



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

Desarrollo de un Aditivo Enzimático a Partir de una *E. coli* XL1-Blue Transformada con el Gen de β -Caroteno 15,15' Monooxigenasa de *Gallus gallus* para su uso en Bovinos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

Martín Barbosa Amezcua

TUTOR:

Dra. Ma. Ofelia Mora Izaguirre
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Amando Shimada Miyasaka
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM

Dr. Carlos Regalado González
Facultad de Química de la UAQ

Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Septiembre de 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mi familia por ser lo mejor y más valioso que Dios me ha dado.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para llevar a cabo el presente trabajo.

A la FES Cuautitlán de la UNAM por darme la oportunidad de pertenecer al Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.

A la Dra. Ofelia Mora Izaguirre y al Dr. Armando Shimada Miyasaka por otorgarme su paciencia, apoyo, confianza y conocimientos y por ser pilar fundamental para realizar esta maestría.

Al Dr. Enrique Piña Garza del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, así como al Dr. Carlos Regalado González del PROPAC de la Facultad de Química de la UAQ por los conocimientos aportados en el transcurso de esta investigación.

A la M.C. Laura González Dávalos del Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional de la FES Cuautitlán por aportarme sus conocimientos teórico-prácticos tan necesarios para el desarrollo del presente proyecto.

Al Dr. Carlos Lozano Flores del Laboratorio de Diferenciación Neural y Axogénesis y a la M.C. Adriana González Gallardo de la Unidad de Proteogenómica del INB de la UNAM por su apoyo técnico, conocimientos y amistad.

Al Dr. Alfredo Varela del Laboratorio de Diferenciación Neural y Axogénesis del INB de la UNAM por permitirme un espacio para llevar a cabo el presente trabajo.

A la Dra. Luz Vázquez Moreno, la M.C. Ma. del Refugio Robles Burgueño y a la M.C. Ana María Guzmán Partida del Laboratorio de Bioquímica de Proteínas y Glicanos del CIAD por brindarme sus conocimientos y amistad y por proporcionarme un lugar en su laboratorio para realizar una gran parte de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio porque juntos hemos hecho más llevadero el estrés causado por el posgrado.

Resumen

Los forrajes utilizados en la producción tropical de ganado bovino, contienen altos niveles de β -caroteno, que produce canales con grasa de color amarillo, y demerita su valor económico; La pigmentación es debida a la baja actividad de la enzima digestiva β -caroteno 15,15'-monooxigenasa (BCMO1). El uso de métodos biotecnológicos que incremente la escisión de éste caroteoide en el tubo digestivo de los bovinos podría disminuir este problema, ya que esta enzima escinde al β caroteno en dos moléculas de retinal, eliminando la fuente de coloración y optimizando el valor comercial de la carne de ganado alimentado en pastoreo. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un aditivo enzimático a partir de bacterias con actividad en el rumen, que han sido previamente transformadas con el gen β -caroteno 15,15'-monooxigenasa de *Gallus gallus*. La enzima fue purificada por FPLC, a partir de una *E. coli* XL1-Blue transformada con este gen, mediante Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados (IMAC) para su posterior medición de actividad *in vitro* y detección del producto por HPLC. Se obtuvo una proteína de aparentemente 63kDa, la cual presenta una actividad enzimática de 2993 pmol de retinal/mg de proteína/hora. Esta proteína puede ser utilizada como aditivo en estudios *in vitro* con la finalidad de disminuir la coloración amarilla de las canales de bovinos.

Palabras Clave: β -Caroteno, BCMO1, Aditivo, Bovinos, Pigmentación

Abstract

Forages used in tropical cattle production, contain high levels of β -carotene which result in carcasses with yellow fat, and decreased economic value; the pigmentation is due to the low activity of the digestive enzyme β -carotene 15,15'-monooxygenase (BCMO1). The use of biotechnological methods to increase the cleavage of the carotenoid in the digestive tract of cattle could decrease this problem, since the enzyme breaks down the β -carotene into two molecules of retinal, thus eliminating the source color and optimizing the commercial value of grass-fed beef cattle. The aim of this study was to develop an enzymatic additive from bacteriae with activity in the rumen, that had been previously transformed with the β -carotene 15,15'-monooxygenase gene from *Gallus gallus*. The enzyme was purified by FPLC from an *E. coli* XL1-Blue transformed with this gene, with Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) for subsequent *in vitro* activity measurement and detection of the product by HPLC. Apparently 63 kDa protein was obtained, which has an enzymatic activity of 2993 pmol retinal/mg protein/hour. This protein might be used on future studies aimed to reduce the yellowing of bovine carcasses.

Key Words: β -Carotene, BCMO1, Additive, Bovine, Pigmentation

Índice

Dedicatorias	I
Agradecimientos	II
Resumen	III
Abstract	IV
Índice	V
Lista de Cuadros	VII
Lista de Figuras	VII
Introducción	1
Generalidades	1
Pastoreo y Carotenoides	1
Metabolismo de los Carotenoides	4
Implicaciones de la Pigmentación de Canales	8
Aditivos Enzimáticos en Nutrición Animal	12
Aditivos Enzimáticos en Rumiantes	13
Purificación de Proteínas	15
Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados	19
Purificación de Proteínas con Etiqueta de Histidinas	20
Justificación	21
Hipótesis	22
Objetivos	22
Objetivo General	22
Objetivos Particulares	22
Materiales y Métodos	22
El Gen de la β -Caroteno 15,15'-Monooxigenasa	22
Caracterización de la Bacteria	23
Extracción del ADN plasmídico	23
Análisis de Restricción del ADN plasmídico	25
Secuenciación del ADN plasmídico	25

Estandarización de la Expresión de la BCMO1 Recombinante	26
Concentración del Inductor	26
Tiempo de Inducción	26
Extracción de la Enzima BCMO1	28
Solubilización de la BCMO1 a Partir de Cuerpos de Inclusión	29
Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados	30
Naturalización de la BCMO1	32
Ensayo Enzimático para BCMO1	33
Análisis del Retinal por HPLC en Fase Reversa	34
La BCMO1 como Aditivo Enzimático en Bovinos	34
Resultados	35
Caracterización de la Bacteria	35
Extracción del ADN plasmídico	35
Análisis de Restricción del ADN plasmídico	36
Secuenciación del ADN plasmídico	37
Estandarización de la Expresión de la BCMO1 Recombinante	38
Concentración del Inductor	38
Tiempo de Inducción	40
Expresión y Solubilización de los Cuerpos de Inclusión	40
Purificación de la BCMO1 de <i>Gallus gallus</i>	44
Naturalización de la BCMO1	46
Análisis por HPLC de Fase Reversa de la Bioconversión de β -Caroteno en Retinal	46
La BCMO1 como Aditivo Enzimático en Bovinos	47
Discusión	48
Caracterización de la Bacteria	48
Secuenciación y Alineación del Gen y la Proteína de la BCMO1	49
Expresión y Solubilización de los Cuerpos de Inclusión	49
Naturalización de la BCMO1 Purificada	50
Ensayo Enzimático	50

La BCMO1 como Aditivo Enzimático en Bovinos	52
Conclusiones	53
Perspectivas	53
Abreviaturas y Siglas Utilizadas	54
Literatura Citada	55

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Concentración y calidad del ADN plasmídico obtenido	35
Cuadro 2. Actividad <i>in vitro</i> reportada en diferentes trabajos de la BCMO1	51

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura química de algunos caroteoides	2
Figura 2. Metabolismo de β -caroteno a nivel intestinal	5
Figura 3. El β -caroteno y su desdoblamiento a retinaldehído	7
Figura 4. Canal de bovino con la grasa pigmentada de amarillo	9
Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología utilizada en el presente trabajo	23
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa del ADN plasmídico obtenido de la bacteria transformada	36
Figura 7. Análisis de restricción del plásmido obtenido de la <i>E. coli</i> transformada con pBAD-BCMO1	37
Figura 8. Alineación de la secuencia del gen insertado en el plásmido (pBAD) y alineación de la proteína traducida utilizando BLAST	38
Figura 9. Western Blot de la bacteria <i>E. coli</i> transformada con el gen BCMO1 inducida con diferentes concentraciones de arabinosa	39
Figura 10. Western Blot del pBAD-BCMO1 en un gel al 12% a diferentes tiempos de inducción	40

Figura 11. SDS-Page de las fracciones proteicas solules de bacterias transformadas con pBAD-BCMO1	41
Figura 12. Western Blot de las diferentes fracciones proteicas de la bacteria transformada.	42
Figura 13. Western Blot de bacterias inducidas y crecidas a diferentes temperaturas (37 y 16°C)	43
Figura 14. Western Blot de la solubilización de los cuerpos de inclusión con diferentes agentes desnaturalizantes	44
Figura 15. Cromatograma de purificación de la BCMO1 por IMAC	45
Figura 16. SDS-PAGE (A) y Western Blot (B) de la BCMO1 purificada	46
Figura 17. Cromatograma de la elución del retinal por HPLC en fase reversa	47

Introducción

Generalidades

En 2010, México ocupó el noveno lugar mundial en cabezas de ganado bovino (32'642,100), el séptimo en número de animales sacrificados (8'515,010 cabezas) y el sexto en toneladas de carne producidas (1'744,740 ton) (FAO, 2012).

El 36.9% de esta carne proviene de unidades de producción ubicadas en el trópico (húmedo y seco), el cual abarca aproximadamente el 28% del territorio nacional (INECC, 2015) y alberga al 31.5% del inventario bovino (SAGARPA, 2006).

En estas regiones la producción de ganado se desarrolla bajo diferentes contextos tecnológicos, siendo el intensivo y el extensivo los más comúnmente utilizados para la producción de carne (Ruíz *et al.*, 2004), ya que de acuerdo al INEGI (2015), el 58.3% del ganado vacuno se encuentra bajo sistemas de producción en pastoreo, el 20.1% en pastoreo controlado y el 13.9 y 7.7% en unidades estabuladas y semi-estabuladas, respectivamente, siendo el sistema extensivo el más utilizado en el trópico.

Particularmente en las regiones tropicales y subtropicales, la alimentación del ganado se basa en el pastoreo de gramíneas nativas o introducidas (Cruz-Monterrosa *et al.*, 2011), comprendiendo principalmente la producción de novillos para abasto, la cría de becerros para la exportación, y la producción de pie de cría (Ruíz *et al.*, 2004).

Pastoreo y Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides con estructuras químicas (Fig. 1) y propiedades físicas específicas; son sintetizados por plantas y otros organismos fotosintéticos como algas y algunos hongos y bacterias, generando colores amarillo, naranja y rojo. La acumulación de carotenoides depende de las condiciones de desarrollo de los organismos, tales como pH, temperatura, y niveles de oxígeno (Liu

y Lee, 2000). En los animales, los carotenoides provienen de los alimentos como fuentes exclusivas, debido a que no pueden sintetizarlos *de novo* (Cardinault *et al.*, 2006).

En organismos fotosintéticos, las dos principales funciones atribuidas a estos compuestos son la absorción de energía para su uso en la fotosíntesis y la protección de la clorofila contra el daño fotooxidativo (Armstrong y Hearst, 1996), mientras que en no fotosintéticos han sido vinculados a mecanismos de prevención de la oxidación (Amengual *et al.*, 2011).

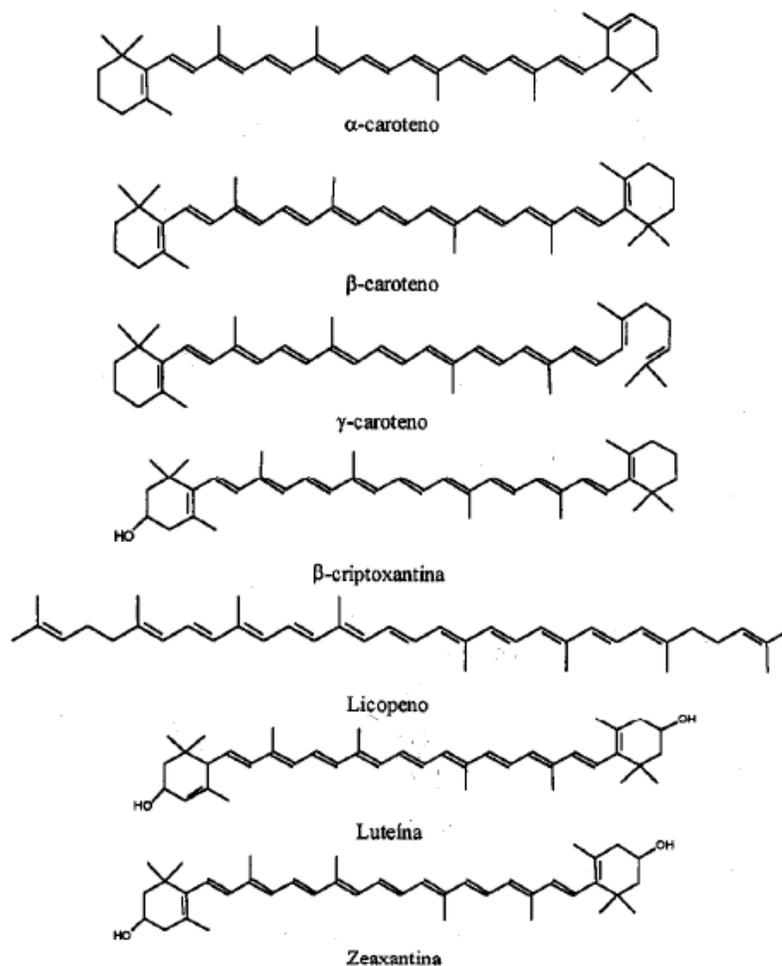


Figura 1. Estructura química de algunos carotenoides

Los carotenoides se dividen en dos grupos, uno soluble en hidrocarburos (acetona, acetonitrilo, hexano, cloroformo, diclorometano, etc.) llamado carotenos y

el otro, poco soluble en ese solvente pero soluble en etanol denominado xantofilas (Goodwin, 1954). El caroteno más abundante en la naturaleza, y el principal miembro de este grupo, es el β -caroteno (Morgan *et al.*, 1969; Strachan *et al.*, 1993; Britton *et al.*, 2008), a tal punto que el contenido total de carotenos de muchos alimentos difiere poco de su contenido de β -caroteno.

Como tetraterpenoide, consta de 40 átomos de carbono en una estructura de núcleo de dobles enlaces conjugados sustituidos con dos anillos β -ionona. Debido a estos 9 dobles enlaces conjugados, el β -caroteno muestra un pico de mayor absorción en el espectro de luz visible a ~450 nm, absorbiendo la luz azul y verde y reflejando la amarilla, por lo cual es responsable de la coloración de naranja a rojo del compuesto (Britton *et al.*, 1995).

En los sistemas biológicos, el isómero predominante es el todo-*trans*- β -caroteno (isómero E). Sin embargo, los isómeros *cis* han sido encontrados en organismos vivos y muestras de alimentos (O'Neil y Schwartz, 1992), entre ellos están 9-*cis*-, 13-*cis*- y 15-*cis*- β -caroteno (isómeros Z), además de varios di- y poli-*cis* análogos (Grune *et al.*, 2010).

El todo-*trans*- β -caroteno es el mayor precursor de vitamina A (Krinsky y Johnson, 2005). Esto es debido principalmente a su estructura simétrica, porque es el único carotenoide capaz de producir dos moléculas de todo-*trans*-retinal después de la escisión oxidativa del doble enlace central 15,15', que es catalizado por la β -Caroteno 15,15'-monooxigenasa (BCMO1) (Grune *et al.*, 2010).

Los forrajes verdes contienen cantidades elevadas de β -caroteno, y debido a esto, el ganado alimentado en praderas consume y absorbe cantidades significativas de este carotenoide, y dado que no todo el β -caroteno se transforma en vitamina A, el excedente se secreta en la grasa de la leche o se deposita en diversos órganos y tejidos, especialmente en el adiposo (Yang *et al.*, 1993; Hoppe *et al.*, 1996), por lo que bajo sistemas de producción en pastoreo, se observa una pigmentación amarilla en la grasa debido al β -caroteno almacenado en este tejido (Morales *et al.*, 2007).

Se considera que este es el principal responsable de la coloración indeseable de la grasa debido a que es el carotenoide mayormente detectado en el suero y tejido adiposo de los bovinos, seguido por la luteína (Yang *et al.*, 1992; Knight *et al.*, 1993; Mora *et al.*, 2000).

Metabolismo de los Carotenoides

Los retinoides son necesarios para el mantenimiento de muchos procesos fisiológicos esenciales en el organismo, incluyendo el crecimiento, desarrollo, visión y reproducción normales, un sistema inmunológico y piel saludables, por lo que con el fin de mantener estos procesos fisiológicos esenciales, los animales deben adquirir los retinoides de la dieta (D'Ambrosio *et al.*, 2011).

El metabolismo de los carotenoides y retinoides (retinal, retinol, ácido retinoico y ésteres de retinilo) es complejo e implica muchas proteínas transportadoras y enzimas específicas, así como otras proteínas que pueden estar implicadas en la mediación de triglicéridos y/o el metabolismo del colesterol (Fig. 2) (D'Ambrosio *et al.*, 2011).

Los procesos digestivos representan los primeros pasos entre la dieta y la acumulación de carotenoides en el animal. En el caso del β -caroteno, este prácticamente no se ve afectado por la fermentación ruminal (Van Soest, 1994; Mora *et al.*, 1999), siendo transportado hasta el intestino delgado, que es el sitio primario para su absorción (Glover, 1960; Morales *et al.*, 2007).

Para la absorción óptima de los carotenoides y retinoides, debe haber grasa presente en la dieta. Los ácidos grasos, son necesarios para facilitar la entrada de estas moléculas a los enterocitos, debido a que se necesita para permitir la formación óptima de los quilomicrones, ya que tanto los retinoides como los carotenoides, al igual que el resto de los lípidos de la dieta, entran en el cuerpo como componentes de los quilomicrones (D'Ambrosio *et al.*, 2011).

El transporte de los carotenoides hacia el interior de la célula está mediado por una clase de proteínas conocidas como receptores Scavenger, en particular el

Receptor Scavenger Clase B tipo I (RS-B1), el cual ha sido identificado en la membrana plasmática de varios tipos celulares (Kiefer *et al.*, 2001; Reboul *et al.*, 2005; Van Bennekum *et al.*, 2005), considerándose un mediador clave de la captación de β -caroteno por el enterocito a partir de la luz intestinal (Van Bennekum *et al.*, 2005; During y Harrison, 2007; Lobo *et al.*, 2010).

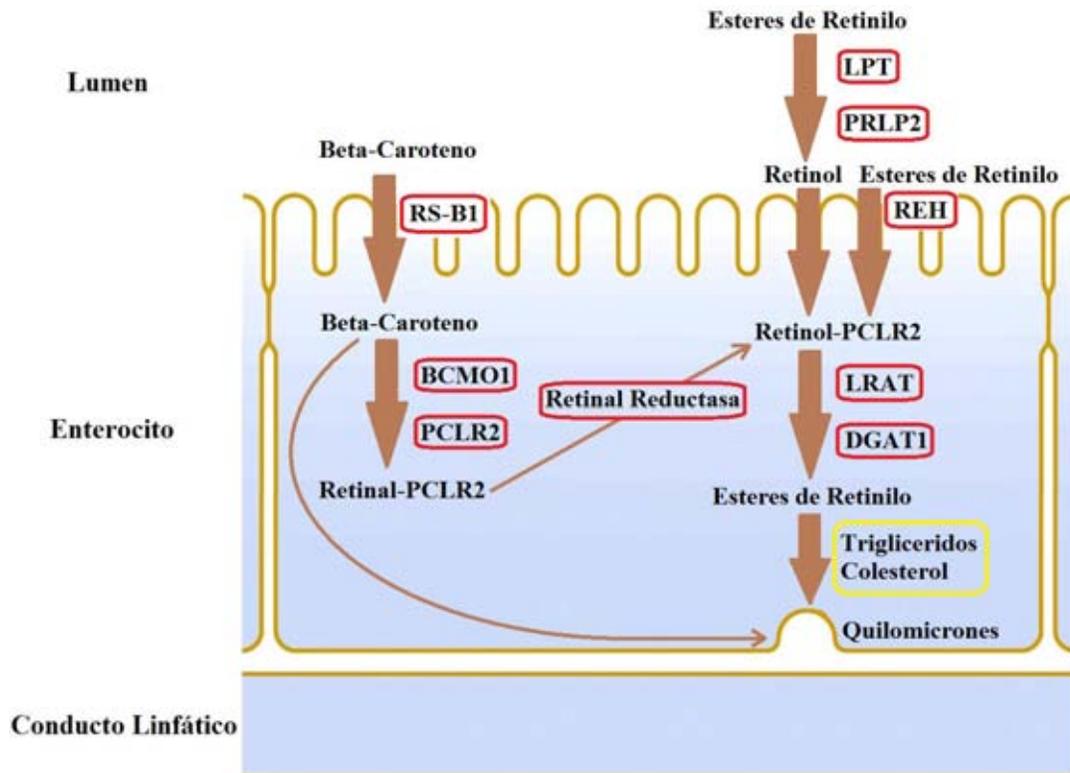


Figura 2. Metabolismo de β -caroteno a nivel intestinal. BCMO1: β -Caroteno-15,15'-Monooxigenasa; RS-B1: Receptor Scavenger Clase B tipo I; PCLR2: Proteínas Celulares Ligadoras de Retinoides Tipo II; LPT: Lipasa Pancreática de Triglicéridos; PRLP2: Proteína Relacionada a Lipasa Pancreática; REH: Retinil Ester Hidrolasa; LRAT: Lecitina Retinol Aciltransferasa; DGAT1: Diacilglicerol Aciltransferasa.

Una vez dentro del enterocito, las oxigenasas de carotenoides, que se expresan en diversos tejidos y tipos celulares, catalizan la escisión oxidativa de distintos dobles enlaces de los carotenoides. Actualmente se menciona que existen

dos de estas enzimas, la β -Caroteno 15,15'-Monooxigenasa (BCMO1) y la β -Caroteno 9,10-Oxigenasa (BCMO2).

La BCMO1 se localiza en el citoplasma y corta el doble enlace central 15,15' del β -caroteno, produciendo dos moléculas de retinal (Glover, 1960; Weng *et al.*, 1999; Morales *et al.*, 2007). Estudios en ratones knockout (KO) y en humanos, muestran que BCMO1 es una enzima crítica para la producción de vitamina A (Van Bennekum *et al.*, 2000; Reboul *et al.*, 2006).

La función fisiológica de la BCMO2 es menos conocida. Los estudios bioquímicos revelan que esta enzima escinde los carotenos tales como β -caroteno y licopeno en el doble enlace C10, C9 para producir una cadena larga y un apocarotenoide de cadena corta (Van Bennekum *et al.*, 2005; During y Harrison, 2007). Dicha escisión excéntrica de β -caroteno se ha discutido como una ruta alternativa para la producción de vitamina A. Sin embargo, ratones deficientes de BCMO1 muestran deficiencia de vitamina A, a pesar de expresar BCMO2 (Van Bennekum *et al.*, 2000), por lo que se considera que solo BCMO1 es significativa en el organismo para la formación de retinoides a partir de carotenoides dietarios (Hessel *et al.*, 2007; Fierce *et al.*, 2008).

Las carotenoide-oxigenasas pueden ser divididas en mono o di oxigenasas, basado en dos diferentes mecanismos de catálisis. El oxígeno atómico del producto de las monooxigenasas es proveído por oxígeno molecular y agua, vía un epóxido como producto intermedio, mientras que las dioxigenasas sólo utilizan oxígeno molecular, vía un dioxietano intermedio (Fig. 3) (Leuenberger *et al.*, 2001).

BCMO1 es una proteína soluble de 63 kDa que contiene Fe^{2+} . Se expresa en el intestino delgado (en los niveles más proximales al estómago), hígado, riñón, pulmones, piel, testículos, el epitelio pigmentario de la retina ocular y en un gran número de tejidos embrionarios (D'Ambrosio *et al.*, 2011).

En este sentido, se ha demostrado que la eficiencia de conversión de β -caroteno en retinal en el interior de las células de la mucosa intestinal por parte de

BCMO1 varía dependiendo de la especie animal (Tee, 1992), siendo cinco veces menor en bovinos que en cabras (Mora *et al.*, 2000), mientras que en ovinos, el β -caroteno absorbido es casi totalmente transformado en retinal en los enterocitos (Prache *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 1992).

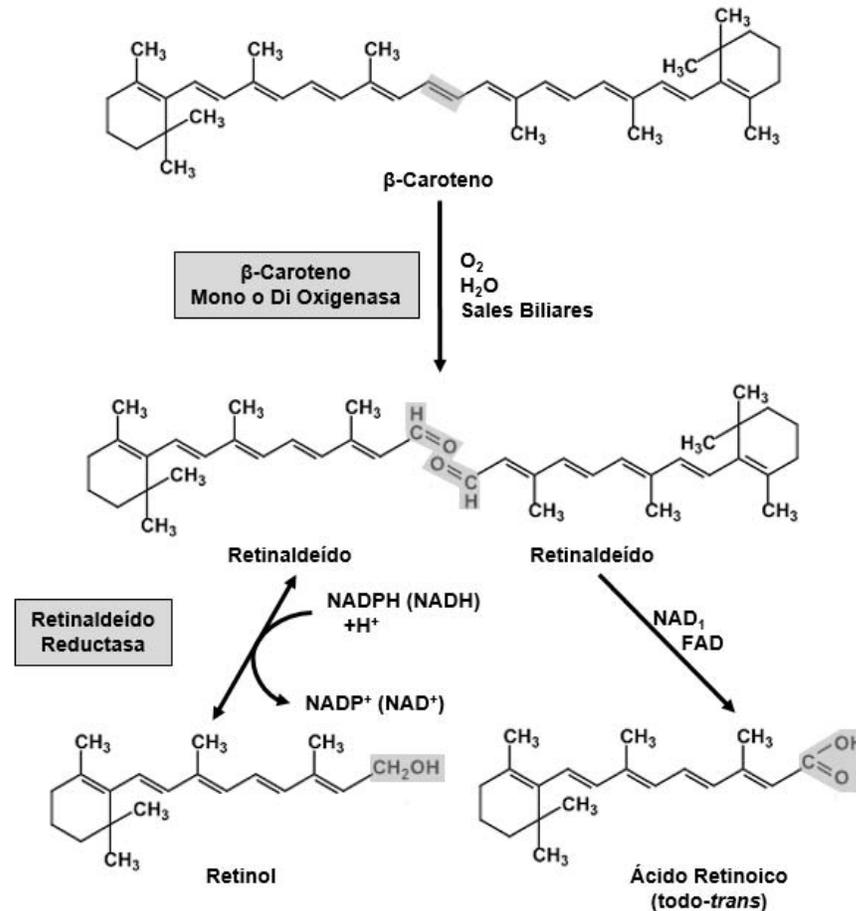


Figura 3. El β -caroteno y su desdoblamiento a retinaldehído y la reducción de éste a retinol o su oxidación a ácido retinoico.

Una vez que las carotenoide-oxigenasas escinden a los carotenoides y se forma retinal, éste se une a la Proteína Celular Ligadora de Retinoides Tipo II (PCLR2), mientras que el β -caroteno intacto y sin modificar se puede incorporar junto con grasas y colesterol en los quilomicrones. En humanos adultos PCLR2 se ha reportado que se expresa solamente en la mucosa intestinal, facilitando la óptima absorción de retinol de la dieta (Ong *et al.*, 1994).

El retinal producido a partir de la escisión de β -caroteno debe someterse a una reducción para formar retinol. Esta es catalizada por una o más Retinal Reductasas (D'Ambrosio *et al.*, 2011).

Los ésteres de retinilo dietarios que se encuentran en el lumen intestinal son convertidos en retinol mediante su hidrolisis por la Lipasa Pancreática de Triglicéridos (LPT) o por una Proteína Relacionada a Lipasa Pancreática (PLRP2). También pueden ser hidrolizados en el borde de cepillo intestinal por una Retinil Ester Hidrolasa (REH), formando retinol. Este retinol se une a PCLR2 en el enterocito y es esterificado nuevamente a ésteres de retinilo por la acción de la Lecitina Retinol Aciltransferasa (LRAT) y la Diacilglicerol Aciltransferasa (DGAT1). Los ésteres de retinilo resultantes son entonces empacados junto con las grasas y colesterol en los quilomicrones, los cuales son secretados hacia el sistema linfático.

El β -caroteno que no es convertido en retinal, también es incorporado en los quilomicrones en el intestino delgado, o es unido a lipoproteínas de alta densidad en el hígado y es eliminado de la circulación, siendo transportado y almacenado junto con otros compuestos lipídicos en diferentes tejidos, incluyendo el tejido adiposo (Yang *et al.*, 1992; Schweigert, 1998), ocasionando la coloración amarillenta (Mora *et al.*, 2000; Mora *et al.*, 2001).

Implicaciones de la Pigmentación de Canales

La naturaleza y cantidad de carotenoides presentes en los productos de rumiantes (carne y leche) varían ampliamente de acuerdo con el contenido de los alimentos ingeridos por los animales (Priolo *et al.*, 2002; Havemose *et al.*, 2004). Los forrajes verdes son fuentes ricas de β -caroteno, por lo que el ganado en pastoreo consume grandes cantidades de este pigmento, el cual en el caso de los bovinos (Prache *et al.*, 2003), puede ser de aproximadamente 35 veces los requerimientos diarios de este compuesto (NRC, 2000).

Como no todo el β -caroteno ingerido y absorbido se transforma en vitamina A, particularmente en bovinos (Mora *et al.*, 2000), el excedente pasa al torrente

sanguíneo y se deposita principalmente en tejido adiposo, donde su acumulación incrementa la pigmentación amarilla en la grasa (Strachan *et al.*, 1993), observándose que aproximadamente 12.9% de las canales bovinas provenientes de las diversas regiones de México muestran esta pigmentación (Fig. 4) (Méndez *et al.*, 2009), estando la intensidad de la tonalidad correlacionada con su contenido de carotenoides y la concentración de β -caroteno en plasma (Knight *et al.*, 1993).



Figura 4. Canal de bovino con la grasa pigmentada de amarillo.

El color es un factor importante asociado con la calidad de los alimentos (Fergus, 1993). La apariencia, inocuidad, características sensoriales y aceptabilidad se relacionan con el color de los alimentos. Cuando un producto alimenticio muestra un color inhabitual (que se observa con escasa frecuencia en la población general), es rechazado por el consumidor, señalando que pudiera estar en mal estado, tener defectos debido a un mal proceso de elaboración o estar adulterado (Tee, 1992).

Sin embargo, a pesar de que el color (tonalidad amarilla) no afecta ni el sabor ni el valor nutritivo de la carne (Mora y Shimada, 2001; Bidner *et al.*, 1986; McCaughey y Cliplef, 1996; Simonne *et al.*, 1996), sí es indeseable (Barrón *et al.*, 2004), ya que las canales pigmentadas son rechazadas por el consumidor final, tanto nacional como extranjero representando una baja en el precio de la carne

(Mora y Shimada, 2001), ya que estos prefieren la carne de bovino con grasa de color blanco (Morales *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 1993).

Este rechazo de las canales pigmentadas (tonalidad amarilla) se da porque los consumidores suponen que los cortes provienen de carne más dura (menor terneza), animales de mayor edad o de desecho de la industria láctea (Barrón *et al.*, 2004), siendo probablemente inconscientes del hecho de que algunos animales jóvenes, con carne altamente deseable, podrían desarrollar canales con grasa amarilla cuando consumen forrajes frescos (Forrest, 1981). En este sentido, Bidner *et al.* (1986) mencionan que los bovinos alimentados en pastoreo presentan un mayor grado de pigmentación de la grasa y requieren un mayor tiempo para alcanzar el peso de sacrificio, pero esto no afecta ni la terneza ni la jugosidad de la carne, en comparación con animales alimentados con dietas altamente energéticas.

Con la finalidad de evitar este rechazo y pérdidas económicas, los bovinos son desarrollados en pastoreo y posteriormente son confinados y alimentados con dietas basadas en granos de cereales y forrajes secos durante varios meses previo al sacrificio (Forrest, 1981), ya que los bovinos finalizados en corral, a diferencia de los provenientes de pastoreo, prácticamente no consumen β -caroteno, por lo que no depositan los pigmentos que causan la coloración del tejido adiposo (Hidiroglou *et al.*, 1987), logrando así reducir parcialmente la pigmentación amarilla de las canales (Hidiroglou *et al.*, 1987). Forrest (1981) menciona que mediante una preengorda de 169 días en pastoreo, seguido por 56 días de engorda en corral, se observa una disminución en la concentración de 0.28 hasta 0.17 mg/g de β -caroteno en la grasa, produciendo canales y carne que probablemente serían aceptables para el consumidor.

No se sabe si esta disminución en la coloración es el resultado de la movilización y oxidación de los carotenoides en el tejido adiposo, el efecto de la dilución debido a un aumento de grasa por el crecimiento del animal o a ambos (Strachan *et al.*, 1993). Es posible que el depósito de β -caroteno en tejido adiposo muestre una rotación constante, que es paralela a la movilización de ácidos grasos,

modulada por la utilización de hormonas que afectan el metabolismo de triglicéridos. Sin embargo, hasta la fecha los factores que influyen en el último aún no se han dilucidado (Arias *et al.*, 2009).

Estas estrategias no garantizan la efectividad de la despigmentación. Además, en muchos casos esto no constituye una alternativa económicamente viable (Barrón *et al.*, 2004), resultando en un incremento innecesario en los costos de producción (Mora y Shimada, 2001).

Aunado a lo anterior, demandas futuras de mayor cantidad de cereales para el consumo humano, o para la producción de etanol (Pimentel y Pimentel, 2008), pueden hacer de los forrajes una alternativa atractiva para la finalización de ganado, a pesar de la ganancia de peso inferior (Bidner *et al.*, 1981; Bidner *et al.*, 1986) y la posible coloración de la grasa de la canal (Forrest, 1981; Bidner *et al.*, 1986). Ésta última característica es particularmente interesante en el contexto actual y la cada vez mayor preocupación de los consumidores por el modo de alimentación de los animales y las cualidades intrínsecas de los productos pecuarios, en relación con las condiciones ambientales y de producción tradicionales (Cardinault *et al.*, 2006).

Barrón *et al.* (2012), mencionan que se podría ofrecer heno o ensilaje durante largos períodos, con el fin de reducir el amarillamiento de la grasa de ganado alimentado en pastoreo, ya que se ha observado que los métodos de conservación reducen la concentración de β -caroteno de 97.7 y 67.4% de carotenoides para henificado y ensilaje, respectivamente, en comparación con pasto recién cortado.

Éstas disminuciones podrían deberse principalmente a la radiación solar, ya que la exposición a los rayos UV es capaz de destruir todos los carotenoides. Sin embargo, pueden ocurrir pérdidas moderadas de carotenoides incluso durante el almacenamiento del heno, probablemente debido a la presencia de oxígeno (Noziere *et al.*, 2006).

Aditivos Enzimáticos en Nutrición Animal

“Bajo este rubro se clasifican todos aquellos compuestos o fármacos que se adicionan a los ingredientes y cuyo uso mejora en alguna forma la apariencia, la vida en bodega, la aceptación, la ingestión, la digestión, la absorción, o el metabolismo, aunque en rigor, no sean estrictamente esenciales para la nutrición del animal” (Shimada, 2015).

En este grupo se encuentran las enzimas, las cuales se emplean con objeto de complementar la acción de las proteínas que se producen en el aparato digestivo, así se digieren los nutrimentos específicos que los animales no desdoblan eficientemente (Shimada, 2015).

Desde 1980 los aditivos basados en enzimas alimenticias juegan un papel importante en la mejora de la eficiencia de la producción animal, cambiando el perfil nutricional de los ingredientes alimenticios. Entre otras funciones, las enzimas alimenticias eliminan ciertos componentes anti-nutricionales de los alimentos, permitiendo que los animales aprovechen más nutrientes, mejorando la eficiencia alimenticia. Además, juegan un rol importante en la reducción de las excretas, disminuyendo el impacto negativo de la producción animal sobre el ambiente (Bedford y Partridge, 2010).

La reducción del costo de la alimentación es la principal razón para usar enzimas alimenticias, ya que estas mejoran la digestibilidad de la energía, proteínas y minerales, por lo que se puede reformular utilizando ingredientes que contengan niveles menores de esos nutrientes (Bedford y Partridge, 2010).

Los aditivos enzimáticos deben ser: activos en el animal una vez que son administrados, estables durante su almacenamiento y ser compatibles con minerales, vitaminas y otros ingredientes alimenticios.

Las enzimas que utilizan los animales son producidas por ellos mismos o por los microorganismos presentes en el intestino. Sin embargo, este proceso no es

100% efectivo por los factores anti-nutricionales que interfieren con la digestión o porque el animal no posee las enzimas necesarias para romper ciertos componentes del alimento, por lo que al complementar a los animales con enzimas específicas, se incrementa la eficiencia de la digestión.

Los aditivos enzimáticos son usados para incrementar la biodisponibilidad de los nutrientes o para complementar las enzimas producidas por el sistema digestivo inmaduro de los animales jóvenes. Estas enzimas no dejan residuos en carne, leche o huevo porque, al ser proteínas son degradadas o excretadas por el animal (Bedford y Partridge, 2010).

En nutrición animal se utilizan diferentes tipos de enzimas, entre las que se encuentran carbohidratasas, proteasas y fitasas. El mercado de las enzimas alimenticias en animales creció un 13% por año en la década de 1998 al 2008. Actualmente excede los 650 millones de dólares anuales, ya que las enzimas son extensamente usadas para mejorar la nutrición de cerdos, aunque su uso en acuicultura y en rumiantes es aún reducido (Bedford y Partridge, 2010).

Aditivos Enzimáticos en Rumiantes

Principalmente se utilizan celulasas, hemicelulasas, proteasas y esterases de ácido ferúlico, aunque la mayoría de la investigación se ha centrado en las enzimas fibrolíticas, porque incrementando la digestibilidad de la fibra, se incrementa el consumo de energía y, por lo tanto, la producción animal. También se ha trabajado sobre el uso de amilasas para incrementar la utilización del almidón (Bedford y Partridge, 2010).

Aunque el modo de acción de las enzimas ruminales permanece desconocido por la complejidad del microbioma ruminal y los procesos de la digestión de fibra, se sabe que los aditivos enzimáticos permanecen relativamente estables en el ambiente ruminal, particularmente cuando se administran junto con el alimento. Esto se debe a que las condiciones en el rumen después de la alimentación son de baja actividad proteolítica y bajo pH, ayudando a incrementar

la estabilidad de las enzimas alimenticias. Además, la presencia de sustratos alimenticios reduce la sensibilidad de las enzimas a la inactivación (Morgavi *et al.*, 2001).

La capacidad hidrolítica de las enzimas en el rumen dependerá de la cantidad de enzima aplicada y de su capacidad de mantenerse activa bajo las condiciones ruminales (pH 5.5-6.8 y temperatura de $39\pm 1^{\circ}\text{C}$). Mientras que algunas enzimas tienen alta actividad cuando se encuentran en sus óptimas condiciones de catálisis, la actividad puede ser mucho menor cuando las condiciones del ensayo simulan las condiciones ruminales, afectando la respuesta animal a la suplementación (Morgavi *et al.*, 2001).

En el caso de los rumiantes, las enzimas alimenticias son administradas en diversas formas, ya sea rociada sobre el forraje o la dieta totalmente mezclada, agregada al concentrado, como polvo agregado al alimento o colocada directamente en el rumen.

Se ha observado que en el caso de los aditivos enzimáticos para rumiantes existe una gran variación en la respuesta animal, por lo que es necesario comprender las razones de esta variabilidad. Por ejemplo, las enzimas comúnmente usadas en rumiantes (del tipo fibrolíticas) parecen ser más efectivas cuando se utilizan en animales con altos requerimientos energéticos, como vacas en lactación temprana (<100 días de lactación) o ganado especializado en producción de carne de rápido crecimiento o cuando se administran directamente al alimento, antes de que éste sea ofrecido a los animales (Bedford y Partridge, 2010).

Cabe mencionar que la actividad enzimática depende principalmente de la composición química del alimento sobre el cual se espera que la enzima trabaje, por lo que una proteína en particular podría no ser efectiva en todas las dietas. Debido a lo anterior, un aditivo enzimático necesita ser formulado para un tipo específico de alimento, la respuesta depende también de la calidad del forraje.

Como la respuesta enzimática no puede ser estimada con precisión, se necesita probar los aditivos enzimáticos utilizando bioensayos que se correlacionen con la respuesta en el rumen. Utilizar un ensayo *in vitro* con líquido ruminal puede ser una herramienta poderosa para seleccionar enzimas que mejoren la producción animal, ya que este método es menos costoso, requiere de menos tiempo y permite un mejor control de las condiciones experimentales que un experimento *in vivo* (Bedford y Partridge, 2010).

Purificación de Proteínas

Como el objetivo del presente trabajo es obtener una proteína recombinante para su uso en rumiantes con una finalidad fisiológica, se requiere purificar grandes cantidades de la molécula.

Ello requiere del uso de técnicas, al menos en etapas tempranas, que tienen una alta capacidad pero baja resolución, como precipitación fraccional con sales o solventes orgánicos (Novakova y Vickova, 2009). Cuando el extracto ha sido reducido en volumen y proteínas a niveles manejables, pueden ser utilizados los métodos de resolución y capacidad media (Cromatografía de Intercambio Iónico) o de alta resolución pero baja capacidad de purificación (Cromatografía de Afinidad) (Cutler, 2004; Hage, 1999).

Muchas proteínas retienen su actividad cuando son manejadas en amortiguadores neutros a baja temperatura, pero hay excepciones que deben tener diferentes estrategias de purificación. Algunas otras retienen mejor su actividad a bajas temperaturas, pero hay otras que son crioprecipitables por pérdida de solubilidad a bajas temperaturas. Uno de los objetivos en la purificación de esta proteína es que conserve su actividad, por lo que esto restringe el rango de técnicas posibles a utilizar (Cutler, 2004). Por ejemplo, la cromatografía de fase inversa requiere del uso de solventes orgánicos para extraer a las proteínas y esto raramente es compatible con la conservación de la actividad (Yoshida, 2004).

El grado de purificación depende del propósito de la misma. Una purificación al 50% es aceptable para su uso con anticuerpos monoclonales, al 95% podría no ser aceptable para su uso con anticuerpos policlonales, particularmente si los contaminantes son altamente inmunogénicos, en cambio una preparación relativamente impura puede ser aceptable para estudios de cinética enzimática. Una muestra al 95% de pureza es adecuada para una secuenciación de aminoácidos. El nivel más alto de purificación es necesario cuando la proteína sea utilizada con fines terapéuticos (Cutler, 2004).

El propósito de la purificación es obtener una población de moléculas con idéntica estructura covalente y tridimensional, que en adición contienen agua y otras partículas como iones del amortiguador. Aún las proteínas terapéuticas contienen impurezas a un nivel de partes por millón. Tal vez no sea posible obtener una muestra altamente purificada, ya que la extra purificación requiere tiempo, incrementa el costo del producto y reduce el rendimiento del producto obtenido, pero es posible obtenerla en suficiente estado de purificación para los propósitos de una investigación particular (Cutler, 2004).

Las fuentes microbianas o fúngicas son la mejor elección como fuente de la enzima porque usualmente crecen bajo condiciones definidas, asegurando la consistencia del material y, en algunos casos, permitiendo la manipulación de la expresión de la proteína a niveles deseados mediante el control de las condiciones y del medio de crecimiento. Una desventaja de utilizar estas fuentes es que poseen una pared celular que dificulta romper la célula, por lo que los microorganismos no son ideales para purificaciones a gran escala, a menos que el laboratorio cuente con equipo especializado para tal fin.

La purificación de proteínas involucra la separación de una especie de entre 1000, o más, con esencialmente las mismas características generales, en una mezcla en la cual ellas pueden constituir una fracción del 1% del total. Por ello es necesario explotar aquellas características en las cuales las proteínas difieren de

las otras para desarrollar un programa de purificación (Cutler, 2004). Entre las más importantes propiedades que pueden utilizarse son las siguientes:

➤ **Solubilidad:** Las proteínas difieren en su balance de cargas y en los aminoácidos polares o hidrófobos que exponen en su superficie y esto les da una capacidad de solubilización bajo condiciones particulares. Tienen a precipitarse diferencialmente en soluciones que contienen sales neutras o solventes orgánicos (Novakova y Vickova, 2009). Este procedimiento es inespecífico porque la precipitación ocurre sobre un rango de diferentes proteínas, por lo que no se puede obtener una alta purificación por este método (dos o tres veces en muchas circunstancias).

➤ **Carga:** Las proteínas difieren entre ellas en la proporción de aminoácidos cargados que contienen (aspártico, glutámico, lisina, arginina e histidina). Por lo que diferirán en la carga neta en un pH particular u otra manifestación de la diferencia entre ellas, en el pH al cual su carga neta es cero (punto isoeléctrico). Esta diferencia es explotada en la Cromatografía de Intercambio Iónico (la herramienta más poderosa en la purificación de proteínas). Esta hace uso de la unión de proteínas con una carga neta (+ o -) a un soporte sólido que contiene un material con grupos cargados del signo opuesto (+ o -) (Charcosset, 1998). La fuerza de unión dependerá de la magnitud de la carga de la proteína en particular.

➤ **Tamaño:** Esta propiedad es explotada directamente en técnicas como Cromatografía de Exclusión por Tamaño y Ultrafiltración. Las proteínas en solución pasan a través de una columna de poros. Las proteínas grandes no tienen acceso y las proteínas pequeñas tienen el paso libre. Está disponible un rango de materiales con diferente tamaño de poro. Este método tiene bajo poder de resolución pero es usado en algunas circunstancias, como cuando la proteína de interés tiene un tamaño extremadamente grande (Charcosset, 1998). En la ultrafiltración, el líquido es forzado a pasar a través de una membrana con poros de tamaño controlado, por los cuales los solutos pequeños pueden pasar, pero los grandes no. El principal valor de esta técnica es para la concentración de proteínas en solución.

➤ **Unión Específica:** Muchas proteínas ejercen su función biológica mediante su unión a algunos otros componentes en el sistema, por ejemplo enzimas que se unen a su sustrato, activadores, inhibidores, hormonas, anticuerpos, antígenos, etc. Este fenómeno puede ser explotado mediante la unión del ligando a un soporte sólido y usándolo como un medio cromatográfico. Un extracto de proteína parcialmente purificada es pasado a través de esta columna a la cual las proteínas se van a unir por su afinidad con el ligando. La extracción se logra variando las condiciones del solvente o introduciendo un soluto que se une fuertemente al ligando o a la proteína (Hage, 1999; Charcosset, 1998). Este método es llamado Cromatografía de Afinidad.

➤ **Propiedades Especiales:**

✓ Estabilidad en Calor: En estas circunstancias es posible obtener una purificación substancial calentando el extracto crudo a una temperatura a la cual la proteína blanco es estable pero los contaminantes son desnaturalizados y precipitados (Cutler, 2004).

✓ Estabilidad a pH Extremo: Mediante la incubación del extracto a pH alto o bajo se pueden obtener proteínas parcialmente purificadas (Cutler, 2004).

Es importante monitorear la actividad de la enzima en cada paso de purificación porque es posible que se pierda si uno o más pasos involucran condiciones bajo las cuales la proteína es inestable.

El uso de bacterias para la sobreexpresión de proteínas recombinantes es popular por el bajo costo y las altas tasas de obtención del producto (Balbás, 2001). Un problema en la obtención de las proteínas es que se requiere la lisis de la pared celular de las bacterias. Existen métodos enzimáticos (hidrolisis por lisozima) y mecánicos (detergentes, presión osmótica) para romper la pared celular y la elección de alguno de ellos depende de la escala del proceso (Cull y McHenry, 1990).

En algunos casos el nivel de expresión de la proteína recombinante puede llegar arriba del 40% de toda la proteína celular, sin embargo, en muchos casos

resulta en la formación de agregados proteicos insolubles, conocidos como cuerpos de inclusión, que pueden contener mucha o toda la proteína de interés (Kane y Hartley, 1991). La naturaleza de la proteína expresada y el ritmo y nivel de expresión influyen en la formación de estos agregados. Se menciona que el tiempo insuficiente del péptido naciente para plagarse es la causa de esto. Las proteínas altamente hidrofóbicas o altamente cargadas son más susceptibles de formar cuerpos de inclusión (Mukhopadhyay, 1997).

Se puede incrementar la cantidad de proteína soluble mediante la disminución de la temperatura de crecimiento, una reducción de la cantidad del agente inductor, incrementando la aireación (Thomas et al., 1997), con la co-expresión con proteínas chaperonas o mediante choque térmico (*E. coli*) para inducir la expresión de chaperonas endógenas (Cutler, 2004).

Estos agregados pueden ser ventajosos porque permiten grandes niveles de expresión y pueden ser fácilmente separados de la porción citoplasmática por centrifugación, siendo un paso efectivo de purificación (Cutler, 2004).

La mayor desventaja de los cuerpos de inclusión es que la extracción de la proteína de interés generalmente requiere del uso de agentes desnaturizantes, lo cual causa problemas cuando se requiere a la proteína en su plegamiento nativo, porque los métodos de naturalización son raramente 100% efectivos. Algunos agregados pueden ser solubilizados por pH y temperatura extrema, pero muchos requieren agentes desnaturizantes fuertes. El agente solubilizador caotrópico más comúnmente utilizado es la urea, que es más compatible con la naturalización de las proteínas. También se usan agentes reductores para prevenir la formación de enlaces disulfuro entre agregados o polipéptidos desnaturizados (Cutler, 2004).

Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados

La cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) está basada en la afinidad que tienen ciertos iones metálicos como el Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} por la histidina y la cisteína en soluciones acuosas. Hoy en día es la cromatografía de

afinidad más extensamente usada, si no es que de todas las cromatografías en general (Burgess y Deutscher, 2009).

Fue inicialmente desarrollada para la purificación de proteínas nativas con una afinidad intrínseca por los iones metálicos. El desarrollo de esta técnica fue acelerado por la rápida maduración de las técnicas de recombinación genética en la década de 1970 y por la invención de un mejor ligando quelato, el ácido nitroacético, en 1980 (Burgess y Deutscher, 2009).

Hoy en día se utiliza en la purificación cromatográfica de un amplio rango de proteínas, que van desde metaloproteínas a anticuerpos, proteínas fosforiladas y proteínas recombinantes con etiqueta de histidinas. La purificación de proteínas recombinantes modificadas para generar polipéptidos extendidos con oligohistidinas (His-tag), utilizando ácido nitroacético en la matriz de la columna representa la más importante aplicación del IMAC (Cutler, 2004).

La elección del ion metálico inmovilizado para utilizar con el IMAC depende de la proteína a purificar. Mientras que los cationes trivalentes como Al^{3+} , Ga^{3+} y Fe^{3+} o tetravalentes como Zr^{4+} son preferidos para capturar fosfoproteínas y fosfopéptidos, iones divalentes como Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} son usados para la purificación de proteínas con etiqueta de histidinas (His-tag) (Burgess y Deutscher, 2009).

Purificación de Proteínas con Etiqueta de Histidinas

La aplicación más importante del IMAC es la purificación de proteínas recombinantes fusionadas con un epítipo que contiene seis o más residuos de histidinas (His-tag). Debido a la alta afinidad y especificidad de la His-tag, un simple paso de cromatográfico, en la mayoría de los casos, lleva a un grado de purificación proteica que es suficiente para muchas aplicaciones (Cutler, 2004).

La estructura de la etiqueta, como lo son su posición, secuencia y longitud, puede influir en el grado de expresión proteica, en la accesibilidad de las histidinas por el ligando de la matriz del IMAC, en la estructura tridimensional de la proteína,

en la formación de cristales o en su solubilidad y actividad. La etiqueta más común consiste en seis residuos de histidinas consecutivas, lo cual provee seis sitios de unión que son suficientes para desplazar el equilibrio asociación/disociación hacia el lado de la asociación, lo cual lleva a una unión estable del péptido al ligando (Burgess y Deutscher, 2009).

Hay muchas ventajas de purificar proteínas utilizando esta técnica cromatográfica, como lo son su bajo costo y la simplicidad de su uso. Además, la interacción proteína-ligando funciona tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes (urea 8M o guanidina 6M), permitiendo naturalizaciones posteriores, incluso en columna. También funciona bajo condiciones oxidantes o reductoras, además de tener alta afinidad y especificidad, permitiendo alta eficiencia de purificación aún en presencia de altas concentraciones de proteínas (Burgess y Deutscher, 2009).

En esta técnica, la elución de las proteínas se logra introduciendo un soluto que se une fuertemente al ligando o a la proteína, siendo en este caso el imidazol el más comúnmente utilizado (Cutler, 2004).

Justificación

El β -caroteno se encuentra en un nivel elevado en los forrajes que se utilizan para la producción de ganado bovino, lo que trae como consecuencia la obtención de canales con grasa pigmentada de color amarillo, lo que a su vez demerita su valor económico. La responsable de esta coloración es la baja actividad de la enzima BCMO1. Debido a lo anterior, el uso de métodos biotecnológicos que incrementen la actividad de esta proteína en el tubo digestivo de los bovinos podría amortiguar este problema, ya que esta enzima escinde al β caroteno en dos moléculas de retinal, eliminando la fuente de coloración y optimizando la producción en pastoreo, aprovechando la máxima capacidad del rumen como fermentador, enviando al mercado canales de buena calidad y del agrado del consumidor.

Hipótesis

La hipótesis del presente estudio fue la siguiente:

La proteína BCMO1 recombinante de *Gallus gallus* será purificada a partir de una *E. coli* XL1-Blue, manteniendo una actividad enzimática aceptable para su uso en bovinos.

Objetivos

Los objetivos del presente estudio fueron:

Objetivo General

Desarrollar un aditivo enzimático a partir de la proteína BCMO1 recombinante de *Gallus gallus* que pueda ejercer su actividad en rumen de bovinos.

Objetivos Particulares

1. Estandarizar la metodología de la expresión y extracción de la BCMO1 heteróloga sin que esta afecte su actividad enzimática.
2. Purificar a la BCMO1 recombinante de *Gallus gallus* a partir de una *E. coli* XL1-Blue.
3. Con base a los resultados, calcular la posibilidad del uso de la BCMO1 como aditivo enzimático en bovinos.

Materiales y Métodos

El Gen de la β -Caroteno 15,15'-Monooxigenasa

En el Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN) de la UNAM, se cuenta con una *E. coli* XL1-Blue recombinante transformada en el vector inducible por arabinosa pBAD, el cual tiene insertado el gen de BCMO1 aislado de intestino delgado de *Gallus gallus*. Esta bacteria ha demostrado que sintetiza a la

proteína BCMO1, con actividad *in vitro*, por lo que se decidió utilizarla para realizar la presente investigación. En la figura 5 se presenta el diagrama de flujo que se siguió para conseguir purificar dicha enzima y medir su actividad *in vitro*.

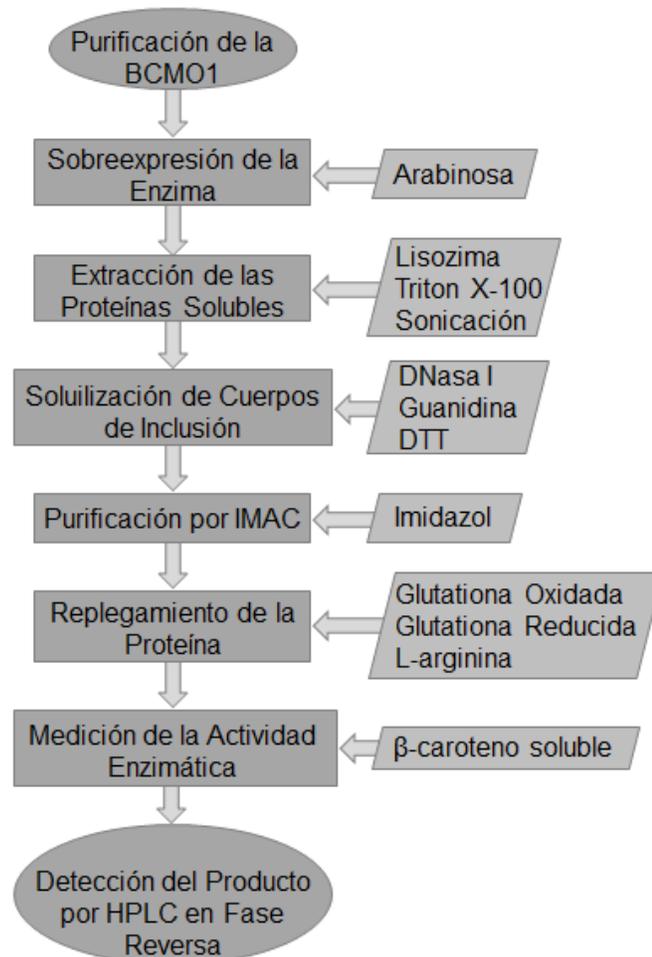


Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología utilizada en el presente trabajo.

Caracterización de la Bacteria

Extracción del ADN plasmídico

Para la caracterización de la bacteria, comprobar que ésta aún conservaba el plásmido, ya que el microorganismo transformado llevaba aproximadamente seis años en ultracongelación, se extrajo el ADN plasmídico para su posterior

secuenciación y digestión con enzimas de restricción para comprobar la identidad e integridad del inserto.

Para la extracción del ADN plasmídico se utilizó el kit Wizard Plus SV Minipreps ADN Purification System de Promega, utilizando la siguiente metodología:

En un tubo Falcon de 50 mL se colocaron 5 mL de medio LB, se agregó ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ y se inocularon con 100 μL de un glicerol de bacterias transformadas ultracongeladas. Se crecieron toda la noche a 37°C en agitación (250 rpm).

Las bacterias obtenidas se centrifugaron a 11,000 g durante 10 min. Para obtener la pastilla celular. La pastilla se resuspendió en 250 μL de la solución de resuspensión, se agregaron 250 μL de solución de lisis, se invirtió 4 veces el tubo para mezclar y se añadieron 10 μL de solución de proteasa alcalina, se invirtió 4 veces nuevamente y se incubó la reacción por 5 min a temperatura ambiente. Después de la incubación se agregaron 350 μL de solución de neutralización, se invirtió 4 veces para mezclar y se centrifugó a 15,000 g durante 10 min.

Se colocó la columna dentro del tubo colector y en ella se decantó el lisado clarificado. Se centrifugó a 15,000 g por un minuto y se desechó la fracción que sobrepasó la columna. Se agregaron 750 μL de solución de lavado y se centrifugó a 15,000 g por un minuto. Nuevamente se desechó la fracción de sobrepaso y se agregaron 250 μL de solución de lavado y se centrifugó a 15,000 g por dos minutos.

Se transfirió la columna a un tubo estéril para de 1.5 mL microcentrifuga, se agregó a la columna 30 μL de agua libre de nucleasas y se centrifugó a 15,000 g por un minuto para eluir el ADN de la columna.

Se evaluó la calidad del ADN obtenido mediante una electroforesis en gel de agarosa (90 V por 50 min) y por la relación de las absorbancias obtenidas a longitudes de onda de 260nm y 280nm (A260/A280) con un espectrofotómetro Nanodrop 1000.

Análisis de Restricción del ADN plasmídico

El ADN plasmídico obtenido se digirió utilizando la enzima de restricción Sac I de Promega, para lo cual se utilizó la siguiente mezcla de reacción en un volumen final de 20 μL en un tubo eppendorf:

- ✓ H_2O estéril: 11.4 μL
- ✓ Buffer J: 2 μL
- ✓ BSA Acetilada [10 $\mu\text{g}/\text{mL}$]: 0.2 μL
- ✓ ADN (1 μg): 5.4 μL
- ✓ Enzima Sac I [10 U/ μL]: 1 μL

Se mezclaron los reactivos gentilmente (por pipeteo), se centrifugó en una microfuga Labnet modelo C1301 y se incubó a 30°C por 3 h en un baño seco marca Boekel. Se evaluó la calidad de la digestión realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1%, el cual fue corrido a 90 V por 50 min y el gel fue documentado en un fotodocumentador MiniBIS Pro de DNR Bio-Imaging Systems

Secuenciación del ADN plasmídico

Para su secuenciación, el ADN se envió a la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM para su secuenciación por el método de terminación con el Big Dye de Applied Biosystems, en un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. Para asegurar la completa secuenciación del inserto, la muestra se secuenció por ambos extremos utilizando los siguientes cebadores:

- ✓ Bad F: ATGCCATAGCATT TTTATCC
- ✓ Bad R: CTGTTTATCAGACCGCTTC

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para comparar la secuencia problema con las almacenadas en la base de datos del GenBank y encontrar las que tienen mayor parecido con la de interés.

Estandarización de la Expresión de la BCMO1 Recombinante

Concentración del inductor

Una vez secuenciado el ADN plasmídico, se corroboró que la bacteria transformada conservara la capacidad de expresar la proteína, estandarizando las condiciones de crecimiento e inducción para obtener la mayor cantidad posible de enzima biológicamente activa. Para esto se utilizó la siguiente metodología:

Debido a que cada enzima recombinante tiene diferentes características de expresión, se incrementó la cantidad de inductor en un rango de 10,000 veces, pasando de 0.00002 a 0.2% de arabinosa en el medio de cultivo.

En un tubo Falcon de 50 mL se hizo un preinóculo inoculando 100 μ L de un glicerol de bacterias transformadas ultracongeladas en 5ml de medio LB con antibiótico (ampicilina 100 μ g/mL) y se crecieron durante 16 h a 37°C en agitación (250 rpm).

Posteriormente se colocaron 10 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) en 12 tubos Falcon de 50 mL, correspondientes a 0, 0.00002, 0.0002, 0.002, 0.02 y 0.2% de arabinosa cada uno y su correspondiente duplicado. Se inocularon con 100 μ L del preinóculo y se crecieron a 250 rpm a 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de ~ 0.5 , momento en el que se agregaron las concentraciones correspondientes de arabinosa a cada tubo y se dejaron creciendo por 4 h a 250 rpm a 37°C.

Trascurrido el tiempo de incubación se tomó un mL de muestra de cada tubo, por duplicado. Se centrifugó a 11,000 g por 10 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

Tiempo de inducción

Una vez establecida la mejor concentración de arabinosa, se procedió a estandarizar el tiempo óptimo de inducción de la enzima recombinante, para lo cual se utilizó la siguiente metodología:

En un tubo Falcon de 50 mL se hizo un preinóculo inoculando 100 μ L de un glicerol de bacterias transformadas ultracongeladas en 5ml de medio LB con antibiótico (ampicilina 100 μ g/mL) y se crecieron durante 16 h a 37°C en agitación (250 rpm).

Posteriormente se colocaron 10 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) en 2 tubos Falcon de 50 mL, se inocularon con 100 μ L del preinóculo y se crecieron a 250 rpm a 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de ~ 0.5 , momento en el que se agregó la arabinosa a cada tubo y se crecieron por 4 h a 250 rpm a 37°C.

Se tomaron muestras (1 mL) del medio de cultivo al tiempo cero (previo a agregar la arabinosa) y a las 1, 2, 3 y 4 h post-inducción. Se centrifugaron a 11,000 g por 10 min, se desechó el sobrenadante y las pastillas celulares se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

Tanto para la concentración de arabinosa como para el tiempo de inducción, el nivel de expresión de la enzima se observó mediante un SDS-PAGE, en un gel de agarosa al 8%. Las pastillas celulares se resuspendieron en 200 μ L de buffer de carga 2X cada una, el cual consistió de:

- ✓ Buffer Superior (Tris HCl 0.5M pH 6.8): 1.5 mL
- ✓ SDS (20%): 9.0 mL
- ✓ Glicerol: 2.0 mL
- ✓ 2-Mercaptoetanol: 2.0 mL
- ✓ Azul de Bromofenol (0.5%): 1.0 mL
- ✓ H₂Omq: 1.5 mL

Una vez resuspendidas las muestras, se colocaron en un baño seco marca Boekel a 100°C por 5 min y se cargaron 5 μ L de muestra en un gel de acrilamida al 8%. Las muestras se corrieron a 100 V por 15 min y posteriormente a 120 V por 2 h en hielo.

Los geles fueron teñidos con plata mediante la metodología propuesta por O'Connell y Stults (1997) y fotodocumentados en un equipo Gel Doc EZ Imager de Bio-Rad mediante el software Image Lab.

Extracción de la Enzima BCMO1

Para la expresión de la BCMO1 recombinante de *E. coli*, la bacteria fue cultivada por 16 h a 37°C en agitación (250 rpm) en 50 mL de medio LB en un matraz de 250 mL con 100 µg/mL de ampicilina, esto es conocido como un preinóculo. Después se inocularon 500 mL de medio de cultivo nuevo en un matraz de 1 L a razón de 1 mL de preinoculo por cada 100 mL de medio LB nuevo con ampicilina a 100 µg/mL y se incubó a 37°C en agitación (250rpm). Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de ~0.5, aproximadamente 2.5 h después, se indujo la expresión de la enzima con arabinosa a una concentración de 0.2% y se incubó por cuatro h a 37°C en agitación (250 rpm).

Una vez transcurridas las cuatro horas de inducción, el medio de cultivo se centrifugó a 9,000 g por 20 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se pasó la pastilla a un tubo falcón de 50 mL previamente pesado. Se lavó la pastilla resuspendiéndola en NaCl 0.9% y se centrifugó a 6,000 g por 10 min a 4°C. Este paso se repitió una vez más.

Una vez lavada la pastilla, se pesó nuevamente el tubo y se hizo el cálculo de bacteria obtenida en peso húmedo, restando el peso del tubo solo a su peso con la pastilla bacteriana. Una vez calculada la cantidad de bacteria obtenida, se agregan 3 mL de buffer de lisis por cada gramo de pellet recuperado, el buffer consistió de:

- ✓ Tris-HCl 50 mM
- ✓ pH 8.0
- ✓ EDTA 1 mM
- ✓ NaCl 50 mM

Una vez agregado el buffer lisis necesario, se adiciona lisozima a una concentración de 300 µg/mL de buffer de lisis y 50 µL de inhibidor de proteasas para proteínas His-tag (libre de EDTA) por cada gramo de bacteria recuperada y se incubó a 4°C en agitación a 60 rpm por 30 min.

Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó 1% de Triton X-100 y se lisaron las bacterias por sonicación mediante 10 pulsos de 30 segundos cada uno con una intensidad de 9 e intervalos de 30 segundos de descanso entre cada pulso, manteniendo el tubo en todo momento en hielo.

Una vez sonicada la muestra, esta se puso a temperatura ambiente y se agregó DNase I a una concentración de 100 U Kunitz/mL de muestra y 10 mM de MgCl₂. Se colocó en agitación a 60 rpm por 15 min, hasta que se remueve todo el ácido nucleico viscoso. Posteriormente se centrifugó a 18,000 g por una hora a 4°C para separar el sobrenadante de los residuos celulares y cuerpos de inclusión. Esta metodología está basada en lo reportado por Burgess y Deutscher (2009).

Solubilización de la BCMO1 a Partir de Cuerpos de Inclusión

Debido a que la *E. coli* transformada con el gen de la BCMO1 de pollo que se utilizó en el presente trabajo expresaba a la proteína recombinante en cuerpos de inclusión, fue necesario estandarizar la metodología para su solubilización en condiciones desnaturalizantes y posterior naturalización para recuperar actividad. Para esto, se siguió la metodología propuesta por Cutler (2004), con algunas modificaciones.

Una vez que se realizó la sonicación de la muestra, se degradó el ADN y se centrifugó para separar la fracción soluble de la insoluble, se desechó la primera. La segunda, la insoluble, se resuspendió en el buffer de solubilización a razón de 3mL por cada gramo de bacteria originalmente obtenida. Este buffer consistió de:

- ✓ Tris HCl 50 mM
- ✓ pH 8.0
- ✓ Guanidina 6 M

- ✓ DTT 5 mM
- ✓ Imidazol 15 mM

Una vez resuspendida la fracción insoluble, esta se puso en agitación a 60 rpm por una hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se centrifugó la solución a 18,000 g por una hora a 4°C para remover cualquier remanente insoluble.

Cuando se utilizó urea o sarkosyl como agentes desnaturizantes, se siguió la misma metodología, con la diferencia de que en el buffer se sustituyó la guanidina con urea (8M) o sarkosyl (0.3% w/v).

Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados

Para la purificación de la enzima se utilizó una columna HisTrap FF de 5mL (GE Healthcare Bio-Sciences) y se siguieron las recomendaciones del fabricante, pero se mantuvieron las condiciones desnaturizantes a lo largo de todo el proceso de purificación.

Para esto, la columna se pre-equilibró con 10 volúmenes de columna del buffer de solubilización sin DTT, compuesto por los siguientes reactivos:

- ✓ Tris HCl 50 mM
- ✓ pH 8.0
- ✓ Guanidina 6 M
- ✓ Imidazol 15 mM

Este pre-equilibrio se realiza para remover todo el níquel débilmente unido a la matriz de la columna para que se evite que sea reducido cuando se adicione el DTT. El flujo fue de 2.5 mL/minuto.

Posteriormente se equilibró la columna con 5 volúmenes de buffer de solubilización al mismo flujo, el cual consistió de:

- ✓ Tris HCl 50mM
- ✓ pH 8.0

- ✓ Guanidina 6 M
- ✓ DTT 5 mM
- ✓ Imidazol 15 mM

El imidazol a bajas concentraciones (10-20 mM) es un reactivo que comúnmente se adiciona en la purificación de proteínas recombinantes con etiqueta de histidinas para inhibir las interacciones inespecíficas de otras proteínas con la matriz de la columna.

Una vez equilibrada la columna, se inyecta la proteína desnaturalizada, máximo 200 mg de muestra, la cual debe de estar clarificada, en caso contrario debe de ser filtrada (poro de 0.45 μ m). La inyección se realizó a un flujo de 1mL/min y se lavó la fracción no unida con 10 volúmenes de columna del mismo buffer, a la misma velocidad de flujo.

La proteína unida se eluyó mediante la adición de 5 volúmenes de columna del buffer de elución a un flujo de 1mL/min. El buffer de elución consistió de:

- ✓ Tris HCl 50 mM
- ✓ pH 8.0
- ✓ Guanidina 6 M
- ✓ DTT 5 mM
- ✓ Imidazol 150 mM

Una vez eluída la proteína, se reequilibró la columna con cinco volúmenes buffer de equilibrio sin agentes desnaturalizantes ni reductores a un flujo de 1mL/min. El buffer de equilibrio consistió de:

- ✓ NaH₂PO₄ 100 mM
- ✓ NaCl 100 mM
- ✓ Glicerol 10%

Para su almacenamiento la columna debe ser limpiada con 5 volúmenes de etanol al 20% y guardarse a temperatura ambiente. Los picos de proteína fueron medidos a una absorbancia de 280nm.

Naturalización de la BCMO1

Debido a que la enzima fue desnaturalizada para extraerla de los cuerpos de inclusión, es necesario naturalizarla para que esta recupere su actividad enzimática. Se utilizó la metodología propuesta por Cutler (2004), con algunas modificaciones.

Una vez que la proteína desnaturalizada fue purificada mediante la cromatografía de afinidad por metales inmovilizados, se procedió a naturalizarla. Para esto se siguió la siguiente metodología.

Se cuantificó la cantidad de enzima eluída mediante la técnica de Bradford (1976) y se calculó la cantidad de buffer de naturalización necesario para que la concentración proteica en solución no excediera los 50 µg/mL. Este buffer consistió de:

- ✓ Tris-HCl 50 mM
- ✓ pH 8.0
- ✓ EDTA 1 mM
- ✓ NaCl 100 mM
- ✓ Glutathiona Oxidada 0.5 mM
- ✓ Glutathiona Reducida 5 mM
- ✓ L-arginina 200 mM

La cantidad necesaria de buffer para hacer la dilución de la proteína fue colocada en un vaso de precipitado y este se colocó en un agitador a baja velocidad. La muestra de proteína fue adicionada gota a gota al buffer en agitación. Una vez diluida la proteína, se mantuvo en agitación a 60 rpm por 2 h. Este proceso se realizó en todo momento dentro de un cuarto frío a 4°C.

Transcurridas las 2 h de incubación, la solución fue filtrada a través de un poro de 0.2µm para remover cualquier agregado. La solución filtrada fue concentrada mediante su centrifugación a 6,000 g por 20 min a 4°C con tubos centricones de 15 mL con un tamaño de poro de 10 kDa. Posteriormente se estimó la cantidad de proteína recuperada mediante la técnica de Bradford (1976).

Ensayo Enzimático para BCMO1

Una vez replegada la proteína y cuantificada su concentración, se procedió a medir su actividad enzimática. Para esto se utilizó la metodología propuesta por During *et al.* (1996), con algunas modificaciones.

Debido a la baja y alta hidrofobicidad de la enzima y el β -caroteno, respectivamente, fue necesario incrementar la solubilidad de este último en soluciones acuosas para facilitar la medición de la actividad enzimática. Para esto se hizo un stock de 10 mL de una solución de 1 mM de β -caroteno y 4.5% de Tween 40 diluido en acetona. Se mezclaron los reactivos con un politrón (Ultra Turrax T25, IKA Labortechnik) a 10,000 rpm por 10 segundos y se evaporó la acetona bajo atmosfera de nitrógeno. Finalmente, se diluyó la mezcla con agua destilada llevándola a un volumen final de 10 mL. Este β -caroteno soluble fue el que se utilizó posteriormente en el ensayo enzimático.

Para el ensayo enzimático, en 2 mL de buffer de incubación, se añadió tanto el β -caroteno soluble como la proteína replegada y se incubó la reacción a 37°C durante 1 hora sin agitación. El buffer de incubación consistió de (para 100 mL de buffer):

- ✓ Fosfato de Potasio 1.37 g
- ✓ pH 7.7
- ✓ Cloruro de Magnesio 0.0193 g
- ✓ Nicotinamida 0.211 g
- ✓ Glutaciona 0.312 g
- ✓ Duodesil Fosfato de Sodio 0.049 g
- ✓ Ácido Taurólico 0.322 g
- ✓ L- α Fosfatidilcolina 0.02 g
- ✓ α -Tocoferol 0.012 g

Transcurrida la hora de incubación, se detuvo la reacción adicionando 500 μL de formaldehído al 37%. Se incubó la reacción a 37°C por 10 min más y se adicionaron 2 volúmenes de acetonitrilo. Cada volumen representaba la suma de los mililitros de buffer de incubación, β -caroteno, proteína y formaldehído utilizados en la mezcla de reacción.

Una vez adicionado el solvente, se agitó con un vortex y se incubó por 5 min en hielo. Transcurrida la incubación se centrifugó a 18,000 g por 10 min.

Análisis del Retinal por HPLC en Fase Reversa

El análisis por HPLC de los retinoides estuvo basado en lo reportado previamente por During *et al.* (1996). Después de la centrifugación, se tomó una muestra de 500 μL de la capa superior y se filtró con una membrana de nylon con un tamaño de poro de 0.2 μm . La fracción filtrada se colocó en viales oscuros para protegerla de la luz y se inyectaron 100 μL , por duplicado, en un equipo HPLC (1100 Series, Agilent Technologies) con una fase móvil de 90% de acetonitrilo, 10% de agua y 0.1% de acetato de amonio. Todos estos reactivos fueron grado HPLC. El flujo fue de 1 mL/min, monitoreando el todo-*trans*-retinal a una longitud de onda de 380 nm.

El retinal formado durante la reacción fue cuantificado calculando el área de su pico de elución con respecto a curva estándar obtenida con todo-*trans*-retinal. Todos los procedimientos que envuelven a los carotenoides se realizaron bajo luz roja suave y en condiciones frías (4°C).

La BCMO1 como Aditivo Enzimático en Bovinos

Con base en los resultados obtenidos de la actividad enzimática de la BCMO1 recombinante de *Gallus gallus* observada en el presente trabajo (2993 pmol de retinal/mg de proteína•hora), se hizo un cálculo matemático para determinar la cantidad de enzima necesaria para desdoblar el β -caroteno que se estima consume un bovino en pastoreo de forrajes verdes.

Para realizar este cálculo matemático se tomaron en cuenta los siguientes datos de la literatura:

Mora *et al.* (2001) mencionan que la suplementación de bovinos con hasta 40 mg de β -caroteno por kg de materia seca, no afecta la concentración de este compuesto en el tejido adiposo de las canales con respecto al control, lo cual indica que, con este nivel de consumo, la mayoría del β -caroteno absorbido es convertido en retinal.

Reynoso *et al.* (2004) estimaron que el contenido de β -caroteno de forrajes (*Danthonia decumbens* y *Cynodon dactylon*) producidos en el trópico húmedo mexicano es de 149 mg/kg de MS, variando esta concentración según la época del año.

Barrón *et al.* (2004) mencionan que los novillos en el trópico mexicano, quienes representan el 82.9% de las canales bovinas, se sacrifican alrededor de los 450 kg de peso vivo. Si estos animales entran a engorda alrededor de los 250 kg (Shimada, 2015), estarán consumiendo en promedio 9.75 kg de materia seca por día durante este periodo, basado en un consumo estimado del 3% de su peso vivo.

Resultados

Caracterización de la Bacteria

Extracción del ADN plasmídico

Con la metodología utilizada en el presente trabajo se obtuvo una concentración de ADN plasmídico de 272 ng/ μ L, con las siguientes características de calidad:

Cuadro 1. Concentración y calidad del ADN plasmídico obtenido.

	Valor
Relación 260/280	1.82
Relación 260/230	1.56
ADN (ng/ μ L)	272

La electroforesis en gel de agarosa al 1% mostró una banda de entre 5 y 6 kb, coincidente con el peso estimado de 5.7 kb (4.1 kb del vector plus 1.58 kb del inserto).

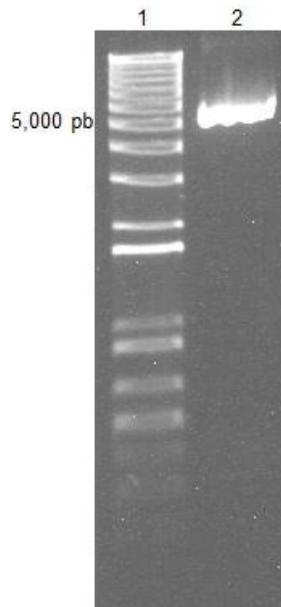


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa del ADN plasmídico obtenido de la bacteria transformada. Línea 1. Marcador de peso; Línea 2. ADN plasmídico.

Análisis de Restricción del ADN plasmídico

El ADN plasmídico obtenido fue sometido a una digestión con la enzima de restricción Sac I con la finalidad de conocer si el vector aún conservaba el inserto. La muestra digerida fue corrida en un gel de agarosa al 1% y fotodocumentada en un equipo MiniBIS Pro de DNR Bio-Imaging Systems.

En la imagen 7 se observa en el tercer carril una banda de entre 4 y 5 kb y una de entre 1.5 y 2 kb, coincidentes con los pesos estimados del vector vacío (4.1 kb) y el inserto (1581 pb)

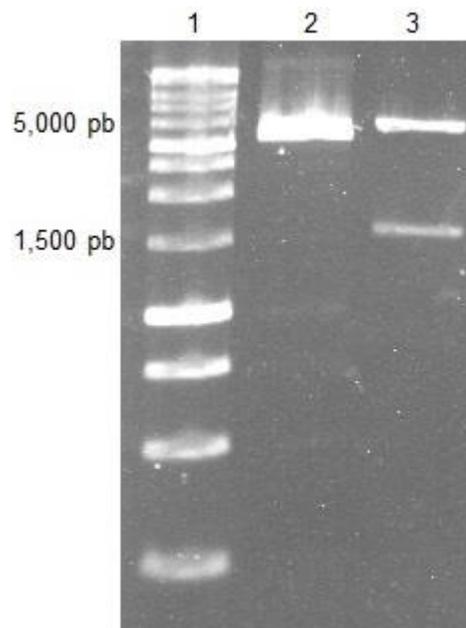


Figura 7. Análisis de restricción del plásmido obtenido de la *E. coli* transformada con pBAD-BCMO1. Línea 1. Marcado de peso; Línea 2. Plásmido sin digerir; Línea 3. Plásmido digerido con Sac I.

Secuenciación del ADN plasmídico

El ADN plasmídico de la *E. coli* XL1-Blue transformada con el gen de BCMO1 de pollo fue extraído y completamente secuenciado para confirmar la presencia del inserto en el vector y la integridad del mismo. La secuencia obtenida fue analizada mediante algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Se obtuvo una identidad del 99% en comparación con el mRNA reportado para la BCMO1 de *Gallus gallus* (Fig. 8a) con sólo el cambio de un nucleótido en el gen heterólogo.

La secuencia de nucleótidos obtenida de la secuenciación fue traducida y el resultado obtenido fue analizado mediante el mismo algoritmo. Se observó una identidad del 100% de la proteína heteróloga cuando fue alineada con la secuencia reportada para *Gallus gallus* (Fig. 8b).

A

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
✓	Gallus gallus beta-carotene 15,15'-monooxygenase 1 (BCMO1), mRNA	2904	2904	100%	0.0	99%	NM_204635.1

B

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
✓	beta,beta-carotene 15,15'-monooxygenase [Gallus gallus]	1097	1097	100%	0.0	100%	NP_989966.1

Figura 8. (A) Alineación de la secuencia del gen insertado en el plásmido (pBAD) y (B) alineación de la proteína traducida utilizando BLAST, con una identidad de 99 y 100% respectivamente.

Estandarización de la Expresión de la BCMO Recombinante

Concentración del inductor

Una vez que se caracterizó la bacteria y se cercioró que aún conservaba el plásmido con el inserto, se procedió a la estandarización de la expresión de la proteína. Se probaron concentraciones de arabinosa desde 0.00002 hasta 0.2% en el medio de cultivo.

En la figura 9^a se observa un western blot en un gel al 8% de las concentraciones 0.2, 0.02 y 0.002, mientras que en la 9B se aprecian las de 0.0002 y 0.00002% de arabinosa. Para el western blot se aprovechó que el vector utilizado (pBAD) codifica para la etiqueta c-Myc, por lo que se utilizó un anticuerpo anti-c-Myc.

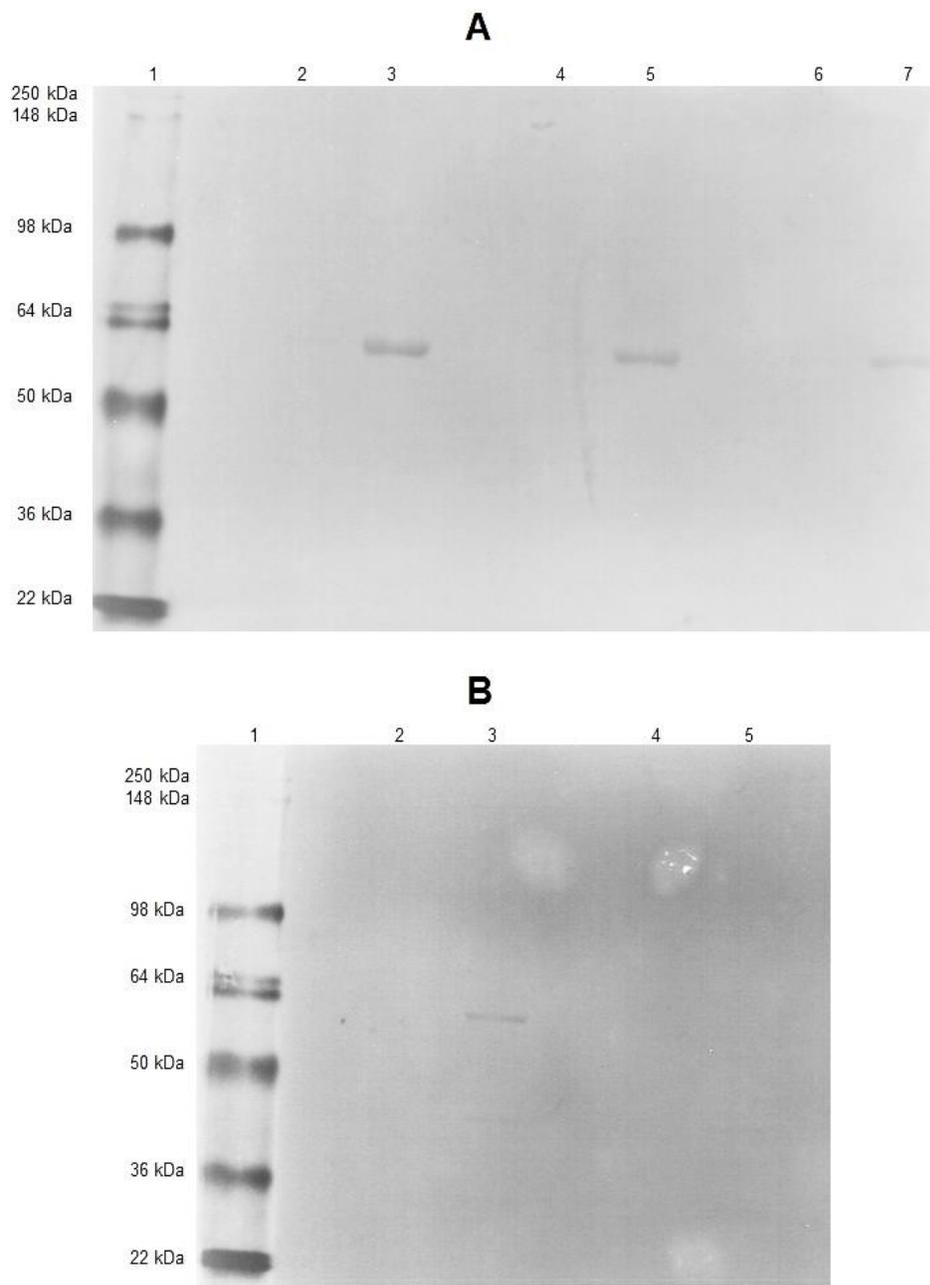


Figura 9. Western Blot de la bacteria *E. coli* transformada con el gen BCMO1 inducida con diferentes concentraciones de arabinosa. (9a) Carril 1. Marcador de peso; Carriles 2, 4 y 6: Fracciones solubles de la inducción con 0.2, 0.02 y 0.002% de arabinosa, respectivamente; Carriles 3, 5 y 7: Fracciones insolubles de la inducción con 0.2, 0.02 y 0.002% de arabinosa, respectivamente. (9B) Carril 1. Marcador de peso; Carriles 2 y 4: Fracciones solubles de la inducción con 0.0002 y

0.00002% de arabinosa, respectivamente; Carriles 3 y 5: Fracciones insolubles de la inducción con 0.0002 y 0.00002% de arabinosa, respectivamente.

Tiempo de inducción

Una vez establecida la mejor concentración de arabinosa, se probaron cinco diferentes tiempos de inducción (0, 1, 2, 3 y 4 h). En la figura 10 se observa que a medida que incrementa el tiempo de exposición al inductor, la banda ubicada a aproximadamente 64 kDa, coincidente con el peso estimado de la proteína de 63 kDa, aumenta de concentración.

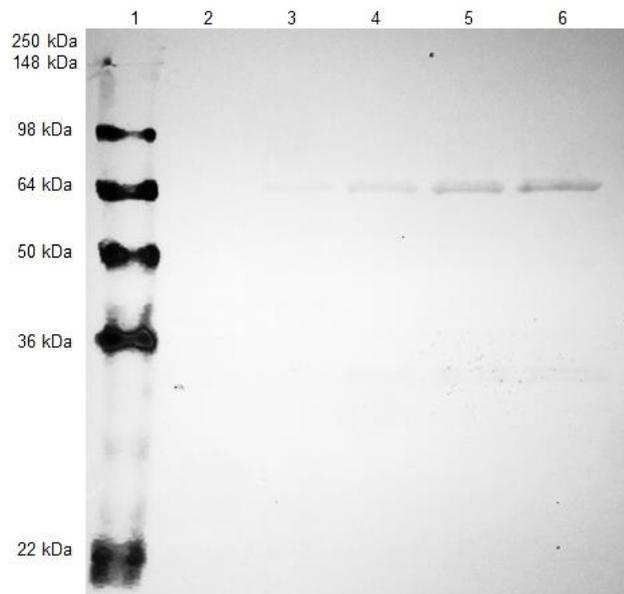


Figura 10. Western Blot del pBAD-BCMO1 en un gel al 12% a diferentes tiempos de inducción. Línea 1. Marcado de peso; Línea 2. Tiempo cero de inducción; Carril 3. Una hora post-inducción; Línea 4. Dos horas post-inducción; Línea 5. Tres horas post-inducción; Línea 6. Cuatro horas post-inducción.

Expresión y Solubilización de los Cuerpos de Inclusión

Se utilizó una *E. coli* XL1-Blue transformada con el gen de la BCMO1 de *Gallus gallus* insertado en pBAD. Mediante el uso de esta construcción, se observó que la proteína de interés se expresa en cuerpos de inclusión.

En la figura 11 se muestra una electroforesis en gel de acrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes en el que se cargaron las fracciones proteínicas solubles de diferentes colonias de bacterias transformadas con la construcción pBAD-BCMO1 inducidas por 4 h a una concentración de arabinosa de 0.2%. No se observan bandas diferentes entre el tratamiento control (carril 2) y los tratados (carril 3-5).

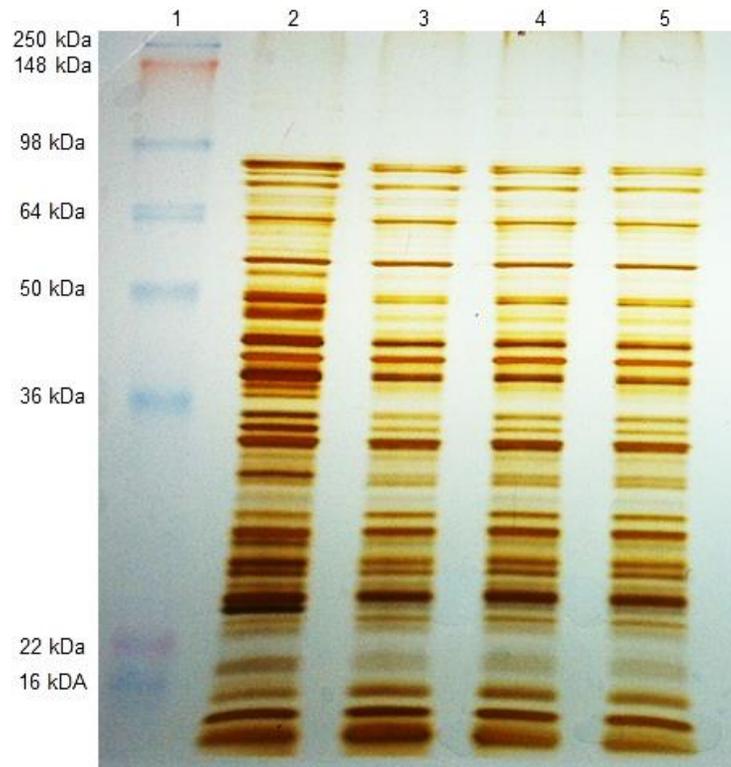


Figura 11. SDS-Page de las fracciones proteicas solubles de bacterias transformadas con pBAD-BCMO1. Carril 1. Marcador de peso molecular; Carril 2. Proteínas solubles de bacterias no inducidas; Carriles 3-5: Proteínas solubles de colonias inducidas.

En la figura 12 se observa un Western Blot de los cuerpos de inclusión de la bacteria transformada sin inducir (carril 3) e inducida (carril 4), en la que se observa que toda la enzima de interés se encuentra en la fracción proteica insoluble, mientras que el anticuerpo (anti c-Myc) no reconoció ninguna banda en la fracción proteica soluble (carril 1).

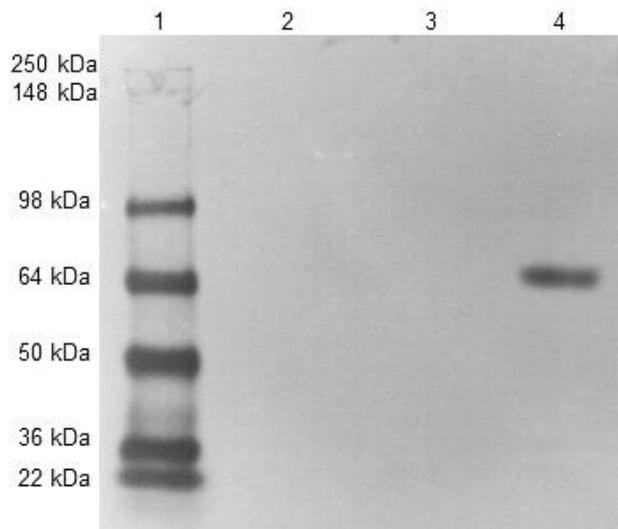


Figura 12. Western Blot de las diferentes fracciones proteicas de la bacteria transformada. Carril 1. Marcador de peso molecular; Carril 2. Fracción proteica soluble; Carril 3. Fracción proteica insoluble de bacterias no inducidas; Carril 4. Fracción proteica insoluble de bacterias transformadas.

Se probaron diferentes estrategias para incrementar la proporción de BCMO1 soluble, entre las cuales estuvieron el crecimiento a bajas temperaturas y el choque térmico.

En la figura 13 se observa un Western Blot de las diferentes fracciones proteicas de bacterias inducidas a 37 y 16°C. En la imagen se aprecia que la inducción a 16°C disminuye tanto la expresión de la enzima como la capacidad de la misma para ser extraída de los cuerpos de inclusión mediante el uso de guanidina 6M (carriles 4 y 7).

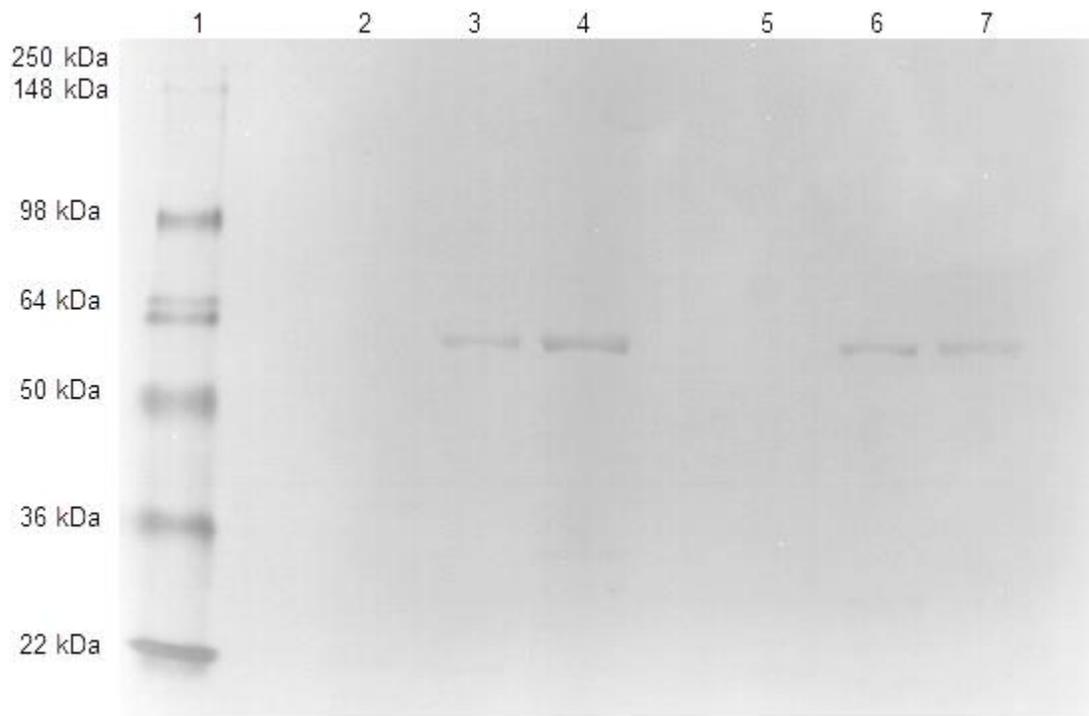


Figura 13. Western Blot de bacterias inducidas y crecidas a diferentes temperaturas (37 y 16°C). Carril 1. Marcador de peso molecular; Carril 2. Fracción proteica soluble de bacterias crecidas a 37°C; Carril 3. Fracción proteica insoluble remanente de bacterias crecidas a 37°C; Carril 4. Fracción proteica solubilizada con guanidina 6M de bacterias crecidas a 37°C; Carril 5. Fracción proteica soluble de bacterias crecidas a 16°C; Carril 6. Fracción proteica insoluble remanente de bacterias crecidas a 67°C; Carril 7. Fracción proteica solubilizada con guanidina 6M de bacterias crecidas a 16°C.

Ninguna de las estrategias mencionadas incrementó la proporción de proteína soluble, por lo que se utilizaron diferentes medios desnaturizantes para solubilizar la enzima de interés: Guanidina (6M), Urea (8M) y Sarkosyl (0.3% w/v).

En la figura 14 se observa un Western Blot de los resultados de la incubación de los cuerpos de inclusión con los diferentes agentes desnaturizantes. El mejor resultado se observó con la guanidina (carril 6), ya que extrae la mayor parte de la enzima, sin que permanezca en los cuerpos de inclusión remanentes (carril 7).

Mientras que el tratamiento con sarkosyl no solubilizó proteína al permanecer toda la fracción en el remanente insoluble (carril 9).

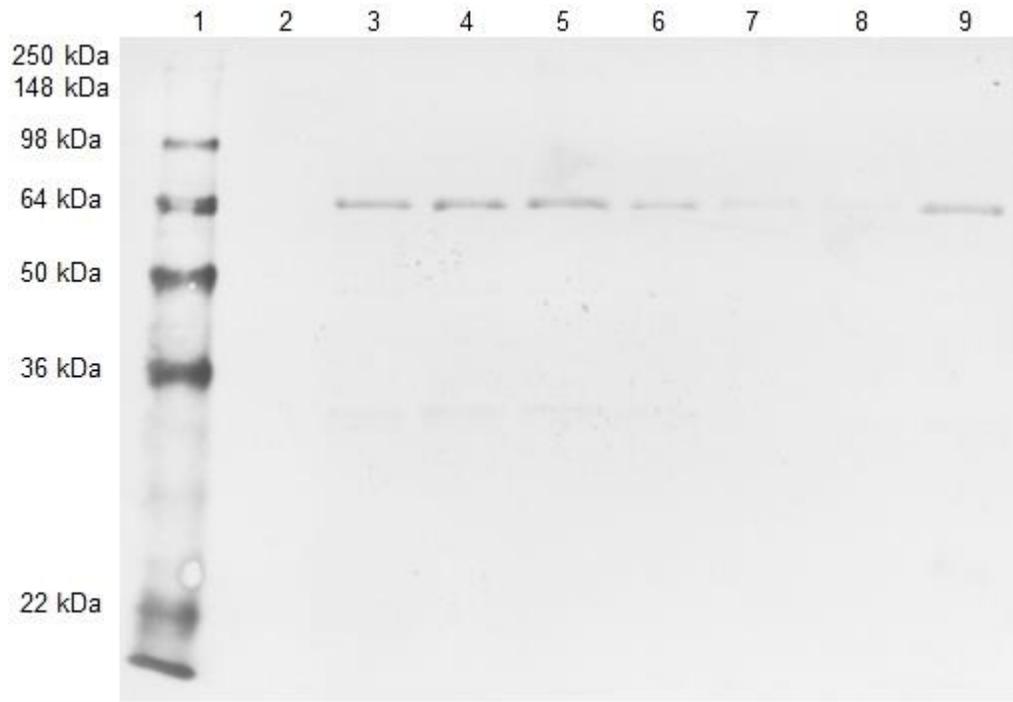


Figura 14. Western Blot de la solubilización de los cuerpos de inclusión con diferentes agentes desnaturizantes. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Fracción proteica soluble; Carril 3: Fracción proteica insoluble; Carril 4: Fracción proteica solubilizada con urea; Carril 5: Remanentes insolubles con urea; Carril 6: Fracción proteica solubilizada con guanidina; Carril 7: Remanentes insolubles con guanidina; Carril 8: Fracción proteica solubilizada con sarkosyl; Carril 9: Remanentes insolubles con sarkosyl.

Purificación de la BCMO1 de *Gallus gallus*

Los cuerpos de inclusión obtenidos de las células inducidas fueron purificados mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados. Al adicionar 150mM de imidazol al buffer, la elución de la proteína de interés se registró en el mL 93 (Fig. 15). Se obtuvo un porcentaje de recuperación proteica de hasta 43.1% con relación al extracto crudo.

Las proteínas obtenidas de cada paso cromatográfico fueron analizadas por SDS-PAGE. La enzima purificada mostró una banda de aparentemente 63 kDa, consistente con el valor estimado basado en los 526 aminoácidos de la estructura primaria de la BCMO1 de *Gallus gallus*, plus el tag de hexa-histidinas en el extremo carboxilo terminal (Fig. 16^a).

En la figura 16b se observa un Western Blot de los diferentes pasos cromatográficos. Las fracciones fueron separadas mediante un SDS-PAGE en un gel al 8% y después transferidas a una membrana de PVDF. La membrana fue posteriormente incubada con un anticuerpo monoclonal conjugado anti-Myc, el cual reconoció únicamente una banda tanto en la línea 2 como en la 3, coincidentes con un peso molecular de aproximadamente 63kDa.

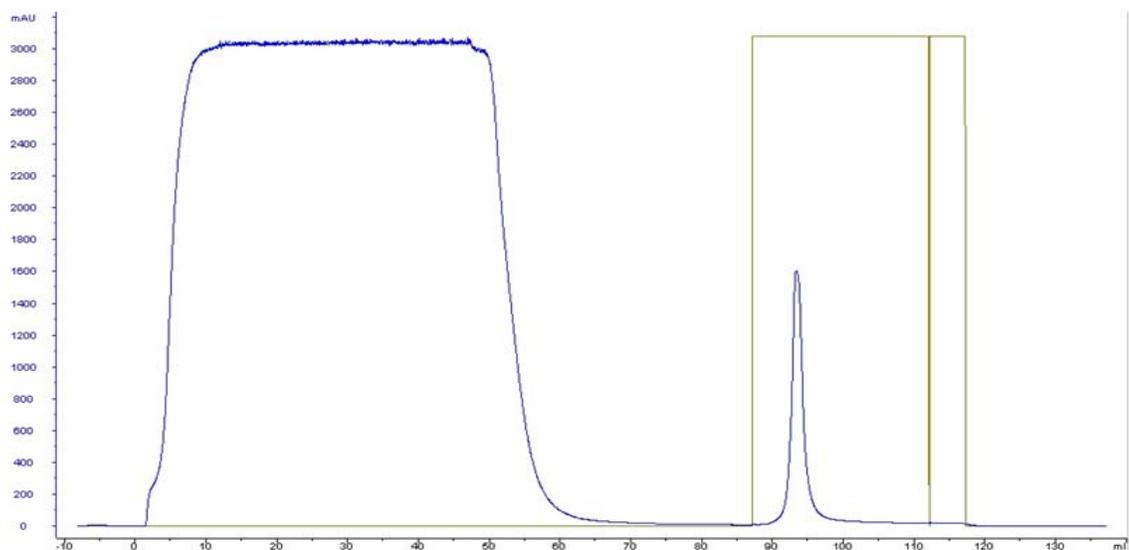


Figura 15. Cromatograma de purificación de la BCMO1 por IMAC. La elución de la enzima registró en el mililitro 93.

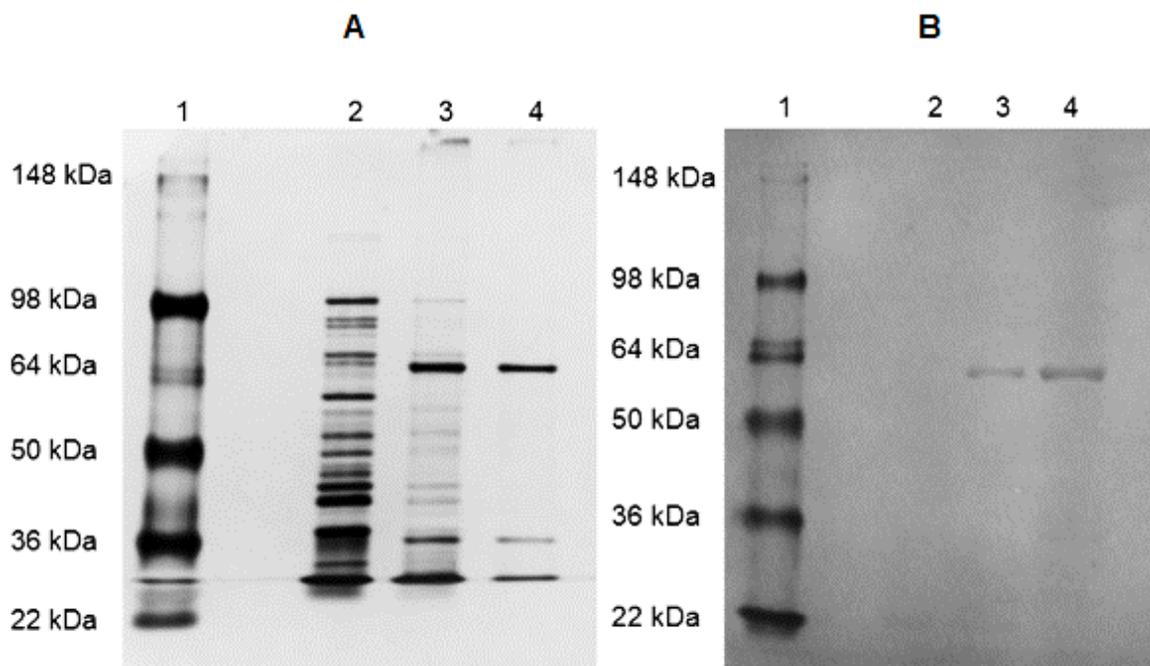


Figura 16. SDS-PAGE (A) y Western Blot (B) de la BCMO1 purificada. Líneas: 1. Marcador de Peso; 2. Proteína soluble; 3. Cuerpos de inclusión; 4. Proteína purificada.

Naturalización de la BCMO1

En el presente trabajo se agregó gota a gota la proteína desnaturizada al buffer de naturalización a 4°C en agitación lenta (60 rpm) para disminuir tanto la concentración del agente desnaturizante como para mantener una baja concentración de proteína en solución (menor a 50 µg/mL), ya que cuando se añadía toda la muestra de una sola vez, se formaban agregados en la solución.

Análisis por HPLC en Fase Reversa de la Bioconversión de β-Caroteno en Retinal

El retinal fue bien resuelto del resto de los compuestos presentes en la muestra mediante la utilización de acetonitrilo:agua (90:10, v/v) con 0.1% de acetato de amonio como fase móvil. El tiempo de retención fue de 1.43 min. (Fig. 17). Bajo

estas condiciones el β -caroteno no fue co-eluido. El límite de detección del estándar de retinal fue estimado en 1 pmol/100 μ L.

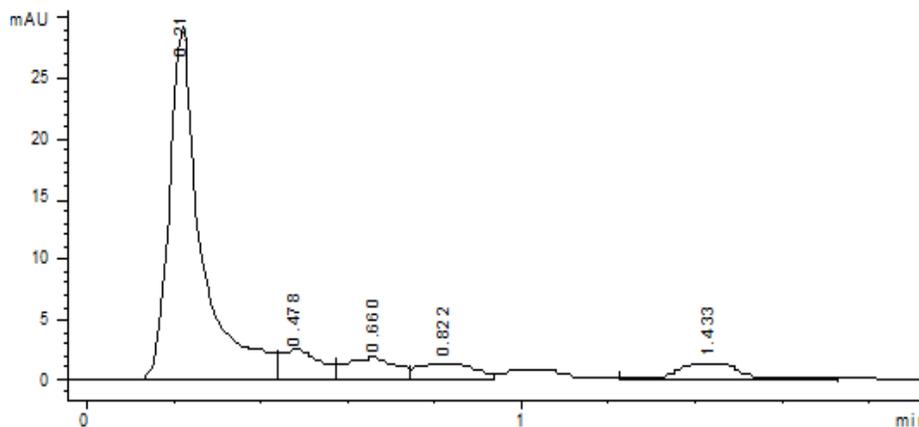


Figura 17. Cromatograma de la elución del retinal por HPLC en fase reversa. El tiempo de retención fue de 1.43 min.

El perfil de elución obtenido de la muestra de la reacción (en presencia de β -caroteno y proteína), mostró un tiempo de retención de 1.43, el cual corresponde al observado en el estándar de todo-*trans*-retinal. Además, el espectro de absorción del pico fue similar al del estándar.

La BCMO1 como Aditivo Enzimático en Bovinos

Basado en los datos observados en la metodología, un novillo en engorda en pastoreo consume alrededor de 1,450 mg (149 mg x 9.75 kg de MS) de β -caroteno por día, de los cuales es capaz de metabolizar por sí mismo 390 mg (40 mg x 9.75 kg de MS) sin que haya cambios aparentes en la concentración de este compuesto en el tejido adiposo. Por lo que la cantidad de enzima que se debe agregar en la dieta es aquella necesaria para degradar 1.06 g de β -caroteno.

La actividad detectada en el presente trabajo fue de 2993 pmol de retinal/mg de proteína•hora, lo cual equivale a 2.993×10^{-9} moles de retinal/mg de proteína•hora o 8.5×10^{-7} g de retinal/mg de proteína•hora. Lo cual indica que la BCMO1 de pollo

analizada en el presente trabajo cataliza la escisión de $4.25e^{-7}$ g de β -caroteno/mg de proteína•hora, ya que por cada molécula desdoblada de este compuesto se obtienen dos de todo-*trans*-retinal.

Con base en estos resultados, se estima que para alcanzar a degradar el 1.06 g de β -caroteno que los novillos en pastoreo son incapaces de metabolizar, se requerirían 2,494 g de enzima.

$$g \text{ de BCMO1} = \frac{(1.06 \text{ g de Caroteno})(0.001 \text{ g de BCMO1})}{(0.000000425 \text{ g de Caroteno})}$$

Discusión

Caracterización de la Bacteria

Mediante el uso de la metodología descrita se obtuvo una concentración de ADN plasmídico de ~270, con una relación 260/280 de 1.82, por lo que la muestra se considera pura, ya que la relación de absorbancia 260/280 se utiliza para cuantificar la pureza del ADN. Una muestra de ADN de alrededor de 1.8 es considerada pura. Cuando este valor es bajo es indicativo de la presencia de contaminantes que tienen una absorbancia de 280, como las proteínas (Logemann *et al.*, 1987).

El ADN obtenido presentó una relación 260/230 de 1.56, por lo que podría estar contaminado con carbohidratos. La relación 260/230 también se utiliza para cuantificar la pureza de la muestra de ADN. Cuando el valor está entre 2.0 y 2.2 se considera que el ADN es puro. Valores inferiores son indicativos de contaminación, principalmente con polisacáridos (Logemann *et al.*, 1987).

En la electroforesis en gel de agarosa (Fig. 6) se obtuvo una sola banda con un peso estimado de entre 5,000 y 6,000 pb, lo cual coincide con el peso estimado del vector más el inserto (~5.7 kb).

Secuenciación y Alineación del Gen y la Proteína de la BCMO1

Los resultados obtenidos de la secuenciación del ADN plasmídico fueron comparados con la base de datos del GenBank mediante el uso del algoritmo BLAST. De la misma manera se comparó la secuencia del gen traducido, lo que arrojó una identidad del 99 y 100% para el gen y la proteína, respectivamente, con respecto al mRNA de BCMO1 y a la BCMO1 de *Gallus gallus*..

Aunque en la secuencia de nucleótidos hubo un cambio de base, la proteína tuvo un 100% de homología con la reportada para la BCMO1 de *Gallus gallus*. Esto se debe a que, si bien en el marco de lectura se observa el cambio de la base, esto no afectó la traducción del gen debido a que el código genético es degenerado (Laguna *et al.*, 2013).

Expresión y Solubilización de los Cuerpos de Inclusión

La sobreexpresión de proteínas heterólogas en algunos casos resulta en la formación de agregados insolubles de proteínas conocidos como cuerpos de inclusión (Cutler, 2004). Dichas proteínas son generalmente abandonadas en vez de tratar de encontrar las condiciones efectivas para su repliegado (Burgess y Deutscher, 2009).

Se probaron diferentes estrategias para incrementar la proporción de BCMO1 soluble, entre las cuales estuvieron:

Crecimiento de las bacterias inducidas a bajas temperaturas (16°C): Se cree que el tiempo insuficiente de plegado del polipéptido naciente para que tome su conformación nativa es causa de su insolubilidad (Cutler, 2004). Disminuyendo la temperatura de crecimiento, la transcripción y la traducción también se ven disminuidas, lo cual le da mayor tiempo al péptido para que tome su conformación nativa (Vera *et al.*, 2006).

Choque térmico de las bacterias: Previo a la inducción las bacterias se sometieron a un choque térmico de 42°C por 20 min para inducir la expresión de las

chaperonas endógenas de la *E. coli*, las cuales ayudan al correcto plegamiento de las proteínas (Burgess y Deutscher, 2009).

Ninguna de las estrategias mencionadas, incrementó la cantidad de proteína soluble, por lo cual se desnaturalizaron los cuerpos de inclusión mediante la adición de urea, sarkosyl o guanidina, siguiendo la metodología propuesta por Burgess y Deutscher (2009). El mejor agente desnaturalizante fue la guanidina, extrayendo el 93.5% de los cuerpos de inclusión, en comparación con urea y sarkosyl, los cuales solubilizaron el 55.6 y 42.9% de la proteína, respectivamente.

Naturalización de la BCMO1 Purificada

En cuanto a la naturalización de la proteína purificada, la mejor metodología observada fue al utilizar L-arginina como aditivo en el buffer, ya que disminuye las interacciones proteína-proteína (Das *et al.*, 2007), además de glutatona oxidada y reducida para crear las condiciones oxidoreductoras adecuadas para la correcta unión de los enlaces disulfuro.

La proteína desnaturalizada fue agregada gota a gota al buffer para mantener en todo momento la menor concentración posible de proteína, ya que como lo mencionan Burgess y Deutscher (2009), la mejor estrategia en la naturalización es naturalizar a la menor concentración de proteína posible para evitar la interacción de las regiones “pegajosas” (hidrofóbicas) de los diferentes péptidos en solución, evitando la agregación de los mismos.

Ensayo Enzimático

In vivo, el β -caroteno se encuentra formando parte de las micelas junto con los lípidos en emulsión por acción de las sales biliares. Este β -caroteno es posteriormente convertido a retinal por la BCMO1 y esta reacción requiere agua (Leuenberger *et al.*, 2001). Sin embargo, en condiciones *in vitro*, la naturaleza del β -caroteno es altamente hidrofóbica, obteniéndose bajos niveles de producto. Por lo que la bioconversión de este compuesto en retinal ha sido incrementada,

particularmente en mamíferos, mediante la inclusión del sustrato en micelas para incrementar su hidrosolubilidad y hacerla más accesible en soluciones acuosas (Kim *et al.*, 2008; Kim y Oh, 2009). Este incremento en la solubilidad del β -caroteno probablemente resultó en el aumento de la producción de retinal en el presente trabajo, aun cuando se utiliza una proteína renaturalizada.

En otros estudios donde también se disminuyó la hidrofobicidad del β -caroteno, mediante el uso de detergentes, la actividad reportada fue significativamente mayor en comparación con la obtenida en este trabajo. Probablemente debido a la mayor cantidad de aminoácidos hidrofóbicos en la estructura primaria de las enzimas estudiadas (Kim *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2009), los cuales corresponden al 32.8% en el caso de la BCMO1 pollo, mientras que para las bacterias puede ser de hasta el 56.3% (Kim *et al.*, 2009). Esta baja actividad también puede ser atribuida a que la proteína de interés no fue inicialmente desnaturalizada en dichos trabajos (Kim y Oh, 2009; Kim *et al.*, 2008) debido a que los métodos de naturalización raramente son 100% efectivos (Cutler, 2004) en cuanto a la cantidad de proteína recuperada así como en la recuperación de la actividad enzimática.

Cuadro 2. Actividad *in vitro* reportada en diferentes trabajos de la BCMO1 purificada mediante diversas metodologías.

Trabajo	Actividad Reportada
Presente	2,993 pmol
Wyss <i>et al.</i> (2000)	2,500 pmol
Kim <i>et al.</i> (2007)	510 nmol
Kim <i>et al.</i> (2008)	1.97 μ mol
Kim y Oh (2009)	320 nmol

En el presente trabajo la masa molecular, secuencia de aminoácidos y de nucleótidos y el pH y temperatura de catálisis óptimos de la BCMO1 de *Gallus gallus* fue similar a la de otros trabajos reportados. Se observó una actividad enzimática de 2993 pmol/mg de proteína/hora, la cual es similar a la reportada para la misma enzima de *Gallus gallus* por otros autores (Cuadro 2) como Wyss *et al.* (2000), pero inferior a lo reportado por Kim *et al.* (2007), Kim y Oh (2009) y Kim *et al.* (2008).

La BCMO1 como Aditivo Enzimático en Bovinos

De acuerdo a la estimación realizada, se requieren aproximadamente 2,500 g de la BCMO1 obtenida para degradar el β -caroteno consumido por animales en pastoreo de forrajes verdes.

La cantidad de proteína necesaria para alcanzar el objetivo de disminuir la pigmentación de la grasa de canales obtenidas de bovinos en pastoreo hace inviable la aplicación práctica de este trabajo, ya que la enzima requerida supera aún a la proteína bruta requerida para que un novillo de 350 kg de peso vivo tenga una ganancia diaria de peso de alrededor de 1.0 kg, la cual es de 789 g (Shimada, 2015).

Estos resultados no son concluyentes ya que la actividad enzimática obtenida en este trabajo fue calculada con una hora de incubación, sin embargo, autores como Morgavi *et al.* (2001) mencionan que los aditivos enzimáticos son relativamente estables en líquido ruminal por al menos seis horas, probablemente porque las condiciones en el rumen después de la alimentación son de baja actividad proteolítica y bajo pH, incrementando la estabilidad de las enzimas alimenticias. El pH y las proteasas del abomaso e intestino parecen afectar más a las enzimas exógenas que las proteasas microbianas ruminales.

Tomando en cuenta que la mayor parte del tiempo que el alimento está en el tracto digestivo de los rumiantes, lo pasa en el rumen, la enzima podría tener una mayor posibilidad de llevar a cabo su función. Sin embargo, la capacidad hidrolítica

de la enzima en el rumen dependerá de la cantidad de proteína aplicada y de su capacidad de mantenerse activa bajo las condiciones ruminales (pH 5.5-6.8 y temperatura de $39\pm 1^{\circ}\text{C}$).

Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio se llegó a las siguientes conclusiones:

Se demostró que la bacteria *E. coli* XL1-Blue transformada con el gen de BCMO1 de *Gallus gallus* tiene la capacidad de expresar la proteína heteróloga y que esta tiene actividad enzimática *in vitro*.

A partir del extracto proteico crudo obtenido de la *E. coli* XL1-Blue transformada fue solubilizada, purificada y naturalizada la BCMO1 recombinante de intestino de pollo mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados, observándose una banda de aparentemente 63 kDa, la cual presenta una actividad enzimática de 2993 pmol de retinal/mg de proteína•hora.

Aparentemente se requiere una gran cantidad de la enzima BCMO1 para alcanzar el objetivo de disminuir la coloración de las canales de bovinos, lo que hace inviable el proyecto. Sin embargo, es necesario hacer pruebas *in vitro* con diferentes tiempos de incubación para corroborar la estabilidad de la enzima en líquido ruminal.

Perspectivas

Se estandarizaron los métodos de extracción y purificación de la proteína heteróloga, por lo que es factible su utilización para obtener una enzima estable que puede ser usada como aditivo en estudios *in vitro* con la finalidad de disminuir la coloración amarilla de las canales de bovinos.

Previo a su utilización como aditivo enzimático *in vivo*, la proteína tiene que ser probada *in vitro*, utilizando bioensayos que se correlacionen con la respuesta en el rumen, simulando las condiciones digestivas particulares de este órgano.

Podría emplearse la metodología propuesta en el presente trabajo para sobreexpresar proteínas recombinantes provenientes de especies con una mayor actividad enzimática que la reportada para *Gallus gallus*. Tal especie pueden ser la Bacteria Marina Incultivable 66A03, la cual presenta la proteína con la mayor actividad reportada.

Abreviaturas y Siglas Usadas

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
INECC	Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
BCMO1	β -Caroteno 15,15'-Monooxigenasa
RS-B1	Receptor Scavenger Clase B tipo I
PCLR2	Proteínas Celulares Ligadoras de Retinoides Tipo II
LPT	Lipasa Pancreática de Triglicéridos
PRLP2	Proteína Relacionada a Lipasa Pancreática
REH	Retinil Ester Hidrolasa
LRAT	Lecitina Retinol Aciltransferasa
DGAT1	Diacilglicerol Aciltransferasa
BCMO2	β -Caroteno 9,10-Oxigenasa
KO	Knockout
DTT	Ditiotreitol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
mRNA	ARN mensajero
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DO	Densidad Óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

IMAC	Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados
His-tag	Etiqueta de Histidinas
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BSA	Albúmina Sérica Bovina
LB	Luria Bertani
MS	Materia Seca
bp	Pares de Bases
kDa	Kilo Daltons
g	Gramo
mg	Miligramo
pH	Potencial de Hidrógeno
nm	Nanómetro
M	Molar
mL	Mililitro
µg	Microgramos
µL	Microlitros
rpm	Revoluciones por Minuto
g	Gravedades
h	Horas
V	Voltios
U	Unidad
pmol	Picomoles

Literatura Citada

- Amengual J., Lobo G.P., Golczak M., Hua Nan M. Li, Klimova T., Hoppel C.L., Wyss A., Palczewski K. & von Lintig J. 2011. A mitochondrial enzyme degrades carotenoids and protects against oxidative stress. *The FASEB J.* 25:948-959.
- Arias E., Gonzalez A., Shimada A., Varela-Echavarria A., Ruíz-Lopez J.L., During A. & Mora O. 2009. β -Carotene is incorporated or mobilized along with

- triglycerides in bovine adipose tissue in response to insulin or epinephrine. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 93:83–93.
- Armstrong G.A. & Hearst J.E. 1996. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB J.* 10:228-237.
- Balbás P. 2001. Understanding the Art of Producing Protein and Nonprotein Molecules in *Escherichia coli*. *Mol Biotechnol.* 19:251-267.
- Barrón G.S., García B.C., Mora I.O. & Shimada M.A. 2004. Impacto económico de la pigmentación del tejido adiposo en bovinos en pastoreo en el trópico. *Agrociencia.* 38(002):173-179.
- Barrón G.S., Mora I.O., Castaño M.V. & Shimada M.A. 2012. La pigmentación amarilla del tejido adiposo de bovinos finalizados en pastoreo y su relación con su concentración de carotenoides y el perfil de ácidos grasos. *Rev Mex Cienc Pecuár.* 44(2):231-240.
- Bedford M.R & Partridge G.G. Enzymes in Farm Animal Nutrition. 2^a ed. USA: CAB Intern, 2010. 330 p. ISBN 978-1-84593-674-7
- Bidner T., Schupp D., Mohamad A. R., Rumore A. B., Montegory N. C., Bagley R. & McMillin K. W. 1986. Acceptability of beef from Angus-Hereford or Angus-Hereford-Brahman steers finished on all-forage or a high-energy diet. *J Anim Sci.* 62:381–387.
- Bidner T.D., Schupp A.R., Montgomery R.E. & Carpenter J.C. 1981. Acceptability of beef finished on all-forage, forage-plus-grain or high energy diets. *J Anim Sci.* 53(5):1181-1187.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem.* 72:248-254
- Britton G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB J.* 9:1551-1558.
- Britton G., Liaaen-Jensen S. & Pfander H. 2008. Carotenoids: Natural Functions. Alemania: *Birkhäuser Verlag*, 2008. 370 p. ISBN 3-7643-7498-3.

- Burgess R.R. & Deutscher M.P. *Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification*. 2^a ed. USA: *Academic Press*, 2009. 851 p. ISBN 978-0-12-374978-9.
- Cardinault N., Doreau M., Poncet C. & Noziere P. 2006. Digestion and absorption of carotenoids in sheep given fresh red clover. *Anim Sci*. 82:49–55.
- Charcosset C. 1998. Purification of Proteins by Membrane Chromatography. *J Chem Technol Biotechnol*. 71:95-110.
- Cruz-Monterrosa R.G., Ramírez-Bribiesca J.E., Guerrero-Legarreta M.I. & Hernández-Mendo O. 2011. Carotenoids digestion in African Stargrass (*Cynodon plectostachyus*) determined with in situ techniques in cattle. *Trop Subtrop Agroecosys*. 14:1011-1017.
- Cull M. & McHenry C. 1990. Preparation of Extracts from Prokaryotes. *Meth Enzymol*. 182:157-153.
- Cutler P. *Protein Purification Protocols*. 2^a Ed. USA: *Humana Press Inc*, 2004. 484 p. ISBN 1-58829-067-0.
- D'Ambrosio D.N., Clugston R.D. & Blaner W.S. 2011. Vitamin A Metabolism: An Update. *Nutrients*. 3:63-103.
- Das U., Hariprasad G., Ethayathulla A.S., Manral P., Das T.K., Pasha S., Mann A., Ganguli M., Verma A.K., Bhat R., Chandrayan S.K., Ahmed S., Sharma S., Kaur P., Singh T.P. & Srinivasan A. 2007. Inhibition of protein aggregation: Supramolecular assemblies of arginine hold the key. *PLoS ONE*. 11:e1176.
- During A. & Harrison E.H. 2007. Mechanisms of provitamin A (carotenoid) and vitamin A (retinol) transport into and out of intestinal Caco-2 cells. *J Lipid Res*. 48:2283–2294.
- During A., Nagao A., Hoshino C. & Terao J. 1996. Assay of b-Carotene 15,15'-Dioxygenase Activity by Reverse-Phase High-Pressure Liquid Chromatography. *Analyt Biochem*. 241:199–205.
- FAO. 2012. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations – for a world without hunger. <http://faostat.fao.org>

- Fergus M.C. 1993. Color as a factor in food choice. *Crit Rev Food Sci Nut.* 33:83-101.
- Fierce Y., de Morais Vieira M., Piantedosi R., Wyss A., Blaner W.S. & Paik J. 2008. *In vitro* and *in vivo* characterization of retinoid synthesis from beta- carotene. *Arch Biochem Biophys.* 472:126–138.
- Forrest R.J. 1981. Effect of high concentrate feeding on the carcass quality and fat coloration of grass-reared steers. *Can J Anim Sci.* 61:575-580.
- Glover J. 1960: The conversion of b-carotene into vitamin A. *Vit Horm.* 18:371–386.
- Grune T., Lietz G., Palou A., Ross A.C., Stahl W., Tang G., Thurnham D., Yin S. & Biesalski H.K. 2010. b-Carotene Is an important vitamin A source for humans^{1–3}. *J Nutr.* 2268S-2285S.
- Hage D. 1999. Affinity Chromatography: A Review of Clinical Applications. *Clin Chem.* 45:593–615.
- Havemose M.S., Weisbjerg M.R., Bredie W.L.P. & Nielsen J.H. 2004. Influence of feeding different types of roughage on the oxidative stability of milk. *Internat Dairy J.* 14:563-570.
- Hessel S., Eichinger A., Isken A., Amengual J. & Hunzelmann S. 2007. CMO1 deficiency abolishes vitamin A production from beta-carotene and alters lipid metabolism in mice. *J Biol Chem.* 282:33553– 33561.
- Hidiroglou N., McDowell L.R. & Johnson D.D. 1987. Effect of diet on performance, lipid composition of subcutaneous adipose and liver tissue of beef cattle. *Meat Sci.* 20: 95-200.
- Hoppe P.P., Chew, B.P., Safer, A., Stegemann I. & Biesalski H.K. 1996. Dietary b-carotene elevates plasma steadystate and tissue concentrations of b-carotene and enhances vitamin A balance in preruminant calves. *J Nutr.* 126:202–208.
- INECC. 2015. Zonas Ecológicas. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. www.inecc.gob.mx/
- INEGI. 2015. Sistema de Consulta de Información Geoestadística Agropecuaria. www.inegi.org.mx/

- Kane J.F., & Hartley D.L. 1991. Properties of recombinant protein-containing inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Bioproc Technol.* 12:121-145.
- Kim N.H., Kim Y.S., Kim H.J. & Oh D.K. 2008. Optimized Formation of Detergent Micelles of β -Carotene and Retinal Production Using Recombinant Human β , β -Carotene 15,15'-Monooxygenase. *Biotechnol Progr.* 24:227-231.
- Kim Y.S. & Oh D.K. 2009. Substrate specificity of a recombinant chicken b-carotene 15,15'-monooxygenase that converts b-carotene into retinal. *Biotechnol Lett.* 31:403-408.
- Kim Y.S., Kim N.H., Kim H.J. Lee J.K. Kim S.W. & Oh D.K. 2007. Effective production of retinal from β -carotene using recombinant mouse β -carotene 15,15'-monooxygenase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76:1339–1345.
- Kim Y.S., Kim N.H., Yeom S.J., Kim S.W. & Oh D.K. 2009. *In Vitro* Characterization of a Recombinant Blh Protein from an Uncultured Marine Bacterium as a b-Carotene 15,15'-Dioxygenase. *J Biol Chem.* 284:15781-15793.
- Kim Y.S., Park C.S. & Oh D.K. 2010. Hydrophobicity of residue 108 specifically affects the affinity of human b-carotene 15,15'-monooxygenase for substrates with two ionone rings. *Biotechnol Lett.* 32:847–853.
- Knight T., Ridland M., Hill F., Death A., & Wyeth T. 1993 Effects of stress and nutritional changes on the ranking of cattle on plasma carotene concentrations. *Proc New Zealand Soc Anim Product.* 53: 455–456.
- Krinsky N.I., & Johnson E.J. 2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molec Aspects Med.* 26:459–516.
- Laguna J., Piña-Garza E., Martínez-Montes F., Pardo-Vázquez J.P. & Riveros-Rosas H. Bioquímica de Laguna. 7ª ed. México: *Manual Moderno*, 2013. 700 p. ISBN 9786074482911
- Leuenberger M.G., Engeloch-Jarret C. & Woggon W.D. 2001. The Reaction Mechanism of the Enzyme-Catalyzed Central Cleavage of β -Carotene to Retinal. *Angewandte Chem.* 113:2683-2687.
- Liu B.H. & Lee Y.K. 2000. Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum sp.* *J Appl Phych.* 12:301-307.

- Lobo G.P., Hessel S., Eichinger A., Noy N., Moise A.R., Wyss A., Palczewski K. & von Lintig J. 2010. ISX is a retinoic acid-sensitive gatekeeper that controls intestinal β,β -carotene absorption and vitamin A production. *The FASEB J.* 24:1656–1666.
- Logemann J., Schell J. & Willmitzer L. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical biochemistry*, 163(1): 16-20.
- McCaughey W.P. & Cliplef R.L. 1996. Carcass and organoleptic characteristics of meat from steers grazed on alfalfa/grass pastures and finished on grain. *Can J Ani. Sci.* 76:149–152.
- Méndez R.D., Meza C.O., Beruecos J.M., Garcés P., Delgado E.J. & Rubio M.S. 2009. A survey of beef carcass quality and quantity attributes in México. *J Anim Sci.* 87:3782-3790.
- Mora O. & Shimada A. 2001. Causas de color amarillo de la grasa de canales de bovinos finalizados en pastoreo. *Vet Méx.* 32(1):63-71.
- Mora O., Romano J.L., Gonzalez E., Ruíz F.J. & Shimada A. 1999. *In vitro* and *in situ* disappearance of β -carotene and lutein from lucerne (*Medicago sativa*) hay in bovine and caprine ruminal fluids. *J Sci Food Agric.* 79:273-276.
- Mora O., Romano J.L., Gonzalez E., Ruíz F.J. & 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. *International J Vit Nutr Res.* 70:199- 205.
- Mora O., Romano J.L., Gonzalez E., Ruíz F.J., Gomez R. & Shimada A. 2001. Presence of fed β -carotene in digesta, excreta, blood and hepatic and adipose tissues of Holstein steers. *Can J Anim Sci.* 81:133-139.
- Morales A., Gonzalez A., Varela-Echavarría A., Shimada A. & Mora O. 2007. Differences in expression and activity of β,β' -carotene-15,15'-oxygenase in liver and duodenum of cattle with yellow or white fat. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 91:341–346.
- Morgan J.H.L., Pickering F.S. & Everitt G.C. 1969. Some factors affecting yellow fat colour in cattle. *Proc New Zeal Soc Anim Product.* 29:164–175.

- Morgavi D.P., Beauchemin K.A., Nsereko V.L., Rode L.M., McAllister T.A., Iwaasa A.D., Wang Y. & Yang W.Z. 2001. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. *J Anim Sci.* 79:1621-1630.
- Mukhopadhyay A. 1997. Inclusion Bodies and Purification of Proteins in Biologically Active Forms. *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* 56:62-108.
- Novakova L. & Vickova H. 2009. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analyt Chim Acta.* 656:8–35.
- Noziere P., Graulet B., Lucas A., Martin B., Grolier P., & Doreau M. 2006. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Anim Feed Sci Technol.* 131:418-450.
- NRC. Nutrient Requirements of Beef Cattle. Subcommittee on Beef Cattle Nutrition, Committee on Animal Nutrition, National Research Council. 7^a ed. USA: *National Academy Press*, 2000. 248 p. ISBN: 0-309-59241-0
- O'Neil C.A., & Schwartz S.J. 1992. Chromatographic analysis of cis/trans carotenoid isomers. *J Chromatogr A.* 624: 235–524.
- O'Connell K.L., & Stults J.T. 1997. Identification of mouse liver proteins on two-dimensional electrophoresis gels by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of in situ enzymatic digests. *Electrophoresis.* 18(3-4): 349-359.
- Ong D.E., Newcomer M.E. & Chytil F. 1994. Cellular retinoid-binding proteins. *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine.* 2: 283-318.
- Pimentel D. & Pimentel M. 2008. Corn and Cellulosic Ethanol Cause Major Problems. *Energies.* 1:35-37.
- Prache S., Priolo A. & Grolier P. 2003. Persistence of carotenoid pigments in the blood of concentrate-finished grazing sheep: its significance for traceability of grass-feeding. *J Anim Sci.* 81, 360–367.

- Priolo A., Micol D., Agabriel J., Prache S. & Dransfield E. 2002. Effect of grass or concentrate feeding systems on lamb carcass and meat quality. *Meat Sci.* 62:179-185.
- Reboul E., Abou L., Mikail C., Ghiringhelli O., Andre M., Portugal H., Jourdeuil-Rahmani D., Amiot M.J., Lairon D. & Borel P. 2005. Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *Biochem J.* 387:455– 461.
- Reboul E., Berton A., Moussa M., Kreuzer C., Crenon I. & Porel P. 2006. Pancreatic lipase and pancreatic lipase-related protein 2, but not pancreatic lipase-related protein 1, can hydrolyze retinyl palmitate in physiological conditions. *Biochim Biophys Acta.* 1761:4–10.
- Reynoso C.R., Mora O., Nieves V., Shimada A., González de Mejía E. 2004. β -Carotene and lutein in forage and bovine adipose tissue in two tropical regions of México. *Anim Feed Sci and Technol.* 113: 183–190.
- Ruiz F.A., Sagarnaga V.M.L., Salas G.J.M., Mariscal A.V., Estrella Q.H., González A.M. & Juárez Z.A. 2004. Impacto del TLCAN en la cadena de valor de bovinos para carne. *Universidad Autónoma Chapingo, México.*
- SAGARPA. 2006. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de bovino en México 2006. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. <http://www.sagarpa.gob.mx>
- Schweigert F.J., Britton G., Liaaen-Jensen S. & Pfander H. 1998. Metabolism of carotenoids in mammals. *Carotenoids, volume 3: Biosynthesis and metabolism.* 249-284 p.
- Shimada Miyasaka Armando. Nutrición animal. 3ª ed. México: *Trillas*, 2015. 397 p. ISBN 978-607-17-0122-0
- Simonne H.A., Green N.R. & Bransby D.I. 1996. Consumer acceptability and β -carotene content of beef as related to cattle finishing diets. *J Food Sci.* 61: 1254–1256.

- Strachan B.D., Yang A. & Dillo R.D. 1993. Effect of grain feeding on fat colour and other carcass characteristics in previously grass-fed *Bos indicus* steers. *Austral J Exper Agric.* 33:269-73.
- Tee E.S. 1992. Carotenoids and retinoids in human nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 31:103-163.
- Thomas J.G., Ayling A. & Baney F. 1997. Molecular Chaperones, Folding Catalysts, and the Recovery of Active Recombinant Proteins from *E. coli*. *Appl Biochem Biotechnol.* 66:197-238.
- Van Bennekum A., Werder M., Thuahnai S.T., Han C.H., Duong P., Williams D.L., Wettstein P., Schulthess G., Phillips M.C. & Hauser H. 2005. Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary β -carotene and cholesterol. *Biochem.* 44:4517–4525.
- Van Bennekum A.M., Fisher E.A., Blaner W.S. & Harrison E.H. 2000. Hydrolysis of retinyl esters by pancreatic triglyceride lipase. *Biochem.* 39:4900–4906.
- Van Soest P.J. Nutritional Ecology of the Ruminant. 2^a ed. USA: *Cornell University Press*, 1994. 40-125 p.
- Vera A., Gozalez-Montalban N., Aris A. & Villaverde A. 2006. The conformation quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnol Bioeng.* 96:1101–1106.
- Weng W., Li L., van Bennekum A.M., Potter S.H., Harrison E.H., Blaner W.S., Breslow J.L. & Fisher E.A. 1999. Intestinal absorption of dietary cholesteryl ester is decreased but retinyl ester absorption is normal in carboxyl ester lipase knockout mice. *Biochem.* 38:4143–4149.
- Wyss A., Wirtz G., Woggon W.-D. Brugger R., Wyss M., Friedlein A., Bachmann H. & Hunziker W. 2000. Cloning and expression of β,β -Carotene 15,15'-Dioxygenase. *Biochem Biophys Res Comm.* 271:334-336.
- Yang A., Larsen T.W. & Tume R.K. 1992. Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Austral J Agric Res.* 43:1809-1817.

- Yang A., McLennan S. Armstrong J., Larsen T., Shaw F. & Tume K. 1993. Effect of short-term grain feeding on bovine body-fat colour: a cautionary note. *Austral J Agric Res.* 44:215-220.
- Yoshida T. 2004. Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review. *J Biochem Biophys Meth.* 60:265–280.