realizó PCR y se analizó con enzimas de restricción. El plásmido pETDuet+CCD4-3 se sometió a PCR punto final con los cebadores antes mencionados para verificar la inserción del fragmento, BoCCD4-3, al vector pETDuet-1. Las condiciones empleadas para la reacción se describen en el apartado 2.3. Adicionalmente, se procedió a digerir con XbaI y HindIII. Para la verificación del inserto ALDH3H1-1, el plásmido pETDuet+CCD4-3+ALDH3H1-1 se sometió a digestión con SpeI y KpnI siguiendo las instrucciones del fabricante, Thermo Scientific Fast Digest. Los productos de digestión fueron visualizados en gel de agarosa 1 %, teñido con 0.3 gel red a 80 v por 40 min.

2.5 Secuenciación de las construcciones pETDUET+CCD4-3, pETDUET+CCD4-3+ALDH3H1-1

Las construcciones obtenidas se mandaron a secuenciar mediante el servicio de la empresa Macrogen Inc, (Seoul, Korea) usando los cebadores correspondientes para cada sitio de clonación del vector pETDuet-1(Figura 2.1) y los cebadores descritos en el apartado 2.3. Posteriormente, las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante alineamientos con la herramienta BLAST disponible de la base de datos NCBI, con la finalidad de buscar homologías con las secuencias reportadas de CCD4-3 y ALDH3H1-1 de *Bixa orellana*.

2.6 Expresión heteróloga en cepas de *E. coli* productora de licopeno y condiciones de cultivo.

Una vez que se corroboraron las secuencias de los constructos pETDuet+CCD4-3, pETDuet+CCD4-3+ALDH3H1-1 se transformaron por choque térmico en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) que alberga el plásmido pACCRT-EIB (Misawa *et al.*, 1995) para la producir licopeno, y como control negativo se empleó a una cepa BL21 trasformada con el vector vacío (pETDuet-1). Las células transformadas se cultivaron hasta que se alcanzara una densidad óptica de 0.4-0.6 midiendo a una longitud de onda de 600 nm, posteriormente la expresión se indujo con isopropil- β -D - tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.5mM, incubando a 25°C a 180 rpm durante 20 hrs. Las células se colectaron centrifugando a 4000 rpm por 20 min a 4°C.

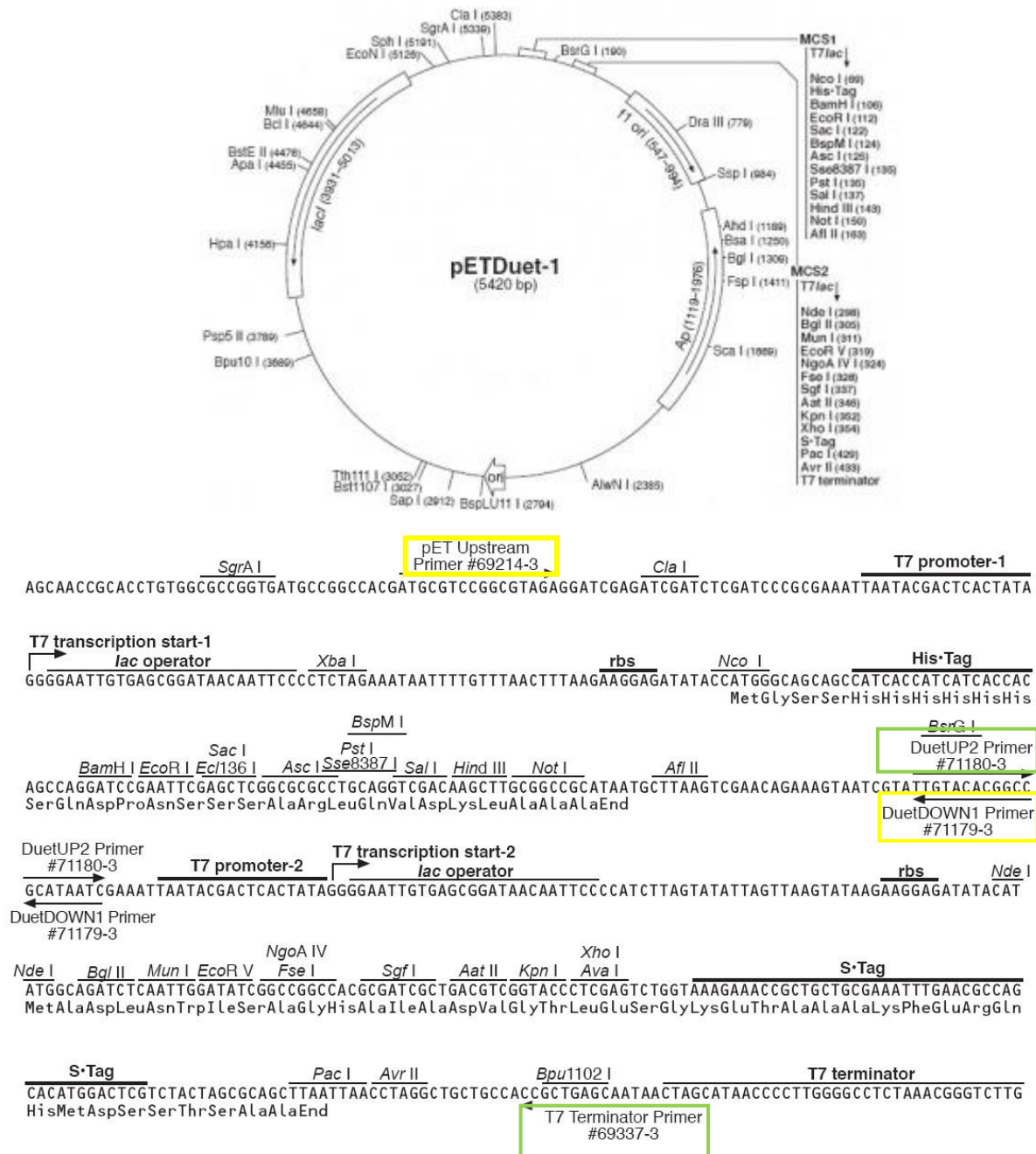


Figura 2.1 Mapa y regiones del vector de clonación/expresión pETDuet-1, este vector porta el gen de resistencia a ampicilina y dos sitios de clonación múltiple (MCS). En los recuadros amarillos se indica a los cebadores empleados para secuenciar al sitio de clonación múltiple 1 (MCS1) y en verde a los del MCS2.

2.7 Análisis de proteínas recombinantes en geles SDS-PAGE 10%

Para evaluar la expresión individual de las secuencias optimizadas de BoCCD4-3 y BoALDH3H1-1 en la cepa *E. coli* BL21 (DE3), se partió de una clona positiva transformada con el constructo pETDuet+CCD4-3, y pETDuet+ALDH3H1-1, respectivamente. Posteriormente, se inocularon con ayuda de un palillo estéril en 5 mL de medio líquido LB adicionado con 100 µg/mL de ampicilina fue incubado a 37°C a 200 rpm toda la noche. A partir del cultivo, se inocularon 2 mL en 100 mL de medio para iniciar el crecimiento a 37°C a 200 rpm hasta llegar a una $OD_{600} \approx 0.6$, después se añadió Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final 0.5mM. Se tomaron muestras de 1 mL de los tiempos de inducción 2, 4, 24 h, se centrifugaron durante 10 min a 4000 rpm a 4°C. El precipitado se disolvió en 250 µL de TRIS-HCL pH 7.5 y posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm por 5 min. Las muestras fueron sonicadas tres veces por 30 s, se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos para obtener la fracción soluble e insoluble. Las fracciones celulares obtenidas de los extractos proteicos, fueron analizadas en geles SDS-PAGE al 10 %, teñido con azul de coomassie, se utilizó como marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards.

2.8 Extracción de pigmentos en sedimentos bacterianos

La extracción de pigmentos se realizó resuspendiendo las pastillas bacterianas en 800 µL de agua grado HPLC/metanol 1:1, incubando por 1 hr a temperatura ambiente, posteriormente, se agregó 800 µL de cloroformo. Las células fueron homogeneizadas y centrifugadas a 10000 rpm por 10 min a 4°C. La fase orgánica fue recuperada y filtrada empleando filtros Millex-GV13 (Durapore PVDP, 13 mm de diámetro, 0.22 µm tamaño de poro), posteriormente, las muestras se secaron bajo flujo de nitrógeno gas y almacenadas a -80 °C para su posterior análisis.

2.9 Análisis e identificación de metabolitos por UHPLC-ESI QTOF-MS/MS

Para la identificación de metabolitos por UHPLC-ESI QTOF-MS/MS, las muestras secas se resuspendieron en 200 µL de cloroformo: isopropanol: acetonitrilo (20:45:135). La identificación de los metabolitos se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada con ionización por electrospray (ESI)/ espectrometría de masas en tándem de tiempo de vuelo de cuadrupolo (QTOF) Waters XEVO-G2XSQTOF (Milford, MA, EE. UU.) en una columna ACQUITY UPLC® BEH 130Å C18, 1.7 µm, 2.1×50 mm (Waters, Milford, MA) mantenida a una temperatura de 25 °C. Para la separación, la fase móvil consistió en un gradiente de ácido fórmico (AF) al 0.1

% en agua (solvente A) y metanol/ACN 50:50 (solvente B), el gradiente se detalla en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 Gradiente empleado para la separación de metabolitos por UHPLC-ESI QTOF-MS/MS

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B
Inicial	0.400	15.0	85.0
2.00	0.400	15.0	85.0
3.00	0.400	1.0	99.0
7.00	0.400	1.0	99.0
8.00	0.600	1.0	99.0
11.60	0.600	1.0	99.0
12.60	0.400	15.0	0.0
15.00	0.400	15.0	0.0

CAPÍTULO III RESULTADOS

3.1. Obtención de plásmidos recombinantes

Para clonar las secuencias codificantes con codones optimizados de BoCCD4-3 y BoALDH3H1-1 en el vector de expresión pETDuet-1, se realizó la amplificación de los ORFs empleando los cebadores con sitios de restricción, previamente descritos en el apartado de metodología. Los productos de PCR visualizados correspondieron a los fragmentos esperados de 1548 pb para CCD4-3 (Figura 3.1 A) y 1452 pb para ALDH3H1-1 (Fig.3.2 A). Posteriormente, estos productos de PCR fueron purificados y ligados al vector pETDuet-1.

Las construcciones resultantes (pETDuet+CCD4-3, pETDuet+ALDH3H1-1) fueron analizadas utilizando enzimas de restricción. Como resultado, se obtuvieron patrones esperados, que muestran la liberación de un fragmento de 2007 pb correspondiente al sitio de corte de pETDuet+CCD4-3 con XbaI y HindIII (Figura 3.1 B) y un fragmento de 1733 pb liberado por el sitio de corte pETDuet+ALDH3H1-1 con NdeI y KpnI (Figura 3.2 B).

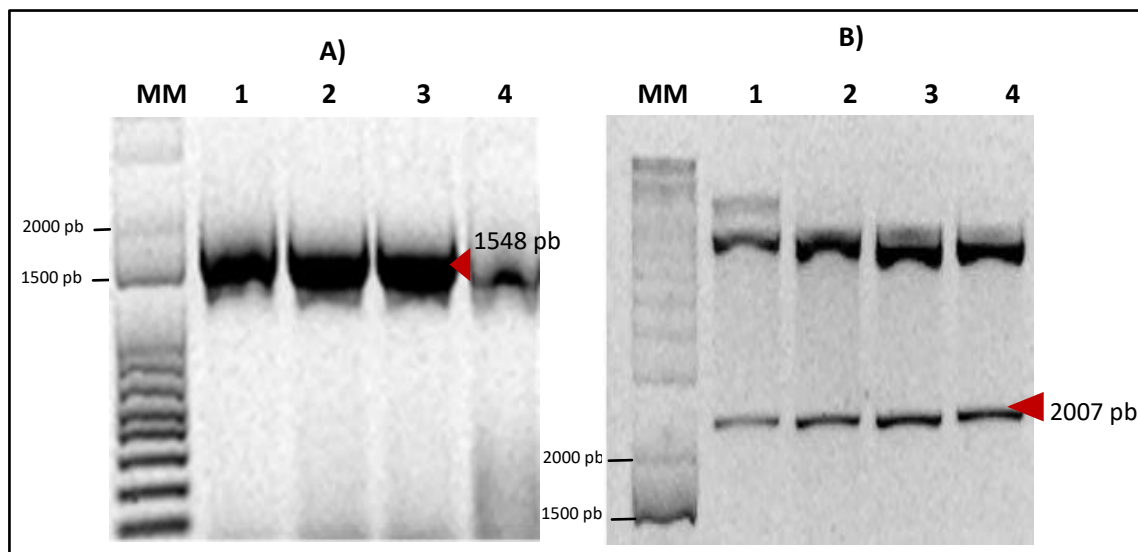


Figura 3.1 Clonación del ORF de CCD4-3 en el vector pETDuet-1. **A)** Amplificación de la secuencia CCD4-3; MM; marcador de peso molecular Kb plus; Carril 1-4 productos de PCR de 1548 pb de CCD4-3 **B)** Digestión de constructos pETDuet+CCD4-3; Carril 1-4; Clonas obtenidas digeridas con las enzimas XbaI y HindIII.

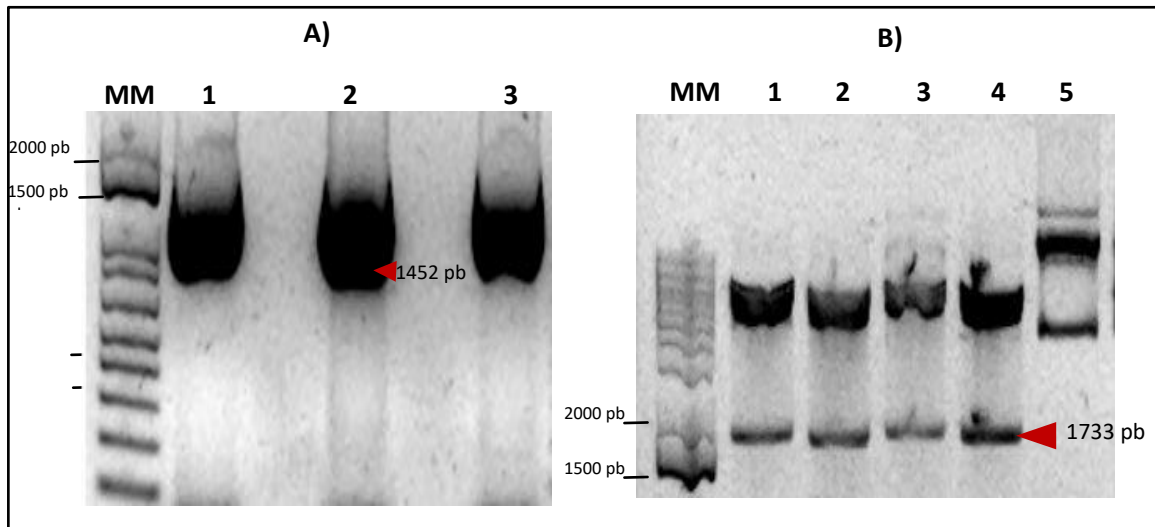


Figura 3.2 Clonación de ORF ALDH3H1-1 en el vector pETDuet-1. **A)** Amplificación de la secuencia ALDH3H1-1; MM; marcador de peso molecular Kb plus; Carril 1-3 productos de PCR de 1452 pb de ALDH3H1-1 **B)** Digestión de constructos pETDuet+ALDH3H1-1; Carril 1-4; Clonas obtenidas digeridas con las enzimas NdeI y KpnI; Carril 5; Plásmido sin digerir.

3.2.2 Construcción del vector de expresión pETDuet+CCD4-3+ALDH3H1-1

El vector de expresión pETDuet+CCD4-3+ALDH3H1-1 se generó mediante la clonación del ORF de ALDH3H1-1 en el sitio de clonación múltiple (MC2) flanqueado por los sitios de reconocimiento para las enzimas NdeI/KpnI en el vector pETDuet+CCD4-3 (Figura 3.3).

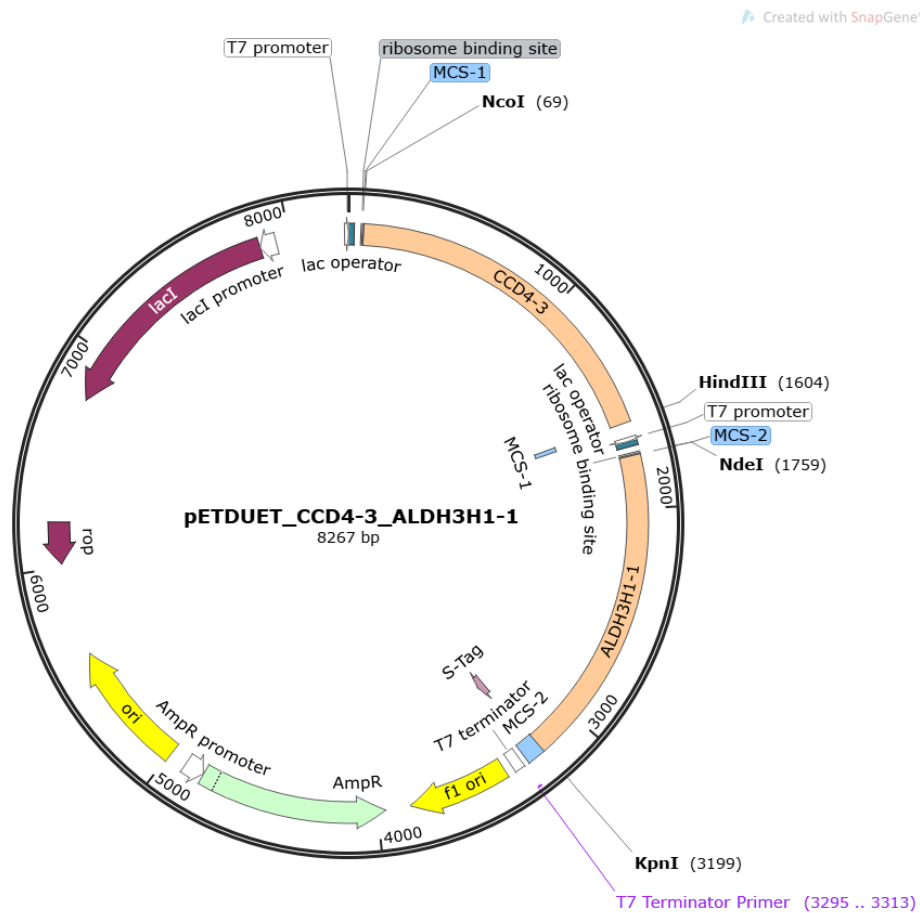


Figura 3.3 Mapa del vector de expresión pETDuet+CCD4-3+ALDH3H1-1 con los insertos CCD4-3 y ALDH3H1-1 clonados en los sitios MCS-1, MCS-2 respectivamente.

El fragmento de la secuencia correspondiente a ALDH3H1-1 fue amplificado y purificado para insertarlo en el vector pETDuet+CCD4-3 linealizado con las enzimas de restricción NdeI/KpnI. En la Figura 3.4 se puede observar el producto de PCR purificado mostrando 1452 pb y la banda de aproximadamente 6800 pb correspondiente al vector lineal.

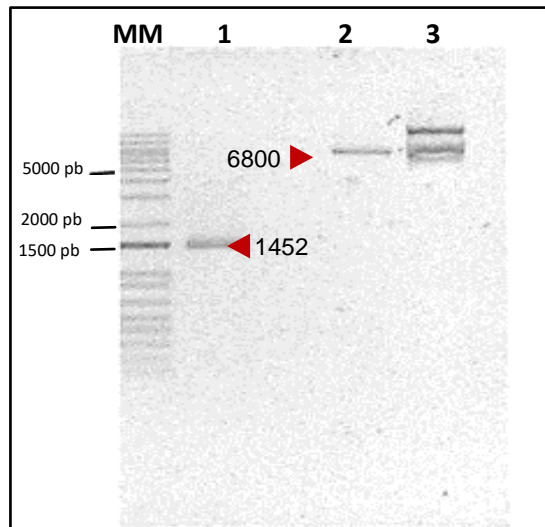


Figura 3.4 Clonación y construcción del plásmido pETDuet_CCD4-3_ALDH3H1-1 .MM; marcador de peso molecular kb plus, carril 1; Amplificación de ORF de ALDH3H1-1, carril 2; plásmido pETDuet+CCD4-3 lineal, carril 3; Plásmido pETDuet+CCD4-3 sin digerir.

Para comprobar la correcta inserción del fragmento ALDH3H1-1 en el vector de expresión pETDuet+CCD4-3, se aislaron dos colonias obtenidas tras la transformación de DH5 α con el producto de ligación. Después, se extrajo el DNA plasmídico, obteniéndose una concentración de 96.05 ng/ μ L. El DNA plasmídico se sometió a digestión con las enzimas de restricción SpeI y KpnI, FastDigest y fue visualizado en un gel de agarosa al 1%, donde se observó una banda de aproximadamente 3195 pb correspondiente al fragmento liberado tras la digestión con las enzimas SpeI y KpnI (Figura 3.5).

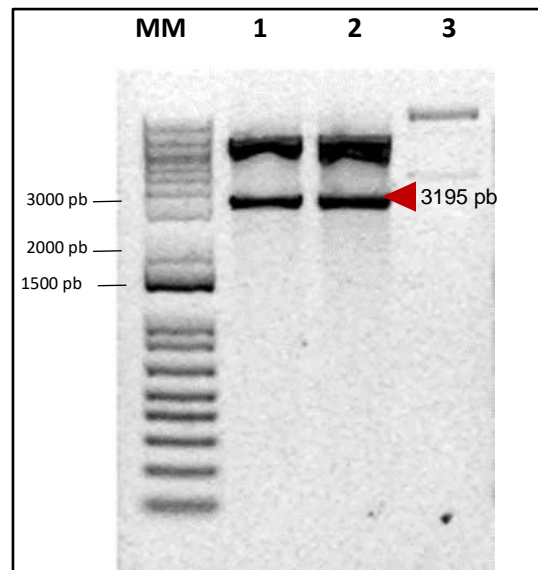


Figura 3.5 Digestión de clonas obtenidas del producto de ligación de pETDuet-CCD4-3 y ALDH3H1-1. MM; Marcador de peso molecular 1Kb plus; Carril 2-3; Producto de digestión con SpeI y KpnI; Carril 4; Plásmido no digerido

3.3 Secuenciación de constructos pETDuet+CCD4-3 y pETDuet+CCD4-3+ALDH3H1-1

Para verificar la identidad e integridad de las secuencias de *BoCCD4-3* y *BoALDH3H1-1* clonadas en el vector pETDuet-1, se secuenciaron empleando los cebadores descritos en el apartado 2.3 de metodología. Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron analizados por alineamientos con la herramienta multalin ([MultAlin result page \(inra.fr\)](http://multalin.result.page.inra.fr)). Los resultados indicaron que, la comparación nucleotídica de los ORFs tuvo 100% y 99.61 de identidad, comparada con las secuencias de *BoCCD4-3* y *ALDH3H1-1*, respectivamente. No obstante, se observó un cambio de un nucleótido en la posición 1451 de la secuencia blanco de *ALDH3H1-1*. Esta mutación hace referencia a un cambio de aminoácido de arginina por prolina (Figura 3.6). Al tener esta mutación, es probable tener un cambio significativo en las propiedades enzimáticas.

De manera similar, se observaron cambios de nucleótidos en las posiciones 1546 y 1548 en la secuencia blanco comparada con la secuencia de *BoCCD4-3*. La sustitución del nucleótido en la secuencia (CCC por **GCG**) resultó en una sustitución de prolina por alanina (Figura 3.7).

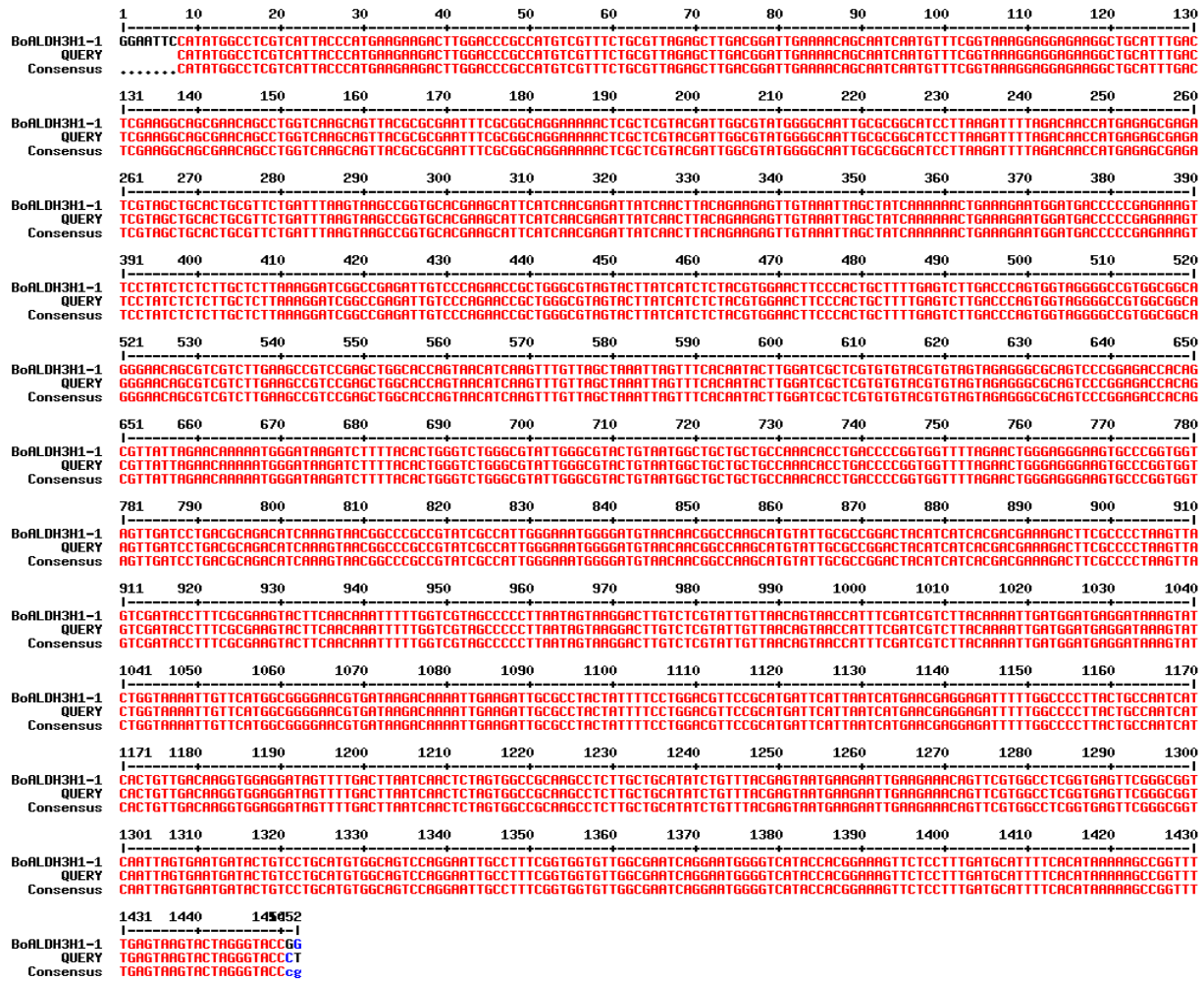


Figura 3.6 Alineamiento de *ALDH3H1-1* obtenida de la secuenciación (Query) y secuencia de ORF *ALDH3H1-1* con codón optimizado. Los nucleótidos resaltados en rojo; indican nucleótidos idénticos; negro; regiones no conservadas que presentaron cambios; azul; nucleótidos medianamente conservados.

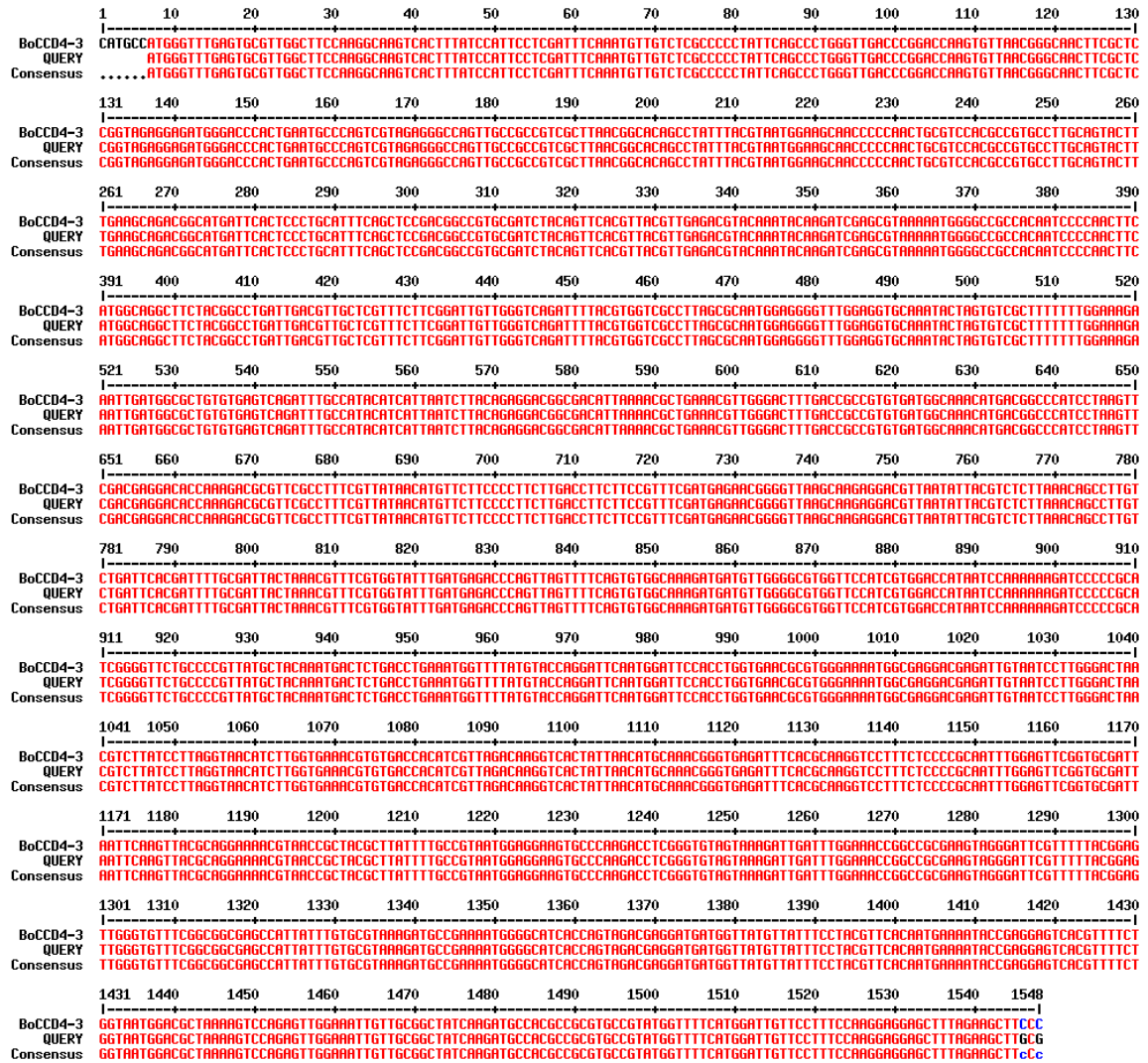


Figura 3.7 Alineamiento de la secuencia de BoCCD4-3 obtenida de la secuenciación (Query) y secuencia de BoCCD4-3 con codón optimizado.

3.4 Propiedades fisicoquímicas de proteínas BoCCD4-3 y ALDH3H1-1

La predicción de las propiedades fisicoquímicas de las secuencias aminoacídicas, se obtuvieron a través de la herramienta ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Los datos obtenidos por el servidor ProtParam muestran que, la proteína codificada por el ORF de *BoCCD4-3* está compuesta por 515 aminoácidos, de peso molecular teórico 57.74 kDa, mientras que para la proteína codificada por el ORF *BoALDH3H1-1* muestra un peso molecular de 50.64 kDa compuesta por 480 aminoácidos. Las características fisicoquímicas y la composición de aminoácidos de ambas proteínas, se resumen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Características fisicoquímicas y composición de aminoácidos.

	BoCCD4-3		BoALDH3H1-1			
Número de aminoácidos	515		480			
pI (punto isoeléctrico)	6.47		9.01			
GRAVY (hidropaticidad)	-0.184		-0.008			
Índice de inestabilidad	41.18		32.88			
Índice alifático	82.89		101.94			
Composición de aminoácidos	Ala (A)	34	6.6%	Ala (A)	39	8.1%
	Arg (R)	30	5.8%	Arg (R)	18	3.8%
	Asn (N)	27	5.2%	Asn (N)	17	3.5%
	Asp (D)	28	5.4%	Asp (D)	26	5.4%
	Cys (C)	4	0.8%	Cys (C)	5	1.0%
	Gln (Q)	10	1.9%	Gln (Q)	11	2.3%
	Glu (E)	33	6.4%	Glu (E)	26	5.4%
	Gly (G)	42	8.2%	Gly (G)	32	6.7%
	His (H)	11	2.1%	His (H)	11	2.3%
	Ile (I)	29	5.6%	Ile (I)	30	6.2%
	Leu (L)	42	8.2%	Leu (L)	52	10.8%
	Lys (K)	28	5.4%	Lys (K)	42	8.8%
	Met (M)	15	2.9%	Met (M)	8	1.7%
	Phe (F)	36	7.0%	Phe (F)	18	3.8%
	Pro (P)	28	5.4%	Pro (P)	24	5.0%
	Ser (S)	33	6.4%	Ser (S)	40	8.3%
	Thr (T)	23	4.5%	Thr (T)	23	4.8%
	Trp (W)	4	0.8%	Trp (W)	6	1.2%
	Tyr (Y)	18	3.5%	Tyr (Y)	7	1.5%
	Val (V)	40	7.8%	Val (V)	45	9.4%
Pyl (O)	0	0.0%	Pyl (O)	0	0.0%	
Sec (U)	0	0.0%	Sec (U)	0	0.0%	

3.5 Expresión de las proteínas CCD4-3 y ALDH3H1-1 recombinantes

Con el objetivo de evaluar la expresión de las proteínas de BoCCD4-3 y ALDH3H1-1 con secuencias optimizadas, se transformaron células químicamente competentes de la cepa *E. coli* BL21 (DE3). La expresión de ambas proteínas fue inducida con IPTG a una concentración de 0.5 mM por 24 h, tal como se describió en el apartado de metodología (2.7).

Las fracciones celulares solubles e insolubles fueron recuperadas por centrifugación y separadas por SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. En el panel A de la Figura 3.8 se muestra el perfil proteico de BoCCD4-3, en los carriles 2 al 5 se muestran a las fracciones solubles e insolubles de las proteínas que corresponden a control no inducido, mientras que los carriles 6 al 10 corresponden a las fracciones solubles e insolubles de lisados tratados con IPTG, se observa que la proteína BoCCD4-3 expresada en el vector pETDuet-1, es expresada preferentemente en la fracción insoluble mostrando una banda que corresponde la masa teórica esperada de 57.74 kDa.

Por otro lado, se obtuvieron resultados similares en la expresión de la proteína ALDH3H1-1 indicando que se observa mayor expresión después de 4 h de inducción en la fracción insoluble, mientras que en cantidad mínima en la fracción soluble. En el panel B de la Figura 3.8, se muestra el perfil proteico de ALDH3H1-1 mostrando una banda correspondiente a su masa teórica de 50.64 kDa.

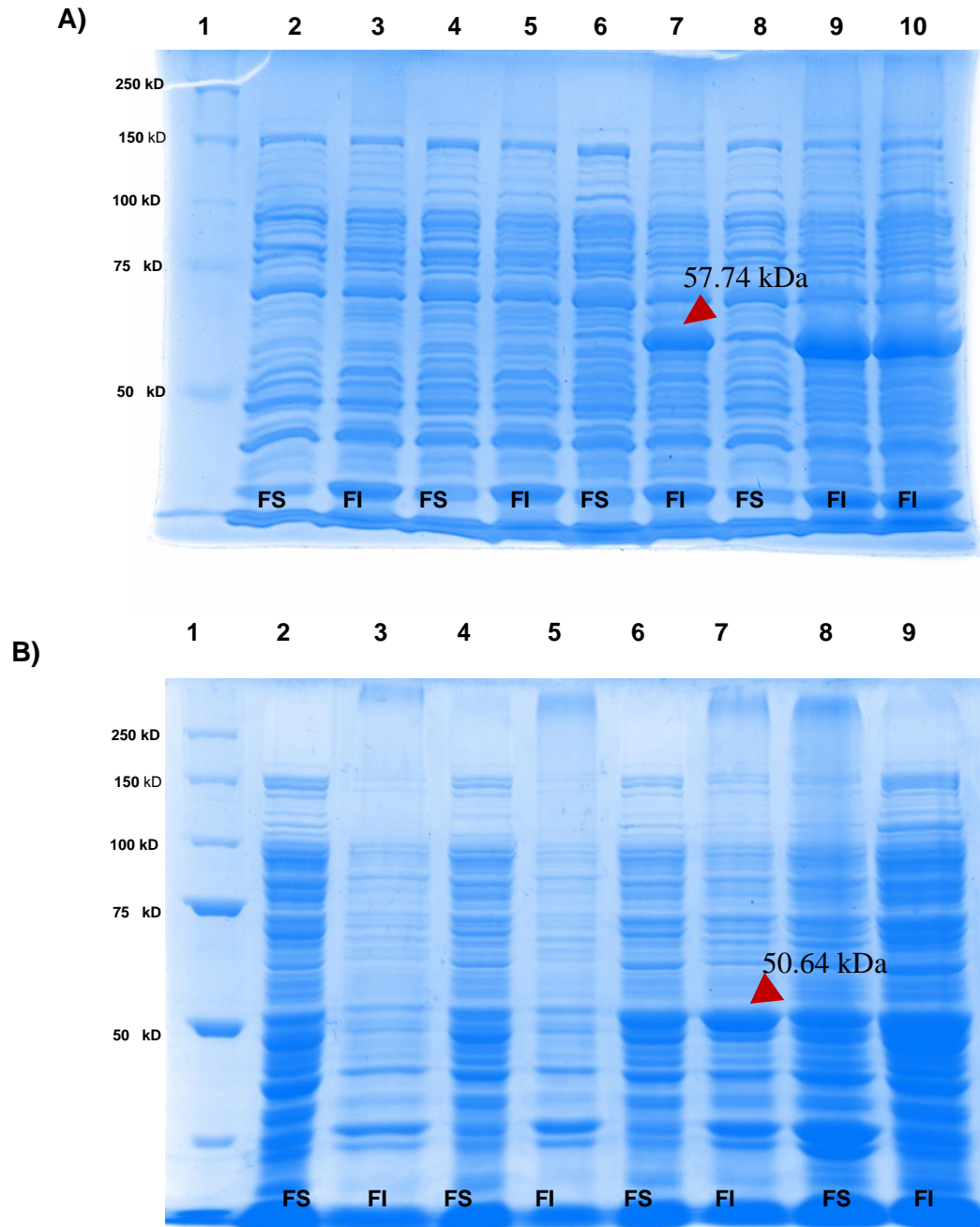


Figura 3.8 Análisis de expresión de proteínas de CCD4-3 y ALDH3H1-1 recombinantes por SDS PAGE 10%. **A)** CCD4-3. **Carril 1** MW. **Carriles 2-3;** *E. coli* BL21 (DE3) transformada con vacío pETDuet-1. **Carriles 4-5;** pETDuet+CCD4-3 No inducido; **Carriles 6-7;** 2 h después de la inducción con IPTG (0,5 mM). **Carriles 8-9;** 4h después de la inducción; carril 10; 24 h después de la inducción. **B)** ALDH3H1-1. **Carril 1** MW. **Carriles 2-3;** *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pETDuet-1 vacío. **Carriles 4-5;** pETDuet+ALDH3H1-1 No inducido. **Carriles 6-7;** 4 h después de la inducción con IPTG (0,5 mM). **Carriles 8-9;** 24 h después de la inducción (FS) fracción soluble (FI) fracción insoluble.

3.6 Caracterización funcional de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH3H1-1)

Para determinar la función de la ALDH3H1-1, se llevó a cabo la co-expresión de pETDuet+CCD4-3+ALDH3H1-1 en células de *E. coli* que acumulan licopeno. La expresión en esta cepa permite evaluar la actividad de las enzimas y así generar un cambio de coloración rojo del licopeno en bacterias (Figura 3.9). Brevemente, se construyeron cepas de *E. coli* transformadas con el plásmido pACCRT-EIB (Control positivo); cepas productoras de licopeno BL21-EIB co-transformadas con el vector pETDuet-1 (Control negativo); cepas BL21-EIB co-transformadas con el plásmido pETDuet+CCD4-3 y pETDuet+CCD4-3+ALDH3H1-1. En la Figura 3.9 se puede observar el cambio de coloración de las pastillas bacterianas entre los controles y las que expresaban CCD4-3 y ALDH3H1-1, lo cual podría estar indicando que ambas enzimas metabolizan el licopeno en bixina aldehído y la bixina aldehído en norbixina.

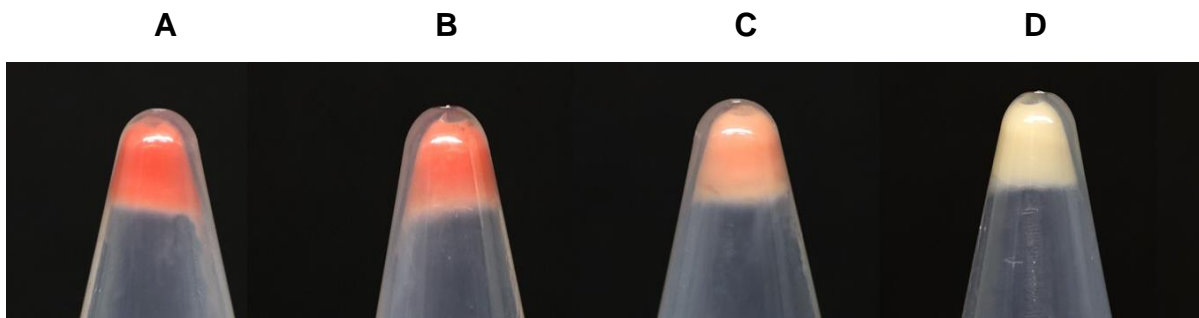


Figura 3.9 Cepas de *E. coli* productoras de licopeno co-trasformadas con **A)** pACCRT-EIB **B)** pETDuet-1 **C)** pETDuet+CCD4-3 **D)** pETDuet+CCD4-3+ALDH3H1-1.

3.7 Identificación de norbixina por UHPLC-ESI- QTOF-MS

Los compuestos derivados por la actividad de las enzimas BoCCD4-3 y ALDH3H1-1 en las cepas que pueden acumular licopeno, se determinaron mediante UHPLC-ESI- QTOF-M. Los valores correspondientes a su masa monoisotópica se obtuvieron mediante el software MassLynx (Water, Milford MA). En la Figura 3.10 se muestra el espectro de masas de licopeno obtenidos en modo positivo (ESI ⁺). Los resultados indicaron que, en la muestra de células de *E. coli* transformadas con el plásmido pACCRT-EIB (Figura 3.10 B), mostraron espectros de masas similares al estándar comercial donde se identificó al ion molecular de m/z 536.4 de licopeno (Figura 3.10 A), a un tiempo de retención (Rt) de 3.376 min. Estos resultados concuerdan con los datos de la masa monoisotópica del licopeno.

Posteriormente, la coexpresión de pETDuet-BoCCD4-3 en la cepa de *E. coli* productora de licopeno indicó que se produjo la escisión en los sitios 5,6 y (5',6') del licopeno. En este caso, se identificó al ion molecular con valor m/z 380.34 a un tiempo de retención 1.898 min (Figura 3.11). De acuerdo con los iones reportados en el estudio de Us-camas y colaboradores 2022, la identificación de un pico correspondiente a la masa de norbixina *in vivo*, sugiere la posible participación de una enzima ALDH endógena de *E. coli* para oxidación de la norbixina.

Finalmente, para la caracterización de la especificidad de sustrato del aldehído deshidrogenasa, se introdujo el vector de expresión pETDuet+CCD4-3+ALD3H1-1 en la cepa de *E. coli* modificada. Se mostró una señal de un pico prominente, con la misma masa previamente identificada con valor de m/z 380.34 en el rango de 100-400 m/z (Figura 3.12). Además, se identificaron los iones 235.13, 284.25, 318.31, según lo reportado en el MS de BoCCD1-4 por Us-camas.

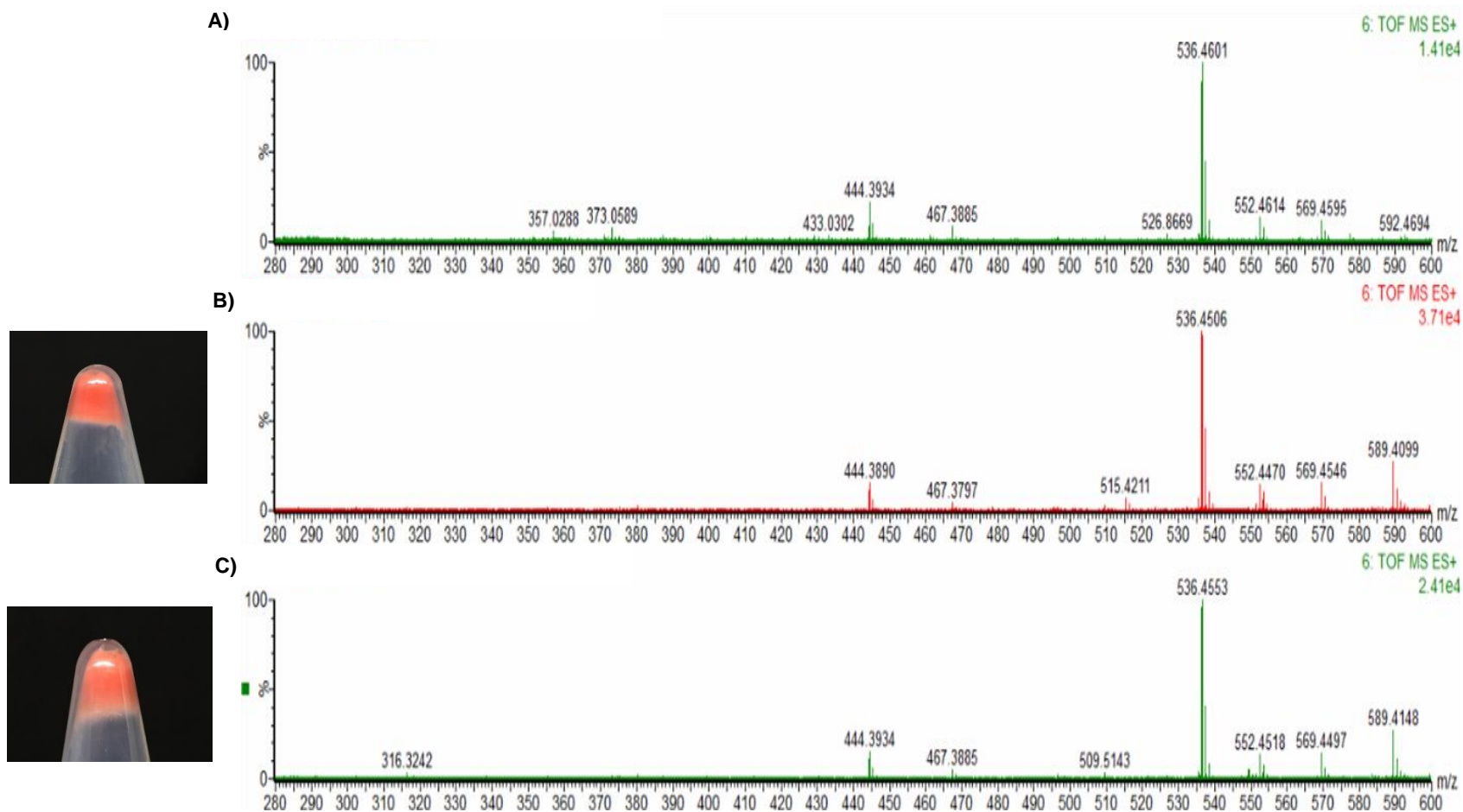
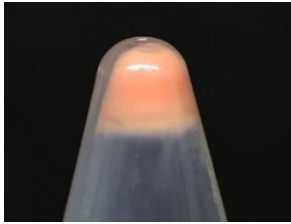


Figura 3.10 Espectros de masas obtenidos (280-600 m/z) de **A)** licopeno comercial **B)** licopeno obtenido por células transformadas con el plásmido pACCRT-EIB (control positivo) **C)** cepa transformada con el vector pETDuet vacío se empleó como control negativo.



pETDuet+CCD4-3

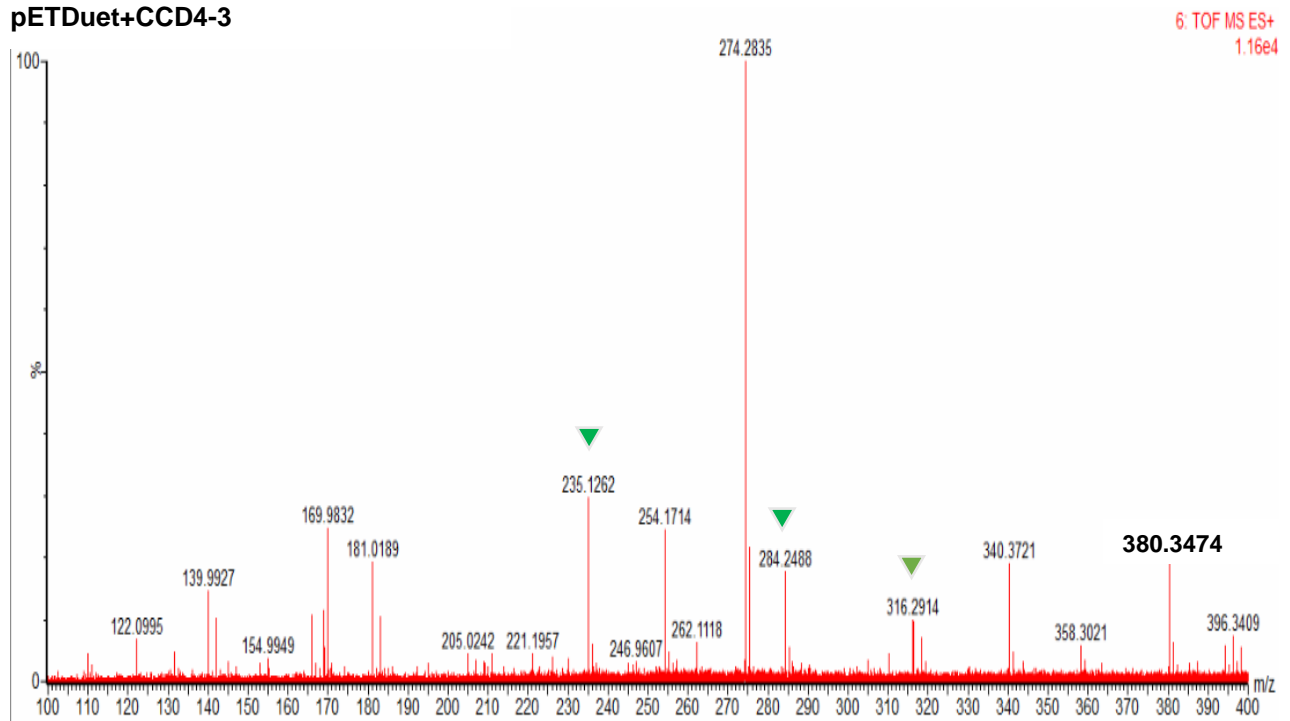
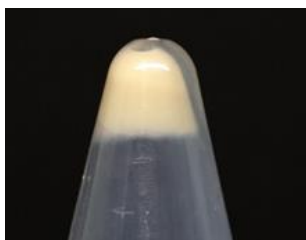


Figura 3.11 Espectro de masas derivados de la actividad enzimática BoCCD4-3 en *E.coli* que acumulan licopeno . Los triángulos resaltan los iones reportados por Us-camas y colaboradores (2022).



pETDuet+CCD4-3+ALD3H1-1

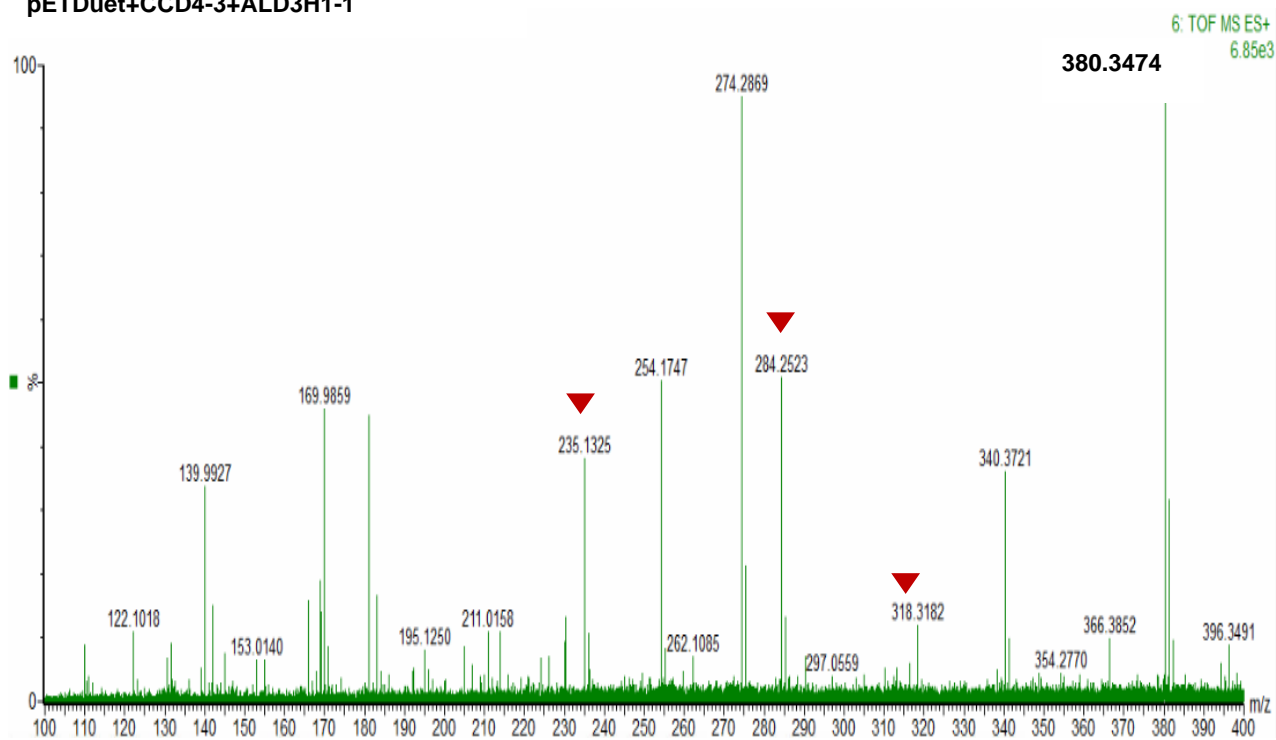


Figura 3.12 Espectro de masas derivados de la actividad enzimática de BoCCD4-3 y ALDH3H1-1 en *E. coli* que acumulan licopeno. Los triángulos resaltan los iones reportados por Us-camas y colaboradores (2022) para identificar norbixina (380 m/z).

CAPÍTULO IV DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados presentados en este trabajo de investigación sugieren positivamente que la enzima BoALDA3H1 es la responsable del segundo paso de la biosíntesis de bixina pues ésta es capaz de convertir bixina aldehído en norbixina.

La actividad funcional de BoALDH3H1-1 evaluada en células de *E. coli* (BL21 DE3) transformadas con el plásmido pACCRT-EIB para producir licopeno, reveló cambios de coloración en los extractos bacterianos, atribuidos a la actividad enzimática de BoCCD4-3 y BoALDH3H1-1 (Figura 3.9). Curiosamente, la actividad enzimática de BoCCD4-3 optimizada en comparación con la BoCCD4-3 reportada Us-camas y colaboradores (2022) produjo cambios de color a menor intensidad, en comparación con las células control (células transformadas con el vector pETDuet vacío). Este comportamiento, se ha reportado en la actividad funcional de BoCCD1-4 por producir cambios de color a menor intensidad que indican la producción de norbixina por aldehídos deshidrogenasas endógenas no específicas de *E. coli* (Us-Camas *et al.* 2022). En nuestros resultados, esta observación podría explicarse por la modificación del péptido señal de cloroplasto en la región N-terminal característico de las CCD4. Este péptido, que suele dirigir proteínas al cloroplasto en plantas, se ha eliminado en la optimización de codones de BoCCD4-3, permitiendo que la enzima muestre una actividad de escisión *in vivo* similar a las CCD1 que carecen del péptido señal. Las enzimas de la familia CCD1 no presentan péptidos señal en su extremo N-terminal, por lo cual, no requieren una dirección precisa para su localización y pueden escindir varios carotenoides en diferentes posiciones en el citoplasma de la célula (Auldrige *et al.*, 2006; Rubio *et al.*, 2008).

En este estudio se insertó el gen *BoALDH3H1-1* específico de *Bixa orellana* en el vector de expresión (pETDuet+CCD4-3) y se observó un cambio de coloración rosa a amarillo (Figura 3.9). Estos cambios de color en las cepas recombinantes que mostraron tonalidad amarilla pueden explicar que la optimización de codones en la secuencia codificante de *BoALDH3H1-1*, mejora la eficiencia en la expresión del gen (*BoALDH3H1-1*) en *E. coli*. Por lo tanto, la modificación de la secuencia que codifica a la enzima, dio lugar a la mejora de la actividad enzimática. Esta actividad enzimática es relevante en el proceso de convertir eficientemente la bixina aldehído en norbixina. La norbixina se ha reportado previamente por presentar un color amarillo (Reith y Gielen, 1971; Satheesahbabu y Haque, 2014).

La identificación de norbixina mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas puede confirmar la actividad de las enzimas y la producción de los compuestos deseados, por lo que, la detección de una señal prominente con la masa m/z 380.34 en los experimentos *in vivo* que involucra tanto a la BoCCD4-3 como BoALDH3H1-1 refuerza aún más la hipótesis de que la oxidación de la bixina aldehído a norbixina está mediada por enzimas ALDH endógenas de *E. coli* y ALDH específicas de *Bixa orellana* (Figura 3.11 y 3.12). Estos resultados son prometedores, sin embargo, es necesario la fragmentación del ion propuesto por MS/MS para corroborar los patrones de fragmentación de norbixina previamente reportados por Us-Camas y colaboradores (2022).

El análisis del transcriptoma de *Bixa orellana* ha proporcionado información sobre las ALDH y su posible participación en la oxidación de la bixina aldehído en norbixina. Entre las enzimas identificadas se destaca la BoALDH3H1-1 como la principal responsable en catalizar la oxidación de la bixina aldehído a norbixina. Informes recientes reportan que el gen que codifica a esta enzima muestra altos niveles de expresión génica en tejidos de semilla inmadura de accesiones de *Bixa orellana*, caracterizadas por presentar alto contenido de bixina (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2015; Sierra-Ulín, 2021). Estos fundamentos son consistentes con investigaciones similares en la elucidación de la ruta heteróloga de crocetin en *Crocus sativus*, donde se demostró que, la enzima CsALDH31 es capaz de convertir la crocetina dialdehído en crocina, siendo la enzima con mayor expresión en el tejido (estigma) donde se acumulan las crocinas, safranal y pirocrocina (Demurtas *et al.*, 2018). Los resultados de este trabajo validan las conclusiones del trabajo de Cárdenas-Conejo y colaboradores (2015) las cuales fueron obtenidas utilizando enfoques bioinformáticos y, por lo tanto, proporcionan evidencia experimental de la función de la enzima BoALDH3H1-1 en la oxidación de bixina aldehído a norbixina.

Por otra parte, los resultados obtenidos mediante la sobreexpresión de las proteínas recombinantes BoCCD4-3 y BoALDH3H1-1 en el sistema heterólogo *E. coli* mostraron que la optimización de los codones en las secuencias de estas proteínas resultó en una mayor expresión. La intensidad de la banda correspondiente a sus masas teórica en comparación con los controles no inducidos (Figura 3.8) sugiere que la optimización de codones mejora la expresión de estas proteínas atribuidos a una mayor eficiencia de traducción. Si bien, estos hallazgos son consistentes con otros estudios que también han demostrado que el uso de codones óptimos está relacionado con una mayor expresión proteica (Qi *et al.*, 2021).

En el caso de la proteína BoALDH3H1-1, se observó una mayor intensidad de banda correspondiente a su masa teórica comparada con las células control (vector pETDuet-1 vacío) no inducidas. Este incremento fue observado en diferentes tiempos de inducción. Sin embargo, se encontró que la máxima expresión se encontraba en la fracción insoluble, lo cual sugiere que esta proteína tiene una tendencia a formar agregados insolubles en *E. coli* (Figura 3.8 B). Esta formación de agregados insolubles es común en la expresión de proteínas recombinantes y puede estar asociada con factores como la estructura compleja de la proteína, características fisicoquímicas, y condiciones de cultivo adecuadas para la bacteria hospedera. Es importante destacar que la formación de agregados insolubles es un desafío común en la expresión de proteínas recombinantes de la familia ALDH. Sin embargo, no necesariamente implica la pérdida total de la función de la proteína (Kirch y Röhrig 2010; Zhao *et al.*, 2021). Este fenómeno también se ha observado en la producción de cantidades sustanciales de la proteína ALDH3A1 (Voulgaridou *et al.*, 2013).

Además, se encontró que la proteína BoALDH3H1-1 es estable, con valores de inestabilidad por debajo de 40, lo que sugiere que mantiene su estructura y función en condiciones normales. Asimismo, el valor negativo de GRAVY indica que la proteína es hidrofílica y soluble en agua, lo cual concuerda con lo reportado de otras ALDH3 de *Brassica rapa* (Gautam *et al.*, 2019).

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES GENERALES

Este estudio proporciona un gran avance en la comprensión de la biosíntesis de bixina, a través de la clonación y coexpresión de los genes *BoCCD4-3* y *BoALDH3H1-1* en una cepa de *E. coli* productora de licopeno. De acuerdo con los resultados obtenidos, la enzima BoALDH3H1-1 juega un papel importante en el segundo paso de la ruta biosintética, que convierte bixina aldehído en norbixina.

5.2 PERSPECTIVAS

1. Una vez confirmada la presencia de la norbixina por la actividad de la BoALDH3H1-1, los estudios a futuro se enfocarán en estudiar la función de SABATH4, la tercera enzima potencialmente involucrada en el tercer paso de biosíntesis de bixina.
2. Probar la actividad de ALDH3H1-1 con otras enzimas caroteno dioxigenasas (CCD1, CCD4) que producen bixina aldehído.
3. Caracterizar bioquímicamente la actividad enzimática de BoALDH3H1-1.
4. Introducir los tres genes *BoCCD4-3*, *BoALDH3H1-1* y *SABATH4* y expresarlas en *E. coli*.

BIBLIOGRAFÍA

- Ampomah-Dwamena, Charles, Supinya Dejnopratt, David Lewis, Paul Sutherland, Richard K. Volz, y Andrew C. Allan. 2012. "Metabolic and Gene Expression Analysis of Apple (*Malus × Domestica*) Carotenogenesis." *Journal of Experimental Botany* 63(12):4497–4511. doi: 10.1093/JXB/ERS134.
- Auldrige, Michele E., Anna Block, Jonathan T. Vogel, Carole Dabney-Smith, Isabelle Mila, Mondher Bouzayen, Maria Magallanes-Lundback, Dean DellaPenna, Donald R. McCarty, y Harry J. Klee. 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(6):982–93. doi: 10.1111/J.1365-313X.2006.02666.X.
- Auldrige, Michele E, Donald R. McCarty, y Harry J. Klee. 2006. "Plant Carotenoid Cleavage Oxygenases and Their Apocarotenoid Products." *Current Opinion in Plant Biology* 9(3):315–doi: 10.1016/j.pbi.2006.03.005
- Beltran, J.C.M., & Stange, C. (2016). Apocarotenoids: A New Carotenoid-Derived Pathway. In C. Stange (Ed.), *Carotenoids in Nature* (pp. 179-197). Subcellular Biochemistry, vol. 79. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-39126-7_9
- Blair, S., y B. Madrigal (2005). Plantas antimaláricas de Tumaco: Costa pacífica colombiana. Universidad de Antioquia, 94-97
- Bouvier, Florence, Odette Dogbo, y Bilal Camara. 2003. "Biosynthesis of the Food and Cosmetic Plant Pigment Bixin (Annatto)." *Science* 300(5628):2089–91. doi: 10.1126/SCIENCE.1085162/SUPPL_FILE/BOUVIER.SOM.PDF.
- Brockner, Chad, Melpomene Vasiliou, Sarah Carpenter, Christopher Carpenter, Yucheng Zhang, Xiping Wang, Simeon O. Kotchoni, Andrew J. Wood, Hans Hubert Kirch, David Kopečný, Daniel W. Nebert, y Vasilis Vasiliou. 2013. "Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) Superfamily in Plants: Gene Nomenclature and Comparative Genomics." *Planta* 237(1):189. doi: 10.1007/S00425-012-1749-0.

- Cannarozzi, G., Schraudolph, N. N., Faty, M., von Rohr, P., Friberg, M. T., Roth, A. C., y Barral, Y. (2010). A role for codon order in translation dynamics. *Cell*, 141(2), 355-367. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.036
- Carballo-Uicab, Victor Manuel, Yair Cárdenas-Conejo, Alba Adriana Vallejo-Cardona, Margarita Aguilar-Espinosa, Jacobo Rodríguez-Campos, Hugo Serrano-Posada, José Alberto Narváez-Zapata, Felipe Vázquez-Flota, y Renata Rivera-Madrid. 2019. "Isolation and Functional Characterization of Two Dioxygenases Putatively Involved in Bixin Biosynthesis in Annatto (*Bixa Orellana* L.)." *PeerJ* 7(6). doi: 10.7717/PEERJ.7064.
- . Cárdenas-Conejo, Yair, Víctor Carballo-Uicab, Meric Lieberman, Margarita Aguilar-Espinosa, Luca Comai, y Renata Rivera-Madrid. 2015. "De Novo Transcriptome Sequencing in *Bixa Orellana* to Identify Genes Involved in Methylerythritol Phosphate, Carotenoid and Bixin Biosynthesis." *BMC Genomics* 16(1):1–19. doi: 10.1186/S12864-015-2065-4/FIGURES/7
- Cárdenas-Conejo, Y., Narváez-Zapata, J. A., Carballo-Uicab, V. M., Aguilar-Espinosa, M., Us-Camas, R., Escobar-Turriza, P., Comai, L., & Rivera-Madrid, R. (2023). Gene expression profile during seed development of *Bixa orellana* accessions varying in bixin pigment. *Frontiers in plant science*, 14, 1066509. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1066509>
- Chandel, Urvashi, Tahira Begum, y Mohsina Syedy. 2014. "Pharmacological Studies of Annatto (*Bixa Orellana* L.)." *Int J Phar Biomed Res* 1(1):1720.
- Cheng, Lu, Na Huang, Sizhu Jiang, Kui Li, Zhong Zhuang, Qiang Wang, y Shan Lu. 2021. "Cloning and Functional Characterization of Two Carotenoid Cleavage Dioxygenases for Ionone Biosynthesis in Chili Pepper (*Capsicum Annuum* L.) Fruits." *Scientia Horticulturae*. doi: 10.1016/j.scienta.2021.110368
- de Clavijo, Claret C. Michelangeli, Paola I. Artioli, y Ada M. Medina. 2003. "ANATOMÍA Y ULTRA ESTRUCTURA DE LA FMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN ONOTO." *Agronomía Tropical* 53(1):33–48.
- Cunningham, Francis X., Barry Pogson, Zairen Sun, Kelly A. McDonald, Dean Dellapenna, y Elisabeth Gantt. 1996. Functional Analysis of the Beta and Epsilon Lycopene Cyclase Enzymes of

Arabidopsis Reveals a Mechanism for Control of Cyclic Carotenoid Formation. *The Plant cell*, 8(9), 1613–1626. doi: 10.1105/tpc.8.9.1613

D Auria, John C., Feng Chen, y Eran Pichersky. 2003. “The SABATH Family of MTs in *Arabidopsis thaliana* and Other Plant Species.” *Recent Advances in Phytochemistry* 37:253–84. doi: 10.1016/S0079-9920(03)80026-6

Dautermann, Oliver, y Martin Lohr. 2017. “A Functional Zeaxanthin Epoxidase from Red Algae Shedding Light on the Evolution of Light-Harvesting Carotenoids and the Xanthophyll Cycle in Photosynthetic Eukaryotes.” *Plant Journal* 92(5):879–91. doi: 10.1111/tpj.13725.

Demurtas, Olivia Costantina, Sarah Frusciante, Paola Ferrante, Gianfranco Diretto, Noraddin Hosseinpour Azad, Marco Pietrella, Giuseppe Aprea, Anna Rita Taddei, Elena Romano, y Jianing Mi. 2018. “Candidate Enzymes for Saffron Crocin Biosynthesis Are Localized in Multiple Cellular Compartments.” *Plant Physiology* 177(3):990–1006. doi:10.1104/pp.17.01815

Dhar, Manoj Kumar, Sonal Mishra, Archana Bhat, Sudha Chib, y Sanjana Kaul. 2020. “Plant Carotenoid Cleavage Oxygenases: Structure–Function Relationships and Role in Development and Metabolism.” *Briefings in Functional Genomics* 19(1):1–9. doi: 10.1093/bfgp/elz037

Elena, C., Ravasi, P., Castelli, M. E., Peirú, S., y Menzella, H. G. (2014). Expression of codon optimized genes in microbial systems: current industrial applications and perspectives. *Frontiers in microbiology*, 5, 21. doi: 10.3389/fmicb.2014.00021

Falchi, Rachele, Elisa Vendramin, Laura Zanon, Simone Scalabrin, Guido Cipriani, Ignazio Verde, Giannina Vizzotto, y Michele Morgante. 2013. “Three Distinct Mutational Mechanisms Acting on a Single Gene Underpin the Origin of Yellow Flesh in Peach.” *The Plant Journal* 76(2):175–87. doi.org/10.1111/tpj.12283

Felemban, Abrar, Justine Braguy, Matias D. Zurbriggen, y Salim Al-Babili. 2019. “Apocarotenoids Involved in Plant Development and Stress Response.” *Frontiers in Plant Science* 10. doi.org/10.3389/fpls.2019.01168

- Fraser Paul, y Bramley Peter. 2004. "The Biosynthesis and Nutritional Uses of Carotenoids." *Progress in Lipid Research* 43:228–65. doi.org/10.1016/j.plipres.2003.10.002
- Frusciante, Sarah, Gianfranco Diretto, Mark Bruno, Paola Ferrante, Marco Pietrella, Alfonso Prado-Cabrero, Angela Rubio-Moraga, Peter Beyer, Lourdes Gomez-Gomez, y Salim Al-Babili. 2014. "Novel Carotenoid Cleavage Dioxygenase Catalyzes the First Dedicated Step in Saffron Crocin Biosynthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(33):12246–51. doi.org/10.1073/pnas.1404629111
- Gao, Chenxi, y Bin Han. 2009. "Evolutionary and Expression Study of the Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) Gene Superfamily in Rice (*Oryza Sativa*)." *Gene* 431(1–2):86–94. doi.org/10.1016/j.gene.2008.11.010.
- Gautam, Ranjana, Israr Ahmed, Pawan Shukla, Rajesh Kumar Meena, y P. B. Kirti. 2019. "Genome-Wide Characterization of ALDH Superfamily in Brassica Rapa and Enhancement of Stress Tolerance in Heterologous Hosts by BrALDH7B2 Expression." *Scientific Reports* 9(1). doi: 10.1038/S41598-019-43332-1.
- Giuliano, Giovanni, Salim Al-Babili, y Johannes von Lintig. 2003. "Carotenoid Oxygenases: Cleave It or Leave It." *Trends in Plant Science* 8(4):145–49. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00053-0
- Hai, Nguyen Thi Lam, Jun-ichiro Masuda, Ikuo Miyajima, Nguyen Quoc Thien, Narges Mojtahedi, Michikazu Hiramatsu, Jong-Hwa Kim, y Hiroshi Okubo. 2012. "Involvement of Carotenoid Cleavage Dioxygenase 4 Gene in Tepal Color Change in *Lilium Brownii* Var. *Colchesteri*." *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 81(4):366–73. doi: 10.2503/jjshs1.81.366
- Harrison, Peter J., y Timothy D. H. Bugg. 2014. "Enzymology of the Carotenoid Cleavage Dioxygenases: Reaction Mechanisms, Inhibition and Biochemical Roles." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 544:105–11. doi: 10.1016/j.abb.2013.10.005
- Hayes, Kevin, Mohamed Noor, Ahmed Djeghader, Patricia Armshaw, Tony Pembroke, Syed Tofail, y Tewfik Soulimane. 2018. "The Quaternary Structure of *Thermus Thermophilus* Aldehyde Dehydrogenase Is Stabilized by an Evolutionary Distinct C-Terminal Arm Extension." *Scientific Reports* 8(1):1–14. doi: 10.1038/s41598-018-31724-8

- Hermanns, Anna S., Xuesong Zhou, Qiang Xu, Yaakov Tadmor, y Li Li. 2020. "Carotenoid Pigment Accumulation in Horticultural Plants." *Horticultural Plant Journal* 6(6):343–60. doi: 10.1016/J.HPJ.2020.10.002.
- Huang, Fong-Chin, Péter Molnár, y Wilfried Schwab. 2009. "Cloning and Functional Characterization of Carotenoid Cleavage Dioxygenase 4 Genes." *Journal of Experimental Botany* 60(11):3011–22. doi:10.1002/cbdv.202100694
- Huang, Weizao, Xinrong Ma, Qilin Wang, Yongfeng Gao, Ying Xue, Xiangli Niu, Guirong Yu, y Yongsheng Liu. 2008. "Significant Improvement of Stress Tolerance in Tobacco Plants by Overexpressing a Stress-Responsive Aldehyde Dehydrogenase Gene from Maize (*Zea Mays*)." *Plant Molecular Biology* 68(4–5):451. doi:10.1007/s11103-008-9382-9
- Ilg, Andrea, Mark Bruno, Peter Beyer, y Iqbal Salim Al-Babili. 2014. "Tomato Carotenoid Cleavage Dioxygenases 1A and 1B: Relaxed Double Bond Specificity Leads to a Plenitude of Dialdehydes, Mono-Apocarotenoids and Isoprenoid Volatiles." *FEBS Open Bio* 4:584–93.
- Jako, Colette, Catherine Coutu, Ingeborg Roewer, Darwin W. Reed, Lawrence E. Pelcher, y Patrick S. Covello. 2002. "Probing Carotenoid Biosynthesis in Developing Seed Coats of *Bixa Orellana* (Bixaceae) through Expressed Sequence Tag Analysis." *Plant Science* 163(1):141–45.
- Jiang, Ruikang, Xiaolin Chen, Jiazhang Lian, Lei Huang, Jin Cai, y Zhinan Xu. 2019. "Efficient Production of Pseudoionone with Multipathway Engineering in *Escherichia Coli*." *Journal of Applied Microbiology* 126(6):1751–60. doi: 10.1111/jam.14245
- Jimenez-Lopez, Jose C, Emma W. Gachomo, Manfredo J. Seufferheld, y Simeon O. Kotchoni. 2010. "The Maize ALDH Protein Superfamily: Linking Structural Features to Functional Specificities." *BMC Structural Biology* 10(1):1–14. 10.1186/1472-6807-10-43
- Jimenez-Lopez, Jose C., Emma W. Gachomo, Manfredo J. Seufferheld, y Simeon O. Kotchoni. 2010. "The Maize ALDH Protein Superfamily: Linking Structural Features to Functional Specificities." *BMC Structural Biology* 10. doi: 10.1186/1472-6807-10-43.

- Jimenez-Lopez, Jose C, Francisco J. Lopez-Valverde, Paula Robles-Bolivar, Elena Lima-Cabello, Emma W. Gachomo, y Simeon O. Kotchoni. 2016. "Genome-Wide Identification and Functional Classification of Tomato (*Solanum Lycopersicum*) Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) Gene Superfamily." *PLoS One* 11(10):e0164798. Doi:10.1371/journal.pone.0164798
- Kirch, Hans Hubert, Simone Schlingensiepen, Simeon Kotchoni, Ramanjulu Sunkar, y Dorothea Bartels. 2005. "Detailed Expression Analysis of Selected Genes of the Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) Gene Superfamily in *Arabidopsis Thaliana*." *Plant Molecular Biology* 57(3):315–32. doi: 10.1007/S11103-004-7796-6.
- Kirch, Hans-Hubert, Dorothea Bartels, Yanling Wei, Patrick S. Schnable, y Andrew J. Wood. 2004. "The ALDH Gene Superfamily of Arabidopsis." *Trends in Plant Science* 9(8):371–77.
- Kotchoni, Simeon O., Christine Kuhns, Andrea Ditzer, HANS-HUBERT KIRCH, y Dorothea Bartels. 2006. "Over-expression of Different Aldehyde Dehydrogenase Genes in *Arabidopsis thaliana* Confers Tolerance to Abiotic Stress and Protects Plants against Lipid Peroxidation and Oxidative Stress." *Plant, Cell & Environment* 29(6):1033–48.
- Lashbrooke, Justin G., Philip R. Young, Samantha J. Dockrall, Krishnan Vasanth, y Melané A. Vivier. 2013. "Functional Characterisation of Three Members of the *Vitis Vinifera* L. Carotenoid Cleavage Dioxygenase Gene Family." *BMC Plant Biology* 13(1):1–17. doi: 10.1186/1471-2229-13-156
- Leal, Freddy, y Claret Michelangeli de Clavijo. 2010. "ACERCA DE LA HISTORIA, TAXONOMÍA, BOTÁNICA Y USOS DE *Bixa Orellana* L." *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología* 28.
- Liu, Feng, Xiangqin Cui, Harry T. Horner, Henry Weiner, y Patrick S. Schnable. 2001. "Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase Activity Is Required for Male Fertility in Maize." *The Plant Cell* 13(5):1063–78. doi: 10.1105/tpc.13.5.1063
- Liu, Y. (2020). A code within the genetic code: codon usage regulates co-translational protein folding. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 1-9. doi:10.1186/s12964-020-00642-6

- Ljung, Karin, Anna K. Hull, Mariusz Kowalczyk, Alan Marchant, John Celenza, Jerry D. Cohen, y Göran Sandberg. 2002. "Biosynthesis, Conjugation, Catabolism and Homeostasis of Indole-3-Acetic Acid in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Molecular Biology* 49(3):249–72.
- Lipinszki, Z., Vernyik, V., Farago, N., Sari, T., Puskas, L. G., Blattner, F. R., ... & Gyorfy, Z. (2018). Enhancing the translational capacity of *E. coli* by resolving the codon bias. *ACS synthetic biology*, 7(11), 2656-2664. doi: 10.1021/acssynbio.8b00332
- Maoka, Takashi. 2020. "Carotenoids as Natural Functional Pigments." *Journal of Natural Medicines* 74(1):1–16. doi: 10.1007/S11418-019-01364-X/FIGURES/15.
- Mauro, V. P., y Chappell, S. A. (2014). A critical analysis of codon optimization in human therapeutics. *Trends in molecular medicine*, 20(11), 604-613. doi:10.1016/j.molmed.2014.09.003
- Mathieu, Sandrine, Nancy Terrier, Jérôme Procureur, Frédéric Bigey, y Ziya Günata. 2005. "A Carotenoid Cleavage Dioxygenase from *Vitis Vinifera* L.: Functional Characterization and Expression during Grape Berry Development in Relation to C13-Norisoprenoid Accumulation." *Journal of Experimental Botany* 56(420):2721–31. doi: 10.1093/jxb/eri265.
- McNulty, D. E., Claffee, B. A., Huddleston, M. J., Y Kane, J. F. (2003). Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 27(2), 365-374. doi: 10.1016/S1046-5928(02)00610-1
- Mezzomo, Natália, y Sandra R. S. Ferreira. 2016. "Carotenoids Functionality, Sources, and Processing by Supercritical Technology: A Review." *Journal of Chemistry* 2016. doi: 10.1155/2016/3164312.
- Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T., (1995). Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.* 177, 6575–6584. doi: 10.1128/jb.177.22.6575-6584.1995
- Ohmiya, Akemi. 2009. "Carotenoid Cleavage Dioxygenases and Their Apocarotenoid Products in Plants." *Plant Biotechnology* 26(4):351–58.

- de Oliveira Júnior, Raimundo Gonçalves, Antoine Bonnet, Estelle Braconnier, Hugo Groult, Grégoire Prunier, Laureen Beaugeard, Raphaël Grougnet, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida, Christiane Adrielly Alves Ferraz, and Laurent Picot. 2019. "Bixin, an Apocarotenoid Isolated from *Bixa Orellana* L., Sensitizes Human Melanoma Cells to Dacarbazine-Induced Apoptosis through ROS-Mediated Cytotoxicity." *Food and Chemical Toxicology* 125:549–61.doi: 10.1016/j.fct.2019.02.013
- Pandey, S., Sharma, A., Panika, G., & Kumar, M. (2019). Morphological studies, traditional and industrial uses of *Bixa Orellana*. A review. *Current Science International*, 8(01), 70-4.
- Parvathy, S. T., Udayasuriyan, V., y Bhadana, V. (2022). Codon usage bias. *Molecular biology reports*, 49(1), 539-565.doi: 10.1007/s11033-021-06749-4
- Plotkin, J. B., & Kudla, G. (2011). Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nature Reviews Genetics*, 12(1), 32-42.doi: 10.1038/nrg2899
- Qi, Jinfeng, Jiancai Li, Xiu Han, Ran Li, Jianqiang Wu, Haixin Yu, Lingfei Hu, Yutao Xiao, Jing Lu, y Yonggen Lou. 2016. "Jasmonic Acid Carboxyl Methyltransferase Regulates Development and Herbivory-induced Defense Response in Rice." *Journal of Integrative Plant Biology* 58(6):564–76.doi: 10.1111/jipb.12436
- Qin, Genji, Hongya Gu, Yunde Zhao, Zhiqiang Ma, Guanglu Shi, Yue Yang, Eran Pichersky, Haodong Chen, Meihua Liu, y Zhangliang Chen. 2005. "An Indole-3-Acetic Acid Carboxyl Methyltransferase Regulates *Arabidopsis* Leaf Development." *The Plant Cell* 17(10):2693–2704.doi: 10.1105/tpc.105.034959
- Quax, T. E., Claassens, N. J., Söll, D., y van der Oost, J. (2015). Codon bias as a means to fine-tune gene expression. *Molecular cell*, 59(2), 149-161.doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.035
- Raddatz-Mota, Denise, Laura J. Pérez-Flores, Fernando Carrari, José A. Mendoza-Espinoza, Fernando Díaz de León-Sánchez, Luis L. Pinzón-López, Gregorio Godoy-Hernández, y Fernando Rivera-Cabrera. 2017. "Achiote (*Bixa Orellana* L.): A Natural Source of Pigment and Vitamin E." *Journal of Food Science and Technology* 54(6):1729–41.doi: 10.1007/s13197-017-2579-7

- REITH, J. F., and J. W. GIELEN. 1971. "PROPERTIES OF BIXIN AND NORBIXIN AND THE COMPOSITION OF ANNATTO EXTRACTS." *Journal of Food Science* 36(6):861–64. doi: 10.1111/J.1365-2621.1971.TB15545.X.
- Rivera, Dora I., y Eugenia M. Flores. 1988. "Morfología Floral Del Achiote, *Bixa Orellana* L (*Bixaceae*)." *Revista de Biología Tropical* 36(2B):499–509.
- Rivera-Madrid, Renata, Margarita Aguilar-Espinosa, Yair Cárdenas-Conejo, y Luz E. Garza-Caligaris. 2016. "Carotenoid Derivates in Achiote (*Bixa Orellana*) Seeds: Synthesis and Health Promoting Properties." *Frontiers in Plant Science* 7:1406. doi: 10.3389/fpls.2016.01406
- Rodrigo, María J., Berta Alquézar, Enriqueta Alós, Víctor Medina, Lourdes Carmona, Mark Bruno, Salim Al-Babili, y Lorenzo Zacarías. 2013. "A Novel Carotenoid Cleavage Activity Involved in the Biosynthesis of Citrus Fruit-Specific Apocarotenoid Pigments." *Journal of Experimental Botany* 64(14):4461–78. doi: 10.1093/jxb/ert260
- Rodríguez-Ávila, N. L., Jose Alberto Narvaez-Zapata, J. E. Ramírez-Benítez, Margarita Aguilar-Espinosa, y R. Rivera-Madrid. 2011. "Identification and Expression Pattern of a New Carotenoid Cleavage Dioxygenase Gene Member from *Bixa Orellana*." *Journal of Experimental Botany* 62(15):5385–95. doi: 10.1093/jxb/err201
- Rodriguez-Concepcion, Manuel, Javier Avalos, M. Luisa Bonet, Albert Boronat, Lourdes Gomez-Gomez, Damaso Hornero-Mendez, M. Carmen Limon, Antonio J. Meléndez-Martínez, Begoña Olmedilla-Alonso, Andreu Palou, Joan Ribot, Maria J. Rodrigo, Lorenzo Zacarias, y Changfu Zhu. 2018. "A Global Perspective on Carotenoids: Metabolism, Biotechnology, and Benefits for Nutrition and Health." *Progress in Lipid Research* 70:62–93. doi: 10.1016/J.PLIPRES.2018.04.004.
- Rubio, Angela, José Luís Rambla, Marcella Santaella, M Dolores Gómez, Diego Orzaez, Antonio Granell, y Lourdes Gómez-Gómez. 2008. "Cytosolic and Plastoglobule-Targeted Carotenoid Dioxygenases from *Crocus Sativus* Are Both Involved in β -Ionone Release." *Journal of Biological Chemistry* 283(36):24816–25. doi: 10.1074/jbc.M804000200

- Satheesahbabu, B. K., y Muthi Ul Haque. 2014. "Evaluation of Natural Color from Annatto Seeds for Pharmaceutical Use." *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Analysis* 1(2):32–35.
- Scotter, M. (2009). The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. *Food Additives and Contaminants*, 26(8), 1123-1145. doi: 10.1080/02652030902942873
- Seo, Hak Soo, Jong Tae Song, Jong-Joo Cheong, Yong-Hwan Lee, Yin-Won Lee, Ingyu Hwang, Jong Seob Lee, y Yang Do Choi. 2001. "Jasmonic Acid Carboxyl Methyltransferase: A Key Enzyme for Jasmonate-Regulated Plant Responses." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(8):4788–93. doi: 10.1073/pnas.081557298
- Seto, Yoshiya, y Shinjiro Yamaguchi. 2014. "Strigolactone Biosynthesis and Perception." *Current Opinion in Plant Biology* 21:1–6. doi: 10.1016/j.pbi.2014.06.001
- Shin, Jun-Hye, Sung-Ryul Kim, y Gynheung An. 2009. "Rice Aldehyde Dehydrogenase Is Needed for Seed Maturation and Viability." *Plant Physiology* 149(2):905–15. doi: 10.1104/pp.108.130716
- da Silva, Jaime A. Teixeira, Judit Dobránszki, y Renata Rivera-Madrid. 2018. "The Biotechnology (Genetic Transformation and Molecular Biology) of *Bixa Orellana* L. (Achiote)." *Plant* 248(2):267–77. doi: 10.1007/s00425-018-2909-7
- Simkin, Andrew J., Steven H. Schwartz, Michele Auldridge, Mark G. Taylor, y Harry J. Klee. 2004. "The Tomato Carotenoid Cleavage Dioxygenase 1 Genes Contribute to the Formation of the Flavor Volatiles B-ionone, Pseudoionone, and Geranylacetone." *The Plant Journal* 40(6):882–92. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02263.x
- Soares, Virgínia L. F., Simone M. Rodrigues, Tahise M. De Oliveira, Talisson O. De Queiroz, Lívia S. Lima, Braz T. Hora-Júnior, Karina P. Gramacho, Fabienne Micheli, Júlio C. M. Cascardo, Wagner C. Otoni, Abelmon S. Gesteira, y Marcio G. C. Costa. 2011. "Unraveling New Genes Associated with Seed Development and Metabolism in *Bixa orellana* L. by Expressed Sequence Tag (EST) Analysis." *Molecular Biology Reports* 38(2):1329–40. doi: 10.1007/S11033-010-0234-8/FIGURES/4.

- Swapnil, Prashant, Mukesh Meena, Sandeep Kumar Singh, Umesh Praveen Dhuldhaj, Harish, y Avinash Marwal. 2021. "Vital Roles of Carotenoids in Plants and Humans to Deteriorate Stress with Its Structure, Biosynthesis, Metabolic Engineering and Functional Aspects." *Current Plant Biology* 26:100203. doi: 10.1016/J.CPB.2021.100203.
- Tan, Bao-Cai, Leina M. Joseph, Wen-Tao Deng, Lijuan Liu, Qin-Bao Li, Kenneth Cline, y Donald R. McCarty. 2003. "Molecular Characterization of the Arabidopsis 9-cis Epoxy-carotenoid Dioxygenase Gene Family." *The Plant Journal* 35(1):44–56. doi: 10.1046/j.1365-3113x.2003.01786.x
- Tola, Adesola J., Amal Jaballi, Hugo Germain, y Tagnon D. Missihoun. 2021. "Recent Development on Plant Aldehyde Dehydrogenase Enzymes y Their Functions in Plant Development and Stress Signaling." *Genes* 12(1):51. doi: 10.3390/genes12010051
- Us-Camas, Rosa, Margarita Aguilar-Espinosa, Jacobo Rodríguez-Campos, Alba Adriana Vallejo-Cardona, Víctor Manuel Carballo-Uicab, Hugo Serrano-Posada, y Renata Rivera-Madrid. 2022. "Identifying *Bixa Orellana* L. New Carotenoid Cleavage Dioxygenases 1 and 4 Potentially Involved in Bixin Biosynthesis." *Frontiers in Plant Science* 13:224. doi: 10.3389/FPLS.2022.829089/BIBTEX
- Varbanova, Marina, Shinjiro Yamaguchi, Yue Yang, Katherine McKelvey, Atsushi Hanada, Roy Borochoy, Fei Yu, Yusuke Jikumaru, Jeannine Ross, y Diego Cortes. 2007. "Methylation of Gibberellins by Arabidopsis GAMT1 and GAMT2." *The Plant Cell* 19(1):32–45. doi: 10.1105/tpc.106.044602
- Vasiliou, Vasilis, Amos Bairoch, Keith F. Tipton, y Daniel W. Nebert. 1999. "Eukaryotic Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) Genes: Human Polymorphisms, and Recommended Nomenclature Based on Divergent Evolution and Chromosomal Mapping." *Pharmacogenetics* 9(4):421–34.
- Vilar, Daniela De Araújo, Marina Suênia De Araujo Vilar, Túlio Flávio Accioly De Lima E. Moura, Fernanda Nervo Raffin, Márcia Rosa De Oliveira, Camilo Flamarion De Oliveira Franco, Petrônio Filgueiras De Athayde-Filho, Margareth De Fátima Formiga Melo Diniz, y José Maria Barbosa-Filho. 2014. "Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa Orellana* L.: A Review." *Scientific World Journal* 2014. doi: 10.1155/2014/857292.

- Vogel, Jonathan T., Bao-Cai Tan, Donald R. McCarty, and Harry J. Klee. 2008. "The Carotenoid Cleavage Dioxygenase 1 Enzyme Has Broad Substrate Specificity, Cleaving Multiple Carotenoids at Two Different Bond Positions." *Journal of Biological Chemistry* 283(17):11364–73.
- Voulgaridou, Georgia Persephoni, Theodora Mantso, Katerina Chlichlia, Mihalis I. Panayiotidis, y Aglaia Pappa. 2013. "Efficient *E. Coli* Expression Strategies for Production of Soluble Human Crystallin ALDH3A1." *PLOS ONE* 8(2):e56582. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0056582.
- Walter, Michael H., y Dieter Strack. 2011. "Carotenoids and Their Cleavage Products: Biosynthesis and Functions." *Natural Product Reports* 28(4):663–92. doi: 10.1039/c0np00036a
- Wang, Yiguang, Chao Zhang, Bin Dong, Jianxin Fu, Shaoqing Hu, y Hongbo Zhao. 2018. "Carotenoid Accumulation and Its Contribution to Flower Coloration of *Osmanthus Fragrans*." *Frontiers in Plant Science* 871:410637. doi: 10.3389/FPLS.2018.01499/BIBTEX.
- Wei, Xuemei, Keliang Tao, Jingwen Zhang, Shugang Lu, Suiyun Chen, y Jugou Liao. 2021. "Identification of SABATH Family Members in *Solanum lycopersicum* and Their Expression Patterns Under Abiotic/Biotic Stresses." *Plant Molecular Biology Reporter* 39(2):403–18. doi: 10.1007/s11105-020-01258-3
- Westfall, Corey S., Ashley M. Muehler, y Joseph M. Jez. 2013. "Enzyme Action in the Regulation of Plant Hormone Responses." *Journal of Biological Chemistry* 288(27):19304–11. doi: 10.1074/jbc.R113.475160
- Yuan, Hui, Junxiang Zhang, Divyashree Nageswaran, y Li Li. 2015. "Carotenoid Metabolism and Regulation in Horticultural Crops." *Horticulture Research* 2. doi: 10.1038/HORTRES.2015.36/41956571/41438_2015_ARTICLE_BFHORTRES201536.PDF.
- Zarei, Adel, Christopher P. Trobacher, y Barry J. Shelp. 2016. "Arabidopsis Aldehyde Dehydrogenase 10 Family Members Confer Salt Tolerance through Putrescine-Derived 4-Aminobutyrate (GABA) Production." *Scientific Reports* 6(1):1–11. doi: 10.1038/srep35115

Zhang, Yucheng, Linyong Mao, Hua Wang, Chad Brocker, Xiangjing Yin, Vasilis Vasiliou, Zhangjun Fei, y Xiping Wang. 2012. "Genome-Wide Identification and Analysis of Grape Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) Gene Superfamily." *PloS One* 7(2):e32153.doi: 10.1371/journal.pone.0032153

Zhao, Nan, Jean-Luc Ferrer, Jeannine Ross, Ju Guan, Yue Yang, Eran Pichersky, Joseph P. Noel, y Feng Chen. 2008. "Structural, Biochemical, and Phylogenetic Analyses Suggest That Indole-3-Acetic Acid Methyltransferase Is an Evolutionarily Ancient Member of the SABATH Family." *Plant Physiology* 146(2):455–67.doi: 10.1104/pp.107.110049

Zubieta, Chloe, Jeannine R. Ross, Paul Koscheski, Yue Yang, Eran Pichersky, y Joseph P. Noel. 2003. "Structural Basis for Substrate Recognition in the Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase Family." *The Plant Cell* 15(8):1704–16.doi: 10.1105/tpc.014548