



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL

Obtención de microorganismos genéticamente modificados
con actividad enzimática de 15, 15' monooxigenasa para
disminuir el color amarillo de canales de bovinos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Esperanza García López

Directora de Tesis:

Dra. María Ofelia Mora Izaguirre

Comité Tutorial:

Dra. Anaid Antaramián Salas

Dr. Armando Shimada Miyasaka

Cuautitlán, Izcalli

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos y dedicatorias

A mi familia por apoyarme en todo momento. A la memoria de Tesa.

Al Dr. Armando Shimada y a la Dra. Ofelia Mora por permitirme participar en su equipo de trabajo, por confiar en mi.

A MC Laura Davalos por su apoyo, conocimiento y amistad.

A la Dra, Evelia Acedo por su apoyo y confianza en todo momento.

Al jurado, por su tiempo y dedicación invertido en el trabajo.

A todos mis amigos/compañeros del laboratorio del Instituto de neurobiología por ser como son y compartir momentos gratos y de trabajo. No quiero dejar de mencionar a ninguno por lo que no mencionaré nombres pero todos saben a quien me refiero.

Para evitar olvidos, quiero agradecer a todos y cada uno de los que me apoyaron para la realización de este trabajo.

A la FESC / UNAM que siempre me ha brindado todo lo necesario para superarme

A CONACyt por permitirme ser becaria y brindarme el apoyo financiero. El trabajo fue sustentado con los proyectos de investigación 50205 y 132088 de CONACyT.

INDICE

	Página	
1	RESUMEN	5
2.	INTRODUCCIÓN	6
	Artículo. Importancia de la expresión y actividad de la β -caroteno 15,15' monooxigenasa y la vitamina A. Su papel en la producción animal.	6
	Revisión.	
	E. García-López y O. Mora	
	Artículo enviado a los: Archivos Latinoamericanos de Producción Animal	
	Abstract	7
	1. Introducción	8
	2. Carotenoides	8
	2.1 Metabolismo de los carotenoides en animales	10
	3. Conversión de β -caroteno a vitamina A	11
	4. Mecanismo de acción de la enzima β -caroteno 15, 15' monooxigenasa	15
	5. Actividad de la enzima β -caroteno 15, 15' monooxigenasa en las diferentes especies animales	16
	6. Metabolismo y función de los retinoides	19
	7. Regulación de la expresión de la enzima β -caroteno 15, 15' monooxigenasa	21
	8. Regulación de la actividad de la enzima β -caroteno 15, 15' monooxigenasa	22
	9. Implicaciones en producción animal	23
	10. Literatura citada	24
3.	HIPOTESIS	27
4.	OBJETIVOS	27
4.1.	OBJETIVO GENERAL	27
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5.	MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS	28
	Artículo. In vitro conversion of β -carotene to retinal in bovine rumen fluid by a recombinant β -carotene-15, 15'-monooxygenase	
	E. García-López, A. González-Gallardo, A. Antaramián, M.L González-Dávalos, A. Shimada, A. Varela-Echavarría, O. Mora	
	Artículo enviado y aceptado para su publicación en el: International Journal for Vitamin and Nutrition Research.	
	Carta de aceptación para la publicación del artículo titulado: <i>In vitro</i> conversión of β -carotene to retinal in bovine rumen fluid by a recombinant β -carotene-15, 15'-monooxygenase	29
	Abstract	30
	Introduction	31
	Material and methods	31
	Purification of total RNA	31
	cDNA síntesis by RT-PCR	31
	Induction of BCMO1	32
	Enzyme assay	32
	β -carotene disappearance in bovine rumen fluid <i>in vitro</i>	32
	pBAD/BCMO1 stability	32
	Statistical analysis	33
	Results	33

	Isolation of cDNA for BCMO1	33
	Induction of BCMO1	33
	Enzyme assay	34
	<i>In vitro</i> digestibility in bovine rumen fluid	35
	Stability of pBAD/BCMO1 after genetic modification	35
	Discussion	36
	Isolation and induction of chicken BCMO1	36
	Enzyme activity	36
	β -carotene disappearance after incubation with bovine rumen fluid <i>in vitro</i>	36
	pBAD/BCMO1 stability	37
	Conclusions	37
	Acknowledgements	37
6	DISCUSIÓN	40
	6.1. Aislamiento e inducción de la BCMO1 de pollo	40
	6.2. Actividad enzimática	40
	6.3. Desaparición de β -caroteno después de la incubación con líquido ruminal bovino <i>in vitro</i>	40
	6.4 Estabilidad de pBAD/BCMO1	41
7.	CONCLUSIONES	42
8.	LITERATURA CITADA	43

1. RESUMEN

La alimentación para ganado basada en pastos produce canales con grasa amarilla; los consumidores rechazan los productos cárnicos provenientes de este tipo de animales, porque suponen que provienen de animales viejos y/o enfermos. Las bacterias recombinantes que expresen la enzima β -caroteno 15,15'-monooxigenasa, introducida en el rumen, podrían contribuir a reducir la coloración amarilla de la grasa ya que esta enzima convierte caroteno en retinal, por lo tanto, la eliminación parcial de la fuente de coloración amarilla.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de una proteína recombinante β -caroteno, 15,15'-monooxigenasa (BCMO1) de la especie *Gallus gallus*, expresada en *E. coli*.

El microorganismo genéticamente modificado se introdujo en el líquido ruminal y se midió la conversión de caroteno en retinal. En condiciones óptimas la enzima produjo 6.8 nmol de retinal/1 mg de proteína/hr a 37°C. Los datos sobre la digestibilidad *in vitro* en el fluido ruminal no mostraron diferencias en la ruptura de β -caroteno o en la producción de retinal ($P > 0,1$) entre la *E. coli* con el vector pBAD sin inserto y *E. coli* con pBAD/BCMO1. El plásmido pBAD/BCMO1 fue estable en *E. coli* durante 750 generaciones. Estos resultados indican que la proteína no produjo retinal a partir de β -caroteno en el fluido ruminal, tal vez debido a su ubicación en el espacio periplásmico en *E. coli*. Las investigaciones futuras deben considerar estrategias para liberar la enzima al medio ambiente ruminal.

2. INTRODUCCIÓN

Regulación de la expresión y actividad de la β -caroteno 15,15' monoxigenasa, su importancia en la producción animal

E. García-López y O. Mora

Artículo enviado a los: Archivos Latinoamericanos de Producción Animal

Importancia de la expresión y actividad de la β -caroteno 15,15' monooxigenasa y la vitamina A. Su papel en la producción animal. Revisión

E. García-López, M.O. Mora Izaguirre¹

Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México.

Recibido Junio 23, 2011. Aceptado Marzo 02, 2012.

Importance of the expression and activity of β -carotene 15.15' monooxygenase and vitamin A. His role in animal production. A Review.

ABSTRACT. β -carotene is one of the most common carotenoids in the diet of domestic animals, is transformed into vitamin A by the enzyme β -carotene-15, 15' monooxygenase, the conversion efficiency depends on the animal species which concerned, among other factors. One of the most efficient at converting the β -carotene into vitamin A is the domestic chicken. In the case of ruminants, in bovines conversion is five times less than goats, which would explain the differences in the fat color between species. This review focuses on the main characteristics of carotenoids and its metabolism in ruminants and non-ruminants, as well as the conversion of β -carotene to retinoids and other apocarotenoids by two proposed models, the central line and the way eccentric, respectively. It refers to what are the different forms of vitamin A and its activity in the cells. It also explains the regulation of expression and activity of the enzyme β -carotene-15, 15' monooxygenase. This review intended to highlight the importance of this enzyme in the conversion of β -carotene to vitamin A and energy metabolism, which will have an impact on animal production.

Key words: carotenoids, vitamin a, bcmo1, animal production.

RESUMEN. El β -caroteno es uno de los carotenoides más comunes en la dieta de los animales domésticos, es transformado en vitamina A por la enzima β -caroteno-15,15' monooxigenasa, la eficiencia de conversión depende de la especie animal de la que se trate, entre otros factores. Una de las especies más eficientes para convertir al β caroteno en vitamina A es el pollo doméstico. En el caso de los rumiantes, en los bovinos la conversión es cinco veces menor a lo que sucede en caprinos, lo que explicaría las diferencias en la coloración de la grasa en cada especie. En esta revisión se abordan las características más destacadas de los principales carotenoides y lo que hasta el momento se conoce de su metabolismo en animales rumiantes y no rumiantes; así como la conversión de β -caroteno a retinoides y otros apocarotenoides mediante dos modelos propuestos, la vía central y la vía excéntrica. Además, se mencionan cuales son las diferentes formas de vitamina A y la actividad de las mismas dentro de las células. Se abordan los temas de la regulación de la expresión y de la actividad de la enzima β -caroteno-15,15' monooxigenasa, con lo que se pretende remarcar la importancia de esta enzima en la conversión de β -caroteno a vitamina A y en el metabolismo energético, lo que tendrá una repercusión en la producción animal.

Palabras Clave: Carotenoides, vitamina A, BCMO1, producción animal.

¹Autor para la correspondencia, e-mail: emora@unam.mx

Introducción

El color y la apariencia son el primer contacto que tiene el consumidor con un alimento, condicionando sus preferencias e influenciando su elección. El color está relacionado con las cualidades sensoriales, la composición química y, por lo tanto, uno de los factores que define la calidad de un producto alimentario (OIE, 2003; Mínguez *et al.*, 2005). Entre los pigmentos vegetales contenidos en frutas y vegetales se encuentran el β -caroteno y la luteína. Estos pigmentos son importantes en la dieta de los animales por su contribución como precursores de vitamina A y en el caso particular de la luteína, por su capacidad pigmentante en las aves. En bovinos, el principal pigmento responsable de dicho color es el β -caroteno y en segundo grado la luteína (Barrón-Gutiérrez *et al.*, 2004). Estos carotenoides pueden además de dar color, actuar como antioxidantes frente a radicales libres de muy diversa naturaleza y origen, inhiben el proceso de auto-oxidación lipídica, por lo que su presencia en las membranas celulares evita los consecuentes procesos detrimentales a nivel celular, entre otras actividades (Mínguez *et al.*, 2005). Los animales acumulan carotenoides en sus tejidos a través de la ingesta de estos compuestos pero en casos particulares como en bovinos engordados en pastoreo, la pigmentación amarilla del tejido adiposo limita su comercialización debido al rechazo del producto por los consumidores, quienes perciben que la carne proviene de animales viejos o de desecho (Barrón-Gutiérrez *et al.*, 2004). En esta revisión se abordan las características de los principales carotenoides, la importancia de la expresión y actividad de la enzima β -caroteno 15,15' monooxigenasa (BCMO1), enzima responsable de formación de vitamina A. Se mencionan las diferentes formas de la vitamina A y su actividad a nivel celular. Se abordan los temas de la regulación de la expresión y de la actividad de la BCMO1, con lo que se busca re-

marcar la importancia de esta enzima en la conversión de β -caroteno a vitamina A y en el metabolismo, lo que tendrá una repercusión en la producción animal.

Carotenoides

En 1837, Berzelius llamó xantofilas a los pigmentos amarillos de hojas de otoño, los cuales fueron solubles en alcohol. Posteriormente, con la separación cromatográfica de estos pigmentos, Tswett (1944) mostró que son una compleja mezcla de "polícromos", los cuales fueron divididos en dos clases: uno soluble en hidrocarburos llamado "carotenos" y el otro, poco soluble en ese solvente pero soluble en etanol denominado "xantofilas". Las dos clases fueron agrupadas juntas bajo el término general de "carotenoides" (Goodwin, 1954).

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés), el término carotenoides es usado para todas las estructuras polisoprenoides con dobles enlaces conjugados (Allen, 1964) y se aplica a un gran número de compuestos liposolubles que colorean de amarillo a rojo (su espectro de luz visible se encuentra entre 400 a 500 nm). La coloración de estos compuestos se debe a la presencia de una serie de dobles enlaces en posición *trans* (IUPAC, 1974; Delgado *et al.*, 2000).

Todos los carotenoides son derivados del licopeno (Goodwin, 1992) con estructura acíclica de $C_{40}H_{56}$ (IUPAC, 1974; Goodwin, 1992).

Los carotenoides son compuestos formados de ocho unidades isoprenoides (hidrocarburo de cinco átomos de carbono), cuyo orden es invertido desde el centro de la molécula (Delgado *et al.*, 2000) su estructura general es de tipo alifática o acíclica alifática (Karrer y Jucker, 1948; IUPAC, 1974; Mínguez *et al.*, 2005; Sadmann, 2006). La fórmula de los carotenoides es escrita y numerada como se presenta en la Figura 1, para lo cual, la molécula se toma como un dímero y la numeración se inicia del centro al extremo, para la

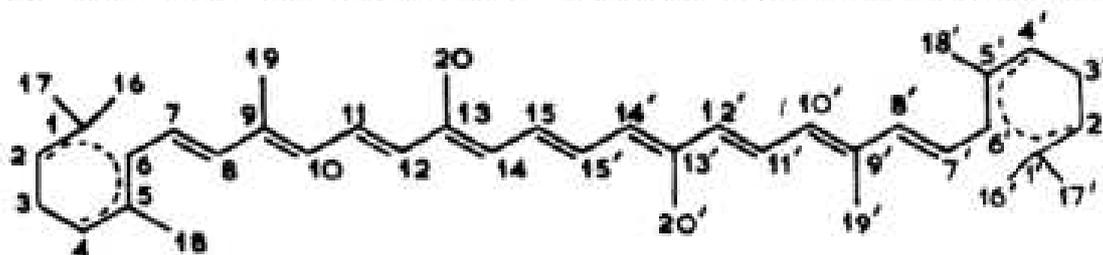


Figura 1. Estructura general de los carotenoides. Tomado de Unión internacional de química pura y aplicada y la unión internacional de bioquímica, 1974.

mitad izquierda se numera comenzando por el carbono que se enlaza a dos metilos y se prosigue de manera lineal hasta el carbono 15 y se procede a numerar los metilos de izquierda a derecha hasta el número 20. La mitad derecha se numera de manera homóloga de derecha a izquierda con numeración primada.

Entre 600 (Yeum y Russell, 2002; Sadmann, 2006) y 700 (Minguez *et al.*, 2005) carotenoides han sido aislados y caracterizados hasta el momento (Yeum y Russell, 2002; Sadmann, 2006). La diversidad exhibida por los carotenoides se da por diferentes cambios químicos en las moléculas, entre los que se observan la ciclización, migración de dobles enlaces, hidrogenación parcial, introducción de un grupos hidroxilo, cetónico ó metoxilo e incluso introducción de puentes de oxígeno, elongación o acortamiento de la cadena, etc. (Karrer y Jucker, 1948; IUPAC, 1974; Goodwin, 1992; Clydesdale, 2000;

Sadmann, 2006). En la Figura 2 se muestra la estructura química de los carotenoides más importantes en la producción animal, entre los que se destacan el β -caroteno y la luteína.

Los carotenoides son responsables del color en algunas especies de diatomeas (Bertrand, 2010), levaduras, bacterias (Simpson, 1983; Choi *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009) hongos y frutas (Minguez *et al.*, 2005; Bertrand, 2010; von Lintig, 2010).

Aunque los animales son incapaces de sintetizarlos *de novo*, sí pueden depositar el pigmento que absorben, tal cual o con alguna alteración de la estructura básica (Simpson, 1983; Deming y Erdman, 1999; Sammar *et al.*, 2001). El color entre rojo y amarillo en la carne, piel, grasa y/o esqueleto del camarón, salmón, cangrejo, langosta, carpa o flamenco es debida a los carotenoides contenidos en el alimento; en pollo de engorda se utiliza luteína para pigmentar la piel provocando una coloración amarilla. Los

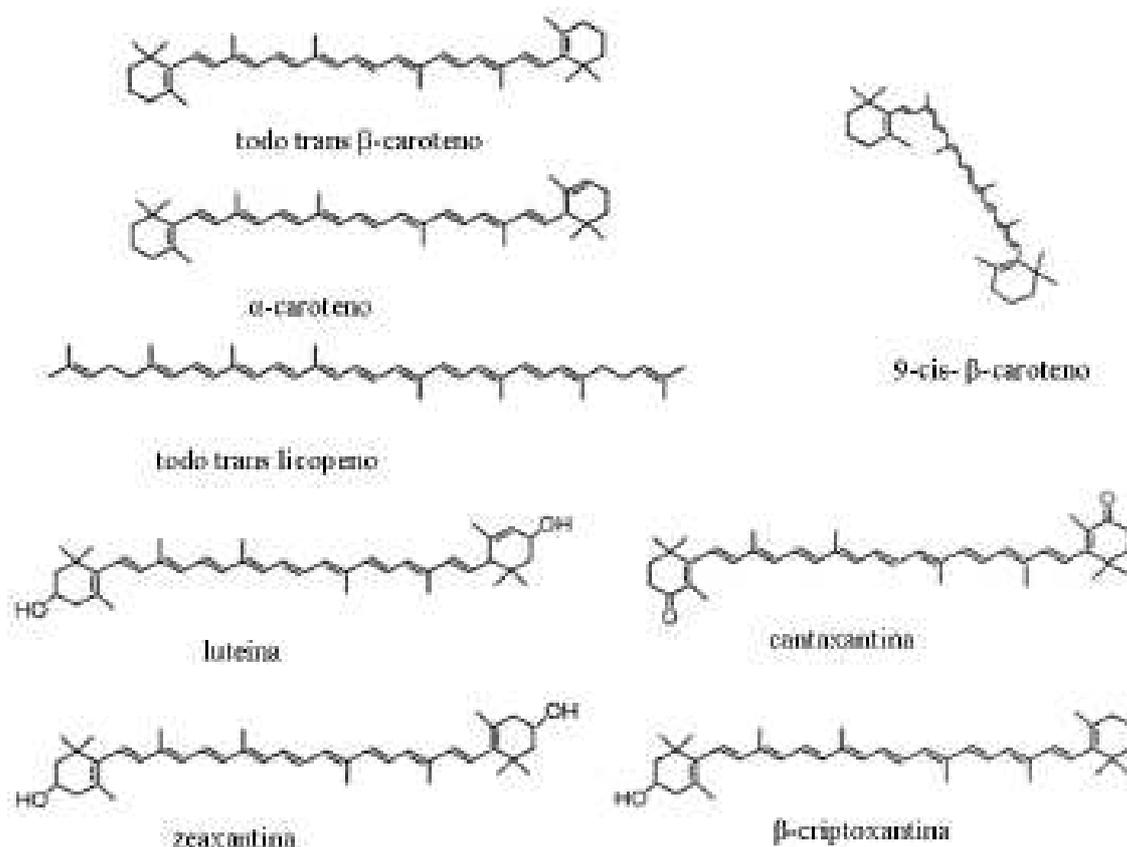


Figura 2. Estructuras de carotenoides comunes. Carotenos: todo trans β -caroteno, α -caroteno, todo trans licopeno, 9-cis- β -caroteno, 13-cis- β -caroteno; xantofilas: luteína, zeaxantina, cantaxantina, β -criptoxantina. Tomado de Daring, A., H. Earl and E. H. Harrison, 2004. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. Arch. Biochem. Biophys. 430:77.

Kim *et al.*, 2009) hongos y frutas (Minguez *et al.*, 2005; Bertrand, 2010; von Lintig, 2010).

Aunque los animales son incapaces de sintetizarlos *de novo*, sí pueden depositar el pigmento que absorben, tal cual o con alguna alteración de la estructura básica (Simpson, 1983; Deming y Erdman, 1999; Sammar *et al.*, 2001). El color entre rojo y amarillo en la carne, piel, grasa y/o exoesqueleto del camarón, salmón, cangrejo, langosta, carpa o flamenco es debida a los carotenoides contenidos en el alimento; en pollo de engorda se utiliza luteína para pigmentar la piel provocando una coloración amarilla. Los carotenoides en producción animal se han usado para pigmentar la piel y la yema del huevo de las aves (Hammersehj *et al.*, 2010), para mejorar la respuesta inmune (β -caroteno y luteína), para aumentar la calidad del semen en machos (luteína) (Mangiagalli *et al.*, 2010), para mejorar la calidad de los embriones (β -caroteno en combinación con vitamina E) (Sales *et al.*, 2008) e incluso como predictores del sistema de alimentación de donde provienen los animales (Röhrle *et al.*, 2011).

En el caso de los bovinos la acumulación de β -caroteno, proveniente de los forrajes, resulta detrimental para la comercialización de las canales de éstos animales (Simpson, 1983; Mora y Shimada,

2001; OIE, 2003; Barrón-Gutiérrez *et al.*, 2004; Minguez *et al.*, 2005).

El 90% de los carotenoides circulantes y absorbidos en humano incluyen al α -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina y β -caroteno. Otros carotenoides tales como violaxantina y neoxantina son comunes en la dieta humana pero no se observa absorción en las mismas proporciones que los carotenoides antes mencionados, implicando que el primer nivel de selección específica para la absorción ocurre en el intestino (Bhosale y Bernstein, 2007).

Los mecanismos para la selectiva afinidad de los carotenoides, aun no está completamente entendido, aunque las proteínas de unión a los carotenoides juegan un importante papel en la acumulación de estos compuestos en los tejidos. Estas proteínas pueden actuar como receptores celulares de superficie, transportadores transmembranales, enzimas metabólicas, mediadores biológicos actuando como ligando ó en los sitios de deposición y estabilización del ligando (Bhosale y Bernstein, 2007).

2.1 Metabolismo de los carotenoides en animales

En el lumen intestinal, los carotenoides se encuentran mezclados con otros lípidos dentro de las micelas (Deming y Erdman, 1999; Mora y Shimada, 2001; Minguez *et al.*, 2005). En animales no rumiantes, se

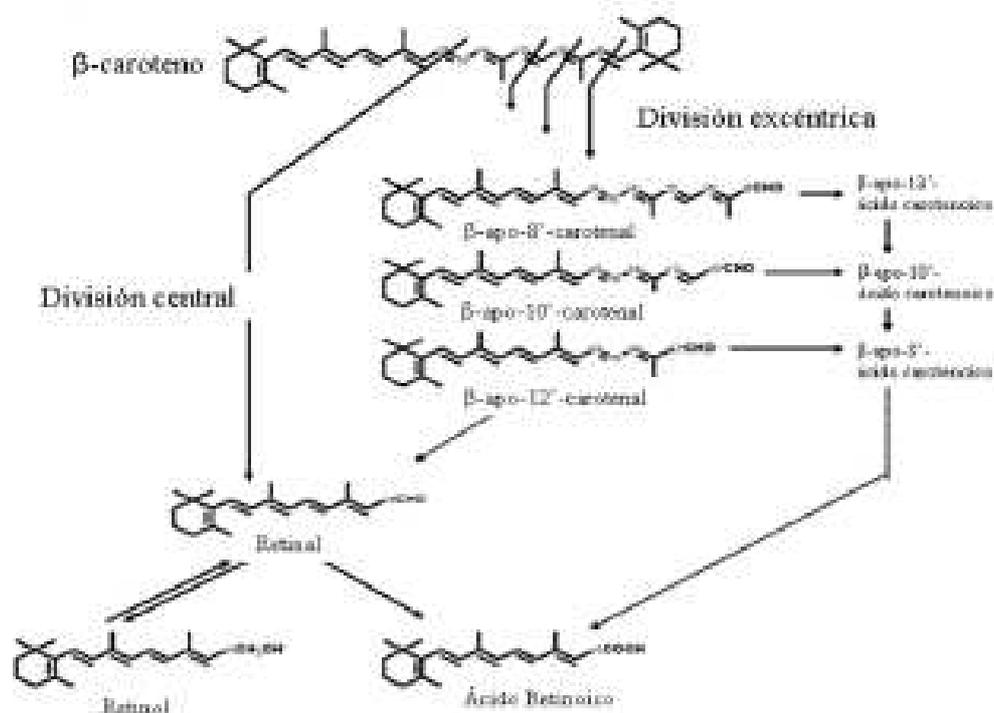


Figura 3. Las principales vías oxidativas en el metabolismo del β -caroteno, división central y excéntrica. Tomado de Durring, A., H. Earl and E. H. Harrison, 2004. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. *Arch. Biochem. Biophys.* 430:77.

ha observado que en función del tipo de grasa ingerida, se distingue que la eficiencia en la absorción cambia. Los triglicéridos de cadena corta o media producen una absorción reducida, mientras que los triglicéridos de cadena larga la aumentan. Elementos como la fibra y los sustitutos de las grasas (como los poliésteres de glucosa) interfieren con su absorción (Minguez *et al.*, 2005).

Respecto al metabolismo o degradación ruminal de los carotenoides, Mora (2001) determinó que la tasa de desaparición de β -caroteno a nivel ruminal está asociada a la tasa de desaparición de la materia seca y del contenido celular; también descarta al rumen-retículo como un lugar en el que exista una alta degradación (utilización por los microorganismos ruminales) de β -caroteno. Por lo que también descarta que la diferencia encontrada en la pigmentación de la grasa de bovinos y cabras, se deba a cambios del β -caroteno el rumen-retículo (Mora, 2001).

El β -caroteno, al ser una molécula no polar, se localiza hidrofólicamente al centro de las micelas, mientras que las xantofilas se acumulan en la superficie debido a sus grupos polares (Deming y Erdman, 1999). El proceso de absorción requiere que la micela se emulsifique, alcance al enterocito y libere a los carotenoides y a los otros lípidos dentro de la célula (Deming y Erdman, 1999). En bovino, una vez dentro del enterocito, del 5 al 7% del β -caroteno absorbido es convertido en vitamina A, incluso, si la concentración de carotenoides aumentan, el porcentaje convertido a vitamina A se mantiene en niveles proporcionalmente bajos, lo cual es debido a la estructura del sitio activo de la BCMO1 en esta especie, que será explicado posteriormente. El resto de los carotenoides y los lípidos de la micela pasan a la sangre sin sufrir modificaciones, incorporados en los quilomicrones. Estos carotenoides pueden ser depositados en diferentes órganos y tejidos, como hígado o tejido adiposo principalmente, así como en pulmón, riñón, piel y médula espinal (Deming y Erdman, 1999; Mora y Shimada, 2001; Minguez *et al.*, 2005).

No existe evidencia de que exista circulación de β -caroteno en ratas, cerdos, pollos, cuyes, cabras, borregos y conejos, debido a una conversión más eficiente a vitamina A (Mora, 1998).

Además de sustrato para la formación de vitamina A, los carotenoides actúan como antioxidantes, por ejemplo, protegiendo a los fotorreceptores de la apoptosis inducida por estrés oxidativo en la retina (Chucair *et al.*, 2007), participan en la prevención de la obesidad, del cáncer, las enfermedades degenerativas y son importantes en procesos biológicos tales como la reproducción, el desarrollo em-

brionario, la diferenciación celular, la inmunidad (Mayne *et al.*, 1996; Minguez *et al.*, 2005; Römer y Fraser, 2005; Sadmann, 2006; Nagao, 2009; von Lintig, 2010) y en el control del metabolismo. Esto último se debe a que la vitamina A es ligando de los receptores nucleares denominados receptores de ácido retinoico (RAR) y receptor X de retinoides (RXR) (Kloer y Schulz, 2006; von Lintig, 2010).

Por otro lado y con respecto a su capacidad de conversión a vitamina A, ésta es variable para cada uno de los carotenoides, por ejemplo β -caroteno tiene 100% de actividad provitamina A y la luteína no es convertida en vitamina A (Simpson, 1983). En el Cuadro 1 se muestran diferentes carotenoides y su actividad de provitamina A.

Si se advierten las diferencias en el metabolismo de los carotenoides tanto en no rumiantes como en rumiantes permitirá a futuro hacer dietas en éstos compuestos para cada especie y administrar el carotenoide indicado para inducir los procesos biológicos deseados así como prevenir padecimientos como los que se mencionaron en el párrafo anterior.

Conversión de β -caroteno a vitamina A

Se han propuesto dos vías oxidativas (ver Figura 5) para la conversión de β -caroteno a vitamina A (Allen y Hayaishi, 1965; Allen, 1989; Mora y Shimada, 2001; Kloer y Schulz, 2006):

1) Ruptura central, la cual ocurre en el doble enlace central 15,15'. El producto de este tipo de división son dos moléculas de retinal debido a la actividad enzimática de la BCMO1.

2) Ruptura excéntrica, que puede ocurrir en uno ó más de otros dobles enlaces. Sus productos pueden ser un β -apo-carotenal largo y otro corto; por ejemplo, cicloctiral y β -apo-8'-carotenal, si acaso la ruptura ocurriera en el doble enlace 8'. Experimentalmente se ha demostrado que los β -apocarotenales pueden ser convertidos a β -caroteno. La enzima responsable es denominada $\beta\beta$ -caroteno 9',10'-oxigenasa (BCMO2).

A mediados de los años 1950 se dio la primera descripción de la actividad enzimática para producir vitamina A (Lindqvist y Andersson, 2002). Allen y Hayaishi (1965), encontraron que la enzima requiere oxígeno para llevar a cabo la reacción por lo que tentativamente la denominaron como β -caroteno 15-15' oxigenasa (Allen y Hayaishi, 1965).

Wyss menciona que la primera denominación formal de la enzima que produce escisión del β -caroteno, es β -caroteno 15, 15' dioxigenasa (EC 1.13.11.21), debido a que el mecanismo de reacción era el de una enzima dioxigenasa (Wyss, 2004). Trabajos recientes, como el de Leutenberger *et al.* (2001) y Lindqvist y Andersson (2002), quienes usaron una preparación

Cuadro 1. Tipos representativos de carotenoides y apocarotenoides con actividad de provitamina A. Adaptado de Simpson (1983).

Carotenoides	Actividad (%)
β -caroteno	100
Neo- β -caroteno	38
α -caroteno	50-54
Neo- α -caroteno	13
3,4,-Dihidro- β -caroteno	75
3,4,3'-4'-Bisdihidro- β -caroteno	38
γ -caroteno	42-50
7,8'-Dihidro- γ -caroteno	20-40-
β -caroteno-5',6'-epoxido	21
α -caroteno-5,6-epoxido	25
β -caroteno-5,6,5',6'-diepoxido	Activo
3-oxo- β -caroteno	52
3-hidroxi- β -caroteno	50-60
4-hidroxi- β -caroteno	48
β -Apo-2'-carotenal	Activo
β -Apo-8'-carotenal	72
β -Apo-10'-carotenal	Activo
β -Apo-12'-carotenal	120
Licopeno	Inactivo
Luteína	Inactivo

Adaptado de Simpson (1983).

de β -caroteno 15, 15' dioxigenasa parcialmente purificada de intestino de pollo y β -caroteno, mostraron que solo una molécula de oxígeno es incorporada en cada una de las moléculas de retinal producidas. Como resultado, la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular cambia la clasificación de esta enzima a EC 1.14.99.36 y su denominación a β -caroteno 15,15' monooxigenasa (Leuenberger *et al.*, 2001; Lindqvist y Andersson, 2002). La Figura 4 muestra los dos mecanismos para la división central del β -caroteno que han sido propuestos.

Para determinar la ubicación de la BCMO1 se realizó inmunohistoquímica, los resultados mostraron que la BCMO1 es expresada en células epiteliales en varios tejidos, incluyendo retina, células glandulares y de mucosa de estómago, intestino delgado, hígado, próstata, endometrio, tejido mamario, células tubulares de riñón, piel, testículo, ovario, glándula adrenal, colon, así como células de músculo esquelético (Morales, 2006; Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Kim y Oh, 2010; Lietz, 2010; von Lintig, 2010); de pollo, ratón, *Drosophila* (Wyss, 2004), humano (Wyss, 2004; Kim y Oh, 2010), ratas, cerdos, conejos, hurones, gerbos, cabras y bovinos (Mora y Shimada, 2001). Las células epiteliales en general son sensibles a la deficiencia de vitamina A, esto indica que la activi-

dad de la BCMO1 puede ser importante por el tipo celular (von Lintig, 2010).

Posteriormente la BCMO1 se purificó parcialmente de intestino e hígado de pollo, ratón, *Drosophila* (Wyss, 2004), humano (Wyss, 2004; Kim y Oh, 2010), ratas, cerdos, conejos, hurones, gerbos (Mora y Shimada, 2001), cabras y bovinos (Mora y Shimada, 2001; Álvarez, 2009).

Así mismo, la clonación molecular, expresión y caracterización de la BCMO1 ha sido reportada en varias especies, incluyendo pollos, mosca de la fruta, humano, ratón, pez cebra, bovinos y una bacteria marina denominada 66A03 (Mora y Shimada, 2001; Kim *et al.*, 2009; Kim y Oh, 2010), para determinar si existen diferencias en la forma y función de la BCMO1 entre las especies.

Desde que Glover *et al.*, (1960), Ganguly *et al.*, (1977), Krinsky *et al.*, (1991), Hansen y Meret (1998), y Sharma *et al.* (1976) mencionado por Wyss en su trabajo del 2004, sugieren que además de la división central del β -caroteno, hay otra vía para la producción de vitamina A, la división excéntrica. (von Lintig y Wyss, 2001; Lakshman, 2004; Wyss, 2004).

Tanto von Lintig y Wyss, (2001, 2004) citan respectivamente en sus publicaciones, que Wang *et al.* (1991) provee evidencia, tanto *in vitro* como *in vivo*,

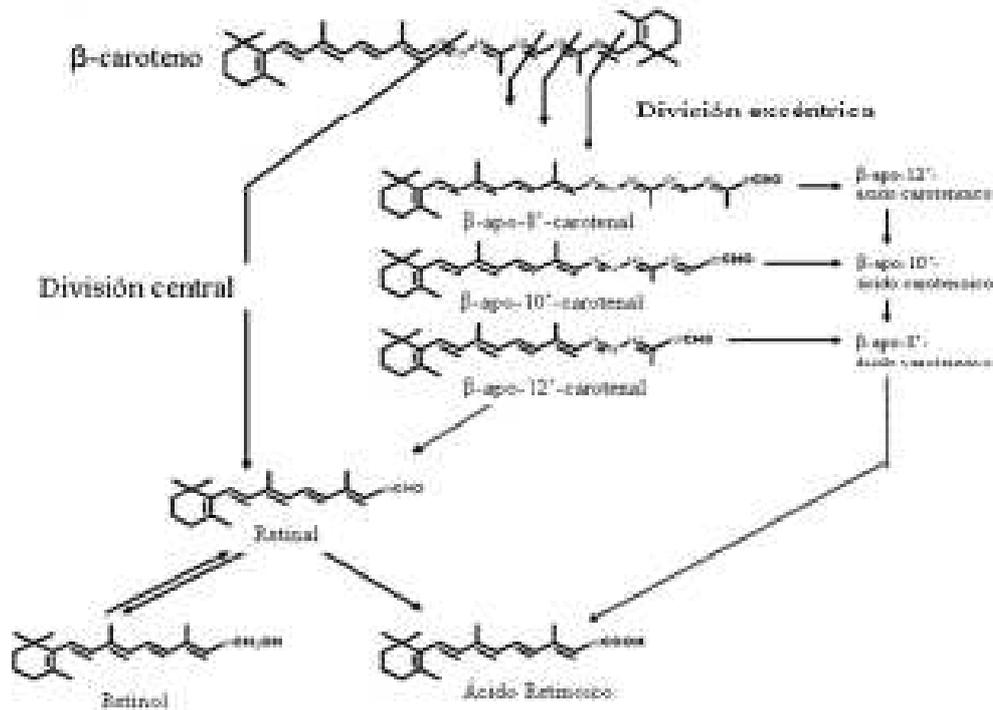
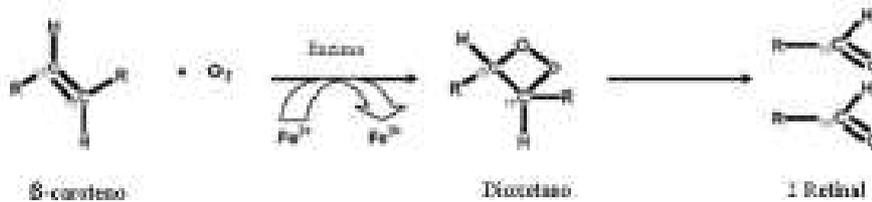


Figura 3. Las principales vías oxidativas en el metabolismo del β -caroteno, división central y excéntrica. Tomado de During, A., H. Earl and E. H. Harrison. 2004. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. Arch. Biochem. Biophys. 430:77.

a) Reacción dioxygenasa



b) Reacción monooxygenasa

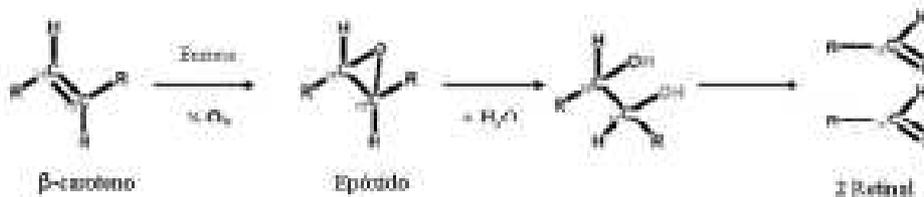


Figura 4. Posibles mecanismos para la división central del β -caroteno. Tomado de During, A., H. Earl and E. H. Harrison. 2004. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. Arch. Biochem. Biophys. 430:77.

Para determinar la ubicación de la BCMO1 se realizó inmunohistoquímica, los resultados mostraron que la BCMO1 es expresada en células epiteliales en varios tejidos, incluyendo retina, células glandulares y de mucosa de estómago, intestino delgado, hígado, próstata, endometrio, tejido mamario, células tubulares de riñón, piel, testículo, ovario, glándula adrenal, colon, así como células de músculo esquelético (Morales, 2006; Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Kim y Oh, 2010; Lietz, 2010; von Lintig, 2010); de pollo, ratón, *Drosophila* (Wyss, 2004), humano (Wyss, 2004; Kim y Oh, 2010), ratas, cerdos, conejos, hurones, gerbos, cabras y bovinos (Mora y Shimada, 2001). Las células epiteliales en general son sensibles a la deficiencia de vitamina A, esto indica que la actividad de la BCMO1 puede ser importante por el tipo celular (von Lintig, 2010).

Posteriormente la BCMO1 se purificó parcialmente de intestino e hígado de pollo, ratón, *Drosophila* (Wyss, 2004), humano (Wyss, 2004; Kim y Oh, 2010), ratas, cerdos, conejos, hurones, gerbos (Mora y Shimada, 2001), cabras y bovinos (Mora y Shimada, 2001; Álvarez, 2009).

Así mismo, la clonación molecular, expresión y caracterización de la BCMO1 ha sido reportada en varias especies, incluyendo pollos, mosca de la fruta, humano, ratón, pez cebra, bovinos y una bacteria marina denominada 66A03 (Mora y Shimada, 2001; Kim *et al.*, 2009; Kim y Oh, 2010), para determinar si existen diferencias en la forma y función de la BCMO1 entre las especies.

Desde que Glover *et al.*, (1960), Ganguly *et al.*, (1977), Krinsky *et al.*, (1991), Hansen y Merel (1998), y Sharma *et al.* (1976) mencionado por Wyss en su trabajo del 2004, sugieren que además de la división central del β -caroteno, hay otra vía para la producción de vitamina A, la división excéntrica, (von Lintig y Wyss, 2001; Lakshman, 2004; Wyss, 2004).

Tanto von Lintig y Wyss, (2001, 2004) citan respectivamente en sus publicaciones, que Wang *et al.* (1991) provee evidencia, tanto *in vitro* como *in vivo*, de la formación de apo-carotenales y vitamina A a partir de la división del β -caroteno con BCMO2. Incluso se llegó a proponer que los apo-carotenales formados por la división excéntrica eran subsiguientemente acortados por un mecanismo similar a la β -oxidación, resultando en la formación de una molécula de vitamina A por molécula de β -caroteno (von Lintig y Wyss, 2001; Wyss, 2004).

Recientemente se clonó la BCMO2 de ratón, pez cebra y humano para su estudio (Kloer y Schulz, 2006); asimismo Kiefer *et al.*, 2001, publicaron la caracterización molecular y la clonación de la BCMO2 de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) en

Escherichia coli (*E. coli*). Estos estudios realizados con la BCMO2 permiten tener una mejor herramienta para investigar el mecanismo para la formación de vitamina A por una vía alterna, y debido a que los retinoides biológicamente activos promueven la diferenciación celular *in vivo* son generalmente sintetizados localmente y actúan en el mismo sitio de síntesis, cada una de las BCMO es específica en cada tejido, aunque de ambas, la más importante, para la producción de vitamina A, es la BCMO1 (Kiefer *et al.*, 2001; Wyss, 2004; Kloer and Schulz, 2006; Cudas y Wagner, 2010).

También respecto a la BCMO2, para bovinos y ovinos se han detectado mutaciones relacionadas con el color de la grasa subcutánea y la concentración de β -caroteno en plasma y leche, aún cuando faltan investigaciones al respecto, ésta se podría utilizar como un gen predictor del amarillamiento de la canal en éstas especies (Tian *et al.*, 2010).

De la misma forma, como en el caso de la BCMO1, también se realizó inmunohistoquímica para determinar la expresión de la BCMO2, la cual fue determinada en las células epiteliales de intestino delgado, mucosa estomacal, células del parénquima hepático, células de Sertoli y Leydig de testículo, túbulo renales, glándula adrenal, células exocrinas pancreáticas, epitelio pigmentado retinal y cuerpo ciliar en el ojo. La BCMO2, pero no la BCMO1, fue detectada en células musculares esqueléticas y cardíacas, tejido conectivo endometrial y prostático, así como en las células endocrinas pancreáticas (von Lintig, 2010).

La existencia de dos enzimas que producen división de los diferentes carotenoides para la formación de vitamina A o apocarotenales, parece indicar que la célula evita o cubre una posible disminución de retinoides a nivel local.

Por otro lado, es necesario determinar posibles asociaciones con proteínas que regulan la entrada de moléculas a través de la membrana celular, el movimiento y la transformación de las mismas por lo que además de estudiar a las BCMO es necesario caracterizar y estudiar las proteínas relacionadas a el metabolismo de los carotenoides, remarcando la importancia y el nivel de complejidad del metabolismo de la vitamina A.

Mecanismo de acción de la enzima β -caroteno 15, 15' monooxigenasa

Las enzimas que son capaces de activar el O_2 son divididas en oxidasas, las cuales usan el oxígeno como un oxidante, y reducen el O_2 en peróxido de hidrógeno o agua; y oxigenasas, las cuales incorporan átomos de oxígeno de la molécula de oxígeno al (los) producto(s). Las mono-oxigenasas catalizan la incorporación de un átomo de oxígeno en el produc-

io, mientras que las di-oxigenasas incorporan ambos átomos de oxígeno en el producto (Bugg, 2003).

La mayoría de las enzimas capaces de catalizar la activación del dióxígeno requieren un metal como cofactor, el cual en la mayoría de los casos hierro ferroso (II) ó hierro férrico (III) (Bugg, 2003).

Mediante espectrofotometría de masas se confirmó la incorporación de oxígeno y agua marcados a los productos obtenidos de la división del caroteno por la BCMO1 (Leuenerberger, 2001). La división central oxidativa es citada en los diferentes trabajos realizados por Lakshman y Okoh, 1993; During, 1996; During, 1999; Nagao, 2000; During, 2001; During, 2004; Gong, 2006; y en la Figura 5 señala esta división central oxidativa (Bugg, 2003).

La BCMO1 de pollo, humano y rata han mostrado tener la misma especificidad por el sustrato para diferentes carotenoides, mostrando actividad para β -caroteno, β -criptoxantina, β -apo-4'-carotenal, β -apo-8'-carotenal, β -caroteno y β -caroteno pero no para β -apo-12'-carotenal, luteína, zeaxantina (Grolier *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2009; Lindqvist y Andersson, 2002) y licopeno (Grolier *et al.*, 1997; Lindqvist and Andersson, 2002; Zariphen *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009), lo cual sugiere: a) al menos uno de los anillos β -ionona es imperativo e insustituible para la ruptura central de las moléculas en los enlaces dobles 15,15'; b) la masa molecular del sustrato debe ser más grande de 30 carbonos, y c) la enzima se une al sustrato formando un saco hidrofóbico con el sitio activo al centro (Grolier *et al.*, 1997; Lindqvist and Andersson, 2002; Kim *et al.*, 2009).

La secuencia de aminoácidos de BCMO1 en humano muestra que el 8% de aminoácidos hidrofóbicos son conservados en la enzima (triptofano, tirosina y fenilalanina) y participan en la formación del saco hidrofóbico de unión al sustrato (Lindqvist y Andersson, 2002). Una vez que se alineó las secuencias de la BCMO1 de pollo, humano, ratón, rata (Lindqvist y Andersson, 2002; Morales *et al.*, 2006), bovino y *Drosophila melanogaster* (Morales *et al.*, 2006) revela seis cisternas conservadas en el sitio activo hidrofóbico (Lindqvist y Andersson, 2002; Morales *et al.*, 2006). Recientemente se ha identificado que las tirosinas en las posiciones Y25 e Y326 en la BCMO1 de ratón, se fijan en el doble enlace 15,15' del sustrato, estabilizando la unión (Lietz *et al.*, 2010).

Si el suplemento de β -caroteno se interrumpiera pero se tuviera acceso a otros carotenoides dietarios, la BCMO1 seguiría produciendo vitamina A al utilizar sustratos similares, evitando la deficiencia de dicha vitamina. Lo cual refleja la importancia de la enzima BCMO1 y de la vitamina A en el metabolismo celular.

Actividad de la enzima β -caroteno 15, 15' monooxigenasa en las diferentes especies animales

La caracterización de la enzima BCMO1, a partir de ratón, rata, pollo, hurón, conejo, cerdo y cuyo, ha sido llevada a cabo con la fracción sobrenadante a 100,000 \times g ó precipitada con sulfato de amonio. Se mostró que la reacción es dependiente de oxígeno molecular y que no es requerido el cofactor nicotinamida dinucleótido para la catálisis (Lindqvist y Andersson, 2002), determinando que la enzima es citosólica (von Lintig y Vogt, 2004; Wyss, 2004; Morales, 2006), sin dominios transmembranales o sitios potenciales para glicosilación amino terminal (Takitani *et al.*, 2006).

También se determinó que la enzima requiere hierro iónico como cofactor pero es inhibida por agentes sulfhidrilo y quelantes de hierro (von Lintig y Wyss, 2001; von Lintig y Vogt, 2004; Wyss, 2004) y cianuro (Lindqvist y Andersson, 2002). Asimismo, la enzima nativa tiene la habilidad de dividir el doble enlace 15,15' de una variedad de carotenoides además de β -caroteno, incluyendo α -caroteno, β -apocarotenoles y β -apocarotenales (Lindqvist y Andersson, 2002).

El promedio para la constante de Michaelis-Menten (K_m) para la enzima nativa en las especies antes mencionadas y utilizando como sustrato al β -caroteno, ha sido determinada en el rango de 1-100M (Goodman *et al.*, 1967; Singh y Cama, 1974; Ershov *et al.*, 1993; Redmond *et al.*, 2001; Lindqvist y Andersson, 2002; von Lintig y Vogt, 2004; Poltakov *et al.*, 2005; Morales, 2006; Kim y Oh, 2009).

El pH óptimo para la reacción fue ligeramente en el rango alcalino (7.8 a 8.2) (Lindqvist y Andersson, 2002; von Lintig y Vogt, 2004; Morales, 2006), el rango de K_m de 2-10 μ M, velocidad máxima de 0.003 - 1.7 nmol de retinal/mg/hr a 37°C dependiendo de la especie (ver Cuadro 2) (Goodman *et al.*, 1967; Singh y Cama, 1974; Ershov *et al.*, 1993; van Vliet *et al.*, 1996; Redmond *et al.*, 2001; Poltakov *et al.*, 2005; Morales, 2006; Kim y Oh, 2009). La función de esta enzima es promovida por la presencia de tioles (Mora y Shimada, 2001).

Kim y Oh (2010) compilaron los parámetros cinéticos de BCMO1 en diferentes especies, los cuales se muestran en el Cuadro 2. La afinidad y la máxima velocidad de la BCMO1 para el β -caroteno es elevada, lo que indica que el β -caroteno es el sustrato ideal para la enzima (Kim y Oh, 2010).

Lo expuesto anteriormente muestra las diferentes observaciones obtenidas en los estudios realizados con la BCMO1 de las diferentes especies animales, además que la actividad y la eficiencia específica para la conversión de los carotenoides a vitamina A, depende de la especie animal de la que se trate; a éste

Cuadro 2. Parámetros cinéticos de la BCMO1 con diferentes carotenoides como sustrato. Adaptado de Kim y Oh. (2010).

Substrato	Especie fuente	K_m (μM)	V_{max} ($nmol \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$)	V_{max}/K_m	Referencia
α -caroteno	Bacteria marina	169	0.78	4.6×10^6	Kim <i>et al.</i> , 2009
	Rata	6.2	4.5×10^4	6.9×10^4	Goodman <i>et al.</i> , 1967
	Pollo	370	9.4	2.5×10^2	Kim and Oh, 2009
β -caroteno	Bacteria marina	37	45	1.2	Kim <i>et al.</i> , 2009
	Humano	7.1	10	1.4	Lindqvist and Andersson, 2002
	Ratón	6.0	0.04	6.7×10^6	Redmond <i>et al.</i> , 2001
	Pollo	26	32	1.2	Kim and Oh, 2009
	Rata	5.7	1.7×10^5	6.7×10^6	Goodman <i>et al.</i> , 1967
	Conejo	67	0.05	7.5×10^6	Ershov <i>et al.</i> , 1993
	Cuyo	9.5	0.06	6.3×10^6	Singh and Cama, 1974
	<i>Drosophila melanogaster</i>	5.0	-	-	Von Lintig and Wyss, 2001
	γ -caroteno	Bacteria marina	382	0.26	6.9×10^4
Pollo	690	9.2	1.3×10^2	Kim and Oh, 2009	
β -Criptoxantina	Bacteria marina	29	10	0.34	Kim <i>et al.</i> , 2009
	Rata	6.7	1.8×10^4	2.69×10^4	Goodman <i>et al.</i> , 1967
	Humano	30	0.90	0.03	Lindqvist and Andersson, 2002
β -Apo-4'-carotenal	Pollo	290	38	0.13	Kim and Oh, 2009
	Bacteria marina	147	7.9	5.4×10^2	Kim <i>et al.</i> , 2009
β -Apo-8'-carotenal	Pollo	180	17	9.4×10^2	Kim and Oh, 2009
	Rata	8.5	1.8×10^4	2.1×10^6	Goodman <i>et al.</i> , 1967
β -Apo-10'-carotenal	Pollo	190	21	0.11	Kim and Oh, 2009
	Rata	9.2	1.4×10^4	1.5×10^6	Goodman <i>et al.</i> , 1967
β -Apo-12'-carotenal	Rata	7.7	2.1×10^4	2.7×10^6	Goodman <i>et al.</i> , 1967

Adaptado de Kim y Oh. (2010).

respecto, Mora (1998) encontró que en bovinos, la síntesis a partir de carotenoides en vitamina A, es cinco veces menor a lo que sucede en caprinos, lo que explicaría las diferencias en la coloración de la grasa. De igual forma, se ha estimado que en humanos del 60 al 70% del β -caroteno que ingiere es convertido directamente a retinal, mientras que el remanente se deposita intacto en el hígado y el tejido adiposo; por lo que se puede mencionar que la enzima BCMO1 de bovino y humano tienen una actividad similar, pigmentando la grasa de estas especies. En cerdos, la absorción de β -caroteno es limitada, siendo la tasa de conversión de este compuesto a vitamina A de 40 a 1 en base a su peso ($100 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) en la dieta (Schweigert *et al.*, 2001). En roedores, el β -caroteno es enteramente dividido en retinal, por lo que no existe β -caroteno en circulación (Wyss, 2004).

La actividad de la BCMO1 es muy diferente entre especies, en cabras es de 190 a 415 pmol de retinal/

mg/ de proteína por hora, en ratas va de 6.3 a 14.9 pmol de retinal/ mg/ de proteína por hora y en pollos hasta de 330 (Morales, 2006) sin embargo Wyss en el 2000 determinó la actividad en 2500 pmol de retinal/ mg/ de proteína por hora en esta última especie (Wyss *et al.*, 2000). La diferencia encontrada en la actividad en la BCMO1 de pollo, puede ser debida en el nivel de purificación alcanzada en cada uno de los trabajos realizados y de la cantidad de enzima presente en cada experimento.

Debido a que aun no ha sido posible purificar completamente la BCMO1, se han realizado experimentos con la BCMO2 para de inicio, determinar por analogía la actividad de la BCMO1. Kloer *et al.* (2005, 2006) reportaron la estructura cristalina de la BCMO2 de *Syngnathocystis sp* como modelo de las BCMO formadoras de retinal. Esta enzima tiene 7 hélices β . El punto central de la hélice es relativamente plano y consiste en lazos cortos que conectan

a cada una de las hélices. En contraste, en la parte superior de la hélice se extienden lazos con hélices cortas formando un domo. El centro activo de la BCMO2 está localizado cerca del eje de las hélices en la parte superior. La característica más prominente es un gran túnel por donde entra el sustrato desde uno de los lados, en una dirección perpendicular al eje de las hélices, pasando por el sitio activo, donde se encuentra el hierro, saliendo el (los) producto(s) paralelo al eje de las hélices (modelo propuesto de la BCMO2 en la Figura 5). El modelo muestra al hierro unido a histidinas reacomodadas en el eje de las 7 hélices. Tomando como base este modelo, Morales *et al.*, (2006) determinaron que en el bovino existen histidinas conservadas en las posiciones 172, 237, 308 y 513 en la secuencia de aminoácidos. Al comparar las secuencias de aminoácidos de *Synechocystis* y el bovino, se observan varios residuos ácidos conservados en las tiras β que están asociadas a la transferencia del electrón durante la catálisis. Las tiras $\beta 20$, $\beta 24$ y $\beta 28$ tienen la mayoría de las regiones conservadas entre especies, y muestran un total de cuatro residuos de ácido glutámico conservados; en la $\beta 6$ tiene un ácido aspártico conservado en todas las especies excepto en *Synechocystis*, esta característica está presente en la tira $\beta 32$; y la $\beta 10$ muestra un ácido aspártico movido en una posición en *Synechocystis* (Kloer *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2006; Kloer y Schulz,

2006), estos hallazgos permiten especular que las diferencias encontradas en la actividad enzimática de la BCMO1 entre las especies puede estar dada por las diferencias en el sitio activo.

Lindqvist y Andersson (2007) en un análisis de secuencias y alineamiento de la BCMO1 de humano, ratón, rata y pollo, mostraron seis cisteínas conservadas en el centro del sitio activo.

Debido a la naturaleza bioquímica de los aminoácidos encontrados en el sitio activo, la unión de sustrato se ve favorecida; además por la naturaleza hidrofóbica de la cisteína se fomenta la carga electronegativa y durante la catálisis, la presencia del nitrógeno de la histidina, es capaz de captar el protón de la cisteína en el momento de la unión al sustrato. Por lo que las mutaciones en el sitio activo, cambian la forma, la carga eléctrica y la función del sitio activo de la BCMO1, siendo ésta la posible razón de las diferencias de actividad de la BCMO1 entre las especies estudiadas hasta el momento.

Soportando la idea anterior, en el 2007, Lindqvist y Anderson, encontraron una mutación en el gen de la β -caroteno 15, 15' monooxigenasa llamada T170M. Esta mutación corresponde al reemplazamiento de una treonina conservada por una metionina que disminuye la actividad de la enzima del 90%, aunque la función de la treonina aun no es clara, la sustitución de este residuo hidrofílico por el residuo de metionina hidrofóbica cambia el sitio activo y por lo tanto la

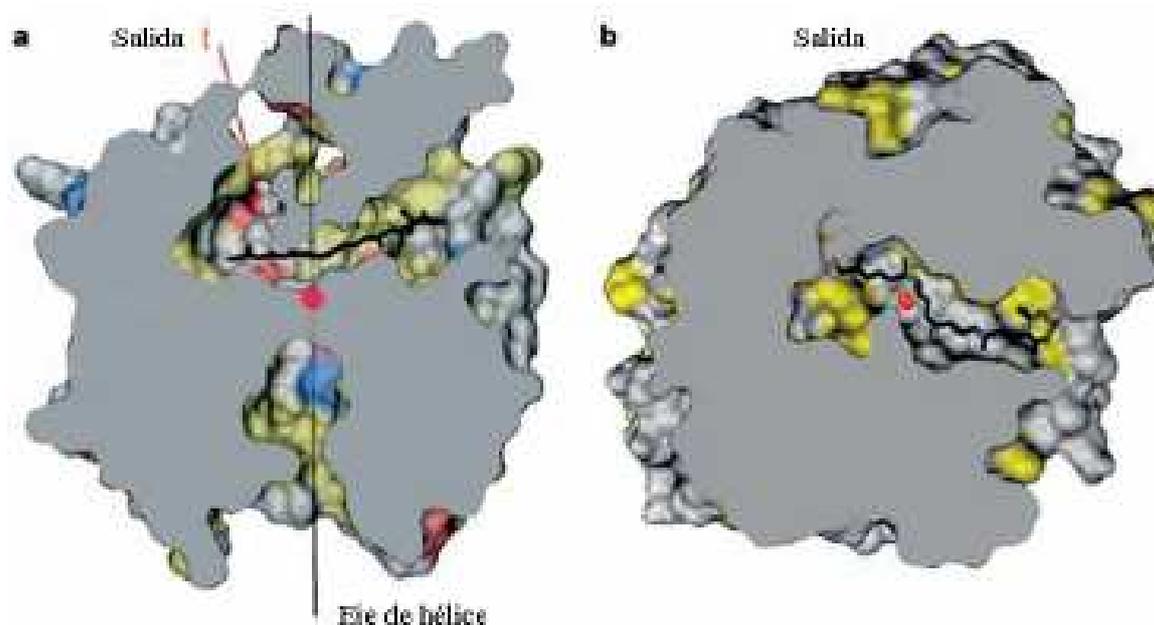


Figura 5. Formación de vitamina A por la β -caroteno 15, 15' mono-oxigenasa. Tomado de Bugg, T. D. H. 2003. Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron* 59, 7075-7101.

actividad. Existe un residuo histidina 172, uno de los 4 residuos histidina coordinados con el hierro del centro catalítico de la enzima, que estabiliza el hidrogeno que está unido al residuo treonina 170, por lo que el residuo metionina 170 desestabiliza la unión o el cambio de posición del hierro ferroso (Fe^{2+}), comprometiendo la capacidad catalítica de la enzima (Lindqvist y Andersson, 2007).

Metabolismo y función de los retinoides

Como se mencionó anteriormente, los retinoides son moléculas formadas de cuatro unidades isoprenoides. En los años recientes el término retinoide se aplica a los compuestos naturales con actividad de vitamina A y sus análogos sintéticos, con o sin actividad biológica de retinol. Las estructuras químicas de los retinoides se observan en la Figura 6. Los tres retinoides que se encuentran en la naturaleza son (Mora, 1998):

- 1) retinol, también denominado vitamina A, axeroftol, axerol
- 2) retinaldehído, denominado también como retinal, y
- 3) ácido retinoico

La vitamina A preformada es consumida como ésteres de retinol, los cuales viajan a intestino, ahí sufren hidrólisis y el retinol libre pasa a través de la mucosa intestinal a los enterocitos donde se re-esterifican con cadenas largas de ácidos grasos principalmente saturados por la enzima lecitina-retinol acil transferasa, la cual está unida a la membrana. El hígado es el principal sitio de almacenamiento de la vitamina A, con más del 95% del total de retinoides que se encuentran en forma de ésteres de retinol, predominantemente como retinil palmitato y estearato en todas las especies hasta hora reportadas como lo son pollo, rata, ratón, cerdo, cabra, bovino, cerdo, hurón, y humano (Mora, 1998).

El receptor de membrana Stra6 permite la entrada de vitamina A a la célula, lo cual permite definir los tipos de célula con elevada especificidad. El receptor Stra6 es expresado en altos niveles en la barrera sangre/órgano y en diversos tipos celulares durante el desarrollo y en los adultos, así mismo, la elevada expresión de Stra6 es sugestivo del requerimiento de acciones de retinol (Cudas y Wagner, 2011). Así, los retinoides biológicamente activos son generalmente sintetizados localmente. Como se regula esta síntesis, requiere futuras investigaciones (Cudas y Wagner, 2011). Otro hecho importante en la investigación del retinol, es el transporte de la vitamina A una célula a otra, al parecer en el desarrollo embrionario y entre células adyacentes, sin embargo aun no hay suficiente información disponible acerca de si la vitamina A se mueve entre las células, o si las moléculas de seña-

lización se elaboran en respuesta a la vitamina A (Cudas y Wagner, 2011).

Aun no está claro si a vitamina A de origen dietético puede influenciar fisiológicamente el balance energético y el almacenamiento de grasa en ratón (Lobo *et al.*, 2010).

Investigadores como Chawla y Lazar (1994), Xue *et al.* (1996) y Kawada *et al.* (2000) mencionan que los carotenoides provitamina A y la vitamina A en su forma de ácido retinoico todo trans inhiben potentemente la diferenciación clonal de líneas celulares de preadipocitos de cerdos (Brandebourg y Hu, 2005).

Por otro lado, García-Rojas *et al.*, (2010), estudiaron el efecto de ácidos grasos como ácido pristánico y ácido fitánico, vitamina A (ácido retinoico todo trans y 9-cis) y carotenoides (β -caroteno y luteína) en la expresión de PPAR β y su coactivador PGC-1 α durante la diferenciación del tejido adiposo bovino. Determinando que el ácido fitánico y vitamina A (tanto ácido retinoico todo trans y 9-cis) fueron los mejores activadores de la expresión de PPAR γ , y que la combinación de los ácidos retinoicos todo trans y 9-cis fue el mejor activador de la expresión de PGC-1 α .

Para la esterificación de la vitamina A, hay una proteína celular ligadora de retinol II (CRBPII, por sus siglas en inglés), que se une al retinal recién formado por la BCMOI y lo presenta a la proteína lecitina retinol aciltransferasa que cataliza la síntesis de ésteres de retinil para almacenar de esta forma la vitamina A en el hígado (MacDonald y Ong, 1988; Boulanger *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2007).

Es necesario que una vez que se forma la vitamina A, esta sea esterificada para su almacenamiento, por lo que Boulanger (2003) propone un mecanismo de inducción coordinada para la expresión de CRBPII y BCMOI, señalando que ambas están reguladas por los ligandos de PPAR, los que regulan la expresión secuencial de ambas enzimas para metabolizar el β -caroteno (Boulanger *et al.*, 2003; Poshakov *et al.*, 2005), este es debido a que el promotor del gen CRBPII tiene una secuencia específica reconocida por el heterodímero de receptor nuclear de hormonas, RXR y PPAR (Durtng *et al.*, 1998) (ver figura 7).

Dentro del papel fisiológico de la vitamina A se encuentra la diferenciación y el crecimiento celular, la reproducción y la visión (Lewis, *et al.*, 1990). La vitamina A (en su forma de ácido retinoico) también interviene en los mecanismos de defensa celulares, a este respecto los resultados del estudio realizado por Pinos-Lagos *et al.*, (2011), muestran que la vitamina A produce señalización simultánea con el desarrollo de la inflamación. También encontraron que los modelos de vacunación y el rechazo de injertos

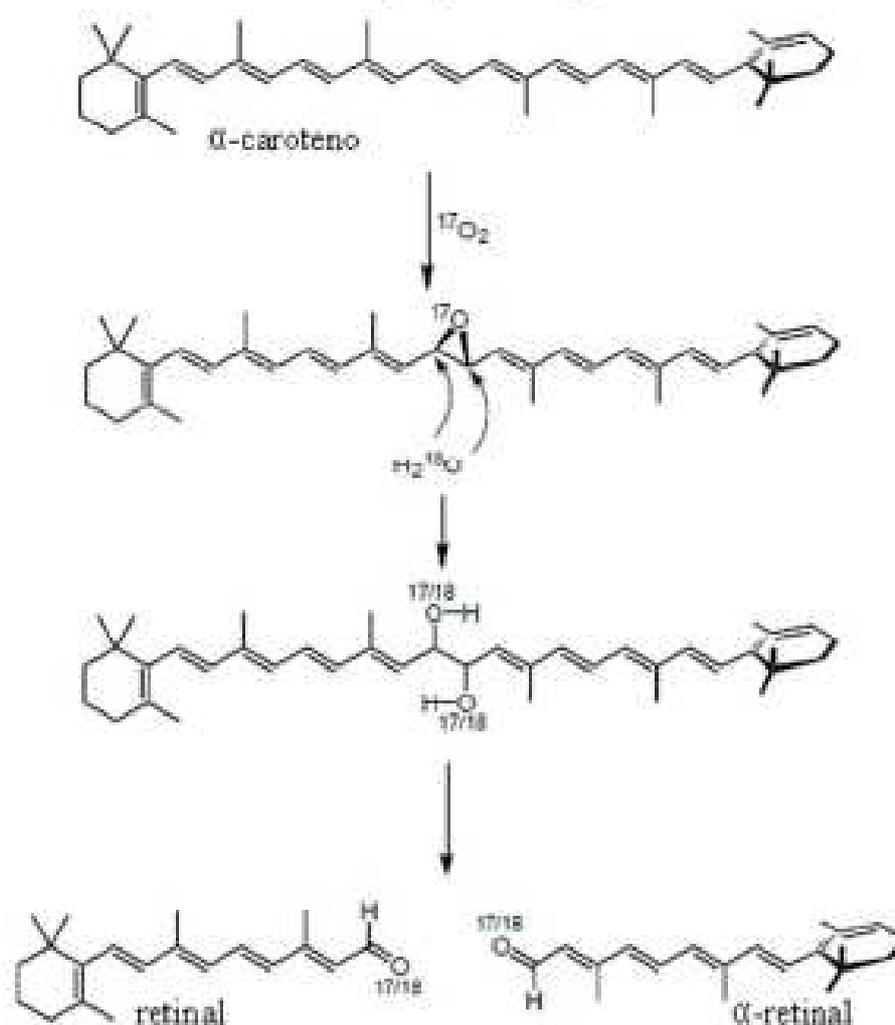


Figura 6. Estructura cristalina de la BCMO2 de *Synchocystis* sp. Cargas positivas, negativas e residuos no polares estas representados en azul, rojo y amarillo, respectivamente. El átomo de hierro catalítico esta indicado por el círculo rojo, el sustrato es de color negro/rojo. A) el corte a través de la molécula aproximadamente a lo largo del eje de las hélices, revelando un bolsillo que penetra desde el centro a lo largo del eje de las hélices hacia el centro, donde se encuentra el hierro catalítico. Sin embargo, el corte muestra el túnel de unión del sustrato que entra a la protena desde el lado derecho, cambiando su dirección cerca del centro y el final del túnel sale en la parte superior izquierda. B) Vista del sustrato (3R)-3-hidroxi-8'- β -apo-carotenol en el corte de la enzima. Tomado de Kloer, D. P. and C. E. Schulz. 2006 Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:2291.

alógenicos (de un individuo a otro perteneciente a la misma especie), son señalizados temporal y espacialmente (restringido a la zona de inflamación) por la vitamina A, reclutando células inflamatorias, promoviendo migración y polaridad (Pino-Lagos *et al.*, 2011). Rhee *et al.* (2011) encontraron en su estudio que la vitamina A tiene influencia sobre el proceso vascular de la arterioesclerosis. Los modelos animales preclínicos y estudios celulares permiten soportar este concepto. Los retinoides muestran efectos

complejos en la proliferación, crecimiento, diferenciación y migración de células musculares lisas vasculares, incluyendo la respuesta a la lesión y a la arterioesclerosis. Las evidencias mostradas por Rhee *et al.* (2011), sugieren que los retinoides pueden involucrar la calcificación vascular y la función endotelial, por ejemplo, por la modulación de la vía del óxido nítrico. Además en este estudio Rhee *et al.* (2011) establecieron efectos de los retinoides en el metabolismo de los lípidos y la adipogénesis puede

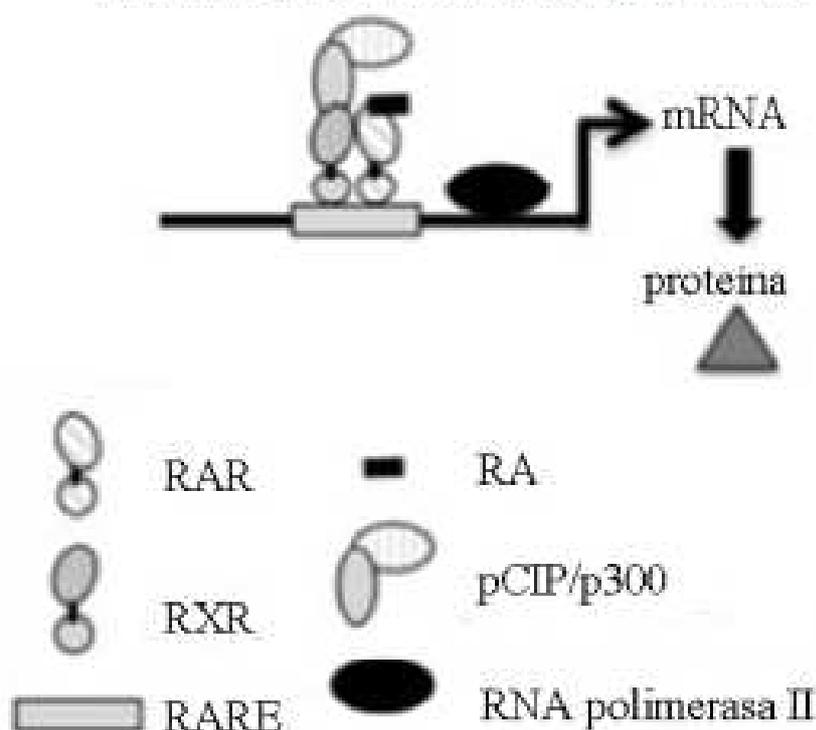


Figura 7. Respuesta transcripcional al ácido retinoico. Se muestran los factores de transcripción, elementos de respuesta, ácido retinoico y RNA polimerasa; complejo que promueve la transcripción de un gen. Tomado de Cudas, L. J. and J. A. Wagner. 2011. Retinoids regulate stem cell differentiation. *J. Cell. Physiol.* 226:322.

indirectamente influenciar la inflamación y la arterioesclerosis (Rhee *et al.*, 2011).

Como mencionamos con anterioridad, la vitamina A estimula a las células a la diferenciación, lo cual está siendo utilizado para pacientes con algún tipo de cáncer como cáncer de piel, neuroblastoma o glioblastoma, entre otros, donde se administra terapia con vitamina A y al finalizar la misma, se aplica quimio y radioterapia, con una mejora significativa con elevada sobrevivencia de los pacientes. Con este antecedente y con el uso del vitamina A en células neoplásicas ha permitido el estudio de los inhibidores de desacetilasas de histonas, permitiendo una combinación terapéutica para el tratamiento de estos padecimientos (Cudas y Wagner, 2011). Así mismo se ha utilizado terapia antioxidante con elevadas dosis de vitamina (combinación de vitamina A, vitamina C y vitamina E) en casos severos de pancreatitis, esto basado en el hecho de que estas tres vitaminas se oxidan retirando del medio celular metabolitos oxidantes que de manera natural se producen en la célula y que las lesionan. Los resultados del estudio muestran que esta terapia antioxidante no produjo beneficio significativo en los pacientes que tenían pancreatitis severa aguda (Bansal *et al.*, 2011). Con lo

mostrado, se puede mencionar que hay mucho que hacer en el estudio de las funciones que la vitamina A produce en las diferentes células.

Regulación de la expresión de la enzima β -caroteno 15, 15' monooxigenasa

Dos subgrupos de la superfamilia de receptores hormonales nucleares modulan las respuestas celulares a la vitamina A, en su forma de ácido retinoico: los RXR y los RAR. El ácido desoxirribonucleico (ADN) presenta una región denominada región promotora de los elementos de respuesta del ácido retinoico (RARE) a la cual se unen los factores de transcripción (RAR y/o RXR) y el ácido retinoico, los cuales regularán la transcripción de los genes blanco. Estos factores de transcripción, son altamente expresados en tejido adiposo blanco y tejido adiposo café o pardo. El ácido retinoico auto-modula los niveles de estado estacionario de sus receptores (tanto RAR como RXR). En ratones silvestres, el contenido de lípidos y el potencial termogénico mostraron ser dependientes de vitamina A (Ribot *et al.*, 2001).

Boulanger *et al.* (2005) encontraron que los factores transcripcionales relacionados con PPAR se unen al sitio PPRE presente en el promotor de la BCMO1 y concluyeron que al menos PPAR α se une

específicamente al elemento PPRE y que posiblemente también PPAR α ó PPAR α /A. Así mismo, Boulanger *et al.* (2003), mostraron que en las células TC7 (células de carcinoma de colon humano, subclones de las células Caco-2) existe, además del PPRE, la secuencia AGGTCA A AGGTCA en el promotor de la BCMO1 que no había sido reportado con anterioridad, el cual deriva del sitio de unión preferencial de unión para el heterodímero PPAR/RXR (GGGTCA A AGGTCA), sugiriendo especificidad para la heterodimerización u homodimerización (Boulanger *et al.*, 2003).

Así mismo, la expresión génica de la enzima es afectada por el estado nutricional. Se ha demostrado que la actividad de esta enzima es promovida por dietas que contienen ácidos grasos poliinsaturados y depleción de cobre en ratas. Es inhibida por suplementación con flavonoides en cerdos y consumo de vitamina A en ratas (ácido retinoico todo trans pero no ácido retinoico 9-cis en hígado; ácido retinoico todo trans y 9-cis en intestino delgado y testículo) (Takitani *et al.*, 2006).

La actividad intestinal de la BCMO1 es promovida por la deficiencia de vitamina A mientras que la suplementación con β -caroteno disminuye la actividad. Para prevenir el exceso de retinol, el balance puede ocurrir a nivel de conversión de β -caroteno a retinal (Takitani *et al.*, 2006).

Lobo *et al.*, (2010) mostraron que el RNAm de la BCMO1 y la expresión son inducidas durante la adipogénesis en cultivo celular. También observaron que el ácido retinoico interfiere con la activación transcripcional de PPAR α a través de la proteína α de unión (C/Ebp α), durante la conversión de preadipocito a adipocito, posiblemente por competencia por cofactores. Adicionalmente, Lobo *et al.*, (2010) mencionan que, la vitamina A ha sido implicada en el incremento en la capacidad para el metabolismo oxidativo y para inducir la lipólisis de triacilglicéridos almacenados en adipocitos; estos efectos son explicados, al menos en parte, por la activación directa los receptores de ácido retinoico en los genes blanco. La reducción de la expresión de PPAR γ dependiente de vitamina A (en su forma de ácido retinoico) y la inducción del metabolismo oxidativo así como la lipólisis, resulta en la capacidad reducida de almacenamiento de grasa en el adipocito (Lobo *et al.*, 2010). Consecuentemente, el aumento de la concentración de vitamina A (retinol superior a 5mM) inhibe la diferenciación de los adipocitos y la acumulación de grasa dentro de adipocitos en cultivo *in vitro*. Además se probó que la adiposidad del ganado bovino se incrementó con dietas de finalización sin suplementación de vitamina A, mejorando el

marmoleo y aumentando el contenido de lípidos extraídos con éter (Pickworth *et al.*, 2011).

En el intestino, la expresión del factor de transcripción específico de intestino (del inglés ISX), se observa en las criptas y permite la diferenciación y función celular, pero no es esencial para proliferación del epitelio intestinal; es activado por vitamina A via RAR que se une a el elemento de respuesta de la vitamina A en su forma de ácido retinoico específico (RARE) con el promotor ISX. Una vez activado, ISX reprime el SR- β 1 y la expresión de BCMO1, indicando que la vitamina A es absorbida y producida en intestino bajo el control de retroalimentación negativa vía inducción de la expresión de ISX (Lietz *et al.*, 2010).

Regulación de la actividad de la enzima β -caroteno 15, 15' monooxigenasa

Debido a que el β -caroteno es el precursor de la vitamina A, la administración de dosis elevadas de éste en humanos no causa hipervitaminosis ni la consecuente intoxicación (como lo causaría la vitamina A), por lo que se ha sugerido que la síntesis de vitamina A por ruptura de β -caroteno debe ser regulada por los niveles de esta vitamina en el organismo, respondiendo a un sistema de retroalimentación negativa (Morales, 2006; Lietz *et al.*, 2010). Hay una conversión más efectiva del β -caroteno en ratas alimentadas con bajas dosis de vitamina A comparada con aquellas que reciben altas dosis de vitamina A dietaria (Lietz *et al.*, 2010).

Por otro lado, el status de la vitamina A afecta la absorción de β -caroteno y es posiblemente el factor más importante que afecte la actividad de la BCMO1. A nivel intestinal se controla la absorción de β -caroteno y la producción de vitamina A por un mecanismo de retro alimentación (Allen, 1989; Lietz *et al.*, 2010).

Una adecuada ingestión de proteína de alta calidad es crucial para la expresión de la proteína BCMO1. Se demostró que en ratas deficientes en proteína, la actividad intestinal de la BCMO1 fue baja, en comparación con las ratas alimentadas con una dieta suficiente en proteína. Además se demostró una actividad BCMO1 en ratas con deficiencia de vitamina A, 2.8 veces superior después de recibir una dieta con 20% de proteína comparada con aquellas que recibieron solo 5% de proteína en la dieta. Hombres que recibieron dietas con 40% de proteína revelaron niveles de vitamina A superiores en hígado, intestino y tejido adiposo en comparación con aquellos hombres que fueron alimentados con 10% o 20% de proteína en la dieta (Lietz *et al.*, 2010). Este es un efecto generalizado de una deficiencia de proteína.

En ensayos *in vitro* usando BCMO1 intestinal de

rata, la conversión de provitamina A fue afectada por la adición de otros carotenoides diferentes al β -caroteno, por ejemplo, la adición de luteína en combinación con β -caroteno en una relación de 3:1 (luteína/ β -caroteno) ha mostrado disminución en la conversión de β -caroteno en retinal, sin embargo esto no fue observado en otros estudios donde se adicionó luteína desde 1:1 hasta 4:1 (luteína/ β -caroteno) para la incubación. Contrariamente, la adición de zeaxantina, la cual es un isómero de luteína, el cual inhibe la actividad de BCMO1 en una relación de 1:1 (zeaxantina/ β -caroteno). Adición de δ -caroteno también reduce la producción de retinal formado hasta por 32%, ya que la división de δ -caroteno, resulta en una sola molécula de todo-trans-retinal en vez de dos como cuando el sustrato es β -caroteno. Los factores que pueden contribuir a las interacciones entre los carotenoides que no son provitamina A y la actividad de la BCMO1 son: 1) competencia del β -caroteno, cantaxantina, zeaxantina o luteína para solubilización en la micelas mixtas y la absorción en el intestino; 2) la cantaxantina inhibe la BCMO1; 3) la cantaxantina inhibe una de las enzimas involucradas en la conversión de retinal a ésteres de retinil, ó 4) realzar el catabolismo de la vitamina A (Lietz *et al.*, 2010).

Se ha visto que el apo-8'-carotenal disminuye la actividad de la BCMO1. Más importante, apo-8'-carotenal fue capaz de almacenar retinol sérico en ratas con agotamiento de vitamina A, mientras que cuando se administró apo-12'-carotenal se alcanzó solo el 50% de la concentración normal de retinol sérico, indicando que el apo-8'-carotenal es mejor sustrato para la BCMO1 (Lietz *et al.*, 2010).

Es necesario tener presente que debido a que los vertebrados no pueden sintetizar la vitamina A de novo, esta solo se obtiene de la ruptura oxidativa de los carotenoides provitamina A en la dieta por acción de la BCMO1. Y que la vitamina A es necesaria en diversas funciones celulares, como se ha descrito anteriormente, por lo que la BCMO1 se convierte en un elemento celular indispensable dentro de la producción animal.

Es necesario hacer más estudios sobre la regulación de la actividad de la BCMO1 a nivel molecular en las diferentes especies productoras de leche, carne, huevo etc., para lograr a futuro manipular la actividad de la enzima de tal forma que se promuevan diferentes fases de la producción animal.

Implicaciones en producción animal

Los carotenoides provenientes de la dieta son importantes para los animales en producción ya que además de dar color a la piel, la yema de huevo y la grasa, ayudan a mejorar la respuesta inmune, mejoran la calidad del semen y de los embriones e incluso

se han propuesto como predictores del sistema de alimentación de donde provienen los animales. En el caso de los bovinos la deposición de β -caroteno, proveniente de los forrajes, resulta detrimental para la comercialización de las canales de estos animales (Simpson, 1983; Mora y Shimada, 2001; OIE, 2003; Barrón-Gutiérrez *et al.*, 2004; Minguez *et al.*, 2005).

Existen dos vías oxidativas principales para la conversión de β -caroteno en apocarotenoides: a) la ruptura central (BCMO1) que genera retinoides (vitamina A), y b) la ruptura excéntrica (BCMO2), que forma β -apo-10'-carotenales y β -ionona. Las enzimas BCMO1 y BCMO2 han sido detectadas en diferentes tejidos.

Se sabe que existen diferencias en los aminoácidos que constituyen el sitio activo en la BCMO1 entre humano, ratón, rata, pollo y bovino. Las mutaciones genéticas que producen el reemplazo de aminoácidos en el sitio activo de la BCMO1 disminuyen la actividad de la enzima hasta un 90%. Se puede pensar que las diferencias de la actividad de la BCMO1 entre las especies animales podrían ser atribuidas a la posición y naturaleza de los aminoácidos en el sitio activo, ya sea por mutaciones o por modificaciones postranscripcionales de la enzima BCMO1, lo que implicaría diferencias en la producción de vitamina A y en el acúmulo de β -caroteno en diferentes tejidos, dependiendo de la especie animal de que se trate.

En el caso de la BCMO2 de bovinos y ovinos se han detectado mutaciones relacionadas con el color de la grasa subcutánea y la concentración de β -caroteno en plasma y leche, aún cuando faltan investigaciones al respecto, ésta se podría utilizar como un predictor del amarillamiento de la canal en éstas especies.

Respecto a la importancia de la BCMO1 en el metabolismo, el promotor del gen de dicha enzima tiene un elemento de respuesta para PPARs, por lo que la expresión de dicha enzima está en parte regulada por dichos factores de transcripción. Los PPARs controlan la expresión de genes del metabolismo de lípidos y la glucosa. PPAR γ y β/δ regulan la oxidación de los ácidos grasos en músculo e hígado y PPAR α es fundamental para la diferenciación de los adipocitos y la lipogénesis en adipocitos maduros, por lo que ésta enzima resulta importante en la diferenciación y metabolismo del tejido adiposo.

Por otro lado la BCMO1 es muy importante en el metabolismo de la vitamina A y de su receptor (RAR), dicho compuesto influye en la diferenciación celular y es esencial durante el desarrollo embrionario, además de influenciar la diferenciación de los adipocitos y la deposición de la grasa, el desacoplamiento mitocondrial, el metabolismo oxidativo y la expre-

sión de adipocinas como la leptina, y la resistina, lo que ejemplifica la importancia de esta enzima en procesos metabólicos esenciales para la producción de huevo, leche y carne (Lobo et al., 2010).

Como ya se mencionó, el aumento en la concentración de vitamina A (5nM en forma de retinol) en cultivo celular inhibe la diferenciación de los adipocitos y la acumulación de grasa. De forma contraria la adiposidad del ganado bovino se incrementó con dietas de finalización sin suplementación de vitamina A, mejorando el marmoleo y aumentando el contenido de lípidos extraídos con éter (Pickworth et al., 2011).

Por todo lo anterior, sería conveniente por un lado, continuar investigando sobre el impacto de esta enzima en cada una de las especies productivas, así como en cada etapa de producción, no solo para entenderlo desde el punto de vista bioquímico y molecular sino también para incrementar o disminu-

nuir su expresión o para seleccionar a aquellos animales que presenten mayor actividad de BCMO1 y por otro lado estudiar mejores y más eficientes formas de administración de vitamina A en las especies productivas, para aumentar rendimiento y mejorar la calidad de los productos obtenidos de ellas.

Literatura Citada

- Allen, O. J. 1964. The biosynthesis and metabolism of carotenoids and retinol (vitamin A). *J. Lipid Res.* 5:281.
- Allen, O. J. and O. Hayashi. 1965. The enzymatic cleavage of β -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 54:1364.
- Allen, O. J. 1989. Provitamin A function of carotenoids: The conversion of β -carotene into vitamin A. *J. Nutr.* 119:105.
- Alvarez, A. C. J. 2009. Diferencias en la expresión de β -caroteno-15,15'-oxigenasa en tres especies de rumiantes. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Bansal, D., A. Bhatta, D. K. Bhasin, P. Pandey, N. Sharma, S. Rana, and S. Malhotra. 2011. Safety and efficacy of vitamin-based antioxidant therapy in patients with severe acute pancreatitis: a randomized controlled trial. *Saudi J Gastroenterol.* 17(3):174.
- Barrón-Cabrero, S., C. García-Rojas, O. Mora-Isaguirre y A. Shimada-Miyasaka. 2004. Impacto económico de la pigmentación del tejido adiposo en bovinos en pastoreo en el trópico. *Agrociencia.* 58(2):173.
- Bertrand, M. 2010. Carotenoid biosynthesis in diatoms. *Photosynth Res.* 106:89.
- Bhosale, P. and P. S. Bernstein. 2007. Vertebrate and invertebrate carotenoid-binding proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 458:21.
- Bodnariga, A., P. McLemore, N. G. Copeland, C. D. Gilbert, N. A. Jenkins, S. S. Yu, S. Gentileman, and T. M. Redmond. 2003. Identification of β -carotene 15,15'-monooxygenase as a peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *FASEB J.* 17:1304.
- Brandenburg, T. D. and C. Y. Hu. 2005. Regulation of differentiation pig preadipocytes by retinoic acid. *J. Anim. Sci.* 83:98.
- Bugg, T. D. H. 2003. Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron.* 59:7075.
- Choi, S. K., Y. Nishida, S. Matsuda, K. Adachi, H. Kasai, X. Feng, S. Komsomsho, W. Miki, and N. Misawa. 2005. Characterization of β -carotene ketolases, CrW, from marine bacteria by complementation analysis in *Escherichia coli*. *Mar Biotechnol (NY).* 7:515.
- Chen, A. J., N. P. Rotstein, J. P. San Giovanni, A. During, E. Y. Chew, and L. E. Polit. 2007. Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48(11):5168.
- Clydesdale, F. M. 2000. Natural pigmentic carotenoids, anthocyanins and betalains - characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40(3):231.
- Dolganov, V. F., A. R. Jiménez, and L. O. Parades. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains. Characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40(3):173.
- Dorning, D. M. and J. W. Erdman. 1999. Mammalian carotenoid absorption and metabolism. *Pure Appl. Chem.* 71(12):2213.
- During, A., A. Nagai, C. Hoshino, and J. Terao. 1996. Assay of β -carotene 15,15'-dioxygenase activity by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 241(2):199.
- During, A., A. Nagai, and J. Terao. 1998. β -carotene 15,15'-dioxygenase activity and cellular retinol-binding protein type II level are enhanced by dietary unsaturated triacylglycerols in rat intestines. *J. Nutr.* 128:1614.
- During, A., M. Fields, C. G. Lewis, and J. C. Smith. 1999. β -carotene 15,15'-dioxygenase activity is responsive to copper and iron concentrations in rat small intestine. *J. Am. Coll. Nutr.* 18(4):309.
- During, A., M. K. Smith, J. B. Piper and J. C. Smith. 2001. β -Carotene 15,15'-dioxygenase activity in human tissues and cell: evidence of an iron dependency. *J. Nutr. Biochem.* 12:640.
- During, A., H. East, and E. H. Harrison. 2004. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. *Arch. Biochem. Biophys.* 430:77.
- Erbov, L. V., A. A. Dmitrievskii, and V. Bykovoiskii. 1993. Properties of beta-carotene-15,15'-dioxygenase, stabilized during purification with lactin and dithiothreitol. *Biochimia.* 58:416.
- García-Rojas, P., A. Aniraman, L. González-Dávalos, F. Villarroya, A. Shimada, A. Varela-Echevarría and O. Mora. 2010. Induction of peroxisomal proliferator-activated receptor γ and peroxisomal proliferator-activated receptor γ coactivator 1 by unsaturated fatty acids, retinoic acid, and carotenoids in preadipocytes obtained from bovine white adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 88:1801.
- Gong, X., S. W. Tsai, B. Yan and L. P. Rubin. 2006. Crosstalk between MEF2 and PPAR α in human intestinal β -carotene 15,15'-monooxygenase gene expression. *BMC Mol. Biol.* 7:7.
- Goodman, D., H. Huang, M. Kane and T. Shimotori. 1967. The enzymatic conversion of all-trans beta-carotene into retinol. *J. Biol. Chem.* 242:3243.
- Goodwin, T. W. 1954. The comparative biochemistry of the carotenoids. Chemical Publishing Co., Inc. New York, E. U. A.
- Goodwin, T. W. 1993. Biosynthesis of carotenoids: an overview. *Methods Enzymol.* 214:330.
- Gudes, L. J and J. A. Wagner. 2010. Retinoids regulate stem cell differentiation. *J. Cell. Physiol.* 226:322.
- Grolier, P., C. Duscka, P. Borel, M. C. Alexandre-Gouabau and V. Anas-Bravo. 1997. In vitro and in vivo inhibition of β -carotene dioxygenase activity by canthaxanthin in rat intestine. *Arch. Biochem. Biophys.* 348(2):233.
- Hammershøj, M., U. Kidmose, and S. Stenfeldt. 2010. Deposition of carotenoids in egg yolk by short-term supplement of coloured carrot (*Daucus carota*) varieties as

Image material for egg-laying hens. *J. Sci. Food Agric.* 90:1163.

International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry. 1974. Nomenclature of carotenoids. Butterworths, London.

Karwe, P. and E. Jucker. 1948. Carotenoids. Elsevier Publishing Company, Inc. London.

Kiefer, C., S. Hassel, J. M. Lampert, K. Vogt, M. O. Lederer, D. E. Bretthaupt and J. von Lintig. 2001. Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J. Biol. Chem.* 276(17):14110.

Kim, Y. S., N. H. Kim, H. J. Kim, J. K. Lee, S. W. Kim and D. K. Oh. 2007. Effective production of retinal from β-carotene using recombinant mouse β-carotene 15,15'-monooxygenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:1339.

Kim, Y.S. and D. K. Oh. 2009. Substrate specificity of a recombinant chicken beta-carotene 15,15'-monooxygenase that converts beta-carotene into retinal. *Biotechnol. Lett.* 31:403.

Kim, Y. S., H. Nam-Kim, S. J. Yeom, S. W. Kim and D. K. Oh. 2009. In Vivo Characterization of a recombinant Bb protein from an uncultured marine bacterium as a β-carotene 15,15'-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 284(23):15781.

Kim, Y. S. and D. K. Oh. 2010. Biotransformation of carotenoids to retinal by carotenoid 15,15'-oxygenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88(4):807.

Klose, D., S. Rush, S. Al-Balili, P. Boyer and G. Schultz. 2005. The structure of a retinal forming carotenoid oxygenase. *Science* 308:267.

Kloer, D. P., and G. E. Schultz. 2006. Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cell Mol. Life Sci.* 63:2291.

Lakshmi, M. R. and C. Chah. 1993. Enzymatic conversion of all-trans-β-carotene to retinal. *Methods Enzymol.* 214:256.

Lakshmi, M. R. 2004. Alpha and omega of carotenoid cleavage. *J. Nutr.* 134:241.

Leusenberger, M. G., C. Engstlech-Jurist and W. D. Woggon. 2001. The reaction mechanism of the enzyme-catalyzed central cleavage of β-carotene to retinal. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40(14):2613.

Lewis, K. C., M. H. Green, G. J. Balmer, and L. A. Zach. 1990. Retinal metabolism in rats with low vitamin A status: a compartmental model. *J. Lipid Res.* 31:1535.

Liste, G., J. Lange, and G. Rimbach. 2010. Molecular and dietary regulation of β-carotene 15,15'-monooxygenase 1 (BCMO1). *Arch. Biochem. Biophys.* 502:8.

Lindqvist, A., and S. Andersson. 2002. Biochemical properties of purified recombinant human β-carotene 15,15'-monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 277:25942.

Lubo, G. F., J. Amargual, H. N. M. Li, M. Golczak, M. L. Borst, K. Pakizowski and J. von Lintig. 2010. β-carotene increases peroxisome proliferator receptor α activity and reduces lipid storage capacity of adipocytes in a β-carotene oxygenase 1-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 285(36):27891.

MacDonald, P. N. and D. E. Ong. 1988. Evidence for a chicken retinal acyltransferase activity in the rat small intestine. *J. Biol. Chem.* 263:13478.

Mangayakoti, M.G., P. A. Martins, T. Srajlovic, C. L. Cardobeno and S.P. Marsili. 2010. Effect of lycopene on semen quality, fertility and native immunity of broiler breeder. *Br. Poult. Sci.* 51(1):152.

Mayne, S. T., G. J. Handelsman and G. Beecher. 1995. Beta-carotene and lung cancer promotion in heavy smokers-a plausible relationship? *J. Natl. Cancer Inst.* 88(21):1513.

Minguez, M. M. I., G. A. Pérez and M. D. Hormón. 2005. Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales: mucho más que simples colorantes naturales. Grupo DE química y bioquímica de pigmentos. Departamento de Biotecnología de Alimentos. Instituto de la Grasa (Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Sevilla, España. <http://www.ig.csic.es/>

Mora I.C. 1998. Estudio sobre el metabolismo de los carotenos en bovinos para prevenir la pigmentación de la grasa. Tesis doctoral. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Mora, I.C. y A. Shimada. 2001. Causas de color amarillo de la grasa de canales de bovinos finalizados en pastoreo. *Vel. Mex.* 32(1):63.

Mora, I.C. 2001. Presence of fed β-carotene in digesta, excreta, blood and hepatic and adipose tissues of Holstein steers. *Can. J. Anim. Sci.* 81:133.

Morales, T. A. 2006. Secuencia de cDNA y expresión de β-caroteno monooxygenasa en bovinos. Tesis doctoral. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. México

Morales, T. A., A. Rosas, A. González, A. Ariaramian, A. Vanda-Echavarría, A. Shimada, O. Mora. 2006. Cloning of the bovine β-carotene-15,15'-oxygenase and expression in gonadal tissues. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 76(1):9.

Nagao, A., M. Maeda, B. P. Lim, H. Kobayashi and J. Teram. 2000. Inhibition of β-carotene-15,15'-dioxygenase activity by dietary flavonoids. *J. Nutr. Biochem.* 11:348.

Nagao, A. 2009. Absorption and function of dietary carotenoids. Yoshikawa T (ed) Food factors for health promotion. *Forum Nutr. Basel, Karger.* 61:55.

Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE). 2003. Informe de la segunda reunión del grupo de trabajo de la OIE sobre seguridad sanitaria de los alimentos derivados de la producción animal. Roma (Italia).

Pickworth, C. L., Lorenz, S. C. and Fluharty, F. L. 2011. Restriction of vitamin A and D in beef cattle finishing diets on feed lot performance and adipose accretion. *J. Anim. Sci.* published online Dec 16, 2011.

Pino-Lagos, K., Y. Guo, C. Brown, M. P. Alexander, R. Elgueta, K. A. Bennett, V. De Vries, E. Nowak, R. Blomhoff, S. Soekranathan, R. A. Chandraratna, E. Dmitrovsky, R. J. Neufele. 2011. A retinoic acid-dependent checkpoint in the development of CD4+ T cell-mediated immunity. *J. Exp. Med.* 9:1767.

Pólkárov, E., S. Gendelman, F. X. J. Cunningham, N. J. Millenbitt and T. M. Redmond. 2005. Key role of conserved histidines in recombinant mouse β-carotene 15,15'-monooxygenase-1 activity. *J. Biol. Chem.* 280:29217.

Redmond, T., S. Gendelman, T. Duncan, S. Yu, B. Wiggert and E. Carit. 2001. Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian beta-carotene 15, 15'-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 276:6560.

Rhee, E. J., S. Nallamshetty and J. Plutsky. 2011. Retinoid metabolism and its effects on the vasculature. *Biochim. Biophys. Acta.* 1821:250.

Ribot, J., F. Folque, M. L. Borst and A. Falco. 2001. Changes of adiposity in response to vitamin A status correlate with changes of PPARα2 expression. *Obes. Res.* 9(8):500.

Römer, S. and P. D. Fraser. 2005. Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta.* 221:305.

Rührle, F. T., A. P. Moloney, M. T. O'Leary, G. Luciano, A. Priolo, P. Caplan, F. J. Morahan. 2011. Carotenoid, colour and reflectance measurements in bovine adipose tissue to discriminate between beef from different feeding systems. *Meat Sci.* 88(3):347.

Sadmann, G. 2006. Production of carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. *Food Biotechnology*. K. Shetty, G. Paliyath, A. Pomatto and R. E. Levin (eds). Second edition. Taylor and Francis Group.

Salas, J. N., L. M. Díaz, A. T. Viveiros, M. N. Pereira, J. C. Souza. 2008. Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with beta-carotene and tocopherol. *Anim. Reprod. Sci.* 106(1-2):77.

Sammer, M., P. J. Babin, M. Durjat, I. Meiri, I. Zchori, A. Elzur and E. Lubzens. 2001. Retinol binding protein in rainbow trout: Molecular properties and mRNA expression in tissues. *Gen. Comp. Endocrinol.* 123:51.

Schweigert, F.J., I. Ruchholz, A. Schalmacher and J. Gropf.

2001. Effect of dietary beta-carotene on the accumulation of beta-carotene and vitamin A in plasma and tissues of gilts. *Reprod. Nutr. Dev.* 41(1):47.
- Sampson, K. L. 1983. Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. *Proc. Nutr. Soc.* 42:7.
- Singh, H. and H. R. Cama. 1974. Enzymatic cleavage of carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta.* 370:49.
- Takitani, K., C. L. Zhu, A. Inoue and H. Tamai. 2006. Molecular cloning of the rat β -carotene 15,15'-monooxygenase gene and its regulation by retinoic acid. *Eur. J. Nutr.* 45:320.
- van Vliet, T., F. van Schaik, W. H. P. Schreurs and H. van der Berg. 1996. In vitro measurement of β -carotene cleavage activity: methodological considerations and the effect of other carotenoids on β -carotene cleavage. *Int. J. Vit. Res.* 66:77.
- von Lintig, J. and A. Wyss. 2001. Molecular analysis of vitamin A formation: Cloning and characterization of β -carotene 15,15'-dioxygenases. *Arch. Biochem. Biophys.* 385(1):47.
- von Lintig, J. and K. Vogt. 2004. Vitamin A formation in animals: Molecular identification and functional characterization of carotene cleaving enzymes. *J. Nutr.* 134(1):251S.
- von Lintig, J. 2010. Colors with functions: Elucidating the biochemical and molecular bases of carotenoid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 30:35.
- Wyss, A., G. Wirtz, W. D. Woggon, R. Brugger, M. Wyss, A. Friedlein, H. Bachmann and W. Hunziker. 2000. Cloning and expression of β , β -carotene 15,15'-dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271:334.
- Wyss, A. 2004. Carotene oxygenases: A new family of double bond cleavage enzymes. *J. Nutr.* 134(1):246S.
- Yamaguchi, N., T. Yamamoto, K. Surogo and S Takase. 2007. Developmental changes in gene expression of β -carotene cleavage enzymes and retinoic acid synthesizing enzymes in the chick duodenum. *Comp. Biochem. Physiol.* 148(3):690.
- Yeum, K. J. and R. M. Russell. 2000. Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annu. Rev. Nutr.* 22:483.
- Zarighien, S., T. Y. Nam, M. T. Ninkamuru and Jr J. W. Erdman. 2006. Dietary lycopene downregulates carotenoid 15,15'-monooxygenase and FFAR4 in selected rat tissues. *J. Nutr.* 136:932.

3. HIPOTESIS

Los microorganismos transformados con actividad enzimática de β -caroteno 15, 15' monooxigenasa no alteran su metabolismo, sobreviven, producen la enzima en cultivo puro y puede degradar β -caroteno produciendo retinal en el líquido ruminal *in vitro*.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la proteína recombinante β -caroteno, 15,15'-monooxigenasa (BCMO1) de la especie *Gallus gallus*, expresada en *E. coli*.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener microorganismos genéticamente modificado con actividad β -caroteno 15, 15' monooxigenasa
2. Medir la actividad β -caroteno 15, 15' monooxigenasa en los microorganismos modificados, aislados y en competencia con otros microorganismos ruminales
3. Medir los cambios en el crecimiento bacteriano por efecto de la modificación genética.

5. MATERIALES, METODOS Y RESULTADOS

***In vitro* conversion of β -carotene to retinal in bovine rumen fluid by a recombinant β -carotene-15, 15'-monooxygenase**

E. García-López, A. González-Gallardo, A. Antaramián, M.L González-Dávalos, A. Shimada, A. Varela-Echavarria, O. Mora

Artículo enviado y aceptado para su publicación en el: International Journal for Vitamin and Nutrition Research.

International Journal for Vitamin and Nutrition Research

Laboratory of Human Nutrition
Institute of Food, Nutrition and Health
Swiss Federal Institute of Technology, Zürich
ETH Zentrum, LfV D 22
Schmelzbergstrasse 7
CH-8092 Zürich, Switzerland

E-mail: ijvnr@ilw.agrl.ethz.ch

Doctor Ofelia Mora
Universidad Nacional Autónoma de México
Blvd. Bernardo Quintana 514-D
Suite 23-141
Querétaro, Querétaro
México. CP 76140

Zürich, March 14, 2012

Manuscript: *In vitro* conversion of β -carotene to retinal in bovine rumen fluid by a recombinant β -carotene-15, 15'-monooxygenase (REF. 11/759)

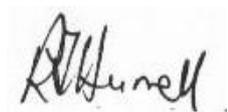
Dear Dr. Mora,

Thank you for submitting your manuscript to the IJVNR. I am pleased to inform you that the Editorial Board has decided to accept the manuscript for publication in its present form.

To cover the costs of publishing, authors are required to contribute CHF. 90. - per printed page. The corresponding invoice will be sent to you by the publishers, Hogrefe & Huber, in Bern, together with the galley proofs.

To expedite publication, it is essential that the proofs and the page charge be returned as quickly as possible. Without payment, the paper cannot be published

Yours sincerely



Richard Hurrell, PhD
Professor
Editor-in-Chief

Original Communication

In Vitro Conversion of β -Carotene to Retinal in Bovine Rumen Fluid by a Recombinant β -Carotene-15, 15'-Monooxygenase

Esperanza García-López¹, Adriana González-Gallardo², Anaïd Antaramián²,
María Laura González-Dávalos³, Armando Shimada²,
Alfredo Varela-Echavarría², and Ofelia Mora³

¹Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México

²Instituto de Neurobiología, UNAM, Juriquilla, Gro, México

³Laboratorio de Rumología y Metabolismo Nutricional (RuMeN), Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM, México

Received: June 16, 2011; Accepted: March 14, 2012

Abstract: Pasture-fed cattle yield carcasses with yellow fat; consumers often reject the resulting meat products because they assume they come from old and/or culled animals. Recombinant bacteria expressing β -carotene 15, 15'-monooxygenase, introduced into the rumen of the animal, might help to reduce the coloration since this enzyme converts carotene to retinal, thereby eliminating the source of yellowness. The goal of this work was to evaluate the effect of a recombinant β -carotene 15, 15'-monooxygenase (BCMO1) from *Gallus gallus*, expressed in *Escherichia coli*. The genetically modified microbe was introduced into ruminal fluid, and carotene conversion to retinal was measured. Under optimum conditions the enzyme produced 6.8 nmol of retinal per 1 mg of protein in 1 hour at 37°C. The data on *in vitro* digestibility in ruminal fluid showed no differences in β -carotene breakdown or in retinal production ($p > 0.1$) between *E. coli* with pBAD vector alone and *E. coli* with pBAD/BCMO1. The pBAD/BCMO1 plasmid was stable in *E. coli* for 750 generations. These results indicate that the protein did not break β -carotene into retinal in ruminal fluid, perhaps due to its location in the periplasmic space in *E. coli*. Future research must consider strategies to release the enzyme into the rumen environment.

Key words: recombinant chicken β -carotene-15,15'-monooxygenase, carcass, yellow fat, β -carotene, retinoids, *in vitro* digestibility

Introduction

Most cattle in tropical countries are pasture-fed, due to the high yields and good quality forages; however, under these conditions 10% of the resulting carcasses show carcass fat with yellow pigmentation, which results from storage of β -carotene in adipose tissue. The yellowness of carcasses is an important economic problem, because consumers prefer white fat, although the yellow color affects neither the flavor nor the nutritive value of the meat [1, 2]. On the contrary, beef from pasture-based production systems is often promoted as being nutritionally superior for human consumption, due to its higher conjugated linoleic acid content and n-3/n-6 fatty acid ratio compared to beef from concentrate-fed animals [3].

The excess β -carotene in cattle that consume large quantities of β -carotene from plants is not sufficiently cleaved into vitamin A in the small intestine, but rather is packaged into chylomicrons and transported to the liver, where it can be transformed by a carotene oxygenase, stored with other lipid compounds, and carried to different tissues [4], including the adipose tissue [5, 6].

Carotenoids are normally present in green forages [1, 2, 7]; the main component, β -carotene, is not affected by ruminal fermentation [8] and is transported with other carotenoids and retinoids to the small intestine, where it can be absorbed. In the enterocyte, the enzyme β -carotene-15,15'-monooxygenase (BCMO1) cleaves β -carotene symmetrically into two molecules of all-trans-retinal or vitamin A [9–12].

It has been shown that the conversion efficiency of β -carotene into retinal or vitamin A inside the mucosal cells varies with species [13], and the ability of the intestine to cleave β -carotene into retinal is five times lower in bovine species than in goat; therefore, β -carotene depots in bovine adipose tissue are elevated, which would account for the yellowness of their carcasses [1, 2, 5, 14, 15]. In order to address this problem, some producers feed their animals with grain for 28 to 56 days before slaughter [2, 16], which reduces the yellowness of the fat but also increases production costs. Published BCMO1 studies have focused mainly on the characterization of the enzyme rather than the amount of retinal produced [17–24].

The aim of this study was to develop a recombinant bacterium *Escherichia coli* containing the chicken BCMO1 gene, and to determine its *in vitro* survival and the stability of BCMO1 enzymatic activity in ruminal fluid.

Material and methods

The experimental protocol was approved by the National Autonomous University of Mexico's Animal Care Advisory Committee [25]. All procedures were carried out in accordance with the Mexican Federal laws for animal care [26, 27]. One-day-old chickens were killed by decapitation, and duodenal mucosa samples were taken immediately thereafter.

Purification of total RNA

Total RNA from samples was purified using the Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. RNA was quantified with the NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE) at 260 and 280 nm, and had 260/280 ratios between 1.8 and 2.0. RNA integrity was verified by electrophoresis in a 1% agarose gel.

cDNA synthesis by RT-PCR

Reverse transcription was performed with 1 μ m total RNA and Oligo (dT)12–18 primer (Sigma-Genosys, St. Louis, MO) and SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. In order to reduce genomic DNA contamination, samples were treated with DNase for 15 minutes at room temperature followed by 5-minute incubation at 70°C.

Specific primers for chicken BCMO1 were designed using the published predicted sequence available at NCBI GenBank (accession number NM_204635) including the restriction site for *SacI*, forward: GAGCTCAGAGCGATGGAGACAATA and reverse: GAGCTCTTCCGTCTCAGCCC. Polymerase chain reaction (PCR) products were obtained using previously synthesized first-strand cDNA and the Recombinant Taq DNA Polymerase kit (Invitrogen) with 2 mM MgCl₂. PCR amplification parameters consisted of an initial denaturation at 94°C for 2 minutes, 30 cycles of denaturation at 94°C for 45 seconds, annealing for 45 seconds at 60°C, and extension at 72°C for 50 seconds, with a final 5-minute extension at 72°C. The PCR product (BCMO1) was subcloned into the pBAD vector (Invitrogen) with *SacI* using T4 ligase (Invitrogen) and then used to transform *E. coli* (XL Blue, Stratagene, La Jolla, CA). Restriction analysis and sequencing were done to confirm orientation and open reading frame of the pBAD/BCMO1.

Induction of BCMO1

E. coli containing pBAD/BCMO1, pBAD/calmodulin (positive control), and *E. coli* pBAD (negative control) were grown in lysogeny broth (LB) supplemented with 100 mg/mL of ampicillin (LB/ampicillin). One mL of an overnight culture was used to inoculate 500 mL of LB/ampicillin. At mid-log phase, expression of BCMO1 was induced with serial dilutions of L-arabinose, or H₂O as control. Cultures were incubated an additional 4 hours, and aliquots were harvested by centrifugation. Aliquots of each sample were either sonicated or broken with osmotic shock to release most of the protein. Both treatments were separated into soluble and insoluble fractions by centrifugation. The total protein concentration in each sample was determined by the Bradford protein assay [28].

The samples were then analyzed using Western blot. Equal amounts of protein were loaded into sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, electrophoresed, and blotted onto a nitrocellulose.

Enzyme assay

Samples from 4-hour cultures of pBAD/BCMO1-transformed bacteria were homogenized and centrifuged for 20 minutes at 9000 × g, resulting in a pellet and S9 fraction. Small subsamples of S9 fraction were stored at 20°C for protein quantification by the Bradford method. The BCMO1 enzyme assay was performed as described previously by van Vliet *et al.* [29], with 1 mg of protein either from cell pellet or supernatant. Different concentrations of β-carotene (0, 1, 10, 25, and 50 μM) and protein (0, 0.5, 1, 2, and 4 mg) from both samples were tested.

All extracts were evaporated under nitrogen at room temperature, and then the final products of the enzymatic assays were resuspended in 5 μL of water, 50 μL of 37 % (w/w) formaldehyde, and 500 μL of acetonitrile.

β-carotene was eluted isocratically with acetonitrile-tetrahydrofuran-water (77.5:20.0:2.5, v/v/v) at a flow rate of 1 mL min⁻¹, with its detection at 436 nm. In all cases, a 20-μL aliquot was injected into the high-performance liquid chromatography (HPLC) system. Separations were performed on a Prodigy C18 (Runcorn, UK) analytical column. The HPLC system included a Hewlett Packard 1100 System with diode array detector.

The retinal formed was quantified on an HPLC system as described by During *et al.* [30]. Retinal was separated on a TSK gel ODS-80Ts C18 reverse-phase column (5 μm size, 80 Å pore size, 4.6 × 150 mm) (Tosoh

Co). Acetonitrile:water (90:10, w/v) containing 0.1 % ammonium acetate was used as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/minute. A 200-μL aliquot was injected into the HPLC system. Retinal was monitored at 380 nm. With this method it is possible to separate retinal, retinol, and retinoic acid, standards of which were used in a calibration curve. The HPLC system included a Hewlett Packard 1100 System with diode array detector.

All procedures involving carotenoids were performed under yellow light and at 4°C.

β-carotene disappearance in bovine rumen fluid in vitro

In order to measure the effect on β-carotene disappearance and retinal formation, an *in vitro* digestibility test was performed in a jar system, using Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) as substrate and rumen fluid, which contains digestive microorganisms, as inoculum. The latter was obtained from Holstein cows with ruminal cannula. *E. coli* with pBAD or with pBAD/BCMO1 was added to the jars.

Samples of Bermuda grass were collected, cut into small pieces, and dried in an oven at 40°C. Once ground, 0.25 g was weighed into bags (Ankom F57, 40-μm pore size).

A total of 4 bags were introduced into each incubation bottle containing 2 liters of 1330 mL of 10 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄·7 H₂O, 0.5 g/L NaCl, 0.1 g/L CaCl₂·2 H₂O, 5 g/L urea, 266 mL of a solution of 15 g/L Na₂CO₃ and 1 g/L Na₂S·9 H₂O, and 400 mL of ruminal fluid at a final pH of 6.8 [31, 32]. Bags were incubated for 24 hours with constant rotation at 39°C, followed by 0.02 % arabinose addition. An *Escherichia coli* inoculum of either pBAD (4 × 10⁸ and 4 × 10⁶), pBAD/BCMO1 (4 × 10⁸ and 4 × 10⁶) was then added.

After 24 hours, bags were rinsed with tap water until the runoff was clear and dried at 40°C. They were stored at -18°C until subsequent analyses.

After *in vitro* digestion, survival and viability of the *E. coli* was tested by plating on MacConkey agar. β-Carotene and retinal were determined by the method reported by Mora *et al.* [33]. Digestibility of pasture samples previously dried at 40°C was measured in samples protected from light in order to reduce the BCMO1-independent degradation of β-carotene or retinal [34].

pBAD/BCMO1 stability

The stability of the vector pBAD/BCMO1 in *E. coli* was determined by restriction analysis and sequencing



Figure 1 A: Chicken BCMO1 complete sequence. The ATG start codon is at position 96, and the stop codon (TAA) is at 1675. Both are marked in bold. The complete sequence consists of 1581 bp.

Figure 1 B: Restriction analysis of genomic DNA from *E. coli* transformed with pBAD/BCMO1. Agarose 1% gel stained with SYBR green. Lane 1, Molecular weight markers. Lane 2, genomic DNA from *E. coli* transformed with pBAD/BCMO1. Lane 3, restriction analysis with SstI, where there are three bands: the band above 12000 bp corresponds to undigested DNA, the band below 5000 bp to the pBAD vector, and the band below 1636 bp to the 1581-bp sequence of BCMO1.

Figure 1 C: Chicken BCMO1 translation protein sequence.

of the fragment released every 100 generations until 750; also, isolated colonies of the bacterial pool were grown with and without antibiotics, as reported by Gregg *et al.* [35].

Statistical analysis

Data from enzymatic assays were analyzed by variance for a completely randomized design in order to detect differences between pBAD and pBAD/BCMO1 using the general linear model of the SAS system [36]. The least-squares mean (LSM) test was used to compare means.

Results

Isolation of cDNA for BCMO1

The complete sequence of the chicken BCMO1 gene is depicted in Figure 1 A. The PCR from *E. coli* transformed with pBAD/BCMO1 showed a 1581-bp fragment that corresponds to BCMO1 (Fig. 1B).

Induction of BCMO1

After the osmotic treatment, protein was 21.5 and 21.5 mg/mL from the pellet and supernatant, respectively, and after arabinose induction increased to 52.2 and 29.2 mg protein/mL, no matter the concentration. On the other hand, the sonication procedure

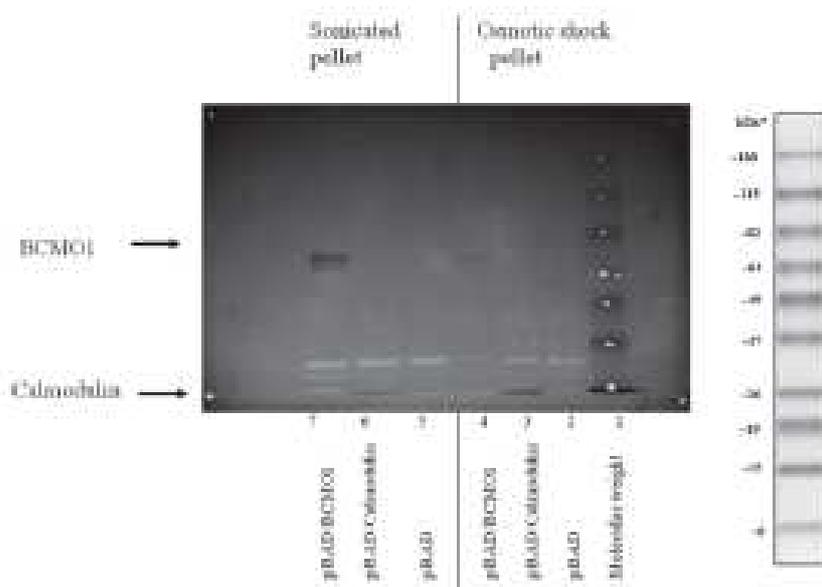


Figure 2: pBAD/BCMO1 induced with 0.2% arabinose; 7.5% polyacrylamide gel. Lane 1, molecular weight markers, the 64-kDa marker is identified by two puncture holes. Lanes 2 to 4 are the pellets obtained after osmotic shock. Lanes 5 to 7 are the pellets obtained by sonication. Lane 2 and 5 show that pBAD, a negative control, has no bands recognized by the anti-myc antibody. Lane 3 and 6 show that pBAD-calmodulin, the positive control, has a protein recognized by anti-myc antibody (black band with molecular weight of 21.3 kDa, as expected for calmodulin). Lanes 4 and 7, pBAD/BCMO1, show a band of molecular weight 64 kDa recognized by anti-myc antibody.

Table 1: Retinal formation catalyzed by partially purified chicken BCMO1 inserted into *E. coli* (nmol retinal/mg protein-h).

Protein	β -carotene				
	0 μ M	1 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M
0 mg	0	ND	ND	ND	ND
0.5 mg	0	17.2 \pm 8.8 ^a	5.3 \pm 1.3 ^b	5.9 \pm 2.3 ^b	8.3 \pm 1.5 ^b
1 mg	0	3.8 \pm 2 ^b	3.8 \pm 0.3 ^b	7.9 \pm 0.8 ^b	6.1 \pm 1.7 ^b
2 mg	0	4.9 \pm 1.8 ^b	4.7 \pm 1.6 ^b	7.6 \pm 4.3 ^b	8.1 \pm 2.5 ^b
4 mg	0	2.28 \pm 0.3 ^b	4.9 \pm 1.8 ^b	5.1 \pm 0.2 ^b	8.4 \pm 2.7 ^b
Incubation buffer	0	ND	ND	ND	ND

^{a,b} means with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).

ND- Non detectable

yielded 11.2 mg of protein/mL from the pellet and 44.3 mg/mL, from the supernatant prior to induction, and 55.1 and 78.2 mg protein/mL, from the pellet and the supernatant, respectively. These results were not significantly different ($p > 0.1$) for either procedure nor after arabinose induction. The results of the Western blot are depicted in Figure 2, lanes 2 to 4, which are the pellets obtained after osmotic shock-control plasmid, pBAD-calmodulin, and pBAD/BCMO1, respectively. Lanes 5 to 7 represent the pellets obtained by sonication-control plasmid, pBAD-calmodulin, and pBAD/BCMO1, respectively. The expected proteins are positive with the anti-myc antibody, 21.3 kDa band for

the calmodulin, and 64 kDa band for the BCMO1. An SDS-PAGE gel presents similar results, therefore is not shown.

Enzyme assay

On average, we observed 6.8 nmol/hour of retinal formed for 1 mg of S9 protein from the cell pellet at 37 °C. The best conditions for retinal production were 0.5 mg of protein and 1 μ M β -carotene (Table 1). Chromatograms of β -carotene and retinal are shown in Figure 3.

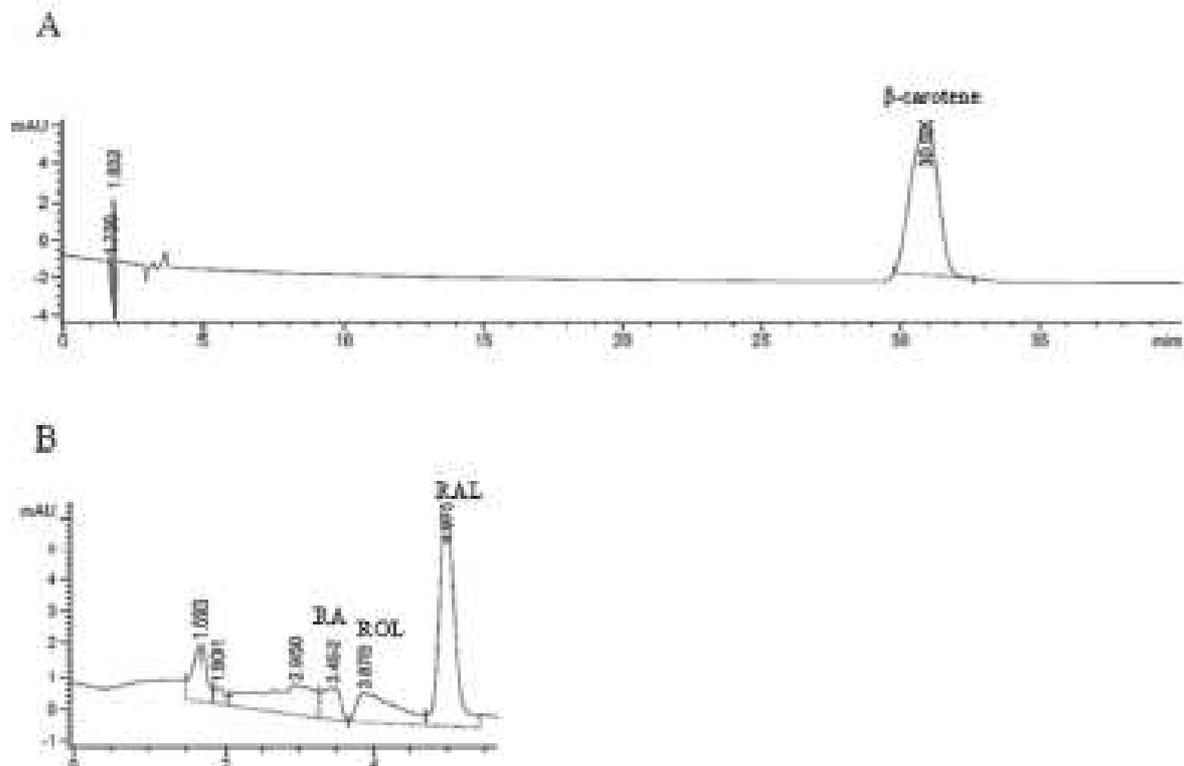


Figure 3A: HPLC elution profile of β -carotene standard. Retention time was 30.9 minutes.

Figure 3B: HPLC elution profiles of retinoids and cleavage product of β -carotene. The mixture of all-trans-retinoic acid (RA), all-trans-retinol (ROL), and all-trans-retinal (RAL) was subjected to HPLC separation and their retention times were 3.4, 3.8, and 4.9 minutes, respectively. The enzyme assay extracts (200 μ L) was subjected to HPLC separation as described under Materials and methods.

In vitro digestibility in bovine rumen fluid

Two concentrations of *E. coli* pBAD/BCMO1 were tested as inoculum, 4×10^8 and 4×10^9 , to determine the survival of the transformed microorganism and the activity of BCMO1 *in vitro*.

E. coli pBAD/BCMO1 was grown as indicated above, until an OD₆₀₀ of 0.5 was reached. Colony forming units (CFUs) were quantified to establish the better inoculum size. They were kept on ice until use. pBAD *E. coli* was used as a negative control. The *in vitro* digestion was performed for 24 hours, protected from light. Triplicate samples were taken for various analyses, and were also protected from light.

To establish the survival of *E. coli* pBAD/BCMO1, serial dilutions were cultured on MacConkey agar plates with ampicillin (100 mg/mL) and incubated for 24 hours at 37°C. The morphology of the isolated CFU was similar in all cases, and using the Gram stain all colonies were found to be Gram-negative rods. Quantification gave an average of 7.317×10^8 CFU/mL. Ten

percent of the population was grown (to preserve the clones) in LB/ampicillin, and DNA was extracted for analysis with the *Sac*I restriction enzyme. This restriction analysis released the expected 1581-bp fragment, and sequencing confirmed BCMO1 gene identity.

β -Carotene and retinal were measured by HPLC before and after *in vitro* digestion; the results showed no differences in β -carotene disappearance or retinal appearance ($p > 0.1$) between the negative control *E. coli* pBAD and *E. coli* pBAD/BCMO1 with either inoculum (4×10^8 or 4×10^9). These results might indicate that the protein remained in the periplasmic space in *E. coli*, and therefore could not cleave β -carotene to produce retinal.

Stability of pBAD/BCMO1 after genetic modification

E. coli pBAD/BCMO1 was grown overnight at 37°C in LB/ampicillin at 250 rpm. An aliquot of overnight cul-

ture was grown under the same conditions in 20 mL of medium either with or without ampicillin. The pBAD/BCMO1 stability was monitored every 100 generations [37] until the 750th generation was reached. DNA was extracted in all cases, and a restriction analysis was performed to confirm the presence of the 1581-bp fragment of BCMO1 gene.

Discussion

Isolation and induction of chicken BCMO1

Kim *et al.* [37] successfully expressed mouse β -carotene 15,15'-monooxygenase in *E. coli* ER2566 as a soluble protein using the pET-24a(+) plasmid vector. In the present study we expressed the chicken BCMO1 gene using the pBAD plasmid vector in *E. coli* XL1 Blue (Stratagene). Using *E. coli* as a host for the expression of β -carotene 15,15'-monooxygenase has commercial advantages for retinal production, including recombinant protein production in inexpensive culture media and ready achievement of high cell concentrations, as compared to virus- and cell-based systems. This approach was also important because the ultimate goal of the project is to decrease carotene absorption by the intestines in order to obtain less-yellow beef carcasses even if cattle are finished on pasture.

Enzyme activity

The partially purified recombinant enzyme obtained from the cell pellet exhibited a specific activity of 6.8 nmol mg⁻¹ min⁻¹. The highest previously reported specific activity was 510 [39] and 10 nmol mg⁻¹ min⁻¹ for the mouse enzyme expressed in *E. coli* and the human enzyme expressed in insect cells [38], respectively. As mentioned by Kim *et al.* [37], the higher specific activity of the mouse enzyme was partly due to the higher purity of the enzyme but primarily due to the superior detergent and solvent system in the assay, which was also used in the present study.

β -carotene disappearance after incubation with bovine rumen fluid *in vitro*

The *in vitro* digestibility test demonstrated that *E. coli* survived without loss of the pBAD/BCMO1 vector and was viable under rumen conditions and in com-

petition with rumen microorganisms. After 24-hour incubation, the transformed strain survived digestion and maintained its genetic modification *in vitro* without antibiotic selection pressure. In 1994, Gregg *et al.* reported the genetic modification of *Bacteroides fibrisolvens* and *E. coli* with fluoroacetate dehalogenase activity to protect ruminants from monofluoroacetate poisoning [39–42]. Krause *et al.* [43] reported that the construction of recombinant xylanolytic *B. fibrisolvens* does improve the digestibility of fiber, but digestibility in bovine species with this bacterium is still less than that of the most potent fiber digesters such as ruminococci; they observed that the use of a recombinant rumen microorganism must take into account the ecological parameters, such as persistence *in vivo* and the niche of the organism. In our case, *E. coli* is a good candidate for the above considerations but the recombinant bacteria with pBAD/BCMO1 was unable to provide enzymatic activity. Most likely the enzyme was not released into rumen fluid, so different strategies must be taken into account that allow enzyme release from the cell or periplasmic space; this could be achieved by subcloning the BCMO1 into a vector containing a signal peptide. Once in the rumen fluid, BCMO1 must retain its activity even under adverse conditions such as the lack of oxygen, elevated temperatures in the digestive processes, or protease presence from other ruminal microorganisms.

Regarding the low oxygen pressure in rumen and the fact that fermentation occurs under anaerobic conditions; although one important factor is indeed the partial pressure of oxygen, the affinity (K_m) of the enzyme by oxygen is also of importance. Beloqui *et al.* [44] reported the presence of polyphenol oxidase (PPO or monophenol monooxygenase), which is a tetramer that contains four atoms of copper per molecule, and binding sites for two aromatic compounds and oxygen in rumen microflora. This suggests that other monooxygenases with various substrate spectra may further be found in ruminant bacteria, and that they could take the oxygen from water.

The digestibility of organic matter in Bermuda grass found in this study was 51.55% after a 24-hour incubation *in vitro*; similar results were obtained by Arthington and Brown in 2005 [45], who determined the *in vitro* digestibility of organic matter in the grass, at 4 and 10 weeks after regrowth, to be 55% and 46.6% in the first year of study; the next year, they also estimated an organic matter digestibility of 52.8% and 41.5% after the regrowth of grass for 4 and 10 weeks, respectively. It was confirmed that the results of *in vitro* digestibility are highly correlated with *in vivo* values by McLeod [46] and Earing *et al.* [47].

pBAD/BCMO1 stability

E. coli pBAD/BCMO1 was grown for 750 generations without antibiotics and without loss of the plasmid. These results are consistent with those obtained by Gregg *et al.* [39] in *Butyrivibrio fibrisolvens* genetically modified with fluoroacetate dehydrogenase; they detected no loss of plasmid when the microorganism was cultured for 500 generations without antibiotic; we were able to take a step further testing the recombinant bacteria obtained in this study for 750 generations. This genetic stability is highly desirable in a modified microorganism designed to be introduced into the rumen environment. For further studies it will be also important to consider the suggestion of Sadman [48], that plasmids are sometimes released into the environment, especially under environmental stress; this should be considered in order to maintain the genetic characteristics by integrating a heterologous chromosomal BCMO1 gene for long-term genetic stability in the absence of antibiotic selection.

Conclusions

We have obtained an *E. coli* construct transformed with the chicken BCMO1 gene, and demonstrated it survives in rumen conditions *in vitro*, with stable expression of the transformed gene product; although we did not obtain an enzyme secreted to the media, it is a very valid (first) attempt to demonstrate that the transformed bacteria survives and expresses an active BCMO1.

Now we should determine if the enzyme is secreted into the rumen environment, and measure its activity (that should be at least similar to that of chicken BCMO1, in order to attain a reduction of yellow fat). It would be also necessary to observe the survival of the transformed microorganisms in the actual rumen conditions.

At the next stage, alternate microbial species such as the ones labeled as GRAS (Generally Regarded As Safe) are being tested.

Acknowledgements

This work was part of the doctoral thesis that the senior author submitted to the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Esperanza García-

López thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for a scholarship at the Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM. The work was supported with grants 50295 and 132088 from CONACYT. The authors are grateful to Dorothy Pless (INB Instituto de Neurobiología-UNAM, Querétaro, Qro., México) for revising the English manuscript.

References

1. Mora, I.O. and Shimada, M.A. (2001) Causas del color amarillo de la grasa de canales de bovinos finalizados en pastoreo. *Vet. Méx.* 32, 63.
2. Barrón, G.S., García, B.C., Mora, I.O. and Shimada, M.A. (2004) Impacto económico de la pigmentación del tejido adiposo en bovinos en pastoreo en el trópico. *Agrociencia* 38, 173.
3. Röhrle, F.T., Moloney, A.P., Osorio, M.T., Luciano, G., Priolo, A., Caplan, P. and Monahan, F.J. (2011) Carotenoid, colour and reflectance measurements in bovine adipose tissue to discriminate between beef from different feeding systems. *Meat Sci.* 88, 347.
4. Deming, D.M. and Erdman, J.W. (1999) Mammalian carotenoid absorption and metabolism. *Pure Appl. Chem.* 71, 2213.
5. van Soest, P.J. (1994) *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2nd edition, p. 280, Cornell University Press, New York.
6. Bugg, T.D.H. (2003) Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron* 59, 7075.
7. Lindqvist, A. and Andersson, S. (2002) Biochemical properties of purified recombinant human β -carotene 15,15'-monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 277, 23042.
8. Leuenberger, M.G., Engeloch-Jarret, C. and Woggon, W.D. (2001) The reaction mechanism of the enzyme catalyzed central cleavage of beta-carotene to retinal. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40, 2613.
9. Wyss, A. (2004) Carotene oxygenases: A new family of double bond cleavage enzymes. *J. Nutr.* 134, S246.
10. Gottesman, M.E., Quadro, L. and Blazer, W.S. (2001) Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *BioEssays* 23, 409.
11. Yang, A., Larsen, T.W. and Tume, R.K. (1992) Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Aust. J. Agric. Res.* 43, 1809.

12. Reynosa, C.R., Mora, O., Nieves, V., Shimada, A. and Mejía, E.G. (2004) β -carotene and lutein in forage and bovine adipose tissue in two tropical regions of México. *Anim. Feed Sci. Tech.* 113, 183.
13. Mora, O., Romano, J.L., González, E., Ruiz, F.J. and Shimada, A. (2000) Low cleavage activity of 15,15-dioxygenase to convert β -carotene to retinal in cattle compared with goats, is associated with the yellow pigmentation of adipose tissue. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 70, 199.
14. Zhou, G.H., Yang, A. and Tume, R.K. (1993) A relationship between bovine fat colour and fatty acid composition. *Meat Sci.* 35, 205.
15. Forrest, J.R. (1981) Effect of high concentrate feeding on carcass quality and fat coloration of grass-reared steers. *Can. J. Anim. Sci.* 61, 575.
16. Kim, Y.S., Park, C.S. and Oh, D.K. (2010) Hydrophobicity of residue 108 specifically affects the affinity of human β -carotene 15,15'-monooxygenase for substrates with two ionone rings. *Biotechnol. Lett.* 32, 847–853.
17. Wyss, A., Wirtz, G., Woggon, W.D., Brugger, R., Wyss, M., Friedlein, A., Bachmann, H. and Hunziker, W. (2000) Cloning and expression of β , β -carotene 15,15'-dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 334.
18. von Lintig, J. and Vogt, K. (2000) Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving β -carotene to retinal. *J. Biol. Chem.* 275, 11015.
19. Lindqvist, A. and Andersson, S. (2002) Biochemical properties of purified recombinant human β -carotene 15,150-monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 277, 23042.
20. Paik, J., During, A., Harrison, E., Mendelsohn, C., Lai, K. and Blazer, W. (2001) Expression and characterization of a marine enzyme able to cleave β -carotene. The formation of retinoids. *J. Biol. Chem.* 276, 32160.
21. Lampert, J., Holsbach, J., Hessel, S., Driever, W., Vogt, K. and von Lintig, J. (2003) Provitamin A conversion to retinal via the β , β -carotene-15,150-oxygenase (bcot) is essential for pattern formation and differentiation during zebra fish embryogenesis. *Development* 130, 2173.
22. Kim, Y.S., Kim, N.H., Kim, H.I., Lee, J.K., Kim, S.W. and Oh, D.K. (2007) Effective production of retinal from β -carotene using recombinant mouse β -carotene 15,15' monooxygenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 1339.
23. Kim, Y.S., Kim, N.H., Yeom, S.J., Kim, S.W. and Oh, D.K. (2009) In vitro characterization of a recombinant Bb protein from an uncultured marine bacterium as a β -carotene 15,150-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 284, 15781.
24. Redmond, T.M., Gentleman, S., Duncan, T., Yu, S., Wiggert, B., Garitt, E. and Cunningham, F.X. Jr. (2001) Identification, expression and substrate specificity of a mammalian β -carotene 15,15'-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 276, 6560.
25. Subcomité Interno para el Cuidado y el Uso de los Animales para Experimentación (SICUAE). (2009) *Programa en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal*, UNAM.
26. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, publicada 22 de Agosto de 2001.
27. Aclaración a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, publicada el 22 de agosto de 2001.
28. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248.
29. van Vliet, T., van Schaik, F., Schreurs, W.H.P. and van der Berg, H. (1996) In vitro measurement of β -carotene cleavage activity: methodological considerations and the effect of other carotenoids on β -carotene cleavage. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 66, 77.
30. Daring, A., Nagao, A., Hoshino, C. and Junji, T.J. (1996) Assay of β -Carotene 15,15'-Dioxygenase Activity by Reverse-Phase High-Pressure Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* 241, 199.
31. Tilley, J.M.A. and Terry, R.A. (1963) A 2-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18, 104.
32. Earing, J.E., Casill, B.D., Hayes, S.H., Vanzant, E.S. and Lawrence, L.M. (2010) Comparison of *in vitro* digestibility estimates using the DaisyII incubator with *in vivo* digestibility estimates in horses. *J. Anim. Sci.* 88, 3954.
33. Mora, O., Romano, J.L., Gonzalez, E., Ruiz, F.J., Gómez, R. and Shimada, A. (2001) Presence of fed β -carotene in digesta, excreta, blood and hepatic and adipose tissues of Holstein steers. *Can. J. Anim. Sci.* 81, 133.
34. Mehrez, Z. and Orskov, E.R. (1977) Study of the artificial bag technique for determining the digestibility



- of feeds in the rumen. *J. of Agri. Sci. (Cambridge)*, 88, 645.
35. Gregg, K., Shafer, D., Cooper, C. and Allen, G. (1995) Genetic manipulation of rumen bacteria: now a reality. Rumen Ecology Research Planning. Proceeding of a Workshop held at ILRI, p. 225, edited by R. J. Wallace and A. Lalou-Kassi, Addis Ababa, Ethiopia.
 36. SAS Institute Inc. (2008) SAS OnlineDoc® 9.1.3. Cary, NC: SAS Institute, Inc.
 37. Kim, Y.S., Kim, N.H., Kim, H.J., Lee, J.K., Kim, S.W. and Oh, D.K. (2007) Effective production of retinal from β -carotene using recombinant mouse β -carotene 15,15'-monooxygenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 1339.
 38. Lindqvist, A. and Andersson, S. (2002) Biochemical Properties of Purified Recombinant Human-Carotene 15,15'-Monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 277, 23942–23948.
 39. Gregg, K., Cooper, C.L., Schafer, D.J., Sharpe, H., Beard, C.E., Allen, G. and Xu, J. (1994) Detoxification of the plant toxin fluoracetate by a genetically modified rumen bacterium. *Biotechnology* 12, 13610.
 40. Beard, C.E., Hafford, M.A., Forster, R.J., Sontakke, S., Teather, R.M. and Gregg, K. (1995) A stable and efficient transformation system for *Butyrivibrio fibrisolvens* OB156. *Curr. Microbiol.* 30, 105.
 41. Gregg, K. (1995) Engineering gut flora of ruminant livestock to reduce forage toxicity: progress and problems. *Tibtech* 13, 418–42.
 42. Gregg, K., Hamdorf, B., Henderson, K., Kopečný, J. and Wong, C. (1998) Genetically Modified Ruminant Bacteria Protect Sheep from Fluoroacetate Poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3496.
 43. Krause, D.O., Bunch, R.J., Dalrymple, B.D., Gobius, K.S., Smith, W.J., Xue, G.P. and McSweeney, C.S. (2001) Expression of a modified *Neocallimastix patriciarum* xylanase in *Butyrivibrio fibrisolvens* digests more fibre but cannot effectively compete with highly fibrolytic bacteria in the rumen. *J. Appl. Microbiol.* 90, 388.
 44. Beloqui, A., Pita, M., Polaina, J., Martínez-Arias, A., Golyshina, O. V., Zumárraga, M., Yakimov, M., García-Arellano, H., Alcalde, M., Fernández, V., Elberough, K., Andreu, J., Ballesteros, A., Ploa, F., Timmia, K., Ferrer, M. and Golyshina, P. (2006) Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome: expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. *J. Biol. Chem.* 281, 22033.
 45. Artlington, J.D. and Brown, W.F. (2005) Estimation of feeding value of four tropical forage species at two stages of maturity. *J. Anim. Sci.* 83, 1726.
 46. McLeod, M.N. and Mindon, D.J. (1982) Accuracy of predicting digestibility by the cellulase technique; the effect of pretreatment of forage samples with neutral detergent or acid pepsin. *Anim. Feed Sci. Technol.* 7, 83.
 47. Earing, J.E., Cassill, B.D., Hayes, S.H., Vanzant, E.S. and Lawrence, L.M. (2010) Comparison of in vitro digestibility estimates using the DaisyII incubator with in vivo digestibility estimates in horses. *J. Anim. Sci.* 88, 3954.
 48. Sadmann, G. (2006) Production of Carotenoids by Gene Combination in *Escherichia coli*. In: *Food Biotechnology* (Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A. and Levin, R.E.) Second edition. Taylor and Francis Group.

Dra. Ofelia Mora Izaguirre

Lab. Rumicología y Metabolismo Nutricional
FESC-UNAM, México
Blvd. B. Quintana 514-D. Col. Arboledas
Querétaro
Qro. 76230
México
Tel.: +52 442 2381032
Fax: +52 442 2381038
ofemora66@unam.mx

6. DISCUSIÓN

6.1. Aislamiento e inducción de la BCMO1 de pollo

Kim *et al.*, (2007) expresaron la β -caroteno 15, 15' monooxigenasa de ratón en *E. coli* ER2566 como proteína soluble usando el vector pET-24a(+). En éste estudio se logró la expresión de la BCMO1 de pollo usando el vector pBAD en *E. coli* XL1Blue (Stratagene). El uso de *E. coli* como huésped para la expresión de la β -caroteno 15, 15' monooxigenasa tiene ciertas ventajas, entre ellas se incluye la producción de concentraciones elevadas de la proteína recombinante en medios de cultivo relativamente baratos, en comparación con los sistemas de virus y células eucariontas. También es importante resaltar que el objetivo final del proyecto es disminuir la absorción de carotenos por intestino a fin de obtener canales de res menos amarillos, aun cuando el ganado sea finalizado en pastoreo, por lo que el uso de microorganismos genéticamente modificados con actividad de BCMO1 pueden contribuir a lograr tal fin.

6.2. Actividad enzimática

La enzima recombinante parcialmente purificada obtenida a partir de la pastilla celular mostró una actividad específica de $6.8 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. La actividad específica más alta reportada había sido de $510 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Kim *et al.*, 2007) para la enzima de ratón expresada en *E. coli* y de $10 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para la enzima de humano expresada en células de insecto (Lindqvist y Andersson, 2002).

Como lo mencionan Kim *et al.*, (2007), la actividad específica mayor de la enzima BCMO1 de ratón fue alta debido, a la pureza de la enzima, y principalmente al detergente y sistema disolvente usados en el ensayo. En el presente estudio se utilizó el mismo detergente y sistema disolvente pero que no se vio reflejado en una mayor actividad de la BCMO1.

6.3. Desaparición de β -caroteno después de la incubación con líquido ruminal bovino *in vitro*

La prueba de digestibilidad *in vitro* demostró que *E. coli* sobrevivió sin pérdida del vector pBAD/BCMO1, fue viable bajo las condiciones ruminales y en competencia con los microorganismos ruminales. Después de 24 horas de incubación, las bacterias transformadas sobrevivieron la digestión y mantuvieron su modificación genética *in vitro* sin la presión de la selección por el antibiótico.

En 1994, Gregg *et al.*, reportaron la modificación genética de *Butirivibrio fibrisolvens* y *E. coli* con deshalogenasa fluoroacetato para proteger a los rumiantes de la intoxicación con monofluoroacetato (Gregg *et al.*, 1994; Beard *et al.*, 1995; Gregg, 1995; Gregg *et al.*, 1998). Krause *et al.*, (2001) encontraron que la construcción de una xilanasa recombinante de *B. fibrisolvens* mejoraba la digestibilidad de la fibra pero la digestibilidad en bovinos con esta bacteria

es todavía menor que la producida por bacterias ruminales eficientes como *Ruminococcus*; Krause *et al.*, observaron que se deben tomar en cuenta los parámetros ecológicos, tales como la persistencia *in vivo* y el nicho del propio organismo para usar microorganismos recombinantes del rumen. En nuestro caso, *E. coli* es un buen candidato tomando en cuenta los parámetros anteriores, pero la bacteria recombinante con pBAD/BCMO1 fue incapaz de mostrar la actividad enzimática de BCMO1. Una posible explicación es que la enzima no fue liberada al fluido ruminal, así que diferentes estrategias deberán implementarse para permitir la liberación de la enzima desde el espacio periplásmico de la célula; esto podría lograrse mediante la subclonación del BCMO1 en un vector que contenga un péptido señal que libere el producto. Una vez en el líquido ruminal, BCMO1 deberá mantener su actividad, incluso en condiciones adversas, tales como la falta de oxígeno, temperaturas elevadas en los procesos digestivos, o la presencia de proteasas de otros microorganismos ruminales.

Puesto que la presión de oxígeno en el rumen es baja y que la fermentación se produce en condiciones anaerobias, es importante tomar en cuenta la presión parcial de oxígeno en el rumen y la afinidad (Km) de la enzima por este gas. Beloqui *et al.*, (2006) demostraron la actividad de polifenol oxidasa (PPO o monofenol monooxigenasa) en la microflora del rumen; esta enzima es un tetrámero que contiene cuatro átomos de cobre por molécula y sitios de unión para dos compuestos aromáticos y oxígeno, lo que sugiere que otras monooxigenasas con diversas necesidades de oxígeno se pueden encontrar en bacterias ruminales y que podrían tomar el oxígeno del agua.

La digestibilidad de la materia orgánica del pasto Bermuda en este estudio fue 51.6% después de una incubación de 24 horas *in vitro*. Arthington y Brown en el 2005, obtuvieron resultados similares en la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica del pasto de 4 y 10 semanas de rebrote; 55% y 46.6% en el primer año de estudio, y 52.8% y 41.5% el segundo año, respectivamente. Se confirmó que los resultados de la digestibilidad *in vitro* están altamente correlacionados con los valores *in vivo* reportados por McLeod (1982) y Earing *et al.*, (2010).

6.4 Estabilidad de pBAD/BCMO1

La *E. coli* con el plásmido pBAD/BCMO1 se cultivó durante 750 generaciones sin antibiótico y sin mostrar la pérdida del plásmido. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Gregg *et al.*, (1994) en *Butyrivibrio fibrisolvens* modificado genéticamente con deshalogenasa fluoroacetato, dichos investigadores no detectaron la pérdida del plásmido cuando el microorganismo se cultivó durante 500 generaciones, sin antibiótico. La estabilidad genética observada en éste trabajo es altamente deseable en un microorganismo modificado diseñado para ser introducido en el entorno ruminal. Para futuros estudios será importante tener en cuenta la sugerencia de Sadman (2006)

quien indica que los plásmidos se liberan al medio, especialmente bajo presión ambiental, lo que debe considerarse a fin de mantener las características genéticas mediante la integración del gen de BCMO1 en forma heteróloga cromosómica a fin de mantener su estabilidad a largo plazo, en ausencia de una selección con antibióticos.

7. CONCLUSIONES

E. coli transformada con el gen BCMO1 de pollo, sobrevive a las condiciones ruminales *in vitro*, con la expresión estable del producto del gen transformado, pero no secreta BCMO1 al medio de cultivo.

Ahora se deberá investigar las condiciones para que la enzima sea secretada al medio ruminal, y medir su actividad (que debería ser al menos similar a la BCMO1 de pollo, con el fin de reducir la grasa amarilla de los bovinos finalizados en pastoreo). También es conveniente determinar tanto la sobrevivencia de los microorganismos transformados como la expresión enzimática en las condiciones *in situ* e *in vivo* del rumen.

En una siguiente etapa de éste proyecto, las especies microbianas alternativas, es decir aquellas etiquetadas como GRAS (generalmente consideradas como seguras, por sus siglas en inglés) deberán ser estudiadas para su uso en productos destinados al consumo humano.

8. LITERATURA CITADA

1. Arthington JD and Brown WF. 2005. Estimation of feeding value of four tropical forage species at two stages of maturity. *J. Anim. Sci.* 83:1726-1731.
2. Beard CE, Hefford MA, Forster RJ, Sontakke S, Teather RM, Gregg K. 1995. A stable and efficient transformation system for *Butyrivibrio fibrisolvens* OB156. *Curr. Microbiol.* 30:105-109.
3. Beloqui A, Pita M, Polaina J, Martínez-Arias A, Golyshina OV, Zumárraga M, Yakimov M, García-Arellano H, Alcalde M, Fernández V, Elborough K, Andreu J, Ballesteros A, Plou F, Timmis K, Ferrer M, Golyshin P. 2006. Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. *J. Biol. Chem.* 281:22933.
4. Earing JE, Cassill BD, Hayes SH, Vanzant ES, Lawrence LM. 2010. Comparison of *in vitro* digestibility estimates using the DaisyII incubator with *in vivo* digestibility estimates in horses. *J. Anim. Sci.* 88:3954-63.
5. Gregg K, Cooper CL, Schafer DJ, Sharpe H, Beard CE, Allen G and Xu J. 1994. Detoxification of the plant toxin flouroacetate by a genetically modified rumen bacterium. *Nat. Biotechnol.* 12:13610-1365.
6. Gregg K. 1995. Engineering gut flora of ruminant livestock to reduce forage toxicity: progress and problems. *Tibtech.* 13:418-42.
7. Gregg K, Hamdorf B, Henderson K, Kopecny J, Wong C. 1998. Genetically Modified Ruminant Bacteria Protect Sheep from Fluoroacetate Poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3496–3498.
8. Kim YS, Kim NH, Kim HJ, Lee JK, Kim SW, Oh DK. 2007. Effective production of retinal from β -carotene using recombinant mouse β -carotene 15,15'-monooxygenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:1339–1345.
9. Krause DO, Bunch RJ, Dalrymple BD, Gobius KS, Smith WJ, Xue GP and McSweeney CS. 2001. Expression of a modified *Neocallimastix patriciarum* xylanase in *Butyrivibrio fibrisolvens*

digests more fibre but cannot effectively compete with highly fibrolytic bacteria in the rumen. J. Appl. Microbiol. 90:388-96.

10. Lindqvist A and Andersson S. 2002. Biochemical properties of purified recombinant human β -carotene 15,15'-monooxygenase. J. Biol. Chem. 277:23942.

11. McLeod MN and Mindon DJ. 1982. Accuracy of predicting digestibility by the cellulase technique; the effect of pretreatment of forage samples with neutral detergent or acid pepsin. Anim. Feed Sci. Technol. 7(1):83-92.

12. Sadmann G. 2006. Production of carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. Food Biotechnology, edited by Shetty K, Paliyath G, Pometto A and Levin RE. Second edition. Taylor and Francis Group.