

OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE UNA β -CAROTENO 15,15'-MONOOXIGENASA RECOMBINANTE A PARTIR DE CUERPOS DE INCLUSIÓN

OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION AND PURIFICATION OF A RECOMBINANT β -CAROTENE 15,15'-MONOOXYGENASE FROM INCLUSION BODIES

Martín Barbosa-Amezcu¹, Luz Vázquez-Moreno², Laura González-Dávalos³, Armando Shimada³, Ofelia Mora^{3*}

¹Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México 04510, México. ²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Hermosillo. Hermosillo, Sonora, México. ³Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN), Secretaría de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Boulevard. B. Quintana 514-D, Colonia Arboledas, 76134, Querétaro, Querétaro. México. (ofemora66@unam.mx).

RESUMEN

Los forrajes utilizados en la producción de ganado bovino en el trópico tienen altos niveles de β -caroteno, que produce canales con grasa de color amarillo y demerita su valor económico. La pigmentación amarilla se debe a la actividad baja de la enzima β -caroteno 15,15'-monooxigenasa (BCMO1) en el intestino delgado e hígado. Un uso biotecnológico de esta enzima podría escindir al β -caroteno en dos moléculas de retinal, eliminar la fuente de coloración y optimizar el valor comercial de la carne del ganado bovino alimentado en pastoreo. El objetivo de este estudio fue obtener una enzima BCMO1 recombinante con actividad similar a las enzimas nativas, a partir de bacterias transformadas con el gen que codifica la β -caroteno 15,15'-monooxigenasa de *Gallus gallus* (*gBCMO1*). La enzima se obtuvo por sobreexpresión a partir de una *Escherichia coli* XL1-Blue transformada con dicho gen, y se purificó por Cromatografía rápida de proteína líquida (Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC); se midió la actividad *in vitro* del proceso por Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC) y el producto final se detectó por Cromatografía de líquidos de polaridad alta (High Polarity Liquid Chromatography, HPLC). Una proteína de aproximadamente 63 kDa se obtuvo, la cual presentó una actividad enzimática de 2993 (\pm 108.2) pmol mg⁻¹ de proteína h⁻¹ (n=3). La proteína aislada se puede evaluar como aditivo en estudios *in vitro* con el fin de disminuir la coloración amarilla de las canales de bovinos.

ABSTRACT

Grasses used in the production of bovine livestock in the tropics contain high levels of β -carotene, which produces carcasses that contain yellow-pigmented fat, reducing their economic value. The yellow pigment is due to the low activity of the enzyme β -carotene 15,15'-monooxygenase (BCMO1) in the small intestine and liver. A biotechnological use of this enzyme could split β -carotene in two molecules of retinal, eliminating the source of coloring and optimizing the commercial value of the meat obtained from grazing cattle. The aim of this study was to obtain a recombinant BCMO1 enzyme with a similar activity to native enzymes, from bacteria modified with the gene that codifies the β -carotene 15,15'-monooxygenase in *Gallus gallus* (*gBCMO1*). The enzyme was overexpressed in an *Escherichia coli* XL1-Blue transformed with that gene and purified by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC); measuring the *in vitro* activity of the process by Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC); and detecting the final product by High Polarity Liquid Chromatography (HPLC). A protein of approximately 63 kDa was obtained, which showed an enzyme activity of 2993 (\pm 108.2) pmol mg⁻¹ of protein h⁻¹ (n=3). The isolated protein can be evaluated *in vitro* as an additive, in order to reduce the yellow pigmentation of the livestock carcasses.

Key words: grazing livestock, pigmented fat, β -Carotene, meat additives, BCMO1.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7073-7740>

Recibido: abril, 2020. Aprobado: mayo, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 317-329. 2021.

Palabras clave: bovinos en pastoreo, grasa pigmentada, β -Caroteno, aditivos cárnicos, BCMO1.

INTRODUCCIÓN

En México el 72.2% del ganado vacuno se encuentra en sistemas de producción en pastoreo (INEGI, 2014), ya sea extensivo o intensivo, en los cuales la alimentación se basa en el consumo de gramíneas nativas o introducidas (Cruz-Monterrosa *et al.*, 2011). Estos pastos poseen una alta concentración de carotenoides, principalmente todo-*trans*- β -caroteno, el cual es el precursor mayor de vitamina A (Grune *et al.*, 2010), porque es el único carotenoide capaz de producir dos moléculas de todo-*trans*-retinal después de la escisión oxidativa de su doble enlace central 15,15', catalizada por la β -caroteno 15,15'-monooxigenasa (BCMO1) (Grune *et al.*, 2010).

La BCMO1 es una proteína soluble de 63 kDa que contiene Fe^{2+} . Esta proteína se expresa en el intestino delgado, 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). Además, la actividad de esta enzima varía entre especies, y es cinco veces menor en bovinos que en cabras (García-López y Mora-Izaguirre, 2011). Mora *et al.* (2001) mencionaron que en bovinos un suplemento 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 ese nivel de consumo, la mayoría del β -caroteno absorbido se convierte en todo-*trans*-retinal.

Cruz-Monterrosa *et al.* (2011) estimaron que el contenido de β -caroteno de *Cynodon plectostachyus* producido en el trópico húmedo mexicano es de 627 mg kg^{-1} de materia seca. Estos datos indican que por cada kg de materia seca de forraje que un bovino en pastoreo consume, tiene una ingesta excedente de β -caroteno, el cual se secreta en la grasa de la leche o se deposita en órganos y tejidos, en especial en el adiposo. Entonces, bajo sistemas de producción en pastoreo hay una pigmentación amarilla en la grasa debido al β -caroteno almacenado en este tejido (Daley *et al.*, 2010).

En algunas regiones de México, 12.9% de las canales bovinas muestran esta pigmentación (García-López y Mora-Izaguirre, 2011). A pesar de que el color (tonalidad amarilla) no afecta ni el sabor ni el valor nutritivo de la carne, ésta resulta indeseable

INTRODUCTION

In Mexico, 72.2% of cattle is found under grazing production systems (INEGI, 2014), either extensive or intensive. Feeding is based on the consumption of native or introduced grasses (Cruz-Monterrosa *et al.*, 2011). These grasses contain high concentrations of carotenoids, mainly all-*trans*- β -carotene, which is the greatest precursor of A-vitamin (Grune *et al.*, 2010). That is the only carotenoid able to produce two molecules of all-*trans*-retinal after the oxidative dissociation of its central double bond 15,15', catalyzed by the β -carotene 15,15'-monooxygenase (BCMO1) (Grune *et al.*, 2010).

BCMO1 is a soluble, 63 kDa protein containing Fe^{2+} . This protein is expressed in the small intestine, liver, kidneys, lungs, skin, testicles, the retinal pigment epithelium of the eye and in many embryonic tissues (D'Ambrosio *et al.*, 2011). Additionally, the activity of this enzyme varies among species; it is five times lower in bovinos than in goats (García-López and Mora-Izaguirre, 2011). Mora *et al.* (2001) reported for bovinos that a supplement of up to 40 mg of β -carotene per kg of dry matter does not affect the concentration of this compound in the adipose tissue of the carcasses. With that level of consumption, most of the absorbed β -carotene becomes all-*trans*-retinal.

Cruz-Monterrosa *et al.* (2011) estimated that the content of β -carotene in *Cynodon plectostachyus*, produced in the humid Mexican tropics, is 627 mg kg^{-1} of dry matter. This data indicates that for every kg of dry forage eaten by grazing livestock, there will be an excess intake of β -carotene, which is then secreted as fat into the milk or is deposited in other tissues and organs, particularly in the adipose tissue. Therefore, under grazing production systems, there is a yellow pigmentation in the meat fat due to the β -carotene stored in that tissue (Daley *et al.*, 2010).

In some of the regions of Mexico, 12.9% of bovine carcasses display this pigment (García-López and Mora-Izaguirre, 2011). Despite the color (a yellow pigmentation) does not affect the flavor or the nutritional value of the meat, it becomes undesirable because the final consumer rejects those pigmented carcasses. This reduces the price of the product because consumers prefer beef with white fat (Barrón-Gutiérrez *et al.*, 2012; García-López and Mora-Izaguirre, 2011).

porque el consumidor final rechaza las canales pigmentadas. Este hecho baja el precio de la carne, porque las personas prefieren la carne bovina con grasa blanca (Barrón-Gutiérrez *et al.*, 2012; García-López y Mora-Izaguirre, 2011).

Por lo anterior, con la hipótesis de que la proteína BCMO1 de intestino delgado de *Gallus gallus* se puede purificar a partir de una *Escherichia coli* XL1-Blue y mantener su actividad enzimática para escindir β -caroteno en bovinos; el objetivo de este estudio fue sobre expresar y purificar la enzima BCMO1 a partir de una *E. coli* XL1-Blue transformada con el gen de esa proteína (*gBCMO1*) y probar su actividad *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El gen de la β -caroteno 15,15'-monooxigenasa (*gBCMO1*)

En el Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México (FESC-UNAM) se desarrolló una *E. coli* XL1-Blue recombinante transformada en el vector inducible por arabinosa pBAD. La recombinante tiene insertado *gBCMO1* aislado del intestino delgado de *G. gallus*. *E. coli* XL-1 Blue ha demostrado que sintetiza a la proteína BCMO1 con actividad *in vitro* (García-López *et al.*, 2012). Por esa razón se decidió utilizar dicha bacteria en este estudio.

Caracterización de la bacteria

Para confirmar la integridad del inserto, se extrajo el ADN plasmídico de la bacteria transformada utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, EUA). La calidad del ADN extraído se evaluó con electroforesis en gel de agarosa al 1% y por la relación de las absorbancias A260/A280 y A230/A260 obtenidas con un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). Además, el ADN plasmídico obtenido se digirió con la enzima de restricción SacI y se secuenció para confirmar la identidad del inserto.

Expresión de la BCMO1 recombinante

De un cultivo bacteriano que creció durante toda una noche se utilizó 1 mL de para inocular 100 mL de medio LB con $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina. El cultivo se colocó en incubación a 37 °C y 250 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica de ~ 0.5 a 600 nm (DO_{600}). Luego se indujo la expresión de la enzima BCMO1 con 0.2% de arabinosa (Sigma-Aldrich, EE. UU.) y se continuó la incubación por 4 h más.

Based on the above, the stated hypothesis was that a recombinant BCMO1 of the small intestine of *Gallus gallus* can be expressed from an *Escherichia coli* XL1-Blue, maintaining its enzyme activity as to disassociate β -carotene in bovines. The aim of this study was to overexpress and purify the enzyme BCMO1 from an *E. coli* XL1-Blue transformed with the gene of that protein (*gBCMO1*) and to test its activity *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

The β -carotene 15,15'-monooxigenase gen (*gBCMO1*)

At Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional, (RuMeN) of Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, under Universidad Nacional Autónoma de México (FESC-UNAM), a recombinant *E. coli* XL1-Blue was developed, transformed with the pBAD arabinose-induced vector. The recombinant bacterium contained the *gBCMO1* gene, isolated from the small intestine of *G. gallus*. *E. coli* XL1-Blue has proven to synthesize the BCMO1 protein with *in vitro* activity (García-López *et al.*, 2012). For this reason, that bacterium was used in this study.

Characterization of the bacterium

To confirm the integrity of the insert, the plasmid DNA was extracted from the transformed bacteria, using the Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (Promega, USA). The quality of the extracted DNA was evaluated with electrophoresis in agarose gel at 1% and by the ratio of A260/A280 and A230/A260 absorbances obtained with a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). In addition, the plasmid DNA obtained was digested with the SacI restriction enzyme and sequenced to confirm the identity of the insert.

Expression of the BCMO1 recombinant

One milliliter of an overnight bacterial culture was used to inoculate 100 mL of LB medium with $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of ampicillin. The culture was incubated at 37 °C and 250 rpm in a shaking incubator until it reached an optical density of ~ 0.5 at 600 nm (DO_{600}); subsequently. Then, the expression of the BCMO1 enzyme was induced with 0.2% of arabinose (Sigma-Aldrich, USA) and incubation was resumed for another 4 h.

Once induced, the cell pellet was obtained by centrifuging, then resuspended in a lysis buffer [Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, lysozyme ($300 \mu\text{g mL}^{-1}$) and protease inhibitors (EDTA-free)]. It was incubated at 4 °C for

Una vez inducida, se obtuvo la pastilla celular por centrifugación, y esta se resuspendió en amortiguador de lisis [Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, lisozima ($300 \mu\text{g mL}^{-1}$) e inhibidores de proteasas (libre de EDTA)]. Durante 30 min se incubó a 4°C y se agregó Tritón X-100 para después colocarla en ultrasonicador SFX150 con una intensidad de 9; se realizaron 10 pulsos con intervalos de 30 s entre cada uno (Branson Ultrasonics Co., EUA).

A la muestra sonicada, se le agregó DNase I ($100 \text{ U Kunitz mL}^{-1}$ de muestra) y 10 mM de MgCl_2 ; se colocó en agitación a 60 rpm por 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó para separar las proteínas solubles e insolubles. Las proteínas se cargaron en un SDS-PAGE al 8% y se analizaron por Western Blot en una membrana de nitrocelulosa. El gel se tiñó con nitrato de plata con la metodología propuesta por Kavran y Leahy (2014). Las imágenes de los geles y las membranas se capturaron en un equipo Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, EUA) con Image Lab® (Bio-Rad).

Solubilización de la BCMO1 a partir de cuerpos de inclusión

La *E. coli* utilizada en este estudio expresó la enzima en cuerpos de inclusión por lo que la proteína se solubilizó en condiciones desnaturizantes. Para esto, se siguió el método propuesto por Singh *et al.* (2015) con algunas modificaciones. Una vez obtenida la fracción proteica insoluble, se resuspendió en un amortiguador (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, guanidina 6 M, DTT 5 mM e imidazol 15 mM) en proporción de 3 mL g^{-1} de bacteria utilizada. La incubación fue a 25°C y 60 rpm por 1 h, y se centrifugó a 4°C para remover los remanentes insolubles.

Purificación de la enzima por IMAC

Para la purificación de la enzima se utilizó una columna HisTrap FF de 5 mL (GE Healthcare Bio-Sciences, UK) acoplada a un equipo FPLC AKTA (GE Healthcare, UK) con recolector de fracciones. Las recomendaciones del fabricante se siguieron y se mantuvieron las condiciones desnaturizantes durante la purificación.

La columna se equilibró con el mismo amortiguador con el que se desnaturizó la proteína. Una vez equilibrada se inyectó la muestra a un flujo de 1 mL min^{-1} y se lavó la fracción no unida con el mismo amortiguador. La enzima se eluyó con incremento en la concentración de imidazol a 150 mM. Las proteínas se monitorearon a una absorbancia de 280 nm.

30 min and Triton X-100 was added to the mixture. Then, it was sonicated in an SFX150 sonifier (Branson Ultrasonics Co., USA) at 9-intensity; 10 pulses were performed with 30 s intervals between each.

The sonicated sample was added with DNase I ($100 \text{ U Kunitz mL}^{-1}$ of sample) and 10 mM of MgCl_2 ; it was stirred at 60 rpm for 15 min at room temperature and centrifuged to separate soluble and insoluble protein fractions. The proteins were loaded onto an SDS-PAGE (8%) and analyzed by Western Blot on a nitrocellulose membrane. The gel was dyed with silver nitrate using the methodology proposed by Kavran and Leahy (2014). The images of gels and membranes were taken with a Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA) using Image Lab® (Bio-Rad, USA).

Solubilization of BCMO1 from inclusion bodies

The *E. coli* used in this study expressed the enzyme in inclusion bodies, therefore the protein was solubilized in denaturalizing conditions. The method proposed by Singh *et al.* (2015) was followed, with some modifications. Once the insoluble protein fraction was obtained, it was resuspended in a denaturalization buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, guanidine 6 M, DTT 5 mM and imidazole 15 mM) with a proportion of 3 mL g^{-1} of bacteria used. Incubation was at 25°C and 60 rpm for 1 h; then it was centrifuged at 4°C to remove the insoluble remains.

Purifying the enzyme by IMAC

To purify the enzyme, a 5 mL HisTrap FF column (GE Healthcare Bio-Sciences, UK) was attached to an FPLC AKTA (GE Healthcare, UK) with a fraction collector. The manufacturer recommendations were followed, and the denaturalizing conditions were maintained during purification.

The column was equilibrated with the same buffer used to denaturalize the protein. Once it was equilibrated, the sample was injected into a flow of 1 mL min^{-1} and the unattached fraction was washed with the same buffer. The enzyme was eluted with an increase in the concentration of imidazole to 150 mM. The proteins were monitored to an absorbance of 280 nm.

Renaturation of BCMO1

Once the protein was purified, it was renatured with the method proposed by Gutiérrez-González *et al.* (2019) with some

Renaturalización de la BCMO1

Una vez purificada la proteína, se renaturalizó con la metodología propuesta por Gutiérrez-González *et al.* (2019) con algunas modificaciones. La cantidad de enzima eluída se cuantificó por medio de la técnica de Bradford y se calculó la cantidad de amortiguador necesario (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, glutatona oxidada 0.5 mM, glutatona reducida 5 mM y L-arginina 200 mM) para diluir la muestra y que ésta no excediera los 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

La cantidad de amortiguador necesario se colocó en agitación a 60 rpm, se añadió la proteína gota a gota y se mantuvo en agitación por 2 h a 4 °C. La solución se filtró (0.2 μm) y se concentró por centrifugación en tubos centricones de 10 kDa (Sigma-Aldrich, EE. UU.) La proteína obtenida se utilizó para medir su actividad *in vitro*.

Actividad enzimática

Una vez renaturalizada la proteína, se midió su actividad con la metodología propuesta por During *et al.* (1996) con algunas modificaciones. Un mM de β -caroteno altamente hidrofóbico se diluyó en 10 mL de acetona con Tween 40 al 4.5 %. La mezcla se homogeneizó con un homogeneizador Ultraturax T25, (IKA Labortechnik, Alemania) a 10 000 rpm por 10 s. Después se evaporó la acetona bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se diluyó con agua destilada para llevarla a un volumen final de 10 mL. Este β -caroteno fue el que se utilizó como sustrato para el ensayo enzimático.

Para el ensayo enzimático, en 2 mL de amortiguador (para 100 mL: fosfato de potasio 1.37 g, pH 7.7, cloruro de magnesio 0.0193 g, nicotinamida 0.211 g, glutatona 0.312 g, duodesil fosfato de sodio 0.049 g, ácido taurocólico 0.322 g, L- β fosfatidilcolina 0.02 g y β -tocoferol 0.012 g) se añadió tanto el β -caroteno soluble como la proteína renaturalizada y se incubó la reacción a 37 °C durante 1 h sin agitación.

La reacción se detuvo con la adición de 500 μL de formaldehído al 37%; se incubó por 10 min y se adicionaron 2 volúmenes de acetonitrilo, se agitó con un vórtex y se incubó por 5 min en hielo, y luego se centrifugó 18 000 x g durante 10 min.

Las muestras obtenidas de los ensayos enzimáticos se analizaron por HPLC para detectar los retinoides formados, con base en lo reportado por During *et al.* (1996). Después se inyectaron por duplicado (100 μL) en el HPLC 1100 Series, con un detector de arreglo de diodos (Agilent Technologies, Alemania). Para separar el retinal se usó una columna TSK gel ODS-80Ts C18 de fase reversa (Tosoh, Tokyo, Japón) con una fase móvil de solución de 90% de acetonitrilo, 10% de agua y 0.1% de acetato de amonio. El flujo fue de 1 mL min^{-1} , monitoreando el todo-*trans*-retinal a 380 nm (la absorbancia máxima del retinal).

modifications. The amount of eluted enzyme was quantified with the Bradford technique, and it was calculated the amount of (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, oxidized glutathione 0.5 mM, reduced glutathione 5 mM and L-arginine 200 mM) buffer required to thin the sample without surpassing 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

The required amount of buffer was stirred at 60 rpm, the protein was added dropwise, and stirring continued for 2 h at 4 °C. The solution was filtered (0.2 μm) and concentrated by centrifuge in 10 kDa centricon tubes (Sigma-Aldrich, USA). The protein obtained was used to measure *in vitro* activity.

Enzyme activity

Once the protein was renatured, its activity was measured using the method proposed by During *et al.* (1996) with some modifications. One mM of highly hydrophobic β -carotene was diluted in 10 mL of acetone with Tween 40 at 4.5 %. The mixture was homogenized using an Ultra-Turrax T25 homogenizer (IKA Labortechnik, Germany) at 10 000 rpm for 10 s. The acetone was evaporated under a nitrogen atmosphere. The mixture was diluted with distilled water until it reached a final volume of 10 mL. This β -carotene was used as a substrate for the enzyme test.

For the enzyme test, in 2 mL of buffer (for 100 mL: potassium phosphate 1.37 g, pH 7.7, magnesium chloride 0.0193 g, nicotinamide 0.211 g, glutathione 0.312 g, sodium duodesyl phosphate 0.049 g, taurocholic acid 0.322 g, L- β phosphatidylcholine 0.02 g and β -tocopherol 0.012 g), both the soluble β -carotene and the renatured protein were added, and the reaction was incubated at 37 °C for 1 h without stirring.

The reaction was ended by adding 500 μL of formaldehyde at 37%; it was incubated for 10 min and 2 volumes of acetonitrile were added. It was stirred using a vortex and incubated for 5 min in ice, then centrifuged 18 000 x g for 10 min.

The samples obtained from the enzyme tests were analyzed using HPLC to find the retinoids formed, based on During *et al.* (1996). Samples were injected in duplicate (100 μL) in the HPLC 1100 Series with diode array detector (Agilent Technologies, Germany). To separate the retinal, a TSK gel ODS-80Ts C18 reverse phase column (Tosoh, Tokyo, Japan) was used, with a 90% acetonitrile, 10% water and 0.1% ammonium acetate solution as the mobile phase. The flow was 1 mL min^{-1} , monitoring the all -*trans*-retinal at 380 nm (the maximum absorbance of retinal).

The retinal formed during the reaction was quantified by calculating the area of the elution peak in relation to an all-*trans*-retinal standard curve. All procedures involving carotenoids were carried out under soft red light and at 4 °C.

El retinal formado durante la reacción se cuantificó al calcular el área del pico de elución respecto a una curva estándar obtenida con todo-*trans*-retinal. Todos los procedimientos donde se trabajó con los carotenoides se realizaron bajo luz roja suave y a 4 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la bacteria

La banda de entre 5 y 6 kb que se observa en la electroforesis en gel de agarosa al 1%, coincide con el peso estimado de 5.7 kb (4.1 kb del vector y 1.58 kb del inserto) (Figura 1A, Carril 2). Además, se observa en Carril 3 una banda de entre 4 y 5 kb; y otra de entre 1.5 y 2 kb que coinciden con los pesos del vector vacío (4.1 kb) y del inserto (1581 pb). Estos resultados coinciden con García-López *et al.* (2012), quienes utilizaron esta misma construcción y encontraron bandas con pesos similares.

El ADN plasmídico de la *E. coli* XL1-Blue transformada con *gBCMO1* se secuenció. El resultado se analizó por medio del algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), con el cual se obtuvo una identidad del 99% con el ARNm reportado para *gBCMO1* de *G. gallus* con el cambio de un nucleótido en el gen heterólogo. La secuencia de nucleótidos obtenida de la secuenciación se tradujo y el resultado obtenido se analizó con el mismo algoritmo. La identidad obtenida fue del 100% cuando se alineó con la secuencia de la proteína heteróloga de *G. gallus*.

Aunque en la secuencia de nucleótidos hubo cambio en una base, la proteína tuvo 100% de homología con la reportada para la BCMO1 de *G. gallus*. Esto se debe a que, si bien en el marco de lectura se observó el cambio de la base, esto no afectó la traducción del gen debido a que el código genético es degenerado (Laguna *et al.*, 2013; Yamaguchi *et al.*, 2014). Con estos resultados se concluyó que la bacteria conservó el vector y que este aún tenía el inserto, el gen que codifica para la BCMO1.

Expresión y solubilización de los cuerpos de inclusión

Una *E. coli* XL1-Blue transformada con *gBCMO1* de *G. gallus* insertado en pBAD se utilizó. Por medio del uso de esta construcción, se observó que la proteína de interés se expresó en cuerpos de inclusión.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of bacterium

A 5 to 6 kb band can be observed in the 1% agarose gel electrophoresis, which coincides with the estimated weight of 5.7 kb (4.1 kb of the vector and 1.58 kb of the insert) (Figure 1A, Lane 2). Additionally, Lane 3 shows a band between 4 and 5 kb, and another of 1.5 to 2 kb that match the weights of the empty vector (4.1 kb) and the insert (1581 pb). These results coincide with García-López *et al.* (2012), who used the same construction and found bands with similar weights.

The plasmid DNA of the *E. coli* XL1-Blue transformed with *gBCMO1* was sequenced. The result was analyzed using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algorithm. The nucleotide sequence had a 99% identity with the mRNA reported for *gBCMO1* from *G. gallus*, with the change of one nucleotide in the heterologous gene. The nucleotide sequence was translated, and the result was analyzed with the same algorithm. The identity obtained was 100% when aligned with the protein sequence in *G. gallus*.

Although there was a change of one base in the nucleotide sequence, the protein had 100% homology with that reported for the BCMO1 from *G. gallus*. This is, although the change of the base was observed in the reading frame, this did not affect the translation of the gene, since the genetic code was degenerated (Laguna *et al.*, 2013; Yamaguchi *et al.*, 2014). With these results, it was concluded that the bacterium kept the vector, which still included the insert, the gene that codifies for *gBCMO1*.

Expression and solubilization of the inclusion bodies

One *E. coli* XL1-Blue transformed with *gBCMO1* from *G. gallus* inserted in pBAD was used. By using this construction, the protein of interest was expressed in inclusion bodies.

Electrophoresis in 12% acrylamide gel under denaturing conditions (Figure 1B) in which the soluble protein fractions from different bacteria (transformed with pBAD-BCMO1 construct and induced with 0.2% arabinose for 4 h) were charged, showed no difference in the band pattern among the

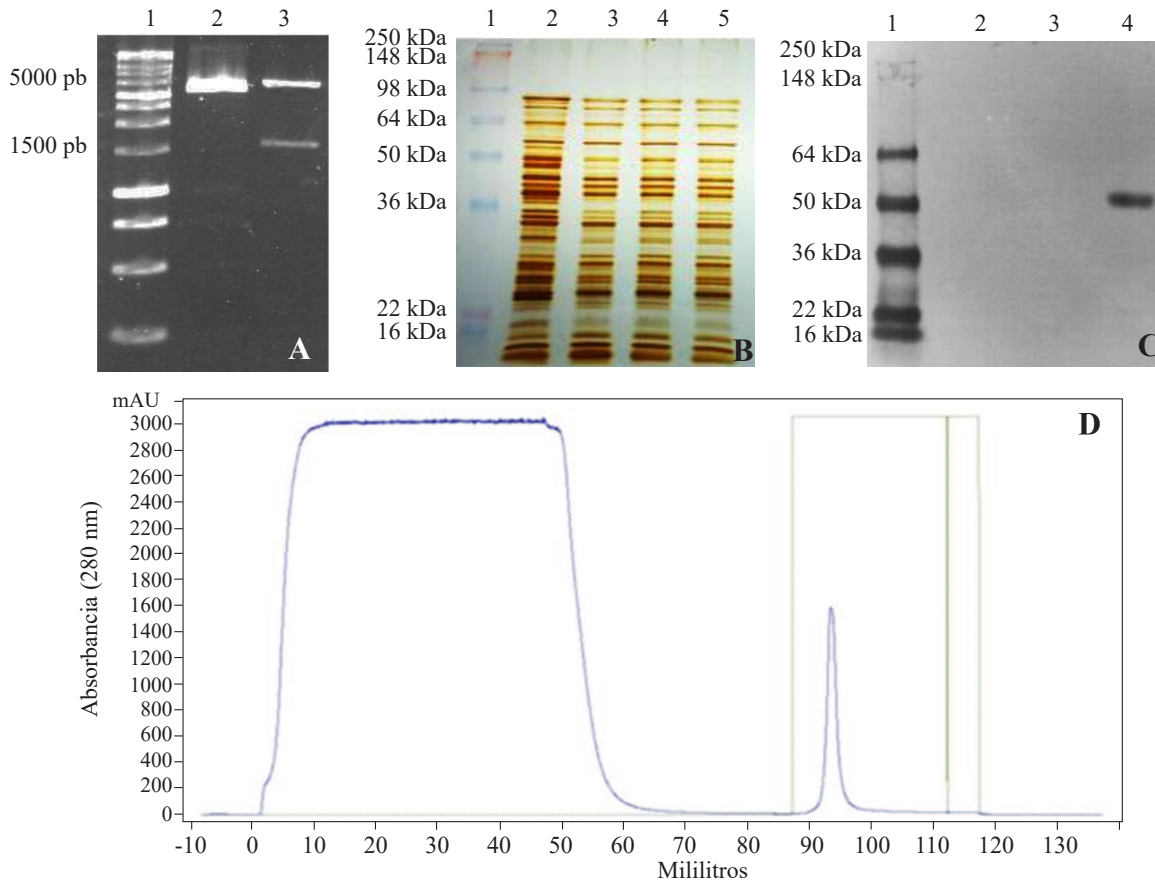


Figura 1. A. Análisis de restricción del plásmido obtenido de la *E. coli* XL1-Blue recombinante transformada con el vector pBAD inducido por arabinosa. Carril 1. Marcador de peso; Carril 2. Plásmido sin digerir; Carril 3. Plásmido digerido con *Sac*I. B. SDS-Page de las fracciones proteicas solubles 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. C. Identificación de las fracciones proteicas de la bacteria transformada por Western Blot. 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. D. Cromatograma de purificación de la BCMO1 por IMAC. La elución de la enzima se registró en el mL 93.

Figure 1. A. Restriction analysis of the plasmid obtained from the recombinant *E. coli* XL1-Blue transformed with the pBAD arabinose-induced vector. Lane 1. Weight marker; Lane 2. Undigested plasmid; Lane 3. Plasmid digested with *Sac*I. B. SDS-Page of the soluble protein fractions of bacteria transformed with pBAD-BCMO1. Lane 1. Molecular weight marker; Lane 2. Soluble proteins of non-induced bacteria; Lanes 3-5. Soluble proteins from induced colonies. C. Western Blot identification of the protein fractions of transformed bacteria. Lane 1. Molecular weight marker; Lane 2. Soluble protein fraction; Lane 3. Insoluble protein fraction from non-induced bacteria; Lane 4. Insoluble protein fraction from induced bacteria. D. Purification chromatogram of BCMO1 by IMAC. Enzyme elution was registered at the 93 mL.

La electroforesis en gel de acrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes (Figura 1B) en la cual se cargaron las fracciones proteicas solubles de diferentes colonias de bacterias transformadas con la construcción pBAD-BCMO1, e inducidas en arabinosa al 0.2% por 4 h, no mostró diferencias en el patrón de bandeo entre el tratamiento control (Carril 2) y los tratados (Carril 3-5).

control treatment (Lane 2) and the others (Lanes 3-5).

Overexpression of heterologous proteins in bacterial host frequently results in the formation of insoluble protein aggregates named inclusion bodies. Despite the progress in the understanding of the structure of that proteins, their solubilization and renaturing are carried out empirically, leading to a

La sobre expresión de proteínas heterólogas con frecuencia da como resultado la formación de agregados insolubles de proteínas conocidos como cuerpos de inclusión. A pesar del avance en el entendimiento de la estructura de estas proteínas, solubilización y renaturalización se efectúan de manera empírica; lo cual conduce a una recuperación deficiente de la proteína funcional (Singh *et al.*, 2015).

El procedimiento Western Blot (Figura 1C) de los cuerpos de inclusión de las bacterias transformada sin inducir (Carril 3) e inducida (Carril 4), permitió observar que toda la enzima de interés se encontraba en la fracción proteica insoluble, mientras que el anticuerpo (anti c-Myc) no reconoció banda en la fracción proteica soluble (Carril 2).

Para la solubilización de los cuerpos de inclusión se probaron diferentes agentes desnaturalizantes, los cuales fueron guanidina (6 M), urea (8 M) y sarkosyl (0.3 % p/v), con los métodos propuestos por Singh *et al.* (2015) y Schlager *et al.* (2012). El agente desnaturalizante más eficiente fue la guanidina, la cual extrajo el 93.5% de los cuerpos de inclusión. En contraste con urea y sarkosyl, los cuales solubilizaron respectivamente el 55.6 y 42.9% de la proteína.

Purificación de la BCMO1 de *G. gallus*

Los cuerpos de inclusión obtenidos de las bacterias inducidas se solubilizaron con guanidina y se purificaron por IMAC. Al adicionar 150 mM de imidazol al amortiguador, la elución de la proteína de interés se registró en el mL 93 (Figura 1D). El porcentaje de recuperación de la proteína fue de hasta 43.1% en relación con el extracto crudo en la columna de purificación.

Las proteínas así obtenidas se analizaron por SDS-PAGE y Western Blot. La enzima purificada mostró una banda de aproximadamente 63 kDa, que corresponde al peso estimado de la BCMO1 de *G. gallus*, basado en los 526 aminoácidos de la estructura primaria, con la marca de hexa-histidinas en el extremo carboxilo terminal (Figura 2A).

En el procedimiento Western Blot de la Figura 2B, puede observarse a las fracciones proteicas separadas por medio de un SDS-PAGE en gel al 8% que después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con un anticuerpo monoclonal conjugado anti-Myc; en el Carril 3 y 4 se observó una banda que correspondía aproximadamente a 63 kDa.

deficient recovery of the protein function (Singh *et al.*, 2015).

The Western Blot of the inclusion bodies (Figure 1C) of non-induced (Lane 3) and induced (Lane 4) transformed bacteria, allowed to observe that the entire enzyme of interest was found in the insoluble protein fraction. Whereas the antibody (anti c-Myc) did not recognize a band in the soluble protein fraction (Lane 2).

Different protein denaturing agents were tested for the solubilization of the inclusion bodies. Guanidine (6 M), urea (8 M) and sarkosyl (0.3 % p/v), following the method proposed by Singh *et al.* (2015) and Schlager *et al.* (2012). The most efficient denaturalizing agent was guanidine, which extracted 93.5% of the inclusion bodies. In contrast with urea and sarkosyl, which respectively solubilized 55.6 and 42.9% of the protein.

Purifying the BCMO1 of *G. gallus*

The inclusion bodies obtained from the induced bacteria were solubilized with guanidine and were purified by IMAC. After adding the buffer with 150 mM of imidazole, the elution of the protein of interest was registered at the 93 mL (Figure 1D). The percentage of protein recovery was as high as 43.1% compared to the raw extract injected in the purification column.

The obtained proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western Blot. The purified enzyme displayed a band of approximately 63 kDa, which is the estimated weight of the BCMO1 from *G. gallus*, based on the 526 amino acids of its primary structure, including the tag of hexa-histidine in the terminal carboxyl end (Figure 2A).

The Western Blot in Figure 2B shows the protein fractions separated by an 8% SDS-PAGE, which then were transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated with an anti-Myc conjugated monoclonal antibody; Lanes 3 and 4 displayed a band corresponding to approximately 63 kDa.

Regarding the purification procedure, three contaminating bands were observed in the purified fraction; only one was recognized by the anti-Myc antibody. When an anti-histidine antibody was used, it recognized those three bands. Due to this, it was not concluded whether they were products of degradation of the same enzyme or endogenous

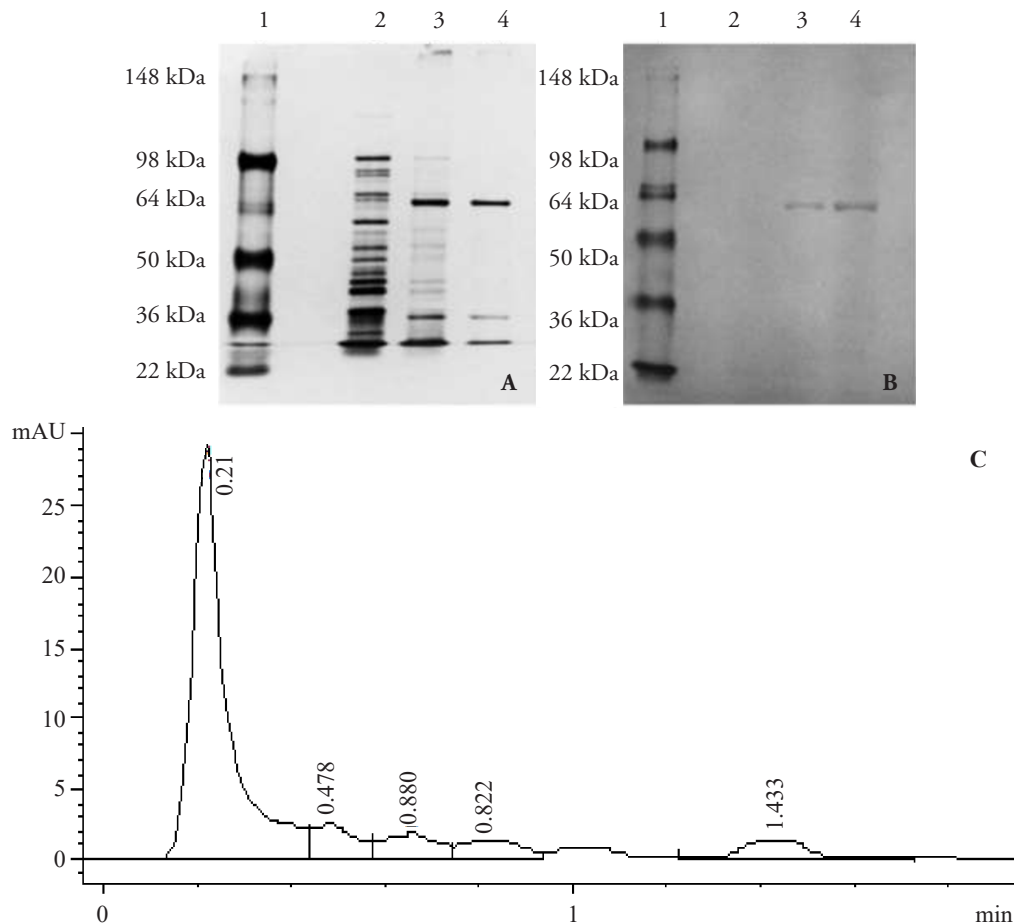


Figura 2. A. SDS-PAGE. B. Western Blot de la BCMO1 purificada; Carril 1. Marcador de Peso; Carril 2. Proteína soluble; Carril 3. Fracción insoluble de proteína (cuerpos de inclusión); Carril 4. Proteína purificada. C. Cromatograma de la elución del retinal por HPLC en fase reversa, el tiempo de retención fue de 1:43 min.

Figure 2. A. SDS-PAGE. B. Western Blot of the purified BCMO1; Lane 1. Weight marker; Lane 2. Soluble protein fraction; Lane 3. Insoluble protein fractions (inclusion bodies); Lane 4. Purified protein. C. Chromatogram of the elution of retinal by HPLC in reverse phase; retention time was 1:43 min.

En cuanto a la purificación se observaron tres bandas contaminantes en la fracción purificada, de las cuales el anticuerpo anti-Myc solo reconoció una. Cuando se utilizó un anticuerpo anti-histidinas, éste reconoció las tres bandas. Debido a esto, no se concluyó si fueron productos de degradación de la propia enzima o proteínas endógenas de la bacteria con regiones altas en histidinas; las cuales mostraron afinidad alta con la matriz de la columna de purificación.

Estos resultados son similares a los encontrados por Kim y Oh (2010), quienes utilizaron enzima de pollo insertada en el plásmido pET-24a (+) y obtuvieron una enzima pura al utilizar IMAC como primer

proteins from bacteria with high-histidine regions that displayed a high affinity with the matrix of the purification column.

These results coincide with those obtained by Kim and Oh (2010), who used chicken enzyme inserted in plasmid pET-24a (+) and obtained a pure enzyme when using IMAC as the first step and Ionic Exchange Chromatography as final step.

Renaturing the BCMO1

In this stage, with the dropwise addition of the denatured protein to the renaturing buffer at 4 °C during a slow stir (60 rpm), the concentration of the

paso y un cromatográfico de intercambio iónico como paso final.

Renaturalización de la BCMO1

En esta etapa, con la adición gota a gota de la proteína desnaturalizada al amortiguador de naturalización a 4 °C en agitación lenta (60 rpm), tanto disminuyó la concentración del agente desnaturalizante, como se mantuvo una concentración baja de proteína en solución (menor a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Cuando se añadía toda la muestra de una sola vez se formaban agregados insolubles proteicos en la solución. Por lo tanto, la mejor estrategia en la renaturalización es hacerla con la menor concentración de proteína posible. Esto para evitar la interacción de las regiones hidrofóbicas de los diferentes péptidos en solución y con ello, su agregación.

El método más eficiente para la renaturalización de la proteína se observó al utilizar L-arginina como aditivo en el amortiguador, porque disminuyó las interacciones proteína-proteína. Además, al usar glutatona oxidada y reducida se crearon las condiciones óxido reductoras adecuadas para la unión correcta de los enlaces disulfuro (Burgess y Deutscher, 2009).

Análisis por HPLC en fase reversa de la bioconversión de β -caroteno en retinal

El retinal se separó del resto de los compuestos presentes en la muestra con el uso 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 (Figura 2C). Bajo estas condiciones el β -caroteno no se co-eluyó. El límite de detección del estándar de retinal se estimó en 1 pmol 100 μL^{-1} . El tiempo del perfil de elución obtenido de la muestra de la reacción enzimática correspondió con lo observado en el estándar de todo-*trans*-retinal. Además, el pico del espectro de absorción fue similar al del estándar.

In vivo, el β -caroteno forma parte de las micelas junto con los lípidos en emulsión por acción de las sales biliares. Este β -caroteno se convierte después en retinal por la BCMO1 y esta reacción requiere agua (Mora *et al.*, 2001). Sin embargo, en condiciones *in vitro*, la naturaleza del β -caroteno es altamente hidrofóbica, y se obtienen niveles bajos de producto. Por lo tanto, la bioconversión de este compuesto en retinal se ha incrementado, en particular en mamíferos, por medio de la inclusión del sustrato en micelas

denaturation agent decreased, as a low concentration of protein in the solution was maintained (below 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). When the entire sample was added at once, insoluble protein aggregates were formed in the solution. Therefore, the best strategy in protein renaturing is to perform it with the lowest possible protein concentration. In order to avoid the interaction of the hydrophobic regions of different peptides in the solution, and thus, their accumulation. The most efficient method to protein renaturing was observed when using L-arginine as an additive in the buffer, since it reduced protein-protein interaction. Additionally, the use of oxidized and reduced glutathione created the appropriate oxidation-reduction conditions for the appropriate disulfide bonds formation (Burgess and Deutscher, 2009).

Analysis by HPLC in reverse phase of the bioconversion of μ -carotene into retinal

The retinal was separated from the rest of the compounds in the sample using acetonitrile:water (90:10, v/v), with 0.1% ammonium acetate as a mobile phase. Retention time was 1:43 min (Figure 2C). Under these conditions, the β -carotene was not co-eluted. The standard detection limit for the retinal was estimated in 1 pmol 100 μL^{-1} . The time of the elution profile obtained from the enzyme reaction sample matched the observations in the all-*trans*-retinal standard. In addition, the absorption spectrum peak was similar to that of the standard.

In vivo, the β -carotene is part of the micelles, along with the lipids in the emulsion due to the action of the bile salts. This β -carotene is then converted into retinal by the BCMO1 and this reaction requires water (Mora *et al.*, 2001). Under *in vitro* conditions, however, β -carotene is highly hydrophobic, and low product levels are obtained. Therefore, in mammals, the bioconversion of β -carotene into retinal is increased through the inclusion of the substrate in micelles to increase hydro-solubility and accessibility in aqueous solutions (Kim and Oh, 2010). In our study, the increase in the production of retinal was probably a result of increasing the solubility of β -carotene, even though a renatured protein was in other studies, in which the hydrophobicity of the β -carotene also decreased with the use of detergents, the activity reported was significantly higher compared to that obtained in our study. This probably due to the higher amount of hydrophobic amino acids in

para incrementar su hidrosolubilidad y hacerlo más accesible en soluciones acuosas (Kim y Oh, 2010). En nuestro estudio, el aumento de la producción de retinal fue un resultado probable del incremento en la solubilidad del β -caroteno, aun cuando se utilizó una proteína renaturalizada.

En otros estudios donde también disminuyó la hidrofobicidad del β -caroteno con el uso de detergentes, la actividad reportada fue significativamente mayor en comparación con la obtenida en nuestro estudio. Probablemente debido a la cantidad mayor de aminoácidos hidrofóbicos en la estructura primaria de las enzimas estudiadas (Kim *et al.*, 2010). Aquéllos corresponden al 32.8% en el caso de la BCMO1 de pollo, mientras que en las bacterias pueden formar hasta el 56.3 %. Esa actividad también puede atribuirse a que la proteína de interés no se desnaturizó al inicio del estudio mencionado (Kim *et al.*, 2010). Los métodos de renaturalización raramente son 100% efectivos en cuanto a la cantidad recuperada de proteína, así como en la recuperación de la actividad enzimática (Singh *et al.*, 2015).

En el nuestro estudio, los valores óptimos de masa molecular, secuencia de aminoácidos y de nucleótidos, pH y temperatura de catálisis de la BCMO1 de *G. gallus* fueron similares a los de otros estudios. La actividad enzimática fue 2993 (\pm 108.2) pmol mg⁻¹ de proteína por hora (n=3). Valor similar al obtenido por Wyss *et al.* (2000) sobre la misma enzima de *G. gallus*, pero inferior a los registros de Kim y Oh (2009) y Kim *et al.* (2010) (Cuadro 1).

De acuerdo con la actividad enzimática obtenida y con los cálculos realizados por el autor en un trabajo previo, un novillo en pastoreo requeriría 2.5 g de la BCMO1 purificada y renaturalizada en este estudio para degradar los 1.06 g de β -caroteno que la bacteria transformada no fue capaz de convertir en

the primary structure of the enzymes studied (Kim *et al.*, 2010). Those amino acids are 32.8% in the case of the BCMO1 in chicken, whereas they can be as high as 56.3% in bacteria. Such activity may also be due to the protein of interest was not denatured at the beginning of that mentioned study (Kim *et al.*, 2010). Renaturing methods are not totally effective regarding the recovered amount of protein, as well as in the recovery of the enzyme activity (Singh *et al.*, 2015).

In our study, optimum values of molecular weight, amino acid and nucleotide sequences, pH and catalysis temperature for the BCMO1 from *G. gallus* were similar to those found in other studies. Enzyme activity was 2993 (\pm 108.2) pmol mg⁻¹ of protein per hour (n=3). A similar value to that reported by Wyss *et al.* (2000) on the same *G. gallus* enzyme, yet lower to those recorded by Kim and Oh (2009) and Kim *et al.* (2010) (Table 1).

According to the enzyme activity obtained and to the calculations performed by the author in an earlier work, a grazing calf would require 2.5 g of the purified and renatured BCMO1 protein found in this study to degrade 1.06 g of β -carotene (the excess that was consumed and the transformed bacterium did not convert into retinal) in order to reduce the yellow pigmentation in beef fat.

CONCLUSIONS

Escherichia coli XL1-Blue transformed with the *Gallus gallus* gene for β -carotene 15,15'-monooxygenase was able to express the heterologous protein and displayed enzymatic activity *in vitro*.

By solubilizing, purifying and renaturing the β -carotene 15,15'-monooxygenase from the protein extract obtained from the *E. coli* XL1-Blue, a 63 kDa band was observed, with an enzyme activity of 2993 pmol of retinal per milligram of protein per hour.

Despite the enzyme activity found, wider validations would be required in live subjects. The activity observed is still considered insufficient to transform all the β -carotene into retinal and to reduce the yellow pigmented fat in cattle carcasses.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the funds provided through the project Num. 132088 and the

Cuadro 1. Actividad *in vitro* de la β -caroteno 15,15'-monooxygenasa (BCMO1) purificada con métodos diferentes.

Table 1. *In vitro* activity of β -carotene 15,15'-monooxygenase (BCMO1) purified by different methods.

Estudio	Actividad BCMO1
Este estudio	2993 pmol
Wyss <i>et al.</i> (2000)	2500 pmol
Kim y Oh (2009)	320 nmol
Kim <i>et al.</i> (2010)	244 nmol

retinal y disminuir así la pigmentación amarilla de la grasa de la carne.

CONCLUSIONES

La bacteria *Escherichia coli* XL1-Blue transformada con el gen de *Gallus gallus* para la β -caroteno 15,15'-monooxygenasa tuvo la capacidad de expresar la proteína heteróloga y mostró actividad enzimática *in vitro*.

Al solubilizar, purificar y renaturalizar la β -caroteno 15,15'-monooxygenasa a partir del extracto proteico obtenido de la *E. coli* XL1-Blue, se observó una banda de 63 kDa, con actividad enzimática de 2993 pmol de retinal por miligramo de proteína por hora. A pesar de la actividad enzimática detectada se requerirán validaciones más amplias en sujetos vivos. La actividad observada aún se considera insuficiente para transformar todo el β -caroteno en retinal y reducir así la pigmentación amarilla de la grasa en las canales de bovinos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado a través del proyecto No. 132088; y por la beca de postgrado otorgada a Martín Barbosa Amezcua en la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

LITERATURA CITADA

- Barrón-Gutiérrez, S., C. García-Bojalil, O. Mora-Izaguirre, y A. Shimada-Miyasaka. 2012. Impacto económico de la pigmentación amarilla del tejido adiposo de bovinos en pastoreo en el trópico. *Agrociencia*. 38: 173-179.
- Burgess, R. R. and M. P. Deutscher. 2009. *Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification*. 2nd. Ed. Academic Press. New York, USA. 835 p.
- Cruz-Monterrosa, R. G., J. E. Ramírez-Bribiesca, M. I. Guerrero-Legarreta, and O. Hernández-Mendo. 2011. Carotenoids digestion in African Stargrass (*Cynodon plectostachyus*) determined with *in situ* techniques in cattle. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 14: 1011-1017.
- D'Ambrosio, D. N., R. D. Clugston, and W. S. Blaner. 2011. Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients*. 3: 63-103. <https://doi.org/10.3390/nu3010063>.
- Daley, C. A., A. Abbott, P. S. Doyle, G. A. Nader, and S. Larson. 2010. A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-feed beef. *Nutr. J.* 9: 10. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-10>.
- During, A., A. Nagao, C. Hoshino, and J. Terao. 1996. Assay of beta-Carotene 15,15'-dioxygenase activity by reverse-phase

postgraduate scholarship granted to Martín Barbosa Amezcua at Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, under Universidad Nacional Autónoma de México.

—End of the English version—

-----*-----

- high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 241: 199-205.
- García-López, E., y M. O. Mora-Izaguirre. 2011. Importancia de la expresión y actividad de la β -caroteno 15,15' monooxygenasa y la vitamina A. Su papel en la producción animal. Revisión. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 20: 105-120.
- García-López, E., A. González-Gallardo, A. Antaramián, M. L. González-Dávalos, A. Shimada, A. Varela-Echavarría, and O. Mora. 2012. *In vitro* conversion of β -carotene to retinal in bovine rumen fluid by a recombinant b-carotene-15, 15'-monooxygenase. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 82: 94-103. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000098>.
- Grune, T., G. Lietz, A. Palou, A. C. Ross, W. Stahl, G. Tang, D. Thurnham, S. Yin, S. and H. Biesalski. 2010. Beta-carotene is an important vitamin A source for humans. *J. Nutr.* 140: 2268S-2285S. <https://doi.org/10.3945/jn.109.119024>.
- Gutiérrez-González, M., C. Farías, S. Tello, D. Pérez-Etcheverry, A. Romero, R. Zúñiga, C. H. Ribeiro, C. Lorenzo-Ferreiro, and M. C. Molina. 2019. Optimization of culture conditions for the expression of three different insoluble proteins in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 9: 16850. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53200-7>.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2014. Sistema de Consulta de Información Geoestadística Agropecuaria. México. <https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/ena/2014/doc/minimonografia/prodbovena14.pdf> (Consulta: junio 2019).
- Kavran, J. M., and D. J. Leahy. 2014. Silver Staining of SDS-polyacrylamide Gel. *In: Methods Enzymol.* 541: 169-176. <https://doi.org/10-1016/B978-0-12-420119-4.00014-8>.
- Kim, Y. S., and D. K. Oh. 2009. Substrate specificity of a recombinant chicken b-carotene 15,15'-monooxygenase that converts b-carotene into retinal. *Biotechnol. Lett.* 31: 403-408. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9873-4>.
- Kim, Y. S. and D. K. Oh. 2010. Biotransformation of carotenoids to retinal by carotenoid 15,15'-oxygenase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 88:807-816. <https://doi:10.1007/s00253-010-2823-9>.
- Kim, Y. S., C. S. Park, and D. K. Oh. 2010. Hydrophobicity of residue 108 specifically affects the affinity of human beta-carotene 15,15'-monooxygenase for substrates with two ionone rings. *Biotechnol. Lett.* 32: 847-853. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0234-8>.
- Laguna, J., E. Piña, F. Martínez, J. Pardo, y H. Riveros. 2013. *Bioquímica de Laguna*. 7^a ed. Manual Moderno. México. pp: 487-513.

- Mora, O., J. L. Romano, E. Gonzalez, F. J. Ruiz, R. Gomez, and A. Shimada. 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.
- Schlager, B., A. Straessle, and E. Hafen. 2012. Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression. *BMC Biotechnol.* 95. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-95>.
- Singh, A., V. Upadhyay, A. K. Upadhyay, S. M. Singh, and A. K. Panda. 2015. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb. Cell Fact.* 14: 41 <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>.
- Wyss, A., G. Wirtz, W. D. Woggon, R. Brugger, M. Wyss, A. Friedlein, H. Bachmann, and W. Hunziker. 2000. Cloning and expression of beta,beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 334-336. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2619>.
- Yamaguchi, N., A. Sunto, T. Goda, and K. Suruga. 2014. Competitive regulation of human intestinal β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 (BCMO1) gene expression by hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 β and HNF-4 β . *Life Sci.* 119: 34-39. <https://doi: 10.1016/j.lfs.2014.10.009>.

