



Apocarotenoides de los hongos Mucorales

Eugenio Alcalde Rodríguez
Tesis doctoral
Universidad de Sevilla
2013

A mis padres y a Paola

Ojalá que se llame *amapola*
que me coja la mano y me diga
que sola no comprende la vida
(...)
Ojalá que empezara de cero
y poderle decir que he pasado la vida
sin saber que la espero (...)

Roberto Iniesta, Extremoduro.

Vi la circulación de mi oscura sangre, vi el engranaje del amor y la modificación de la muerte, vi el Aleph, desde todos los puntos, vi en el Aleph la tierra, y en la tierra otra vez el Aleph y en el Aleph la tierra, vi mi cara y mis vísceras, vi tu cara, y sentí vértigo y lloré, porque mis ojos habían visto ese objeto secreto y conjetural, cuyo nombre usurpan los hombres, pero que ningún hombre ha mirado: el inconcebible universo (...)

Jorge Luis Borges, "El Aleph".

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al Prof. Enrique Cerdá Olmedo por aceptarme en su laboratorio y hacer posible esta tesis. A los profesores Javier Ávalos y Luis Corrochano, del departamento de Genética, por su ayuda siempre que me ha sido necesaria.

También quiero agradecer al Prof. Alejandro Fernández, la Prof. M^a del Mar Herrado y a José Antonio González, de la Universidad de Granada, y al Prof. Isidro González y la Prof. Josefina Aleu, de la Universidad de Cádiz, por su contribución en los aspectos químicos de esta tesis.

Mis estancias fuera de Sevilla han contribuido enormemente a mi formación como investigador. Estas no habrían sido posibles sin la ayuda de los Profesores Victoriano Garre y Santiago Torres, de la Universidad de Murcia; el Prof. Alexander Idnurm, de la Universidad de Missouri-Kansas City (U.S.A.); el Dr. Salim Al-Babili y el Prof. Peter Beyer, de la Universidad de Friburgo (Alemania).

Este trabajo ha sido posible gracias al esfuerzo previo de numerosos compañeros del grupo de Enrique y del Departamento de Genética.

Índice

0 Introducción	13
0.1.1 Taxonomía	13
0.1.2 Historia natural	14
0.1.3 Usos y aplicaciones de los mucorales	18
0.2 Terpenoides, carotenoides y apocarotenoides	20
0.2.1 Terpenoides	20
0.2.2 Carotenoides	21
0.2.2.1 Carotenoides de mucorales	22
0.2.2.2 Síntesis de carotenoides	23
0.2.2.3 Síntesis en <i>Phycomyces</i>	24
0.2.3 Apocarotenoides	25
0.2.3.1 Apocarotenoides de mucorales	25
0.2.3.2 Síntesis de apocarotenoides de mucorales	26
0.2.4 Regulación de la síntesis de carotenos en mucorales	28
0.2.5 Otros apocarotenoides en la naturaleza	31
Capítulo 1. Corte del β-caroteno en mucorales	35
1.1 Introducción	35
1.1.1 Oxigenasas que cortan carotenos	35
1.1.1.1 Oxigenasas de <i>Phycomyces</i>	37
1.1.1.2 Comparación de oxigenasas de varios organismos	38
1.1.2 Apocarotenoides de 7 carbonos: los metilhexanoides	39
1.1.3 Identificación de apocarotenoides	40
1.2 Resultados	41
1.2.1 Oxigenasas de <i>Mucor</i>	41
1.2.1.1 Genes	41
1.2.1.2 Ensayos <i>in vivo</i>	43
1.2.1.3 Ensayos <i>in vitro</i>	43
1.2.2 Metilhexanoides	45
1.2.2.1 Metilhexanoides de <i>Phycomyces</i>	45
1.2.2.2 Metilhexanoides de <i>Blakeslea</i>	46
1.3 Discusión	47
1.3.1 Oxigenasas	47

1.3.1.1 Comparación de oxigenasas de varios organismos	47
1.3.1.2 Actividades enzimáticas	48
1.3.2 Metilhexanoides	49
1.3.3 Corte del β-caroteno en mucorales	51
Capítulo 2. Trisporoides y ciclofarnesoides	53
2.1 Introducción	53
2.1.1 Trisporoides y ciclofarnesoides	53
2.1.2 Nomenclatura general de los apocarotenoides	54
2.2 Resultados	58
2.2.1 Apocarotenoides de <i>Phycomyces</i>	58
2.2.1.1 Fraccionamiento cromatográfico de apocarotenoides	58
2.2.1.2 Identificaciones	59
2.2.1.3 Diferencias entre cultivos mixtos y simples	62
2.2.1.4 Evolución temporal	63
2.2.1.5 Ausencia de C ₂₅ en los cultivos	64
2.2.2 Trisporoides y ciclofarnesoides de <i>Blakeslea</i>	64
2.3 Discusión	66
2.3.1 Apocarotenoides de <i>Phycomyces</i>	66
2.3.1.1 Nuevas determinaciones y nuevos métodos	66
2.3.1.2 Diferencias entre cultivos simples y mixtos	67
2.3.1.3 Evolución temporal	68
2.3.2 Apocarotenoides de <i>Blakeslea</i>	68
2.3.3 Apocarotenoides de mucorales	69
Capítulo 3. Biotransformaciones de apocarotenoides	73
3.1 Introducción	73
3.2 Resultados	73
3.2.1 Biotransformación de ciclofarnesoides	73
3.2.2 Biotransformación de trisporoides	75
3.2.2.1 Biotransformación de trisporoides por mutantes <i>carS</i>	77
3.3 Discusión	78
3.3.1 Biotransformaciones de ciclofarnesoides	79
3.3.2 Biotransformaciones de trisporoides	79
4 Discusión general	83
4.1 Diversidad de apocarotenoides de mucorales	83
4.2 Ruta biosintética de apocarotenoides de <i>Phycomyces</i>	84
4.3 Feromonas de mucorales	86
4.4 Integración y regulación de las biosíntesis de caroteno y apocarotenoides	86
4.4.1 Curso temporal	86
4.4.2 Inducción sexual	87

4.4.3 Comparación de flujos metabólicos	87
4.4.4 Agregados enzimáticos y compartimientos subcelulares	88
4.4.5 Regulación general de las rutas	89
5 Materiales y métodos	93
5.1 Estirpes	93
5.1.1 Bacterias	93
5.1.2 Mucorales	93
5.2 Cultivos generales	94
5.3 Secuencias	95
5.4 Extracción y análisis de apocarotenoides	95
5.4.1 Obtención de exudados y extracción	95
5.4.2 Análisis de los apocarotenoides	96
5.4.2.1 Análisis por cromatografía líquida	96
5.4.2.2 Análisis de apocarotenoides en LC-HRMS	96
5.5 Clonación	97
5.6 Construcción de plásmidos	98
5.7 Producción heteróloga de enzimas	99
5.7.1 Expresión heteróloga	99
5.7.2 Obtención de lisados crudos	99
5.8 Ensayos enzimáticos <i>in vitro</i>	99
5.8.1 Sustratos	99
5.8.2 Ensayos	100
5.9 Ensayos en células de <i>E. coli</i> que contienen carotenoides	100
5.10 Ensayos de biotransformación de apocarotenoides	101
Bibliografía	103
Conclusiones	123
Resumen	125

Introducción

0.1 Mucorales

0.1.1 Taxonomía

Los hongos forman un linaje de organismos de aspectos muy diversos, como setas, levaduras, royas, trufas, mohos y muchos otros menos conocidos (Alexopoulos *et al.*, 1996). Se han descrito más de setenta mil especies y se estima que deben existir 1,5 millones (Hawksworth, 1991; Hawksworth *et al.*, 1995). Constituyen uno de los Reinos en que se clasifican los seres vivos.

Los *Mucorales* (Zycha *et al.*, 1969; Walther *et al.*, 20013) son un vasto conjunto de hongos escasamente conocido en sus aspectos fundamentales y casi tan distante de otros hongos filamentosos como de los animales y las plantas. Considerados tradicionalmente un Orden dividido en 9 Familias (Zycha *et al.*, 1969), constituyen sin duda un taxón de nivel muy superior, que puede ser llamado *Mucoromycota* o *Mucoromycotina*. La taxonomía de los hongos se encuentra en revisión (Voigt *et al.*, 2013), pero parece razonable aceptar un phylum *Zygomycota* y un subphylum *Mucoromycotina* (Hibbet *et al.*, 2007). Aquí los llamaremos mucorales, sin mayúscula ni cursiva, como nombre común bien asentado por su uso histórico.

Se ha propuesto (Walther *et al.*, 2013) un orden *Mucorales*, *sensu stricto*, que comprende solo cuatro familias del orden tradicional: *Mucoraceae*, *Thamnidaceae*, *Choanephoraceae* y *Syncephalastraceae*, ahora divididas en 13 familias (Figura 1). Para ello se han estudiado más de 600 estirpes y se han comparado sus secuencias ITS (secuencias del ADN para ARNr, transcritos, pero desechados) y LSU (secuencia de ADN que codifica el ARNr de mayor tamaño).

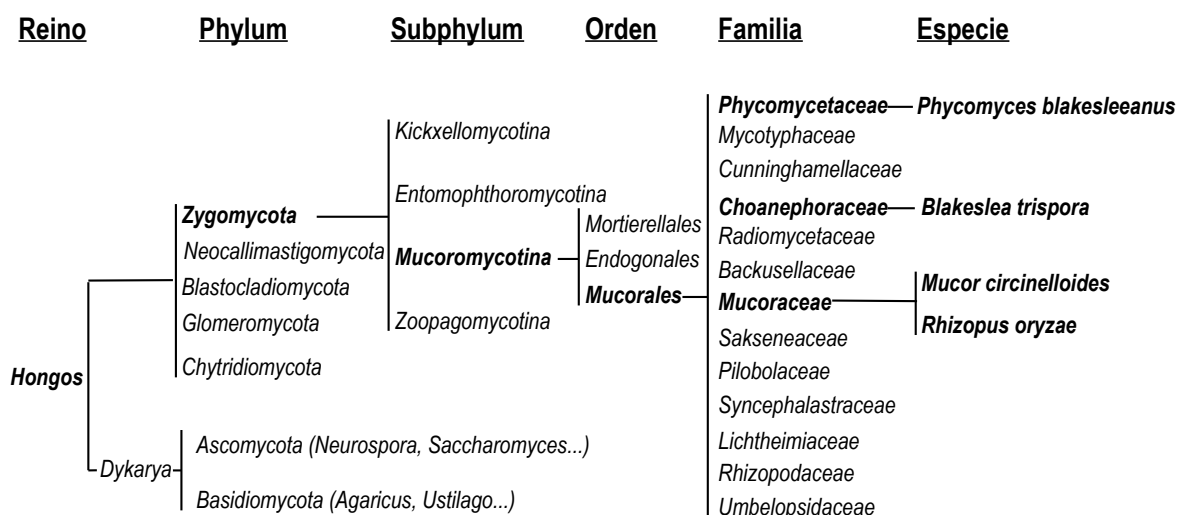


Figura 1. Esquema taxonómico de los mucorales. En negrita se destacan los grupos bajando de nivel taxonómico hasta llegar a las especies destacadas en esta tesis.

Este trabajo se ocupa de tres de los mucorales más conocidos: *Phycomyces blakesleeanus*, *Blakeslea trispora* y *Mucor circinelloides*, pertenecientes a las familias *Phycomycetaceae*, *Choanephoraceae* y *Mucoraceae*, respectivamente. Estos organismos se llamarán simplemente *Phycomyces*, *Blakeslea* y *Mucor*, cuando no haya confusión. El nombre del primero está bien asentado, mientras que el género *Mucor* es tan heterogéneo que sin duda requerirá nuevos nombres en un futuro próximo y el género *Blakeslea* probablemente deberá integrarse en el género *Choanephora*, más antiguo.

Disponemos de las secuencias genómicas completas de *Rhizopus oryzae* (sinónimo de *R. arrhizus*) y *Phycomyces blakesleeanus*, publicadas por el Broad Institute, y *Mucor circinelloides*, por el Joint Genome Institute.

0.1.2 Historia natural

Los mucorales son, en su mayoría, saprofitos, aunque algunas especies son parásitos de animales, plantas y otros hongos. *Phycomyces* se encuentra en ambientes húmedos de todo el mundo, viviendo sobre materia en descomposición. Se ha visto en muy pocas ocasiones en la naturaleza, pero sus esporas se encuentran con frecuencia en heces sólidas de mamíferos. *Blakeslea* se encuentra sobre todo en regiones tropicales como parásito de hojas, pero no es un patógeno de plantas, sino un oportunista (Zycha *et al.*, 1969; Webster, 1993); se ha encontrado en las flores de *Artocarpus integer*, de la

familia *Moraceae* (Sakai *et al.*, 2000), donde su papel podría ser el de atraer insectos, con lo que sería el primer hongo conocido que participa en la polinización de plantas. *Mucor* presenta una amplia distribución geográfica y se encuentra en suelos, sobre materia orgánica en descomposición y en otros ambientes, incluso como patógeno de humanos (Ribes *et al.*, 2000).

Aunque los tres hongos difieren en sus preferencias ambientales y en sus temperaturas óptimas de crecimiento, pueden cultivarse en las mismas condiciones de medio y temperatura en el laboratorio.

Los tres hongos se encuentran usualmente en forma vegetativa haploide. El ciclo vegetativo comienza con la germinación de esporas (más propiamente esporangiosporas). Las de *Phycomyces* (Cerdá-Olmedo y Heisenberg, 1968) son aproximadamente elipsoidales y multinucleadas, con 3,4 núcleos por espora de media (Figura 2); en algunos medios que permiten el crecimiento micelial óptimo, germinan diariamente un 2% de las esporas, pero el calentamiento a 48–50 °C y diferentes agentes químicos, como el acetato, producen la germinación masiva e inmediata (Robbins *et al.*, 1942; Ribero y Cerdá-Olmedo, 1994).

Las esporas de *Blakeslea* utilizadas en este trabajo (estirpes F921(-) y F986(+)) son multinucleadas (con 4,7 y 6,4 núcleos por espora de media, respectivamente) (Mehta *et al.*, 2003). Tienen forma elipsoidal, son de color pardorrojizo, están rayadas longitudinalmente y presentan unas prolongaciones fibrilares en los extremos que provocan la formación de agregados. Se tratan con detergente para desenmarañarlas y germinan sin activación previa en los medios de cultivo usuales (Mehta *et al.*, 2003).

Las esporas de la estirpe CBS277.49 (-) de *Mucor* son irregulares en forma, tamaño y número de núcleos (de 1 a 16); las de la estirpe NRRL3631 (+) son de aspecto uniforme, casi esféricas y uninucleadas (Li *et al.*, 2011). En ambos casos germinan espontáneamente en los medios de cultivo usuales.

A partir de las esporas germinadas se desarrollan hifas cilíndricas no tabicadas que se van ramificando para formar una masa, el micelio, tan grande como permitan los nutrientes y las demás circunstancias. En cultivos en medio líquido agitado aparecen masas miceliales esféricas, mientras que en medio sólido o líquido sin agitación se extienden superficialmente de forma radial (Figura 2) y desarrollan estructuras aéreas, los esporangióforos, especializadas en la esporulación. *Mucor* desarrolla también hifas aéreas que le dan un aspecto algodonoso. Los esporangióforos difieren mucho en forma

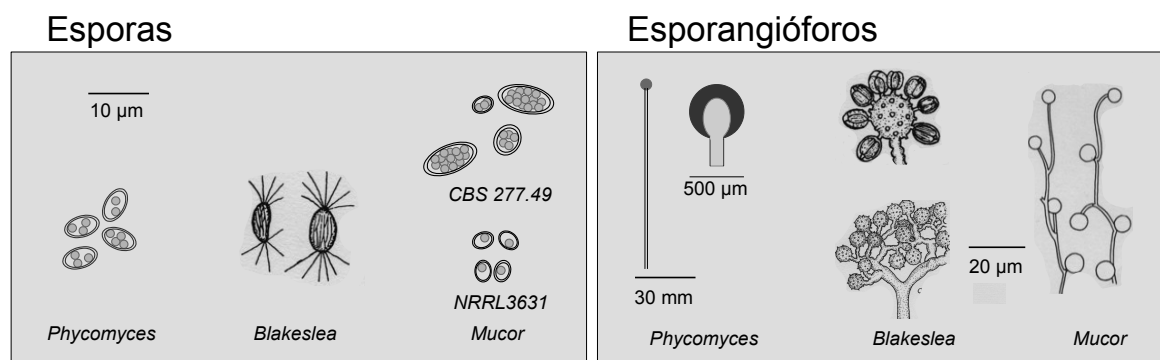


Figura 2. Comparación de las esporas y los esporangióforos de *Phycomyces*, *Blakeslea* y *Mucor*.

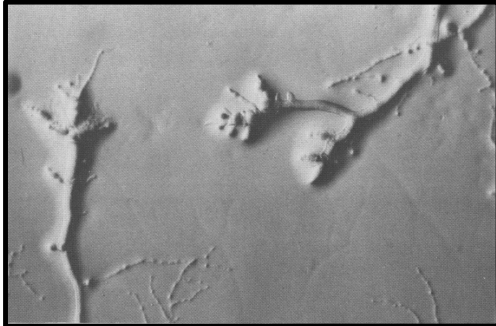
y tamaño entre las distintas especies. Los de *Phycomyces* pueden ser, dependiendo de las condiciones, micróforos (milímetros) o macróforos (varios centímetros). Los de *Mucor* y *Blakeslea* son mucho menores (de 50 a 80 y de 20 a 45 µm, respectivamente). Estas estructuras son fototrópicas. En el extremo de los esporangióforos se generan los esporangios, de forma esférica, que contienen las esporas del ciclo asexual (Figura 2).

Blakeslee en 1904 reconoció en las estirpes de los mucorales dos sexos que llamó (+) y (-), indistinguibles morfológicamente y solo identificables por su reacción mutua. La proximidad de micelios de distinto sexo sobre medio sólido induce el comienzo del ciclo sexual. Ambos sexos, antes de ponerse en contacto, difunden señales químicas específicas (Burgeff, 1924); esta fue la primera demostración de feromonas en la naturaleza. Aún no se han identificado químicamente, pero se sabe que son derivados del β-caroteno, ya que los mutantes que no pueden sintetizarlo son incapaces de estimular al sexo contrario (Sutter, 1975).

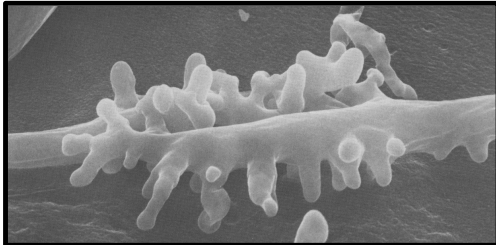
El primer cambio morfológico apreciable del ciclo sexual es el engrosamiento de las puntas de las hifas, que se convierten en los cigóforos. Estos se entrelazan por parejas para formar las cigosporas (Figura 3), que contienen citoplasma y núcleos de ambos sexos. Su tamaño y forma es muy variable dependiendo de la especie, siendo mucho mayores en *Phycomyces* que en *Mucor* o *Blakeslea* (Figura 4).

Las cigosporas de *Phycomyces* germinan tras un periodo de incubación de 2 a 3 meses y forman directamente estructuras parecidas a los esporangióforos y los esporangios del ciclo vegetativo, con la diferencia importante de que las cigosporas son productos de recombinación. Se ha desarrollado así el análisis genético de *Phycomyces*.

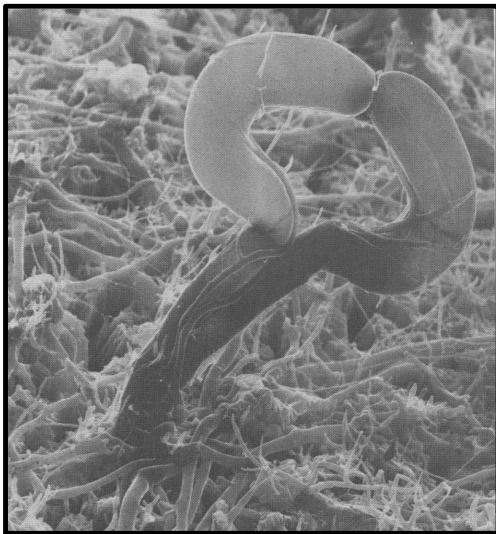
Cigóforos (silvestre x silvestre)



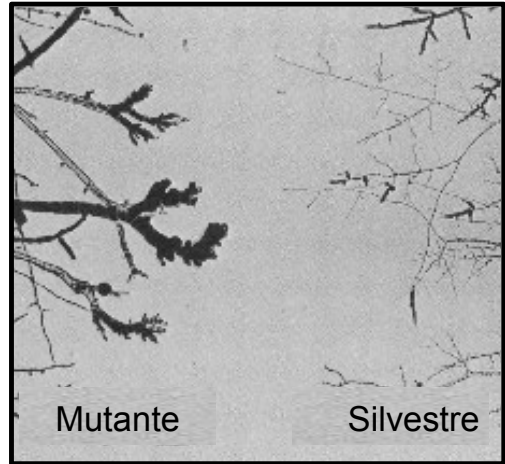
Cigóforos entrelazados



Progametangios y suspensores



Cigóforos (mutante x silvestre)



Cigospora



Figura 3. Desarrollo de la cigospora en *Phycomyces*. Cuando micelios de sexos opuestos se encuentran sobre una superficie sólida desarrollan hifas gruesas, llamadas cigóforos, en respuesta a un intercambio de señales químicas. Estas contactan y se desarrollan en el aire adoptando una disposición en tenazas, en la que cada mitad está compuesta por la región distal de un cigóforo, el progametangio. Una pared transversal tabica los ápices de cada progametangio, separando una célula llamada gametangio; la parte restante se llama suspensor. La fusión de los gametangios origina una sola célula, la cigospora, que está rodeada por apéndices negros ramificados procedentes de los suspensores.

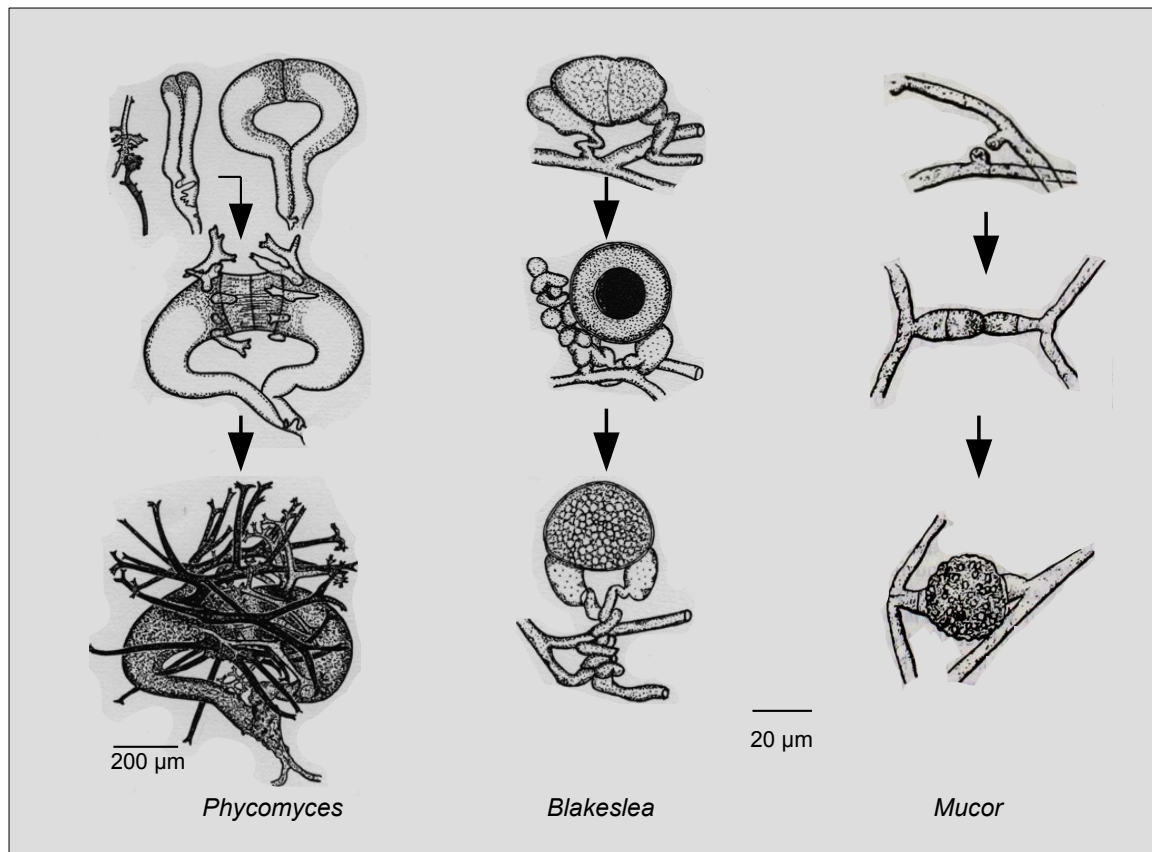


Figura 4. Comparación del proceso de formación de las cigosporas en *Phycomyces*, *Blakeslea* y *Mucor*.

En nuestro laboratorio no se ha conseguido la germinación de las cigosporas de *Mucor* ni de *Blakeslea* y, por tanto, no disponemos de análisis genético por recombinación en estos organismos.

Los mucorales y otros cigomicetos (Sutter, 1987), como los Mortierellales (Schimek *et al.*, 2003), comparten los mecanismos básicos del desarrollo sexual, lo que da lugar a reacciones sexuales incompletas entre especies y géneros distintos.

0.1.3 Usos y aplicaciones de los mucorales

Phycomyces aparece por primera vez en la literatura a principios del siglo XIX en Suecia (Agardh, 1817) con el nombre de *Ulva nitens*, porque se le tomó por un alga. Este error desembocó, unos años más tarde, en el nombre actual, *Phycomyces*, que etimológicamente significa “alga hongo” (Kunze, 1823). Durante casi un siglo solo se

conocía una especie, *Phycomyces nitens*; pero Burgeff en 1925, basándose en datos morfológicos y genéticos, dividió a las estirpes conocidas hasta ese momento en dos especies, *P. nitens* y *P. blakesleeanus*. Esta última ha concentrado casi todas las investigaciones de laboratorio, que empezaron hace más de un siglo; describían su crecimiento, su desarrollo y su respuesta a la luz (Carnoy, 1870; Sachs, 1879; Massart, 1888). *Phycomyces* ha estado en los laboratorios durante tantos años gracias a su fácil manejo y al gran potencial que ha demostrado en distintos ámbitos de estudio. Alfred Blakeslee descubrió su reproducción sexual y la de otros mucorales (Blakeslee, 1904; 1906).

Hans Burgeff desarrolló la genética de *Phycomyces* en los años siguientes. *Phycomyces* fue el primer organismo en el que se estudiaron mutantes espontáneos (Burgeff, 1912; 1914; 1928) y el segundo en el que se indujeron mutaciones artificiales (Dickson, 1932). Ya en sus publicaciones de principios de siglo, Blakeslee describió presuntos heterocariontes (Blakeslee, 1906), pero el término lo acuñó Burgeff unos años más tarde (Burgeff, 1914). Trabajos en nuestro laboratorio (Mehta y Cerdá-Olmedo, 2001) han demostrado que los fenotipos descritos por Blakeslee y Burgeff se debían a diploides parciales y no a heterocariontes.

Para *Phycomyces* se desarrollaron los primeros medios químicamente definidos, lo que mostró que es auxótrofo para la tiamina, vitamina B1 (Burgeff, 1924; Schopfer, 1934); este es el primer caso descrito de avitaminosis no humana.

El interés por las investigaciones en *Phycomyces* se vio fuertemente impulsado por Max Delbrück, uno de los fundadores de la Biología Molecular, gracias a sus esfuerzos por encontrar la base biológica de su comportamiento. Fue en el laboratorio de Delbrück donde se aislaron los primeros mutantes sensoriales, lo que permitió proponer una ruta de transducción sensorial entre receptores y efectores (Bergman *et al.*, 1973).

En la actualidad existe una amplia literatura sobre *Phycomyces*, que incluye un tratado (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987), varias revisiones generales (Galland y Lipson, 1984; Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1992; Cerdá-Olmedo, 2001; Cerdá-Olmedo y Corrochano, 2001) y más de dos mil monografías primarias.

Blakeslea se describió por primera vez a principios del siglo XX (Thaxter 1914). Los nuevos resultados moleculares parecen favorecer su incorporación al género *Choanephora*, como propusieron otros autores (Zycha *et al.*, 1969; Webster, 1993).

Los estudios sobre la genética de *Blakeslea* se limitan a la descripción de mutantes de la actividad sexual (Khrabrova y Zhdanov, 1979) y de la producción de caroteno (Mehta y Cerdá-Olmedo, 1995; Mehta *et al.*, 2003). Se han identificado los genes estructurales de la ruta de síntesis de β -caroteno (Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2004) y se ha estudiado su regulación por la luz (Quiles-Rosillo *et al.*, 2005). Cabe destacar su importancia para la producción industrial de β -caroteno (Ciegler, 1965).

Mucor fue descrito por primera vez por Van Tieghem en 1875 y está presente en los laboratorios desde hace más de 35 años. Es una herramienta ideal para el estudio de diferentes procesos como el dimorfismo en hongos (crece como levadura en anaerobiosis y como hongo filamentoso en presencia de oxígeno) (Orlowski, 1991), la respuesta a la luz (Corrochano y Garre, 2010), la síntesis de lípidos (Wynn *et al.* 1997), el silenciamiento génico (Nicolás *et al.*, 2003) y el metabolismo secundario en hongos.

Aunque no ha sido posible el uso de la genética clásica, sí se ha podido desarrollar un sistema eficaz de transformación génica (Van Heeswijk y Roncero, 1984) que permite la integración de vectores por recombinación homóloga (Navarro *et al.*, 2001). Recientemente se han incorporado nuevas técnicas para integrar ADN exógeno, como la electroporación (Gutiérrez *et al.*, 2011) y el uso de *Agrobacterium tumefaciens* (Nyilasi *et al.*, 2005). Estas técnicas, junto con el silenciamiento génico, convierten a *Mucor* en una herramienta ideal para el estudio de distintos procesos biológicos de los mucorales.

0.2 Terpenoides, carotenoides y apocarotenoides

0.2.1 Terpenoides

Los terpenoides forman un amplio grupo de metabolitos que incluye compuestos muy heterogéneos. La estructura de los terpenoides consta o deriva de varias repeticiones de una unidad fundamental de 5 carbonos, el isopreno (C_5). Los terpenos son hidrocarburos, con solo carbono e hidrógeno; los terpenoides incluyen además derivados con diversas modificaciones. Los terpenoides se clasifican según el número de unidades de isopreno que contengan. Cuando el número de unidades es bajo suelen ser volátiles y pueden ser olorosos, como el mentol (C_{10}) y otros componentes de los

aromas vegetales y los perfumes industriales. Muchos tienen funciones en la comunicación entre organismos.

Los terpenoides pueden tener funciones estructurales, como los esteroides y los carotenoides de las membranas. Otros actúan como cofactores de enzimas y en reacciones de oxidación-reducción, como la ubiquinona de las mitocondrias y otras estructuras subcelulares. Los terpenoides también participan en la modificación de proteínas por adición de grupos farnesilo y geranylgeranilo (Gelb *et al.*, 2006). Algunos terpenoides pueden llegar a ser moléculas gigantes, como el caucho; la investigación de la estructura del caucho llevó a los conceptos de macromolécula y polimerización (Staudinger, 1920; Staudinger y Fritsch, 1992).

0.2.2 Carotenoides

Los carotenos son tetraterpenos (C_{40}) y sus derivados oxigenados se denominan xantofilas, que junto con los carotenos conforman el grupo de los carotenoides. Producen carotenoides las plantas, las algas, muchos hongos y muchas bacterias. Los animales no los sintetizan, pero los toman en la dieta. Los carotenoides son los principales colorantes de los seres vivos y forman parte de nuestra vida diaria: el licopeno da color a los tomates, el β -caroteno a las raíces de las zanahorias (Walter y Strack, 2011), la astaxantina a salmónidos y crustáceos y diversos carotenoides a frutos, flores y animales (Schmidt *et al.*, 2011) (Figura 5). Los carotenoides forman parte de los pigmentos antena en la fotosíntesis (Walter y Strack, 2011), captan la luz y protegen contra el daño oxidativo; asociados a la clorofila contribuyen a la diversidad de tonos y colores de los organismos fotosintéticos. Algunos carotenoides, como la zeaxantina (Figura 5) y la luteína, participan en la visión de los mamíferos (Abdel-Aal *et al.*, 2013). Los carotenoides tienen muchos usos en alimentación humana y animal como provitaminas, antioxidantes y colorantes; también tienen importantes aplicaciones en farmacología y cosmética (Lee y Schmidt-Dannert, 2002; Fraser y Bramley, 2004).

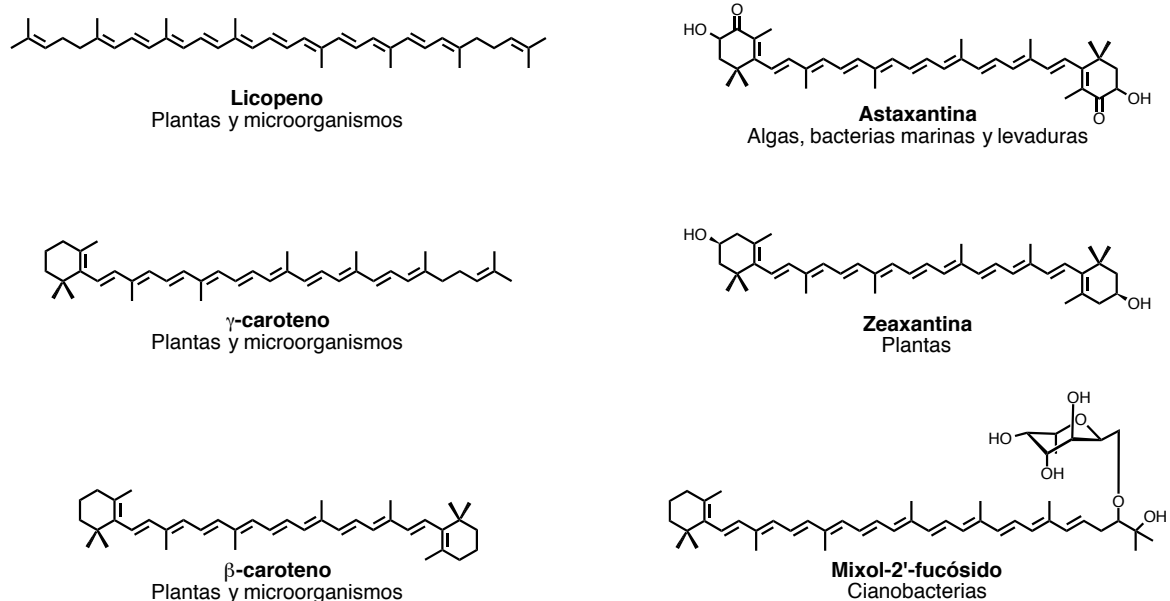


Figura 5. Ejemplos de carotenoides en la naturaleza. En la primera columna se muestran tres ejemplos de carotenos presentes en mucorales y en la segunda tres xantofilas.

Los fragmentos de los carotenoides y sus derivados se denominan apocarotenoides. Muchos son volátiles y confieren, por ejemplo, aroma a las rosas, sabores al azafrán y a los tomates y buqué al vino. También pueden tener funciones fisiológicas: el retinal (C_{20}) es indispensable en los fotorreceptores de los vertebrados (Walter y Strack, 2010).

0.2.2.1 Carotenoides de mucorales

En esta tesis trabajaremos con el β -caroteno (Figura 5) y los apocarotenoides derivados de su ruptura. Al β -caroteno se debe la coloración amarillenta de *Phycomyces* y *Mucor* y la algo más anaranjada de *Blakeslea*, particularmente notoria en micelios y esporangióforos jóvenes y en zonas de interacción sexual. En *Phycomyces* no se han podido generar mutantes que no contengan, al menos, pequeñas cantidades de carotenos; esto parece indicar un papel esencial de los carotenos para la vida del organismo. El β -caroteno es esencial para ciertas funciones, como la fotomorfogénesis (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1990). Los trisporoides (C_{18}) son apocarotenoides de los mucorales derivados de la ruptura del β -caroteno y están implicados en su sexualidad.

Phycomyces (Cerdá-Olmedo, 1987, 2001), *Blakeslea* (Mehta y Cerdá-Olmedo, 1995; Mehta *et al.*, 2003) y *Mucor* (Iturriaga *et al.*, 2001; Iturriaga *et al.*, 2005; Papp *et al.*, 2006) se han usado en las investigaciones sobre la producción de β -caroteno y su regulación, que tienen repercusiones industriales. El mercado de carotenoides purificados prefiere la producción biológica a la síntesis química. *Blakeslea* es el más atractivo de los tres para producir β -caroteno por varias razones: su carotenogénesis sexual es más potente, la temperatura óptima de crecimiento es más alta y crece mejor y más deprisa en líquidos aireados y agitados. La mayor producción de β -caroteno en *Phycomyces* se obtiene en cultivos superficiales, más complicados de mantener industrialmente.

0.2.2.2 Síntesis de carotenoides

Los carotenoides, como los demás terpenoides, derivan de unidades de 5 carbonos, el pirofosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). Existen dos vías diferentes para sintetizarlos: una vía dependiente del mevalonato, que parte de acetil-CoA (Goodwin y Lijinsky, 1951; Yokoyama *et al.*, 1960; McGarvey y Croteau, 1995), utilizada por los eucariontes no fotosintéticos, como los hongos, y una vía independiente de mevalonato (Rohmer *et al.*, 1993), que tiene 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato como intermediario, en muchas plantas y bacterias (Rohmer, 1999; Lange *et al.*, 2000; Eisenreich *et al.*, 2001; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002). Una primera molécula de IPP se isomeriza para generar el DMAPP. La transferasa de prenilo media la adición sucesiva de tres moléculas de IPP al DAMPP. La primera adición genera el pirofosfato de geranilo (C_{10}) y la siguiente el pirofosfato de farnesilo (C_{15}), que participa en la farnesilación de proteínas y es el precursor de los esteroides. Una última adición genera el pirofosfato de geranilgeranilo, GGPP (C_{20}), precursor de muchos terpenoides, como los carotenos, la ubiquinona y los dolicoles.

La unión de dos moléculas de GGPP por la sintasa de fitoeno forma una molécula de fitoeno (C_{40}). El fitoeno sufre cuatro deshidrogenaciones, mediadas por la deshidrogenasa de fitoeno, para dar lugar a la molécula de licopeno (C_{40}). La ciclasa de licopeno cicla los extremos para generar el β -caroteno (C_{40}) (Figura 6).

0.2.2.3 Síntesis en *Phycomyces*

La biosíntesis de β -caroteno en *Phycomyces* depende de dos genes estructurales que codifican para tres proteínas que actúan formando un agregado enzimático (De la Guardia *et al.*, 1971; Aragón *et al.*, 1976): el gen *carB* para la deshidrogenasa de fitoeno (Eslava y Cerdá-Olmedo, 1974; Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997) y el gen bifuncional *carRA* para la ciclasa de licopeno y la sintasa de fitoeno (Torres-Martínez *et al.*, 1980). Ambos genes se encuentran ligados en los genomas de *Phycomyces* (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982; Arrach *et al.*, 2001), *Mucor* (Velayos *et al.*, 2000b) y *Blakeslea* (Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2004). En *Phycomyces* y *Blakeslea* toda la síntesis del β -caroteno desde acetato ocurre en compartimentos especializados, independientes de los de otros terpenoides, como los esteroides y la ubiquinona (Kuzyna y Cerdá-Olmedo, 2007).

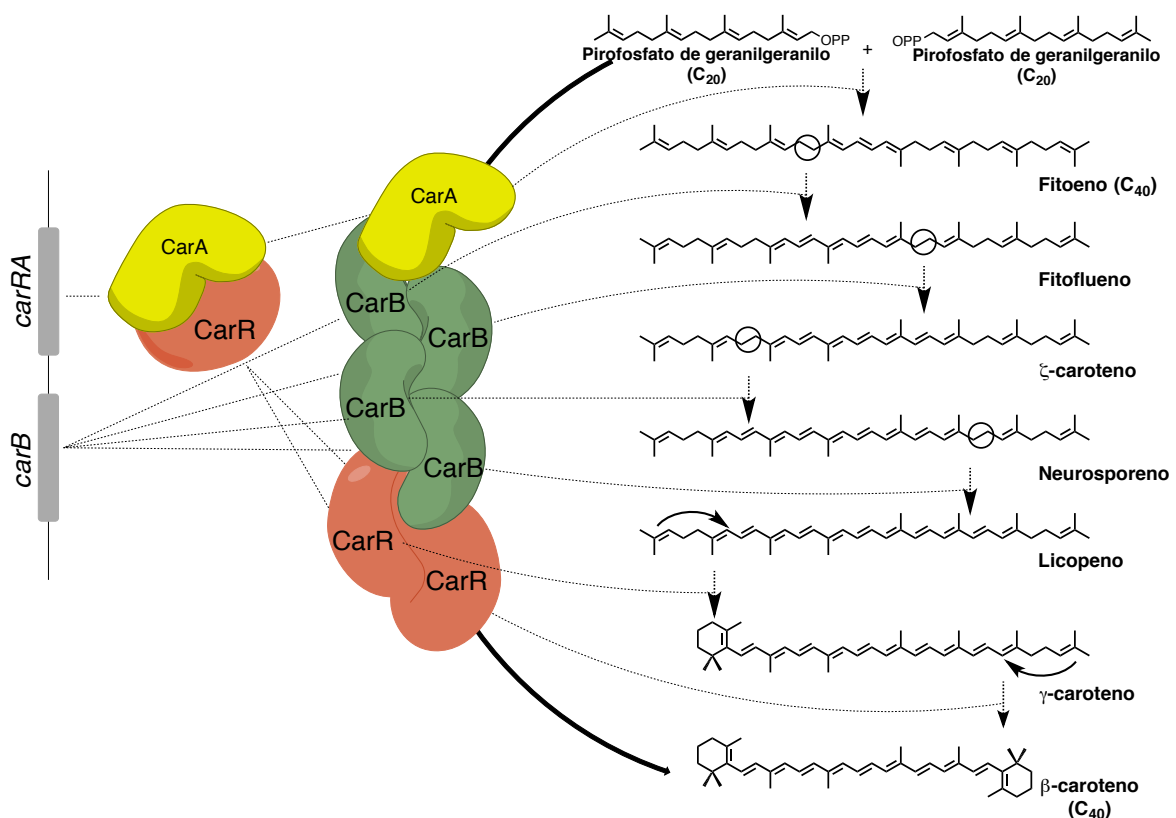


Figura 6. Ruta de síntesis del β -caroteno en *Phycomyces*. A partir de dos moléculas de GGPP se genera el fitoeno. Cuatro deshidrogenaciones (círculos) y dos ciclaciones lo convierten en β -caroteno. CarA, sintasa de fitoeno; CarB, deshidrogenasa de fitoeno y CarR, ciclasa de licopeno. Las líneas punteadas relacionan cada gen con su proteína y estas con la reacción que catalizan.

0.2.3 Apocarotenoides

Los apocarotenoides derivan o pueden derivar de fragmentos de carotenoides. La ruptura del esqueleto carbonado puede ocurrir por fotoquímica o por reacciones químicas inespecíficas o enzimáticas. Se conoce una familia de oxigenasas específicas para ciertos dobles enlaces de la cadena de polieno que describiremos en el Capítulo 1. La diversidad estructural de los apocarotenoides (Figuras 10 y 11) depende del carotenoide del que procedan, del corte que los produzca y de las modificaciones que sufran (Walter y Strack, 2011). Algunos apocarotenoides pueden tener una ruta de síntesis alternativa: el ácido abscísico es una hormona de plantas que deriva del β -caroteno, pero *Botrytis cinerea* posee una ruta de síntesis directa por ciclación y oxidación del difosfato de farnesilo (Inomata *et al.*, 2004).

Los apocarotenoides pueden ser metabolitos esenciales para la vida de los organismos o para ciertas funciones o intermediarios en la ecología de las especies. Es posible que algunas funciones atribuidas a los carotenos en *Phycomyces* se deba a los apocarotenoides que derivan de ellos. Así, los mutantes de *Phycomyces* que carecen de β -caroteno no pueden reproducirse sexualmente, pero no se debe a la ausencia de β -caroteno sino a la ausencia de apocarotenoides, que son esenciales en este proceso en *Phycomyces* y otros mucorales (Tagua *et al.*, 2012).

Hay mutantes de *Phycomyces* incapaces de cortar el β -caroteno para producir apocarotenoides (Tagua *et al.*, 2012). Estos mutantes se han convertido en una herramienta esencial para distinguir entre las funciones del β -caroteno y las de los apocarotenoides.

0.2.3.1 Apocarotenoides de mucorales

El ácido trispórico C (C_{18}) fue el primer apocarotenoide identificado en mucorales y se aisló de cultivos mixtos de *Blakeslea* (Caglioti *et al.*, 1966). Se han identificado otros ácidos trispóricos en cultivos mixtos de varios mucorales; se ha establecido una clasificación en cinco series según la oxidación de la cadena lateral y la posición de los sustituyentes en el anillo (Figura 7): ácido trispórico A, B (Cainelli *et al.*, 1987), C (Caglioti *et al.*, 1966), D y E (Sutter *et al.*, 1989). Esta clasificación se puede hacer extensible a otros apocarotenoides.



Figura 7. Ácidos trispóricos.

Los ácidos trispóricos pertenecen a una familia de apocarotenoides de 18 carbonos denominada trisporoides. Se ha demostrado que los trisporoides proceden de la fragmentación del β -caroteno (Austin *et al.*, 1969; 1970). La producción de ácidos trispóricos ocurre solo en cultivos mixtos (Werkman y van den Ende, 1973), pero se han aislado muchos trisporoides en cultivos aislados y mixtos de varios mucorales que podrían ser precursores de ellos (Tabla 2 y Figura 21, capítulo 2).

0.2.3.2 Síntesis de apocarotenoides de mucorales

Desde hace más de cuarenta años se han propuesto diferentes rutas metabólicas para los apocarotenoides. Estas difieren tanto en la ruptura del β -caroteno como en la modificación de los trisporoides. La primera propuesta (Sutter, 1987) implicaba la ruptura del β -caroteno vía retinal, que perdería dos carbonos para generar los trisporoides (Figura 8 A). En esta propuesta se requería la cooperación de ambos sexos para generar los ácidos trispóricos. Compartirían los primeros pasos (Austin *et al.*, 1969, 1970; Werkman y van den Ende, 1974) y los siguientes serían específicos de cada sexo (Sutter *et al.*, 1973; Nieuwenhuis y van den Ende, 1975) hasta generar los ácidos trispóricos (Werkman, 1976).

Los infructuosos esfuerzos por confirmar la presencia de algún retinoide (C_{20}) en *Phycomyces* llevaron a proponer a los trisporoides como productos directos de la ruptura del β -caroteno (Figura 8B). Además se identificaron compuestos C_{15} (Tabla 2 y Figura 22, Capítulo 2), con la misma estructura que los trisporoides pero con la cadena lateral más corta, que se nombraron apotrisporoides porque se supusieron derivados de los trisporoides (Sutter y Whitaker, 1981; Sutter y Zawodny, 1984). Esta nueva ruta implicaba la existencia de dos nuevos apocarotenoides lineales: un C_4 , procedente del corte del β -caroteno (C_{40}) en dos trisporoides (C_{18}), y un C_3 , procedente del corte de los trisporoides para generar los apotrisporoides.

Las propuestas de ruptura del β -caroteno para generar los trisporoides, una directa y otra vía retinal (Figura 8A y B), se han asumido hasta hace poco (Schachtschabel *et al.*, 2005; Schachtschabel y Boland, 2007), a pesar de que nunca se ha identificado ningún apocarotenoide lineal C_2 , C_3 o C_4 , implicados en ellas.

La búsqueda en nuestro laboratorio de fragmentos que confirmaran alguna de las vías de ruptura del caroteno llevó al descubrimiento en *Phycomyces* de una nueva familia de apocarotenoides lineales de 7 carbonos (C_7), denominados metilhexanoides. Estos derivarían fácilmente de la ruptura asimétrica del β -caroteno. El hallazgo de los C_7 llevó a replantear las rutas anteriores y a proponer una nueva vía, que implicaría dos cortes asimétricos y tres familias de compuestos C_{18} , C_{15} y C_7 , los trisporoides, los ciclofarnesoides y los metilhexanoides, respectivamente (Polaino *et al.*, 2010) (Figura 8C).

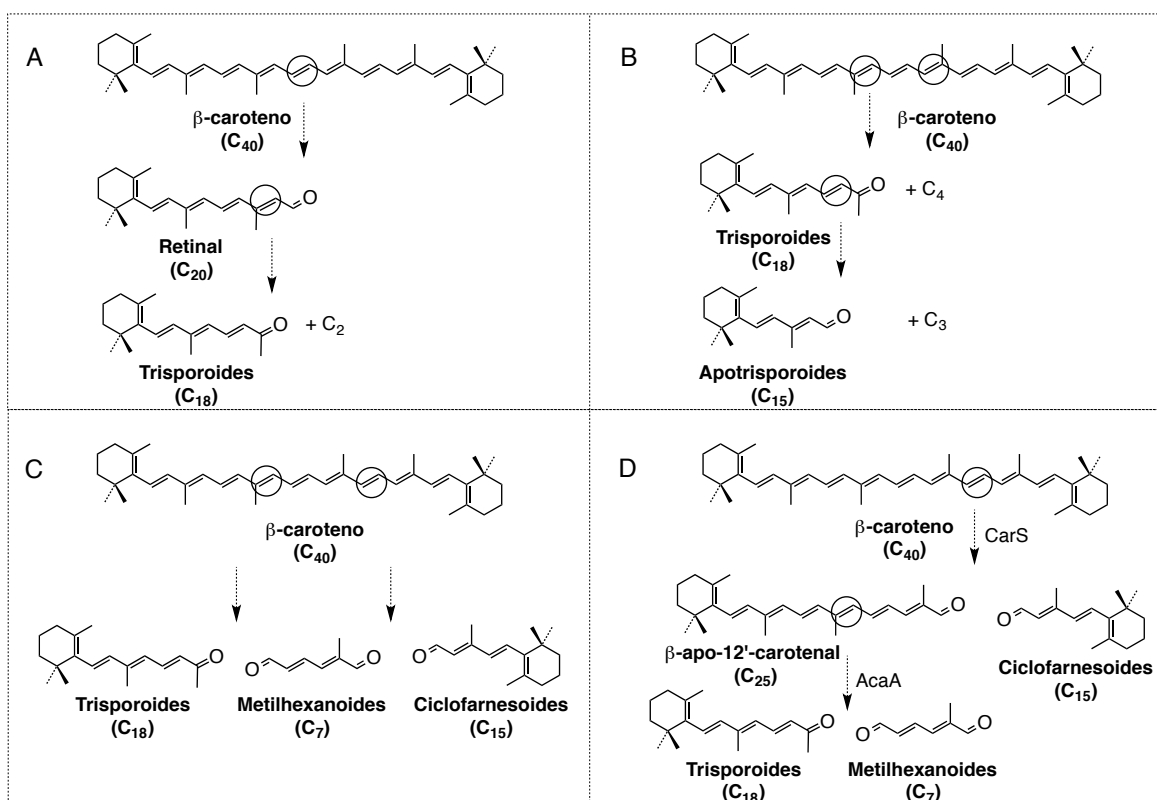


Figura 8. Propuestas de rutas biosintéticas de los trisporoides en mucorales. A, Werkman y van den Ende, 1974; B, Sutter y Whitaker, 1981; Sutter y Zawodny, 1984; C, Polaino *et al.*, 2010; D, Medina *et al.*, 2011.

El corte del β -caroteno podría ser mediado por oxigenasas como las que cortan carotenoides en otros organismos (Kloer y Schulz, 2006; Walter y Strack, 2011). Otros trabajos realizados en nuestro laboratorio identificaron las oxigenasas responsables de los cortes propuestos del β -caroteno, denominadas CarS y AcaA. CarS realiza un primer corte para generar un C_{15} y un C_{25} y, posteriormente, AcaA corta el C_{25} en C_{18} y C_7 (Medina *et al.*, 2011) (Figura 8D).

0.2.4 Regulación de la síntesis de carotenos en mucorales

Phycomyces ha sido el objeto de las más activas investigaciones sobre la regulación de la síntesis de caroteno (Bejarano *et al.* 1988; Govind y Cerdá-Olmedo 1986; Mehta y Cerdá-Olmedo 2001; Mehta *et al.* 1997; Murillo y Cerdá-Olmedo 1976), extendidas parcialmente a *Blakeslea* (Mehta y Cerdá-Olmedo 1995; Mehta *et al.* 2003) y a *Mucor* (Velayos *et al.*, 2000a; Lorca-Pascual *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2001). Las industrias se han ocupado mucho de *Blakeslea*, con numerosas patentes sobre aspectos prácticos.

La cantidad de caroteno que podemos encontrar en el micelio de *Phycomyces* está sometida a diversos factores fisiológicos y ambientales: las mutaciones en genes estructurales y reguladores, la interacción sexual, la luz azul y numerosos agentes químicos externos de distinta naturaleza (Cerdá-Olmedo, 2001) (Figura 9).

Las técnicas para la obtención de mutantes de *Phycomyces* permitieron la identificación y caracterización genética de dos genes estructurales, *carRA* y *carB*, y cinco genes reguladores, *carC*, *carD*, *carI*, *carF* y *carS*. El gen *carRA*, además de ser responsable de la síntesis de dos proteínas estructurales, tiene una función reguladora (Torres-Martínez *et al.*, 1980; Murillo *et al.*, 1981) y el gen *carC* codifica, además, para una sintasa del GGPP (Tagua, 2012). Los mutantes superamarillos acumulan grandes cantidades de β -caroteno y están afectados en los genes reguladores *carS* (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976), *carD* (Salgado *et al.*, 1989) o *carF* (Mehta *et al.*, 1997). La combinación de algunas de estas mutaciones tiene un efecto sinérgico y llega a aumentar hasta doscientas veces la producción de caroteno con respecto a las estirpes silvestres (Murillo *et al.*, 1982; Cerdá-Olmedo, 1986, 2001). Los mutantes *carC* (Revuelta y Eslava, 1983) presentan menor cantidad de caroteno que el silvestre. Los mutantes *carI* y *carA*, afectados en el dominio A del gen *carRA*, presentan una leve

disminución de la cantidad de caroteno y son insensibles a los agentes químicos carotenogénicos (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982).

La luz azul incrementa la producción de caroteno en algunos mucorales. Los genes *carB* y *carRA* de *Phycomyces* y sus homólogos en *Mucor* inducen su expresión en presencia de luz azul, lo que aumenta la producción de β -caroteno (Arrach *et al.*, 2001; Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997; Velayos *et al.*, 2000a). Este incremento se produce en *Phycomyces* tanto por luz azul continua como en pulsos (Bejarano *et al.* 1991). La producción de β -caroteno en *Blakeslea* no responde a la luz continua, observándose incluso una ligera disminución (Sutter 1970), pero muestra un leve incremento tras la iluminación de micelios que crecen en oscuridad (Quiles-Rosillo *et al.* 2005).

La interacción entre micelios de sexo opuesto produce un aumento de la síntesis de β -caroteno (carotenogénesis sexual) en *Phycomyces*, *Blakeslea* y otros mucorales (Blakeslee, 1904; Barnett *et al.*, 1956; Govind y Cerdá-Olmedo, 1986). Este efecto está mediado por apocarotenoides que provienen de la ruptura del β -caroteno (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986). En *Phycomyces* la interacción sexual aumenta hasta 5 veces la cantidad de β -caroteno (Ciegler, 1965; Metha *et al.*, 2003; Yuldasheva *et al.*, 1972). Este aumento es sinérgico con mutaciones superproductoras.

Diferentes agentes químicos afectan a la producción de β -caroteno en los mucorales, pero esta regulación no es igual en las distintas especies. Muchos agentes que aumentan la síntesis de β -caroteno en *Phycomyces* no lo hacen en *Blakeslea* o *Mucor* y viceversa. El ftalato de dimetilo y otros compuestos fenólicos incrementan la producción de β -caroteno en *Phycomyces* pero no en *Blakeslea*. El retinol (Eslava *et al.*, 1974), la β -ionona (Mackinney *et al.*, 1952; 1956; Reyes *et al.*, 1964) y otros compuestos que contienen un anillo β (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986) incrementan el contenido de β -caroteno en ambos hongos.

Estas observaciones y otras (Salgado y Cerdá-Olmedo, 1992) apoyan la regulación de la síntesis de β -caroteno por realimentación. La señal inhibitoria se propuso como un complejo formado por el β -caroteno con la proteína CarS (Bejarano *et al.*, 1988). La función de la proteína CarS se regula por los productos CarC y CarD (Salgado *et al.*, 1989) (Figura 9). El retinol, las iononas y sus análogos compiten con el β -caroteno y previenen la inhibición (Bejarano *et al.*, 1988). Se propuso también que el complejo actúa sobre CarA en presencia de la proteína Carl porque se encuentran mutantes en el dominio A del gen *carRA* y en el gen *carl* insensibles a la inhibición por realimentación (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982; Arrach *et al.*, 2001).

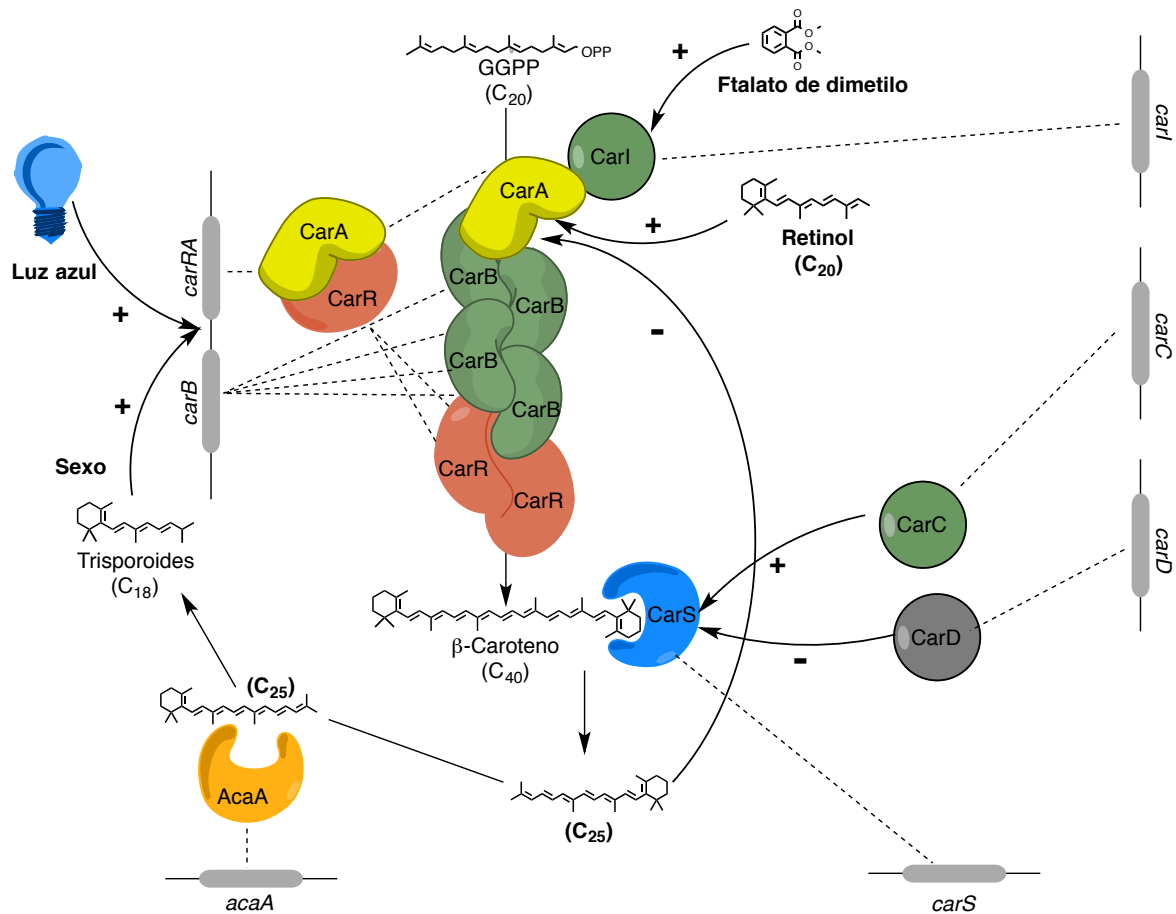


Figura 9. Biosíntesis de β-caroteno y su regulación en *Phycomyces*. Modificada de Almeida y Cerdá-Olmedo (2008). El agregado enzimático, en el centro, está formado por los productos de dos genes estructurales (izquierda). Dos genes (abajo) codifican para las oxigenasas que cortan el β-caroteno. Al menos tres genes (derecha) participan en la regulación. Las líneas punteadas relacionan cada gen con su proteína, las flechas rectas indican reacciones metabólicas y las flechas curvas la regulación (+, estimulación, y -, inhibición).

Posteriormente se identificó el gen *carS*, se analizaron varias estirpes mutantes en dicho gen (Tagua *et al.*, 2012) y se comprobó la actividad oxigenasa de la proteína CarS (Medina *et al.*, 2011). Estos resultados debilitaron la hipótesis del complejo CarS-β-caroteno, porque la actividad oxigenasa de CarS destruiría el β-caroteno asociado a ella. Además, los mutantes *carS* que producían una proteína sin actividad enzimática mostraban un mayor contenido de β-caroteno que el silvestre (Tagua *et al.*, 2012). Por ello se propuso que uno de los productos directos del corte del β-caroteno por CarS, el β-apo-12'-carotenal (C₂₅), sea el inhibidor de la síntesis de β-caroteno en *Phycomyces* (Medina, 2013). En esta nueva propuesta el retinol, las iononas y sus análogos compiten con el C₂₅ para evitar su efecto inhibitorio (Figura 9).

0.2.5 Otros apocarotenoides en la naturaleza

Los apocarotenoides de plantas tienen funciones muy diversas: pigmentos, aromas, fragancias, moléculas reguladoras y compuestos con funciones desconocidas (Giuliano *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 2007; Ohmiya, 2009).

La bixina (C_{24}) deriva de la parte central del licopeno después de la ruptura de los dobles enlaces 5,6 y 5',6' (Figura 10). Se obtiene de las semillas de *Bixa orellana* (achiote) y es un importante colorante alimentario. *Escherichia coli* produce bixina cuando se le transfieren los genes responsables de la biosíntesis (Bouvier *et al.*, 2003a).

En los estigmas de *Crocus sativus* (azafrán) la zeaxantina (C_{40}) se rompe por los dobles enlaces 7,8 y 7',8'. Esto produce crocetina (C_{20}), que le confiere el color característico, y dos moléculas C_{10} que se unen cada una a un azúcar para generar picrocrocina (Figura 10), que al calentarse libera safranal, responsable del aroma (Bouvier *et al.*, 2003b; Rubio *et al.*, 2008; Moraga *et al.*, 2009; Ahrazem *et al.*, 2010).

La ruptura de los dobles enlaces 9,10 y 9',10' de carotenoides bicíclicos de plantas produce un apocarotenoide lineal C_{14} y dos cíclicos C_{13} (Figura 10). Los derivados dicarboxílicos del C_{14} , como la micorradicina (Klingner *et al.*, 1995), se acumulan en raíces (Fester *et al.*, 2002), principalmente en las colonizadas por hongos micorrízicos. En otros casos ni la modificación del fragmento C_{14} ni sus derivados se conocen. Los derivados de los fragmentos del C_{13} se encuentran frecuentemente en flores, frutos y raíces colonizadas (Bouvier *et al.*, 2005; Auldrige *et al.*, 2006; Strack y Fester, 2006); estos apocarotenoides C_{13} proporcionan la fragancia a las rosas (Eugster y Märki-Ficher, 1991; Huang *et al.*, 2009), el aroma al tomate (Simkin *et al.*, 2004) y el buqué al vino (Mendes-Pinto, 2009), entre otros. Algunos de estos apocarotenoides C_{13} se glicosilan, con lo que se vuelven menos volátiles (Maicas y Mateo, 2005).

El apocarotenoide de plantas mejor estudiado es el ácido abscísico. Es una hormona vegetal implicada en procesos de desarrollo, el control del crecimiento y la respuesta a estrés (Finkelstein *et al.*, 2002). Se produce a partir de la ruptura de isómeros 9-*cis* y 11-*cis* de carotenoides cíclicos (Schwartz *et al.*, 2003). La ruptura del doble enlace 11,12 produce santocina (C_{15}), precursor del ácido abscísico, y un compuesto C_{25} (Figura 10). Los isómeros de la neoxantina (C_{40}) parecen ser los substratos para la síntesis de ácido abscísico en *Arabidopsis thaliana* en condiciones de estrés (North *et al.*, 2007). El metabolismo del ácido abscísico se ha estudiado sobre todo en *Zea mays* (maíz) (Nambara y Marion-Poll, 2005).

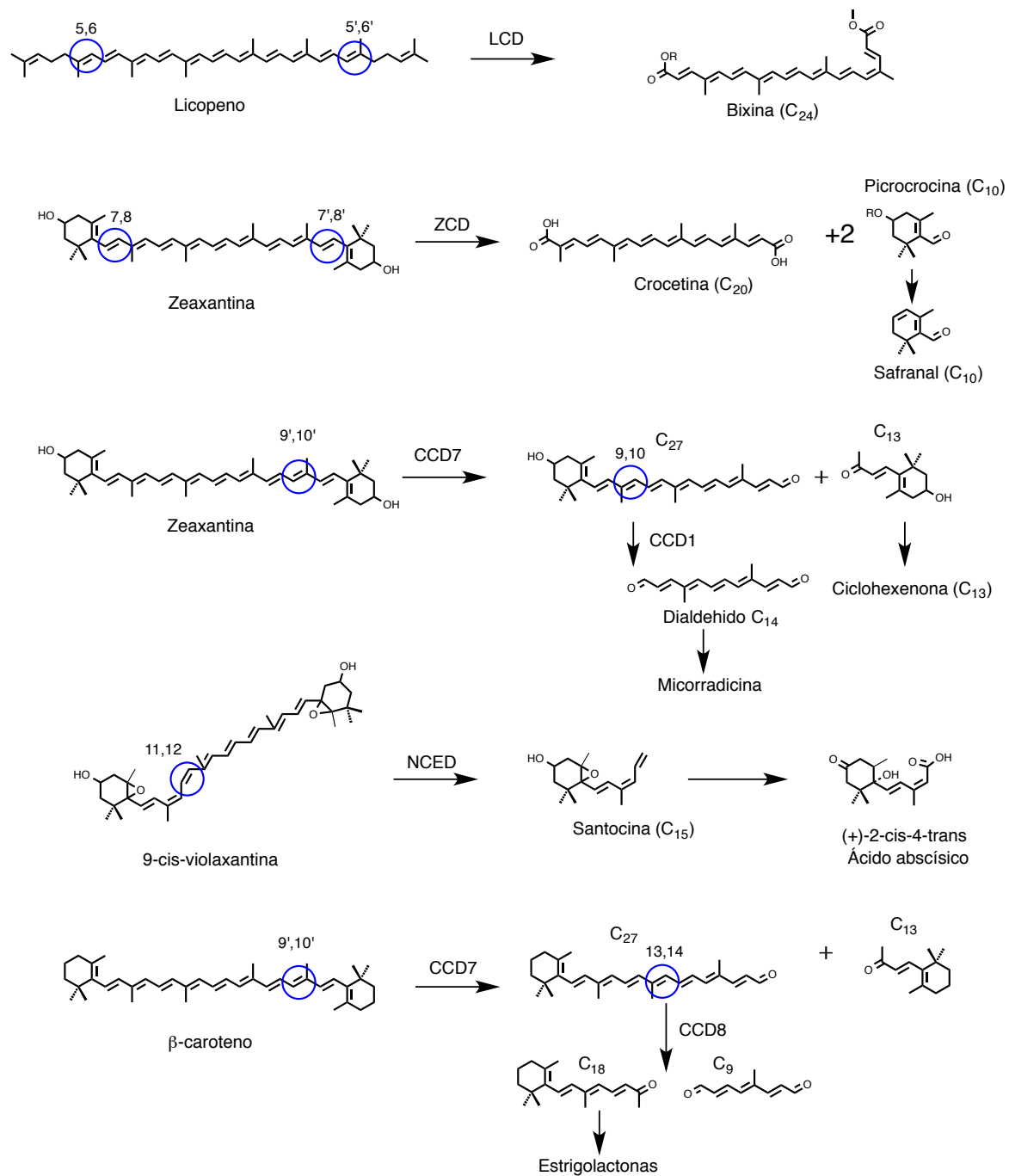
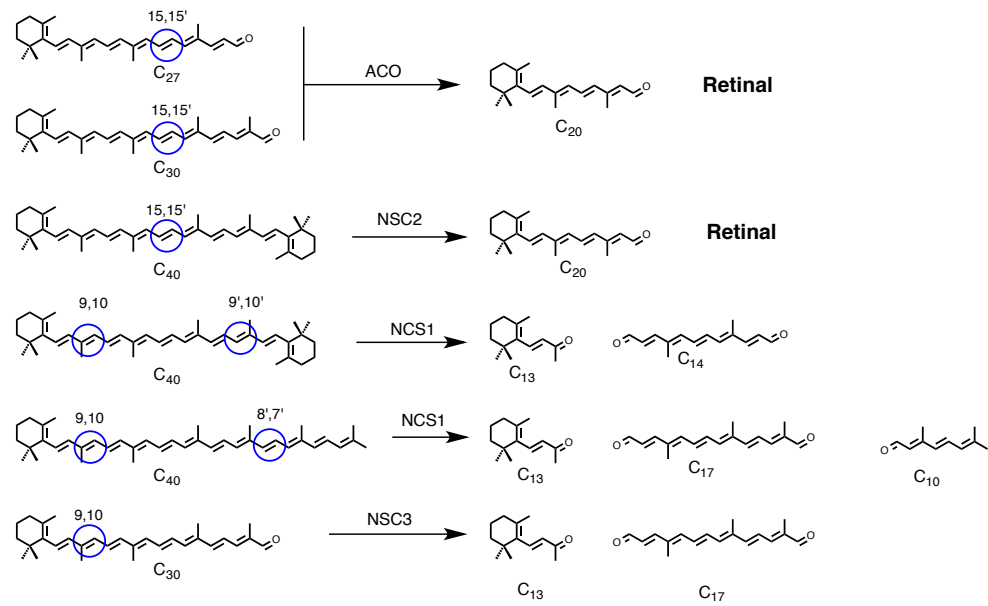
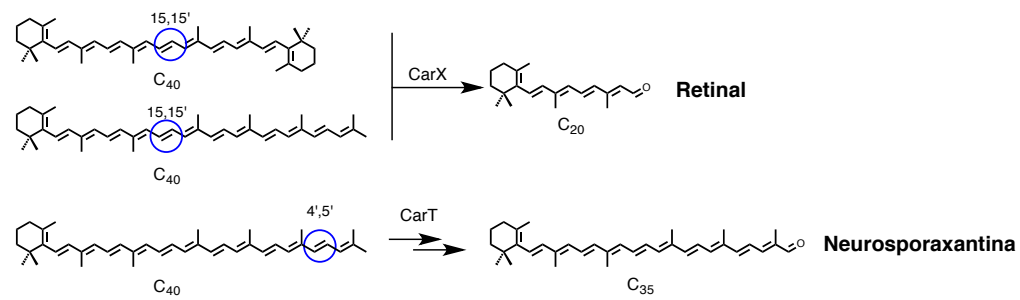


Figura 10. Apocarotenoides producidos por oxigenasas de plantas. LCD, dioxigenasa de licopeno; ZCD, dioxigenasa de zeaxantina; CCD, dioxigenasa de carotenoides; y NCED, dioxigenasa de 9-*cis*-epoxicarotenoides; R, disacárido. Los círculos señalan los sitios de corte. Modificada de Walter y Strack (2011).

Cianobacterias



Hongos



Metazoos

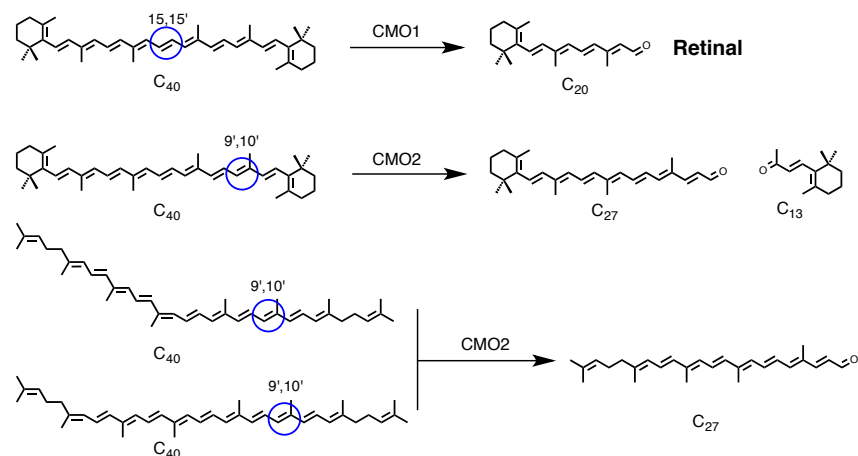


Figura 11. Apocarotenoides producidos por oxigenasas de varios organismos. ACO, oxigenasa de apocarotenoides; NSC, oxigenasa de β -caroteno y apocarotenoides; CCD, oxigenasa de carotenoides; CarX, oxigenasa de β -caroteno; CarT, oxigenasa de toruleno; y CMO, monooxigenasa de carotenoides. Los círculos señalan los sitios de corte. Modificada de Walter y Strack (2011).

Las estrigolactonas son apocarotenoides C₁₈ que actúan como hormonas de plantas, regulando la inhibición de las ramificaciones. Se producen por la ruptura sucesiva del β-caroteno (Figura 10). La primera ruptura ocurre en un enlace doble 9', 10' y produce β-apo-10'-carotenal (C₂₇) y β-ionona (C₁₃). La segunda ruptura ocurre en los enlaces 13,14 del C₂₇ y produce un compuesto C₁₈, precursor de las estrigolactonas (Schwartz *et al.*, 2004).

Los retinoides (C₂₀) derivan de la ruptura del β-caroteno en el doble enlace 15,15' (Figura 11), que produce dos moléculas de retinal. Esta familia de apocarotenoides tiene funciones en muchos organismos (Walter y Strack, 2011). En insectos y mamíferos, incluyendo humanos, los retinoides, como la vitamina A y el ácido retinoico, tienen funciones en la visión del color, el desarrollo (von Lintig y Vogt, 2010; Zhong *et al.*, 2012) y la plasticidad cerebral (Shearer *et al.*, 2012).

En hongos, como el ascomiceto *Fusarium fujikuroi*, el retinal actúa, presumiblemente, como el cromóforo de proteínas fúngicas (Prado-Cabrero *et al.*, 2007b); en el basidiomiceto *Ustilago maydis* también se produce retinal (Estrada *et al.*, 2009) (Figura 11).

Capítulo 1

Corte del β -caroteno en mucorales

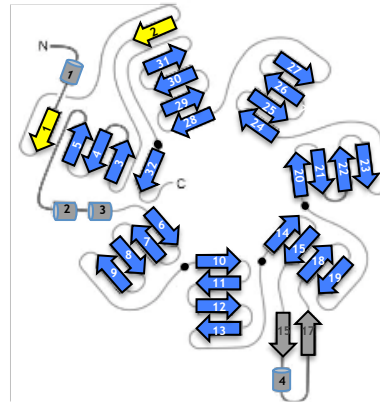
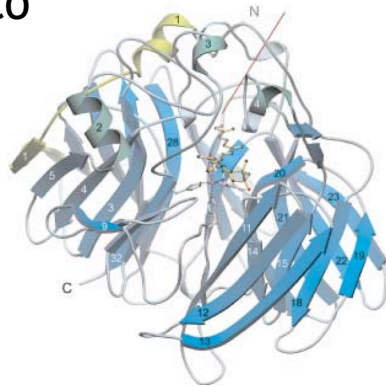
1.1 Introducción

1.1.1 Oxigenasas que cortan carotenos

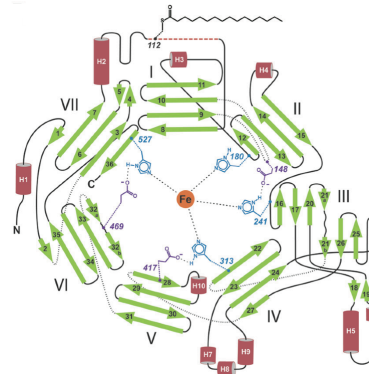
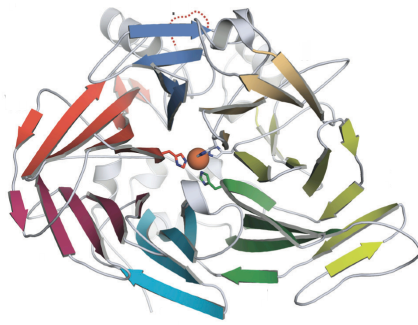
Las enzimas que cortan carotenoides pertenecen a una familia de oxigenasas de la cadena de polieno con ejemplos conocidos en todos los grupos taxonómicos (Ryle y Hausinger 2002). También hay lipoxigenasas y peroxidasas capaces de cortar carotenoides, pero no está claro su papel biológico. Las oxigenasas comparten el empleo del ion ferroso, cuatro residuos de histidina involucrados en la unión del hierro y el oxígeno, varios residuos de glutamato o aspartato y una estructura secundaria rica en láminas β alrededor del centro activo. La estructura tridimensional parece haberse conservado más que la secuencia (Figura 12).

La primera oxigenasa que se identificó (Schwartz *et al.*, 1997) fue NCED1, que corta 9-*cis*-violaxantina (un 9-*cis*-epoxicarotenoide) para producir el ácido abscísico en *Z. mays* (Figura 10). Las demás se identificaron por el parecido de sus secuencias. En animales, BCO-I (von Lintig y Vogt, 2000; Wyss *et al.*, 2000; Redmond *et al.*, 2001) y BCO-II (Kiefer *et al.*, 2001) cortan el β -caroteno para producir retinal y β -ionona, respectivamente (Figura 11). También se han encontrado oxigenasas capaces de romper el licopeno (LCD), produciendo bixina (Bouvier *et al.*, 2003b), y la zeaxantina (ZCD), generando crocetina (Bouvier *et al.*, 2003a) (Figura 10). Algunas oxigenasas bacterianas rompen enlaces dobles de substratos diferentes a los carotenoides (Kamoda *et al.*, 2003), como el lignoestilbeno, bifenol de la lignina.

ACO



RPE65



VP14

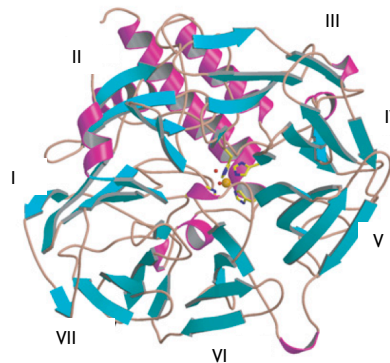
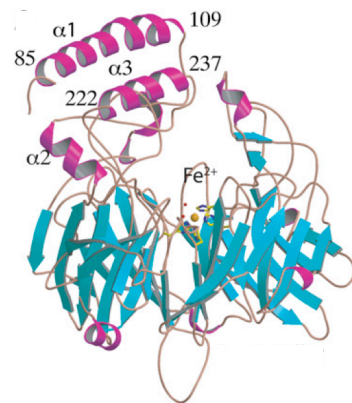


Figura 12. Estructura tridimensional de tres oxigenasas de carotenoides. ACO, una oxigenasa de apocarotenoides de *Synechocystis* sp. (Kloer *et al.*, 2005), RPE65, una isomerasa del retinol de *Bos taurus* (Kiser *et al.*, 2009), y VP14, una oxigenasa de epoxicarotenoides de *Zea mays* (Messing *et al.*, 2010). Se observa una cavidad determinada por láminas β dispuestas alrededor del átomo de Fe^{2+} y los aminoácidos indispensables, en la que se introduce el sustrato hasta llegar al centro activo. La amplitud y la profundidad de la cavidad restringen sustratos y sitios de corte; unos lazos de aminoácidos completan la estructura y una superficie lipofílica le permite asociarse a membranas.

Otras enzimas de la familia no cortan a los carotenos, pero tienen actividades isomerasa o hidrolasa; por ejemplo, RPE65 (Redmond *et al.*, 1998) convierte el *trans*-retinol en 11-*cis*-retinal en el epitelio pigmentado de la retina.

Se conocen muchas reacciones catalizadas por las oxigenasas de carotenoides (Figuras 10 y 11), pero se discuten sus mecanismos (Kloer y Schulz, 2006). El doble enlace C=C se rompe a los correspondientes aldehídos o cetonas usando oxígeno como oxidante e ion ferroso como cofactor, pero se desconoce si la reacción sigue un mecanismo de monooxigenasa (Leuenberger *et al.*, 2001), que incorpora un oxígeno del H₂O y otro del O₂, o de dioxigenasa (Schmidt *et al.*, 2006), en que ambos proceden de los oxígenos del O₂. A menudo las oxigenasas de plantas son llamadas dioxigenasas y las de animales monooxigenasas (von Lintig, 2010; Walter y Strack, 2011).

Las reacciones *in vitro* se llevan a cabo en presencia de Fe²⁺ en exceso (von Lintig y Vogt, 2000) o con un agente como ascorbato (Schwartz *et al.*, 1997), ditiotreitól (Ershov *et al.*, 1993) y *tris*(2-carboxietil)fosfina que lo mantenga reducido (Lindqvist y Anderson, 2002, Kloer y Schulz, 2006).

1.1.1.1 Oxigenasas de *Phycomyces*

En el genoma de *Phycomyces* se han identificado cinco secuencias que codifican para posibles oxigenasas y se ha demostrado que dos de ellas cortan el β-caroteno generando fragmentos de 18, 15 y 7 carbonos (Figura 8). Una de estas oxigenasas es el producto del gen *carS*, identificado anteriormente porque sus mutantes son superproductores de β-caroteno e incapaces de cruzar con individuos de sexo opuesto (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976). Se ha localizado *carS* en el genoma de *Phycomyces* por cruzamientos y se ha demostrado su función porque los mutantes *carS* no cortan el β-caroteno (Tagua *et al.*, 2012).

La proteína CarS corta el doble enlace 11',12' del β-caroteno *in vivo* (expresión heteróloga en *Escherichia coli*) e *in vitro* y genera β-apo-12'-carotenal (C₂₅). Otra de las secuencias para posibles genes de oxigenasas, ahora llamada gen *acaA*, codifica una proteína que corta el β-apo-12'-carotenal (C₂₅) *in vitro* y produce β-apo-13-carotenona (C₁₈). AcaA sola no funciona *in vivo*, pero la expresión conjunta de AcaA

y CarS produce el compuesto C₁₈ a partir de β-caroteno (Medina *et al.*, 2011). En estos análisis no se encontraron los compuestos de 15 y 7 carbonos que deben resultar del corte del β-caroteno y del C₂₅, respectivamente.

1.1.1.2 Comparación de oxigenasas de varios organismos

Es instructiva la comparación, presentada como cladograma en la Figura 13, de 53 secuencias de oxigenasas o parecidas de organismos muy distantes en la evolución. 42 de las secuencias son oxigenasas de organismos muy distintos y las otras 11 son secuencias de *Phycomyces*, *Mucor* y *Rhizopus* parecidas a las anteriores pero con función desconocida.

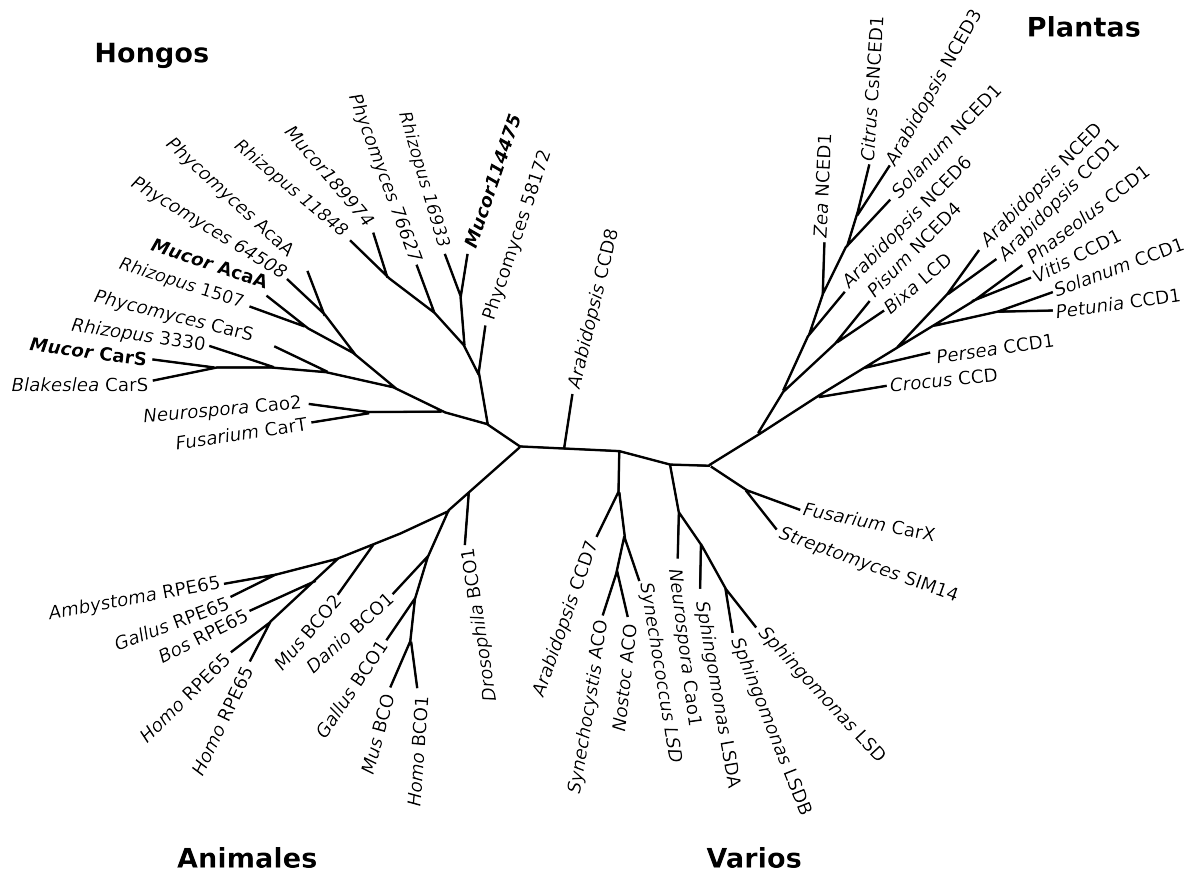


Figura 13. Cladograma de oxigenasas que cortan carotenoides. En negrita, genes de *Mucor* investigados en este trabajo. LCD, oxigenasa de licopeno; BCO y CarX, oxigenasas de β-caroteno; CCD, oxigenasa de carotenoides; NCED, oxigenasa de 9-cis epoxicarotenoides; Cao2 y CarT, oxigenasas de toruleno; ACO, oxigenasa de apocarotenoides; Cao1, oxigenasa de estilbenos; LSD, oxigenasa de lignoetilbenos; y RPE65, proteína de 65 kDa del epitelio pigmentario de la retina. Otras proteínas de mucorales se indican según los proteomas respectivos. Modificado de Medina *et al.*, 2011.

Una rama entera se compone de proteínas de hongos. Dentro de esta se agrupan las catorce secuencias de mucorales, la mayoría de función desconocida, y oxigenasas de toruleno de los ascomicetos *Fusarium fujikuroi* y *Neurospora crassa* (Prado-Cabrero *et al.*, 2007a; Saelices *et al.*, 2007); otras enzimas de estos ascomicetos se encontraron en un grupo muy distante.

En la rama de las proteínas de vertebrados se distinguieron dos grupos: las oxigenasas que cortan β -caroteno a retinal y las proteínas del epitelio pigmentario de la retina (RPE65), que actúan como isomerasas. En esta rama también se localizó una oxigenasa de ratón (BCO2) (Kiefer *et al.*, 2001), que corta β -caroteno asimétricamente.

Casi todas las proteínas de plantas formaron una tercera rama. Fuera de estas tres ramas principales se encontraron proteínas con diferentes funciones, la mayoría de bacterias, pero también de *Arabidopsis* y ascomicetos.

1.1.2 Apocarotenoides de 7 carbonos: los metilhexanoides

Los metilhexanoides (Figura 14) son la prueba de que el β -caroteno se corta para producir tres familias de apocarotenoides de 18, 15 y 7 átomos de carbono. Los metilhexanoides solo se han identificado en *Phycomyces* productores de β -caroteno (Polaino *et al.*, 2010) y su identificación en cultivos es suficiente para asegurar que el β -caroteno se está cortando asimétricamente en sus enlaces dobles 11',12' y 13,14; la estructura de los metilhexanoides solo puede generarse a partir del β -caroteno cortando en esas posiciones.

En cultivos mixtos y simples de *Phycomyces* de 5 días de edad se han identificado dos metilhexanoides, el ácido (2*E*,4*E*)-6-hidroxi-5-metilhexa-2,4-dienoico y el ácido (2*E*,4*E*)-6-hidroxi-2-metilhexa-2,4-dienoico. Estos derivan fácilmente del (2*E*,4*E*)-2-metilhexa-2,4-dienodial, que se produciría a partir del corte del β -caroteno (Polaino *et al.*, 2010) (Figura 14).

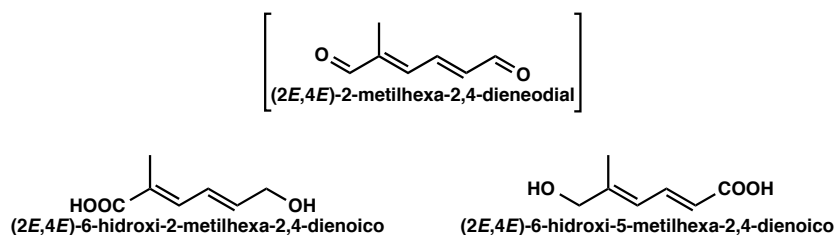


Figura 14. Metilhexanoideos de *Phycomyces*. Entre corchetes, el metilhexanoide hipotético producido por el corte del β -caroteno. Los otros dos fueron encontrados en cultivos de cinco días de estirpes de ambos sexos, separadas (cultivos simples) o mezcladas (cultivos mixtos).

1.1.3 Identificación de apocarotenoides

Una técnica genética nos permite distinguir entre los apocarotenoides y otros metabolitos, aunque tengan estructuras parecidas: la comparación de las estirpes silvestres con otras mutantes carentes de β -caroteno y, por tanto, de apocarotenoides.

Nuestra columna de cromatografía retiene menos eficazmente las moléculas cuanto más pequeñas sean y cuantos más átomos de oxígeno tengan. El coeficiente de retención depende también de otros aspectos de la forma y la estructura de la molécula.

Los apocarotenoides absorben radiación ultravioleta y su longitud de onda de absorbancia máxima aumenta con el número de enlaces dobles conjugados que tengan y también de la presencia de carbonilos, de aldehidos, de cetonas ácidos o de esteres conjugados con dobles enlaces (sobre todo por la cetona en C4). La mayoría de los apocarotenoides estudiados tiene entre dos y cuatro enlaces dobles conjugados y la absorbancia máxima se encuentra entre 250 y 340 nm, aproximadamente (Figura 15).

La fórmula química se determinó por espectrometría de masas de alta resolución, teniendo en cuenta la posible adición o pérdida de distintos átomos que pueden sufrir los compuestos durante la ejecución de la técnica.

El paso de la fórmula química a la estructura molecular se realizó atendiendo a los apocarotenoides ya conocidos. Cuando fue necesario se confirmó su estructura mediante resonancia magnética nuclear, que distingue entre isómeros con la misma masa, o por síntesis química del compuesto candidato.

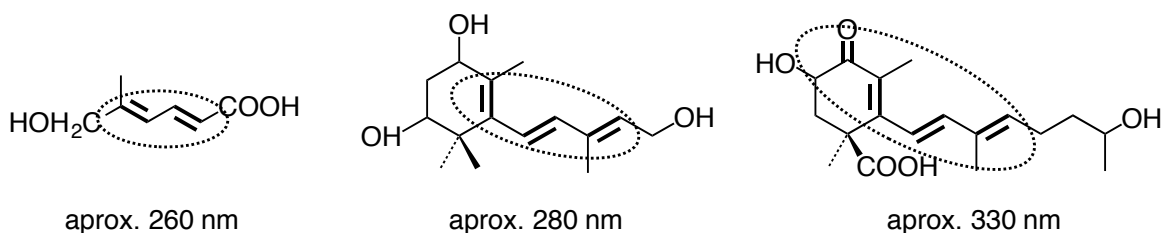


Figura 15. Absorbancia de los apocarotenoides. La longitud de onda de máxima absorbancia ultravioleta depende del número y la disposición de dobles enlaces conjugados. La curva punteada indica el cromóforo de cada molécula.

1.2 Resultados

1.2.1 Oxigenasas de *Mucor*

1.2.1.1 Genes

Se rastreó el proteoma de *Mucor* mediante la herramienta Blast en busca de las proteínas homólogas a las cinco descritas en *Phycomyces*. Se localizaron cuatro secuencias (146755, 141273, 114475 y 189974), cada una de las cuales se parecía mucho a una de las de *Phycomyces*. Dos de ellas tenían, como sus homólogas de *Phycomyces*, los cuatro residuos de histidina y varios de glutamato o aspartato que se creen necesarios para cortar carotenoides. Una de las dos (146755) se parecía mucho a CarS de *Phycomyces* (coinciden el 72 % de los aminoácidos), la otra (141273) a AcaA (45 %) y se llamaron de la misma manera. Las otras dos solo tenían tres de las histidinas presuntamente necesarias. Se compararon las secuencias de *Mucor* con las de una cianobacteria, una planta, un ascomiceto y un mamífero (Figura 16). La conservación de secuencias, aunque afecta a pocos aminoácidos, es indudable, sobre todo cerca de los extremos carboxilo y amino.

Synechocys. -----MVTSPPTSSPSQRSYS-PQDWLRGY-
Arabidopsis MASLITTKAMSHHHVLSSTRITTLTYSDNSIGDQOIKTKPQVPHRLFARRIF---GV---TRAVINSAAPSPLPEKEKVEGERRCHVAVT
Homo -----MDIIFG
Fusarium -----MALN-----GPGVYHRTREHEQEDASDI TKNI LAESWKSWPNE-----AAFDF
Mucor CarS -----MI-----TP-----A-----EAN---P---NINEAAPSP-----VGFK
Mucor AcaA -----MIVGLL-----TLISLP-----VSGFVFLYRNYN-----DVYRRFQVILKS-----HKLS

Synechocys. -QSQPQEWYVVEDVEGSI PPDLQGTLYRNGPGLLEIG----DRPKHPFDGDMVTA FKFPDGD----RVHFQSKFVRTQGYVEEQKA
Arabidopsis SVQQEN-WEGELT-VQGKIPTWLNGLTYLRNGPGLWNIG----DHDFRHLFDGYSTLVKQLQFDGGR----IFAAHRLLES DAYKAAKKH
Homo RNRKEQLEPVRAK-VTGKIPAWLQGTLLRNGPDMHTVG----ESRYNHWF DGLALLHSFTIR DGE----VYYSKYLRS DTYNTNIEA
Fusarium -RLEEHRGLRLLT-LKGTIPSWAAGSLYRTGPGQSRVEDTARGTHFTTHWFDGFAQTHRFDIIPSEDGETQVWVYSRRQADEWIADVKKK
Mucor CarS -NVPSVESPVELK-LEGQIPSWVHGVMYRSGSRYNLLDNGDTHFI GHFPDGLAMLHRFEINGET---QTKYNSRHTSHGVERRIGQR
Mucor AcaA -NTPVEVDPIVLQVQSGQIPSWLNGIMYRIGPGRFNI QDDGSTFNI RHAFDGLPFMHRFEVNGST---QTLKYNSRMLAKSLETIKKNK
* * * * * : * * * * * : . : : : *

Synechocys. GKMIYRGVFG----SQPAGGWLKTIFDLRL---KN-----IANTNITYWDR-----LLALWEGGQP
Arabidopsis NRICY-REFSETPKSV---IINKNPFSGIGEIVRLFS-GESLTDNA-----NTGVIKLG-----DGRVMCLTEITQKGS
Homo NRIVV-SEFGTMAYPDCKNIFSKAFSYLSHTIPDF-----TDNC-----LINMKCG-----EDFY---ATSE TNYI
Fusarium GWRSG-MTFG---QKADPCVGFIAKVMVTFEP---KLGNNHVALLANVPGVPKDEETEALNGVPGPLGHRV-----NTSNL FVSTDYGTI
Mucor CarS DGT-L-LTFG----PDPCKTIFGRIQSVYHHISKFG-ANAALQENDAE---FDMVNVTVTPNFPLGADLEQETGVKRGEALVVKRDANTL
Mucor AcaA TSKGL-IFFG----HIPEMTFPEWLYNFYIRFNLLILFPKSRDRGRPD---SQAVGVTVPNFP LARIKKAD---NENVLVSKTDANVL
* .

Synechocys. HRLEPSNLATIGLDDLGGILAE--GQP-LSAHPRIDPAS-----TFDGGQPCYVTFSSIKSSLSTLTLELDD--PQ-----
Arabidopsis ILVDHETLETIGKFEYDDVLS--HMIQSAHPIVT-ET-E---MWTLPDLVKPGYRVVRMEAGSNK---REVV-----
Homo RKINPQLETFLEKVDYRKYVAV---NLAT-SHPHYD-EAGNVLMGTSIVEKKGTKYVIFKIPATVPE--GKKQG-----KSPWKH
Fusarium RRIDPSTLQPLAETTYDHLPSLSGPCSC-SHAQRDPSGDLFNFNL--AFGRVPTYRIFRVDAA---SGTEVLA-----
Mucor CarS QVVDPESLKPLKMFITYAHVSKKLGQLCA-SHHQYDEETDEYINFMV--KLGPFPTFTFSLGPLYLSPGPEKEALPAPEPRLHQPIWRH
Mucor AcaA QKIHAETLEPQNIFNYTSYDARIQQLSA-AHQQYDNTKEIFNFAL--TTGVPRLVVFSTSES----GKAT-----ILAD
: . . * : * : : * : : : *

Synechocys. -GKLLRQKTEFPGFAFIHDFAITPHYAIFLQNNVTLN--GLPYLFGLR---GAGECVQFHPDKPAQIILVPRDGEI----KRIP-V
Arabidopsis GRVRC---RSGSWGPGWVHSFAVTENYVVIPEMPLRYSVKNLLRAEPTPLYKFEWC-----PQDGAFIHVMSKLTGEV---VASVE-V
Homo TEVFCSPISRSLLSPSYHSGFVGTENYVIFLEQPFRLDILKMAT---YIRMSWASCLAFHREKTYIHIIDQRTROP---VQTKFY-T
Fusarium -----TISDLNVFPAYMHSFFLTENHVVICIPASHYAWRLKTKQWEGN---IDSMKPPDKERKCKWLVDVRRHGK---GLVATFS-T
Mucor CarS LG---AWKTMEALKPSYIHSFSMTKNYIIIPNFPYYSGFLSAIYYSS---AYQTF-YWDETRHTLPHVIDRHTGHVAT---YE-A
Mucor AcaA FT---HRTDKSPIQAPYIHSWLVTENYVIEPESMVLKDRGANMLMNGS---FLSST-SWVKDAPTYCHVIARRPAQEKEGLVASIPVN
: * . : * : : : : : *

Synechocys. QAGVFH HANAFAEENGKII-----LDSIC-YNSLPQVDT---DGDFRS--TNFD-----NLDPGQLWRFTID
Arabidopsis PAYVTFHF INAYEEDKNGD--GKATV IADCEHNADTRILDMLRLD LTRSSH--GHD-----VLPDARIGRFRIP
Homo DAMVVFHVNAYEEDGCIV--F-----DVI A-YEDNSLYQLFYLANLNQDFKENS R-----LTSVPTLRRFVAVP
Fusarium PAAFFHHSINAFENKIEDEDGTEQTDLFFDLAK--YNNMDIIKGFYYDVLMDRDDA-----TKKYWFKNDRY---KNCAPLTRYRFR
Mucor CarS DPCFSFHTANAWDEDVLPGRKERVIYMDYCM-YEN'DIVDASFELGKTPTKGLDLDLVQPARVYVFDKNTAHKEHQIAPSQFRYRIG
Mucor AcaA PGFFTFFHVGNAFETKNE-----SGETVLTDAAS-FCDGDMHQLHSFGTPHRKGF TAE-----
. * * * * : . * * * * *

Synechocys. PAAA-----TVEKQLMVSRCCEFPVVHPQVGRPY-RYVYMGAAHSTG---NAPLQAILKVDLE
Arabidopsis LDGS--KYGKLETAV-----EAEKH-----GRAMMCSINPLYLGQKY-RYVYACGAQRPCNF-----PNALSVDIV
Homo LHVD--KNAEVTNLIKVA-STTATALKEEDGQVYQPEFLYEGLELPRVNYAHNGKQY-RYVFATGVQWS-PI-----PTKIIKYDIL
Fusarium LPSAPTP-----DTTFSASAE-----QVL-AIPSPHAGLEPTIHLRNGKPY-RYVYSASLRGLTTS-----VDALVKTDDL
Mucor CarS QVPVAKPGADAWTPSWSNAFSKFTQ---FNKRRVASYTVIGHDLEMPRFNPRYSMKPY-RFCWGVCSERHAPSASGVSVNGLIKLDLN
Mucor AcaA KVSQTTFNNGISYPPRQSGFGLVRYKLNLDQSTLSDITLAKNAEFPFRFNQDYALKEESRFVYGCQLQGF T---EKREDETGLLIKVDLT
: : : . : * : : : * : : *

Synechocys. S-----GTETLRSFAP-HGFAEPIFVPRPGGVAEDDGWLLCLIKAD---LHRSELVILDAQDITAPAIATLKLKHHIPYPLHGS
Arabidopsis -----EKKVKNWHEH-GMIPSEPFVPRPGGVAEDDGWVVISVSEEN---GGSFAILLDSSFE--EIRAKFPYGLPYLGHGC
Homo -----TKSSLKWRED-DCWPAEPLFVPAPGAKEDDGVIILSAIVSTD--PQKLPFLILLDAKSTF--ELARASVDVMDHMLDHLG
Fusarium -----TSEAFIWTGPEGHTPGEPIVFPVPRGAEAEEDGIVFSLVVDGV---NEKAYILCLNGKTE--ELGRAEADFAIQGFHGI
Mucor CarS NVYLGPNTDKESSAKIWDEP-SCSCAEP I F I P H P D A Q D E D G V M S I V N T T L E D G S E S C F L L I L D A C S F T --E I A R T T I G A F N A V T L H G S
Mucor AcaA G-----QGEPLTFVEE-GFNCSPEPIFVPKPAGTREDDGVLVSLVN---NFDCCYFIVFDASNLR--ELARIKIQI IAVTFHGS
. * * * * * : * * * * * : : : : : * * * * *

Synechocys. WAQT-----
Arabidopsis WIPKD-----
Homo FITDMDWDTTKQAASEEQDRDRASDCHGAPLT
Fusarium HLPAA-----
Mucor CarS FVDKHGRGI AVN-----
Mucor AcaA YVDHEFKSININ-----

Figura 16. Alineamiento de CarS y AcaA de *Mucor* con oxigenasas de carotenoides: CarT, de *Fusarium fujikuro*; BCO1, de *Homo sapiens*; CCD8, de *Arabidopsis thaliana*; ACO de *Synechocystis* sp. Aparecen sombreadas las histidinas y los glutamatos o aspartatos que se creen necesarios para el corte. Asterisco, indica conservación estricta; dos puntos, similitud en propiedades químicas; un punto, similitud en tamaño y disposición espacial.

1.2.1.2 Ensayos *in vivo*

Se ensayaron las posibles actividades oxigenasas de las proteínas CarS, AcaA y 114475 de *Mucor* sobre β -caroteno, licopeno y zeaxantina aplicando esencialmente los mismos métodos que ya se habían usado con *Phycomyces* (Medina *et al.*, 2011). Para expresar las proteínas en condiciones que facilitan su solubilidad en el citoplasma se clonaron los ADNc correspondientes en fase con el dominio tiorredoxina en los vectores pThio (LaVallie *et al.*, 1993), se transformaron células de *E. coli* que acumulan β -caroteno, licopeno o zeaxantina (Hundle *et al.*, 1994; Prado-Cabrero, *et al.*, 2007b; Estrada *et al.*, 2008) y se analizaron los posibles productos.

La proteína quimérica tiorredoxina=CarS decoloró las células que acumulan β -caroteno (Figura 17 A) y en ellas se encontró β -apo-12'-carotenal (C₂₅) (Figura 17 D), que se identificó comparando su espectro de absorción y su tiempo de retención con los de un patrón auténtico. Esta construcción no tuvo efectos detectables en las estirpes productoras de licopeno o zeaxantina y las construcciones con AcaA y 114475 tampoco los tuvieron en ninguna de las estirpes probadas.

Hay que tener en cuenta que los cromatogramas presentados en la Figura 17 (D, E y F) no siempre están leídos a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorbancia de cada compuesto, por lo que la absorbancia registrada no siempre refleja adecuadamente la cantidad de un compuesto.

1.2.1.3 Ensayos *in vitro*

Las construcciones descritas anteriormente se utilizaron para transformar células de *E. coli* que sobreexpresaban nuestras proteínas quiméricas. En los ensayos *in vitro* se usaron extractos crudos de proteínas de las células transformadas.

El extracto crudo de la estirpe que contenía tiorredoxina=CarS producía β -apo-12'-carotenal (C₂₅) al incubarlo en presencia de β -caroteno (C₄₀) (Figura 17 E). El que contenía tiorredoxina=AcaA producía β -apo-13-carotenona (C₁₈) al incubarlo con β -apo-12'-carotenal (C₂₅) (Figura 17 F).

No se detectaron los fragmentos C₁₅ ni C₇ que se deberían producir al cortar C₄₀ a C₂₅ y este a C₁₈, respectivamente. No se observó ningún efecto al incubarlo con licopeno o zeaxantina con extractos crudos que contenían CarS o AcaA. Los extractos crudos con 114475 no dieron resultados fiables con los sustratos utilizados.

Los ensayos *in vivo* e *in vitro* se realizaron en el laboratorio del Prof. Peter Beyer, en colaboración con el Doctor Salim Al-babili, en la Universität Freiburg.

1.2.2 Metilhexanoides

1.2.2.1 Metilhexanoides de *Phycomyces*

En todos los cultivos simples y mixtos de las estirpes silvestres NRRL1555 (-) y A56 (+) se encontraron los dos metilhexanoides, el ácido (2*E*,4*E*)-6-hidroxi-5-metilhexa-2,4-dienoico y su isómero 2-metil (Figura 18), ya conocidos (Polaino *et al.*, 2010, 2012).

Los análisis de los extractos ácidos (Tabla 1), donde se encuentran ambos compuestos, indican una relación constante entre ellos ($2,2 \pm 0,7$, media y desviación del cociente entre los isómeros 5-metil y 2-metil). La producción aumenta con el tiempo y con la interacción sexual. Los cultivos mixtos jóvenes tenían el triple de estos compuestos que los cultivos simples de la misma edad.

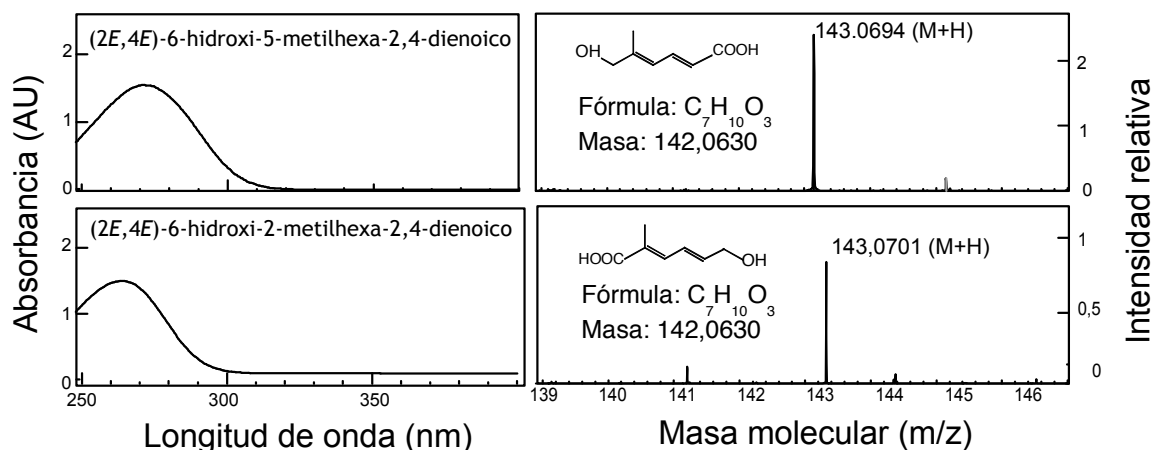


Figura 18. Metilhexanoides identificados en *Phycomyces*. A la izquierda, espectro de absorción y nombre del compuesto; a la derecha, señal de espectrometría de masas (entre paréntesis, corrección por pérdida o ganancia de aductos) y estructura, fórmula química y masa molecular.

Tabla 1. Metilhexanoides identificados en *Phycomyces*. Absorbancia de 200 a 900 nm de los metilhexanoides (MAU s/L de cultivo) en cultivos simples y mixtos. AU, “unidades de absorbancia”. Entre paréntesis, nomenclatura nueva; entre comillas y en cursiva, nomenclatura antigua.

Compuesto	Cultivos simples		Cultivos mixtos		
	NRRL1555 (-)	A56 (+)	NRRL1555 (-) x A56 (+)		
	2 d		2 d	3 d	5 d
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-6-hidroxi-5-metilhexa-2,4-dienoico (Ma63) <i>“Ma26”</i>	0,33	0,23	0,79	0,63	2,92
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-6-hidroxi-2-metilhexa-2,4-dienoico (Ma69)	0,13	0,07	0,34	0,45	1,63
Total	0,46	0,31	1,13	1,08	4,54

1.2.2.2 Metilhexanoides de *Blakeslea*

En cultivos mixtos de tres días de edad de las estirpes F921(-) y F986(+) se identificaron cinco compuestos de la familia de los metilhexanoides (Figura 19). Para ello se determinaron sus estructuras por resonancia magnética nuclear, una vez separados por cromatografía líquida, y se confirmaron por síntesis química las de los tres primeros. Los detalles se encuentran en una publicación conjunta con nuestros colegas químicos de la Universidad de Granada (Barrero *et al.*, 2011).

Las cantidades estimadas no tienen en cuenta ni las pérdidas durante el procedimiento ni las posibles impurezas en las muestras sometidas a resonancia magnética nuclear.

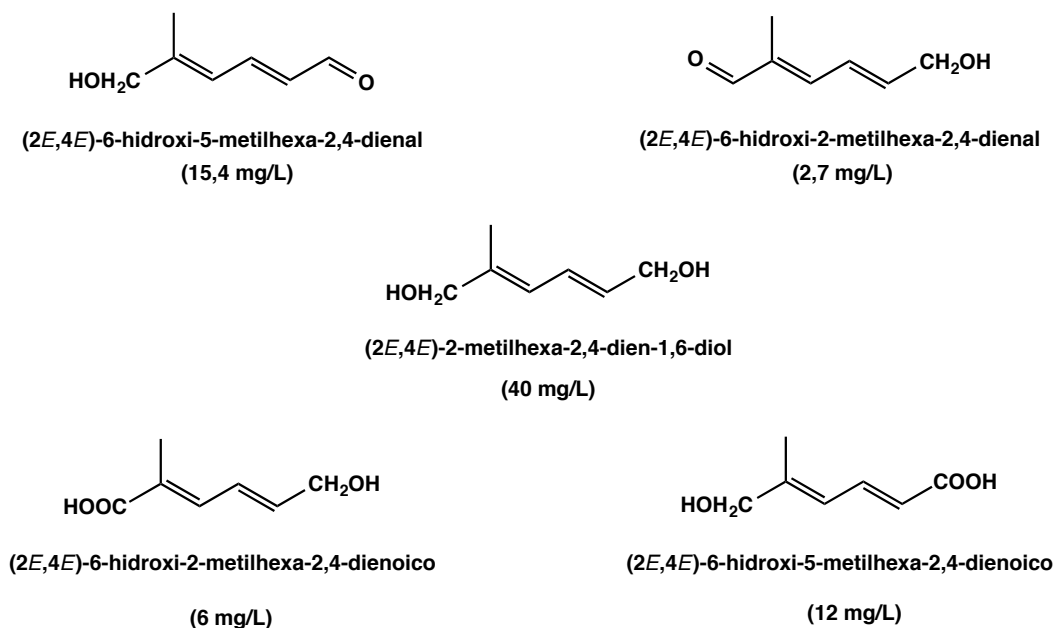


Figura 19. Metilhexanoides en cultivos mixtos de las estirpes F986(+) y F921(-) de *Blakeslea*. Entre paréntesis, concentraciones estimadas por L de cultivo.

1.3 Discusión

1.3.1 Oxigenasas

1.3.1.1 Comparación de oxigenasas de varios organismos

El centro activo de las oxigenasas (Figura 12) se encuentra en el interior, rodeado por las histidinas necesarias para su función y un segmento polipeptídico junto al extremo carboxilo. Como es de esperar, estos elementos se conservan en todas las oxigenasas (Figura 16), incluidas las de *Mucor* objeto de este trabajo, pero la conformación del centro activo debe permitir discriminar entre los distintos sustratos que pueden ser cortados por las enzimas de esta familia.

Se observa además la conservación de un segmento de la proteína cercano al extremo amino, que no se encuentra en el centro activo, sino en el exterior de la

enzima. La conservación de una zona exterior sugiere la interacción con otras proteínas que contribuyeran a la función, la regulación o la localización de las oxigenasas.

La comparación de secuencias de las oxigenasas y otras proteínas relacionadas (Figura 13) reconoce tres grupos monofiléticos relativamente modernos, el de animales, el de mucorales y el de plantas, y varios grupos menos definidos, presumiblemente originados por radiaciones más antiguas, con proteínas de bacterias, ascomicetos y plantas. El ancestro común de las plantas debió tener varios genes para estas oxigenasas. Los ascomicetos contienen genes muy distintos, incluso del grupo de los mucorales. El ancestro común de los hongos y los animales debió tener varios genes, solo uno de los cuales ha dejado descendientes en los mucorales y otro en los animales. La transferencia horizontal de genes podría ofrecer explicaciones alternativas a la situación observada.

1.3.1.2 Actividades enzimáticas

Hay que tener en cuenta que tanto en los ensayos heterólogos como en los ensayos *in vitro* las condiciones son imperfectas para la actividad de las enzimas, ya que son muy diferentes de las condiciones fisiológicas en las que actúan en la naturaleza. La producción heteróloga en *E. coli* de caroteno y su corte son actividades extrañas para las que la evolución no ha ajustado condiciones óptimas.

La proteína CarS de *Mucor* mostró la misma actividad *in vivo* que su homóloga de *Phycomyces* (Medina *et al.*, 2011): cortó el β -caroteno por el doble enlace 11',12' y produjo β -apo-12'-carotenal, compuesto de 25 carbonos. Esto indica que CarS de ambos hongos debe de tener la misma función en la célula: introducir el primer corte en el β -caroteno. La actividad *in vitro* de la enzima de *Mucor* es novedosa, ya que no se había encontrado con la de *Phycomyces*.

Las proteínas AcaA de *Phycomyces* (Medina *et al.*, 2011) y de *Mucor* cortan *in vitro* el compuesto C_{25} a fragmentos C_{18} y C_7 . Ninguna de ellas corta el β -caroteno, sea en *E. coli* o *in vitro*. Las células de *E. coli* que producen β -caroteno y coexpresan CarS y AcaA de *Phycomyces* producen β -apo-13-carotenona, compuesto de 18 carbonos (Medina *et al.*, 2011) y es probable que así ocurra también con las proteínas de *Mucor*.

Estos resultados indican que el metabolismo del β -caroteno en *Mucor*, como en *Phycomyces* (Medina *et al.*, 2011), comienza con el corte del doble enlace 11',12' del

β -caroteno por CarS, lo que genera un compuesto C_{15} y un C_{25} . Este sirve de sustrato para AcaA que lo corta y genera un C_{18} y un C_7 (Figura 8 D).

La enzima AcaA de *Mucor*, a diferencia de la de *Phycomyces*, no corta el licopeno, un carotenoide lineal, ni apocarotenoides grandes, como el β -apo-8'-carotenal (C_{30}) o el β -apo-10'-carotenal (C_{27}) (Medina *et al.*, 2011). Esto sugiere diferencias entre ambas enzimas en su reconocimiento de los sustratos, más específico en *Mucor* que en *Phycomyces*, tal vez porque la de *Mucor* reconoce la distancia del lugar de corte al anillo y al extremo libre oxidado.

Las enzimas CarS y AcaA de *Mucor* y *Phycomyces* (Medina *et al.*, 2011) no cortan a la zeaxantina (Figura 5), un carotenoide polar por oxidación del anillo. Esto sugiere que la oxidación del anillo impide la actividad de estas enzimas de los mucorales.

1.3.2 Metilhexanoides

En *Phycomyces* no hemos identificado (Figura 14) ningún metilhexanoide distinto de los ya publicados (Polaino *et al.*, 2010). En *Blakeslea* hemos identificado cinco metilhexanoides, dos de ellos idénticos a los de *Phycomyces*. El más abundante es uno de los nuevos, el (2*E*,4*E*)-2-metilhexa-2,4-dien-1,6-diol (Figura 19).

Estos resultados nos han permitido proponer una ruta biosintética para los metilhexanoides (Figura 20) a partir del metilhexanoide hipotético (Figura 14) producido en el corte del β -caroteno. Para generar los dos metilhexanoides de *Phycomyces* hacen falta dos actividades, oxidación y reducción, cada una de ellas en dos sustratos, los extremos asimétricos de la molécula. Las cuatro acciones podrían ser catalizadas por cuatro enzimas diferentes, pero parece más probable un proceso con menos enzimas. Una deshidrogenasa y una reductasa bastarían (Figura 20), si su acción no exigiera una posición precisa del metilo. Ambas enzimas deben estar estrechamente asociadas, ya que no se encuentran metilhexanoides con un solo extremo modificado o con ambos extremos iguales. Las dos enzimas podrían formar un heterodímero. Ambas enzimas actuarían en cualquiera de los extremos, pero con diferente afinidad, ya que la relación entre el producto reducido cerca del metilo es de dos a tres veces más abundante que su isómero (Tabla 1). La existencia de una enzima bifuncional, con los dos centros activos, podría ser una explicación alternativa al heterodímero.

reductasa capaz de actuar sobre los metilhexanoides sin asociarse a la deshidrogenasa podría ser una explicación alternativa.

1.3.3 Corte del β -caroteno en mucorales

Mucor, muy alejado evolutivamente de *Phycomyces*, tiene dos oxigenasas homólogas a CarS y a AcaA de *Phycomyces* (Medina *et al.*, 2011) y que, como ellas, cortan el β -caroteno en tres familias de apocarotenoides: trisporoides, ciclofarnesoides y metilhexanoides. En *Blakeslea* ya se habían descrito trisporoides y ciclofarnesoides (Tabla 2, capítulo 2) y nosotros hemos identificado, por primera vez, metilhexanoides (Figura 19). Estos resultados sugieren que el mecanismo de corte del β -caroteno se ha conservado dentro de los mucorales y que la formación de apocarotenoides debe aportar ventajas selectivas a sus portadores.

Capítulo 2

Trisporoides y ciclofarnesoides

2.1 Introducción

Los apocarotenoides han sido investigados a lo largo de casi medio siglo en distintos laboratorios, con mucorales muy diferentes y con técnicas muy variadas. Se han encontrado en cultivos simples de uno u otro sexo y, más abundantes, en cultivos mixtos de estirpes de sexos opuestos. El resultado es un conjunto de compuestos identificados con fiabilidad desigual (Tabla 2).

2.1.1 Trisporoides y ciclofarnesoides

Los trisporoides conocidos y otros hipotéticos son variaciones de un esqueleto común y los disponemos en una tabla, red o sistema periódico, en la que los compuestos contiguos podrían derivarse uno de otro por un paso metabólico sencillo (Figura 21). De esta manera la red puede verse como un conjunto de rutas biosintéticas reales o posibles. No se han incluido en la Figura los 4-dihidrotrisporatos de metilo B y C, que no se han encontrado en los trabajos de esta tesis.

Los ciclofarnesoides, apocarotenoides de 15 átomos de carbono, identificados en mucorales (Tabla 2) se han llamado a veces apotrisporoides porque podrían suponerse fragmentos de trisporoides (Figura 8 B). Nuestro laboratorio demostró que provienen directamente de la ruptura del β -caroteno (Figura 8 C y D) y se les llama ciclofarnesoides porque su esqueleto es el del ciclofarnesano (Polaino *et al.*, 2010; Medina *et al.*, 2012). Los ciclofarnesoides se pueden disponer en una tabla o red similar a la de los trisporoides (Figura 22). Proponemos una nueva nomenclatura para los

apocarotenoides de 15 carbonos, con criterios similares a los empleados para los trisporoides y con columnas designadas por nuevas letras mayúsculas.

Un compuesto ya conocido, el 1,6-ciclofarnesa-4,6,8-trieno-2,10,11-triol, que deriva de la 4-dihidrociclofarnesina S, como las cabezas de las columnas R y T, se saldría del plano de la Figura, que adquiriría así una tercera dimensión.

2.1.2 Nomenclatura general de los apocarotenoides

En trabajos anteriores de este laboratorio (Polaino, 2009; Polaino *et al.*, 2012; Medina *et al.* 2013) se estableció que hay más de cincuenta apocarotenoides en los cultivos de *Phycomyces* (Medina *et al.*, 2013). Eso desaconseja darles nombres triviales conforme se van descubriendo y mucho menos cuando aún se desconoce su estructura. En aquellos trabajos se usó una nomenclatura general para los apocarotenoides que no requiere conocer su estructura química. Los compuestos ausentes en los mutantes apocarotenogénicos (Polaino *et al.*, 2012) detectados en el cromatograma normalizado se designan con una letra mayúscula (C, ciclofarnesoides; T, trisporoides; M, metilhexanoides; y X, compuestos no identificados), seguida de una minúscula (a, fracción ácida; n, fracción neutra) y de un número (tiempo de retención en decenas de segundos).

En este trabajo hemos mejorado la separación de los apocarotenoides por cromatografía líquida y la detección por espectrometría de masas nos ha permitido distinguir entre aquellos apocarotenoides con tiempos de retención y espectros de absorción similares, como la ciclofarnesina U y la 4-dihidrociclofarnesina S (Figura 22). Por este motivo hemos adaptado la nomenclatura descrita en el párrafo anterior a los tiempos de retención del nuevo método de cromatografía líquida; en las tablas correspondientes a las distintas familias de apocarotenoides (Tablas 1, 3 y 4) se indican la nomenclatura nueva y la antigua

Esta nomenclatura permite designar a los apocarotenoides de estructura desconocida y provee un alias conveniente para aquellos cuyo nombre sistemático es muy complejo, como el (2*S*,6*E*,8*E*)-1,6-ciclofarnesa-4,6,8-trieno-2,10,11-triol y su isómero 6*Z*, llamados a partir de ahora Cn121 y Cn122, respectivamente.

Tabla 2. Apocarotenoides identificados en cultivos mixtos y simples de mucorales. Los tres bloques comprenden compuestos de 18 ó 19 carbonos (trispóroides), 15 carbonos (ciclofarnesoides) y 7 carbonos (metilhexanoides). Se proponen nuevos nombres triviales para los ciclofarnesoides y se indican entre paréntesis y con letra cursiva los nombres antiguos.

Nombre	Cultivo y organismo	Referencia
Ácido trispórico A	Mixtos de <i>Blakeslea</i>	(Cainelli <i>et al.</i> , 1967)
Ácido trispórico B	Mixtos de <i>Blakeslea</i>	(Cainelli <i>et al.</i> , 1967)
Ácido trispórico C	Mixtos de <i>Blakeslea</i> y <i>Phycomyces</i>	(Caglioti <i>et al.</i> , 1966; Polaino <i>et al.</i> , 2012)
Ácido trispórico D	Mixtos de <i>Blakeslea</i>	(Sutter <i>et al.</i> , 1989)
Ácido trispórico E	Mixtos de <i>Blakeslea</i> y <i>Phycomyces</i>	(Miller y Sutter, 1984; Sutter <i>et al.</i> , 1989)
Dihidrotrispórido de metilo B	Simples (–) de <i>Blakeslea</i> y <i>Mucor mucedo</i>	(Bu Lock <i>et al.</i> , 1976; Sutter y Whitaker, 1981b)
Dihidrotrispórido de metilo C	Simples (–) de <i>Blakeslea</i> y <i>Mucor mucedo</i>	(Bu Lock <i>et al.</i> , 1976; Sutter y Whitaker, 1981b)
Metiltrispórido B	Simples (+) de <i>Blakeslea</i>	(Sutter y Whitaker, 1981b)
Metiltrispórido C	Simples (+) de <i>Blakeslea</i> y <i>Mucor mucedo</i>	(Bu Lock <i>et al.</i> , 1976; Sutter y Whitaker, 1981b)
Metiltrispórido E	Simples (+) de <i>Mucor mucedo</i> y <i>Phycomyces</i>	(Miller y Sutter, 1984)
Trisporina B	Simples (–) de <i>Blakeslea</i> y <i>Mucor mucedo</i>	(Sutter y Whitaker, 1981b)
Trisporina C	Simples (–) de <i>Blakeslea</i> y <i>Mucor mucedo</i>	(Sutter y Whitaker, 1981b)
Trisporol B	Simples de <i>Blakeslea</i>	(Bu Lock <i>et al.</i> , 1972; Prisbylla <i>et al.</i> , 1979)
Trisporol C	Simples de <i>Blakeslea</i>	(Sutter y Whitaker, 1981b)
B- <i>apo</i> -13-carotenona	Expresión heteróloga de CarS de <i>Phycomyces</i> en <i>E. coli</i> productora de B-caroteno	(Medina <i>et al.</i> , 2011)
1,6-ciclofarnes-4,6,8-trieno-2,10,11-triol	Simples y mixtos de <i>Phycomyces</i>	(Polaino <i>et al.</i> , 2012)
Ciclofarnesina R (<i>apotrisporina</i>)	Simples y mixtos de <i>Blakeslea</i>	(Sutter y Zawodky, 1984)
Ciclofarnesina S (<i>apotrisporina E</i>)	Simples y mixtos de <i>Phycomyces</i> y mixtos de <i>Blakeslea</i>	(Sutter, 1986; Polaino <i>et al.</i> , 2012)
Ciclofarnesina U	Simples y mixtos de <i>Phycomyces</i>	(Polaino <i>et al.</i> , 2012)
Ciclofarnesol R (<i>apotrisporol</i>)	Simples y mixtos de <i>Blakeslea</i>	(Sutter y Whitaker, 1981b)
6-hidroxi-2-metilhexa-2,4-dienoico	Simples y mixtos de <i>Phycomyces</i>	(Polaino <i>et al.</i> , 2012)
6-hidroxi-5-metilhexa-2,4-dienoico	Simples y mixtos de <i>Phycomyces</i>	(Polaino <i>et al.</i> , 2012)

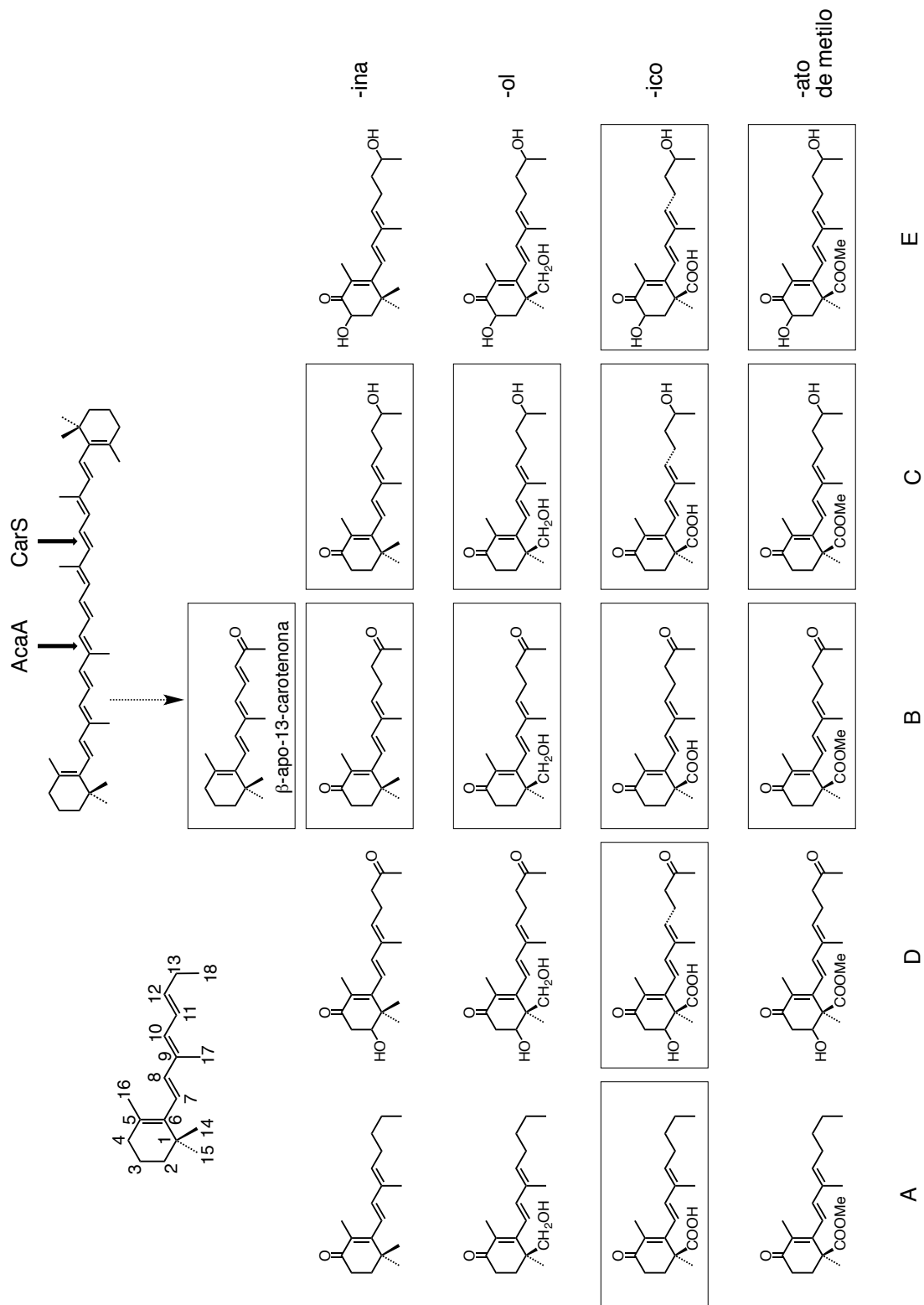


Figura 21. Disposición en red de trisporoides conocidos e hipotéticos. Las variaciones que afectan a los carbonos C2, C3 y C13 determinan las columnas, designadas por letras mayúsculas. Las filas se definen por el nivel de oxidación del C14 y se designan por sufijos indicados a la derecha. El nombre de cada compuesto se construye con la raíz trispor- y el sufijo y la letra que correspondan. En recuadros, los trisporoides identificados.

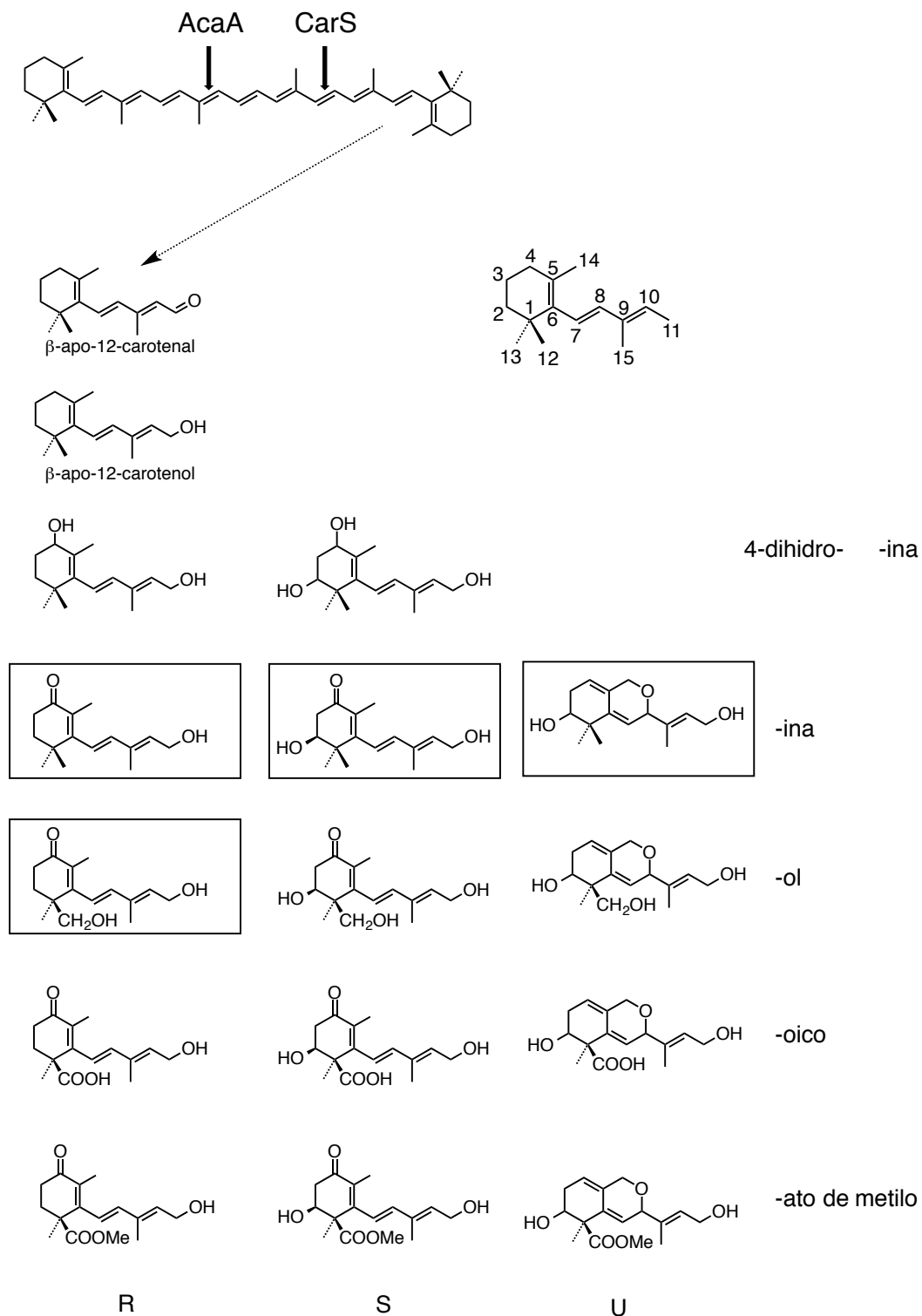


Figura 22. Disposición en red de ciclofarnesoides conocidos e hipotéticos. Las variaciones que afectan al carbono C2 determinan las columnas R y S y la formación del heterociclo, la U. Las filas se definen por los niveles de oxidación de los carbonos C4 y C12 y se designan por prefijos y sufijos indicados a la derecha. El nombre de cada compuesto se construye con la raíz ciclofarnes- y el prefijo, el sufijo y la letra que correspondan. En recuadros, los ciclofarnesoides identificados.

2.2 Resultados

2.2.1 Apocarotenoides de *Phycomyces*

Se analizaron los apocarotenoides de cultivos simples de las estirpes silvestres NRRL1555 (-) y A56 (+) y de cultivos mixtos de ambas a distintos tiempos de incubación y se compararon con los controles de las estirpes mutantes C5 (-) y S342 (+), incapaces de sintetizar β -caroteno y, por tanto, apocarotenoides. Los extractos neutros (pH 8) y ácidos (pH 2) se sometieron a técnicas analíticas en colaboración con el Prof. Alejandro Fernández Barrero y sus colegas de la Universidad de Granada.

2.2.1.1 Fraccionamiento cromatográfico de apocarotenoides

Las tres familias de apocarotenoides de mucorales se diferencian en el tiempo de retención en cromatografía líquida (Figura 23). Los metilhexanoides aparecen en el cromatograma de los extractos ácidos, en torno al minuto 12, los ciclofarnesoides en el de los extractos neutros, entre el minuto 16 y el 20, y los trisporoides en el de los extractos neutros y ácidos, a partir del minuto 20.

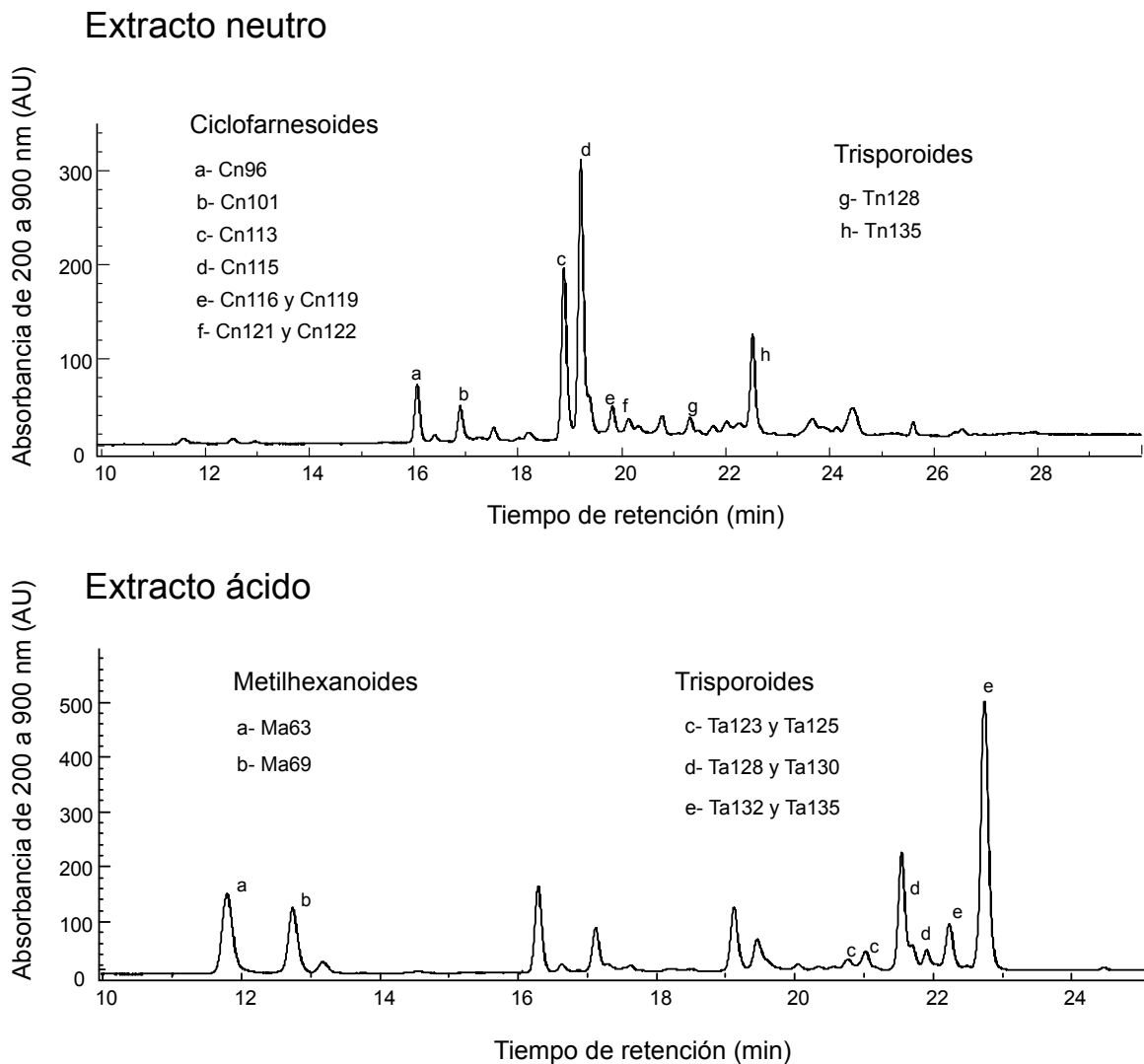


Figura 23. Ejemplo de cromatograma. Fraccionamiento cromatográfico de exudados de un cultivo mixto de las estirpes NRRL1555 (-) y A56 (+) de tres días de edad.

2.2.1.2 Identificaciones

En cultivos mixtos de las estirpes silvestres se identificaron tres ácidos trispóricos, D, C y E (todos en sus dos versiones isoméricas 9Z y 9E) y dos trisporoles, D y E (Figura 24). Nuestros colegas químicos de la Universidad de Granada identificaron una pequeña cantidad de (9Z) trisporato de metilo C, usando otras técnicas cuyos resultados no están descritos en este trabajo.

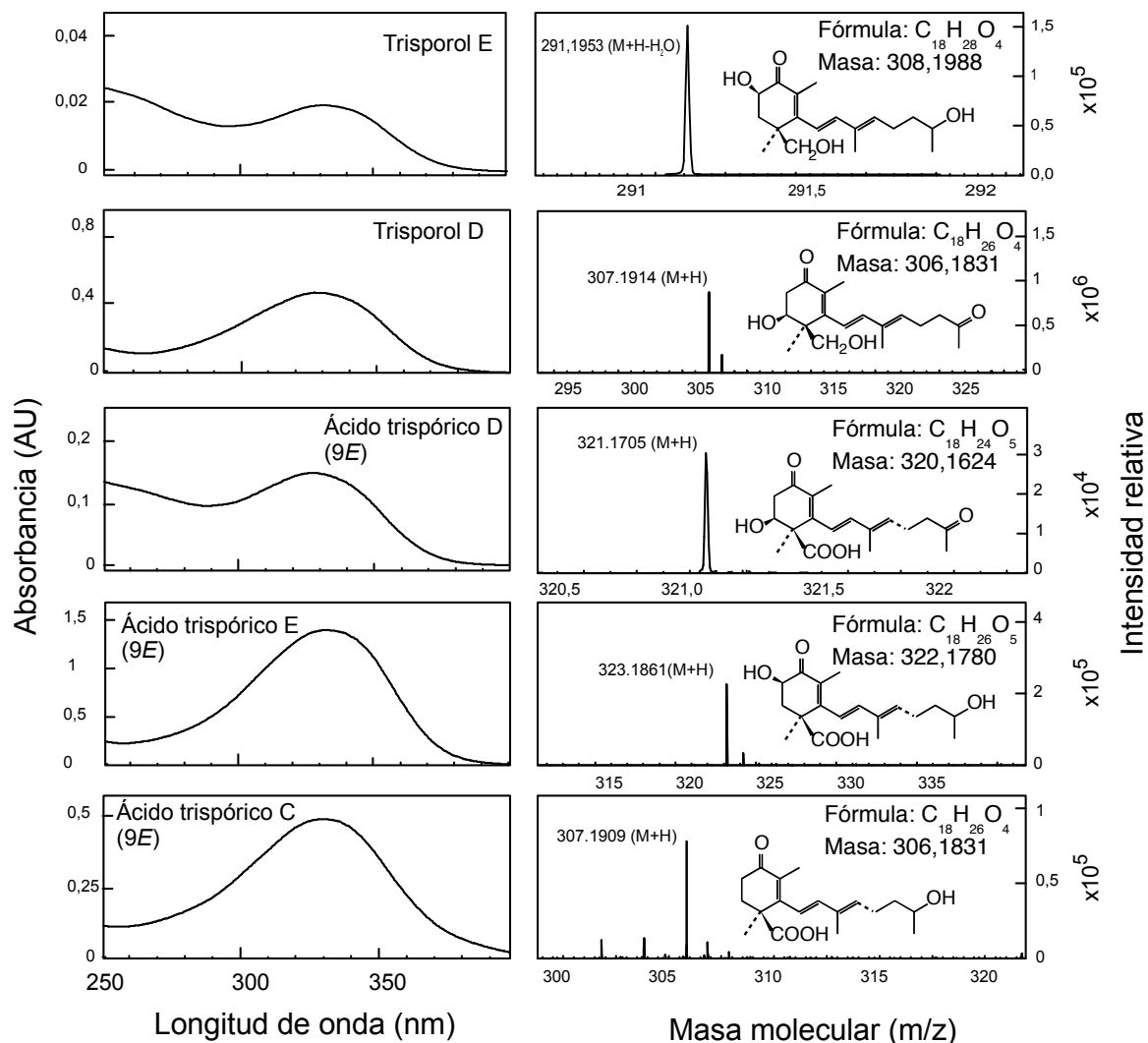


Figura 24. Trisporoides identificados en cultivos mixtos de tres días de *Phycomyces*. A la izquierda, espectro de absorción y nombre del compuesto; a la derecha, señal de espectrometría de masas (entre paréntesis, corrección por pérdida o ganancia de aductos) y estructura, fórmula química y masa molecular.

En cultivos simples y mixtos de las mismas estirpes se identificaron seis ciclofarnesoides (Figura 25), tres de los cuales ya identificados en trabajos anteriores en nuestro laboratorio en cultivos de cinco días de edad (Tabla 2) y otros tres nuevos para la ciencia: la 4-dihidrociclofarnesina T, el ciclofarnesol S y la 4-dihidrociclofarnesina S.

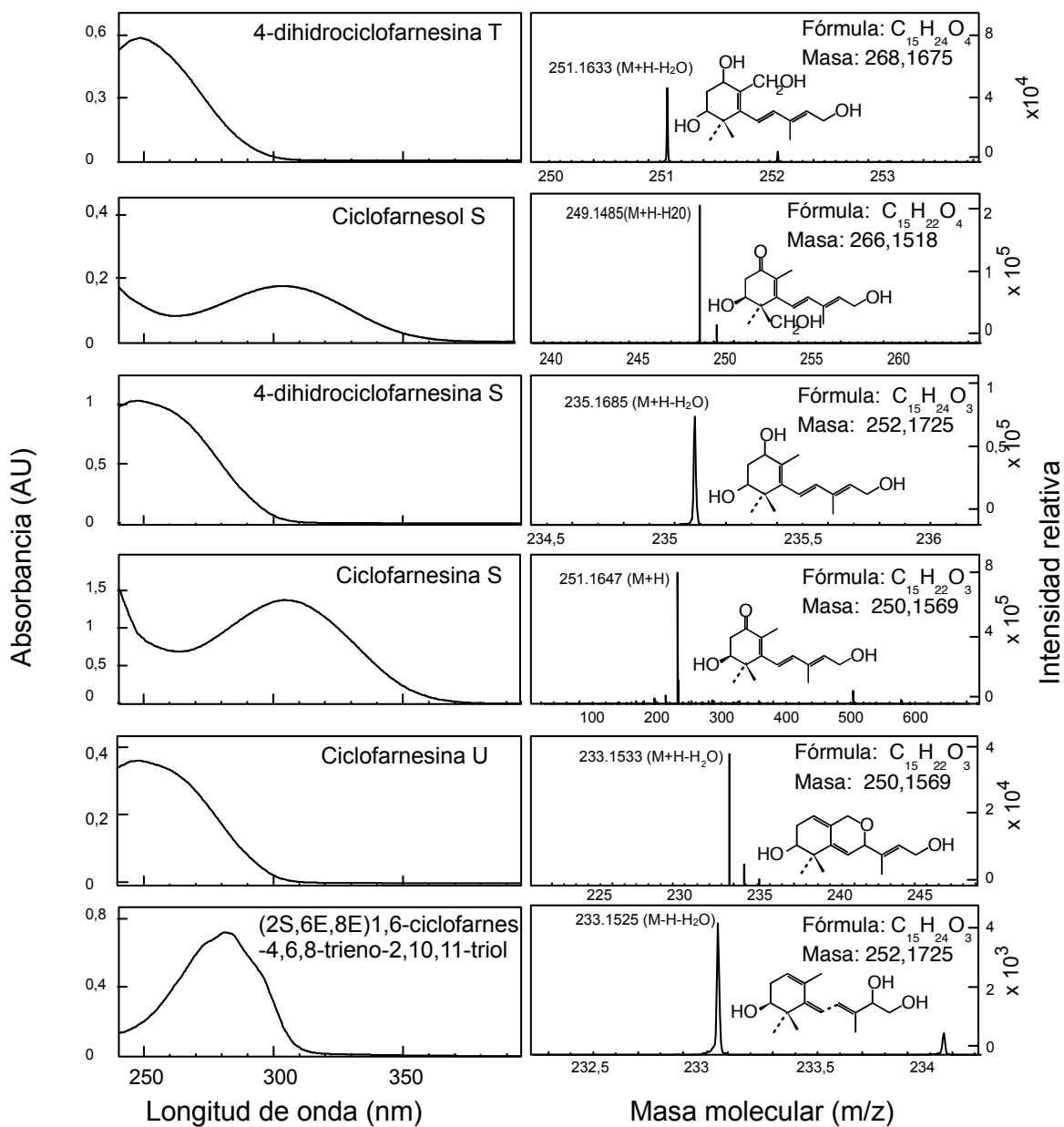


Figura 25. Ciclofarnesoides identificados en cultivos de tres días de *Phycomyces*. A la izquierda, espectro de absorción y nombre del compuesto; a la derecha, señal de espectrometría de masas (entre paréntesis, corrección por pérdida o ganancia de aductos) y estructura, fórmula química y masa molecular.

2.2.1.3 Diferencias entre cultivos mixtos y simples

Se estudiaron los ciclofarnesoides y los trisporoides de cultivos simples y mixtos de dos días de edad. Los trisporoides (Tabla 3) solo se encuentran en los extractos ácidos de cultivos mixtos. Se identificaron los ácidos trispóricos C y E, ambos con sus dos formas isoméricas 9Z y 9E.

Los ciclofarnesoides (Tabla 4) están en mayor cantidad y diversidad en cultivos mixtos que en simples. La ciclofarnesina S solo se observó en los cultivos mixtos. La 4-dihidrociclofarnesina T y la 4-dihidrociclofarnesina S se encontraron en cultivos simples de ambos sexos y en los mixtos. No se han identificado ciclofarnesoides de carácter ácido.

Tabla 3. Trisporoides identificados en *Phycomyces*. Absorbancia de 200 a 900 nm (kAUs/L de cultivo) en cultivos simples y mixtos. Entre paréntesis, nomenclatura nueva; entre comillas y en cursiva, nomenclatura antigua.

Compuesto		Cultivos simples		Cultivos mixtos		
		NRRL1555 (-)	A56 (+)	NRRL1555 (-) x A56 (+)		
		2 d		2 d	3 d	5 d
Trisporol E	(Tn128)	-	-	-	2	-
Trisporol D "Tn136"	(Tn135)	-	-	-	2	-
(9E) ácido trispórico D	(Ta123)	-	-	-	46	142
(9Z) ácido trispórico D "Ta96"	(Ta125)	-	-	-	92	42
(9E) ácido trispórico E	(Ta128)	-	-	24	824	2126
(9Z) ácido trispórico E "Ta91"	(Ta130)	-	-	46	82	216
(9E) ácido trispórico C "Ta102"	(Ta132)	-	-	52	308	370
(9Z) ácido trispórico C "Ta109"	(Ta135)	-	-	88	2214	2638
Total		0	0	210	3570	5534

2.2.1.4 Evolución temporal

Estudiamos los trisporoides (Tabla 3) y ciclofarnesoides (Tabla 4) de cultivos mixtos con distintas edades. La mayor diversidad de ambas familias de apocarotenoides se encontró en cultivos mixtos de tres días de edad y la mayor cantidad a los cinco días. Los trisporoles se identificaron en cultivos de 3 días. Los ácidos trispóricos C y E se identificaron en cultivos de dos, tres y cinco días, y el ácido trispórico D se detectó en los de tres y cinco días. Todos los ácidos trispóricos mostraron sus dos formas isoméricas 9Z y 9E.

Todos los ciclofarnesoides tenían carácter neutro. La ciclofarnesina U, se encontró en dos formas isoméricas, pero no se determinó la isomería. Las ciclofarnesinas T (en sus dos formas isoméricas) y los isómeros Cn121 y Cn122 aparecen a los tres días y se acumulan a los cinco días.

Tabla 4. Ciclofarnesoides identificados en *Phycomyces*. Absorbancia de 200 a 900 nm (kAU s/L de cultivo) en cultivos simples y mixtos. Entre paréntesis, nomenclatura nueva; entre comillas y en cursiva, nomenclatura antigua.

Compuesto		Cultivos simples		Cultivos mixtos		
		NRRL1555 (-)	A56 (+)	NRRL1555 (-) x A56 (+)		
		2 d		2 d	3 d	5 d
4-dihidrociclofarnesina T	(Cn96)	38	70	168	182	328
Ciclofarnesol S	(Cn101)	–	–	44	96	332
4-dihidrociclofarnesina S	(Cn113)	548	732	784	602	530
Ciclofarnesina S "Cn115"	(Cn115)	–	–	166	964	3210
Ciclofarnesina U "Cn96"	(Cn116)	–	–	–	18	246
Ciclofarnesina U "Cn113"	(Cn119)	–	–	–	100	1612
(2S,6E,8E)-1,6-ciclofarnes- 4,6,8-trieno-2,10,11-triol "Cn122"	(Cn121)	–	–	–	26	1004
(2S,6Z,8E)-1,6-ciclofarnes- 4,6,8-trieno-2,10,11-triol "Cn123"	(Cn122)	–	–	–	–	268
Total		586	802	1162	1988	7530

En los análisis de la fase ácida solo se observaron algunos ciclofarnesoides ya identificados en la fase neutra que muestran una “afinidad intermedia” entre la extracción neutra y la ácida. Los cultivos de un día de edad no produjeron señales de apocarotenoides en cromatografía líquida con detección por ultravioleta.

2.2.1.5 Ausencia de C₂₅ en los cultivos

La β-apo-12'-carotenona es el primer apocarotenoide precursor de los trisporoides y los metilhexanoides. Aparece como un fragmento del β-caroteno producido por la oxigenasa CarS y cortado a su vez por la oxigenasa AcaA (Medina et al, 2011 y Capítulo 1) y se ha considerado como posible regulador de la biosíntesis de β-caroteno (Medina, 2013). Disponemos del compuesto puro, proporcionado por el Dr. Salim Al-Babili, ajustamos los procedimientos de fraccionamiento y detección para optimizar su identificación y se han revisado todos los resultados, pero no lo hemos encontrado en ningún experimento. Debemos considerarlo un intermediario transitorio, que pasa fugazmente entre las dos oxigenasas.

2.2.2 Trisporoides y ciclofarnesoides de *Blakeslea*

En cultivos mixtos de las estirpes F921 (-) y F986 (+) de tres días de edad se identificaron por resonancia magnética nuclear (Tabla 5) el ácido trispórico C en sus versiones 9Z y 9E, y 3 ciclofarnesoides, el ciclofarnesol R, el ácido ciclofarnesoico R y el ácido ciclofarnesoico R acetilado en el hidroxilo del carbono 11; los 2 últimos eran nuevos para la ciencia.



Figura 26. Apocarotenoides C₁₃. A la izquierda, identificado en cultivos mixtos de *Blakeslea*; a la derecha, su éster metílico.

También se identificó (Figura 26) un ácido de trece carbonos, que podría derivar del corte del β -caroteno, de un trisporoide o de un ciclofarnesoide. Este C_{13} es un nuevo producto natural y su estructura se confirmó por síntesis química; su éster metílico (Figura 26) se había sintetizado para servir de intermediario en la síntesis química del ácido trispórico B (Takahashi *et al.*, 1988).

Los apocarotenoides de los extractos neutro (pH 8) y ácido (pH 2) se separaron en fracciones por cromatografía líquida y se estimó la cantidad de cada apocarotenoide. Los detalles de estas determinaciones por nuestros colegas químicos se encuentran en nuestra publicación conjunta (Barrero *et al.*, 2011).

Tabla 5. Cuantificación de los apocarotenoides de *Blakeslea*. Los valores están referidos al volumen de un cultivo mixto de las estirpes F921 (-) y F986 (+) de tres días de edad.

Compuesto	Cantidad (mg/L)	Peso molecular (g)	Concentración ($\mu\text{mol/L}$)	Total ($\mu\text{mol/L}$)
Metilhexanoides:				
(2E,4E)-6-hidroxi-5-metilhexa-2,4-dienal	15,4	126,1	122,2	
(2E,4E)-6-hidroxi-2-metilhexa-2,4-dienal	2,7	126,1	21,4	
(2E,4E)-2-metilhexa-2,4-dien-1,6-diol	40,0	128,1	312,3	582,6
(2E,4E)-6-hidroxi-2-metilhexa-2,4-dienoico	6,0	142,1	42,2	
(2E,4E)-6-hidroxi-5-metilhexa-2,4-dienoico	12,0	142,1	84,5	
Ciclofarnesoides:				
Ciclofarnesol R	24,6	250,2	98,3	
Ciclofarnesoico R	14,6	264,1	55,3	175,8
Ciclofarnesoico R acetilado en C11	6,8	306,1	22,2	
Trisporoides:				
Trispórico C (9E)	22,1	306,2	72,2	
Trispórico C (9Z)	48,2	306,2	157,6	229,8
Apocarotenoides C_{13} :				
β -9-apo-4,9-ceto-16-carotenoico	4,0	236,1	16,8	16,8
Total	196,4	2333,4	1005	1005

Si comparamos la cantidad de los metilhexanoides con la de trisporoides o ciclofarnesoides encontramos que los metilhexanoides son aproximadamente tres veces más abundantes (3,3 veces para los ciclofarnesoides y 2,5 para los trisporoides). Es posible que se esté sobreestimando la cantidad de metilhexanoides por el método de separación. Si la cromatografía líquida no los separa adecuadamente de otros compuestos, presentes en las extracciones y con propiedades cromatográficas similares, estos incrementan el peso de la fracción.

2.3 Discusión

2.3.1 Apocarotenoides de *Phycomyces*

2.3.1.1 Nuevas determinaciones y nuevos métodos

Esta tesis amplía los resultados de dos tesis anteriores de este laboratorio (Polaino, 2009; Medina, 2013), diversificando las circunstancias de los cultivos, mejorando la detección e introduciendo técnicas apropiadas para la determinación de estructuras.

Los exudados de cultivos mixtos de *Phycomyces* de cinco días de edad tienen una considerable absorbancia a 328 nm (Polaino *et al.*, 2012), que se debe atribuir a apocarotenoides porque no se encuentra en estirpes incapaces de sintetizar β -caroteno. Los cultivos de cinco días parecieron apropiados para investigar apocarotenoides con función fisiológica, ya que en cultivos mixtos de las estirpes silvestres las primeras cigosporas aparecen a los 6 días de incubación y la mayor acumulación de apocarotenoides en cultivos mixtos se observa a los cinco días.

La tesis de Medina (2013) amplió el estudio a muchas estirpes mutantes y a apocarotenoides que absorbían a 280 nm. Se detectaron más de cincuenta compuestos, muchos de ellos ciclofarnesoides, que habían escapado antes al detector de 328 nm (Polaino, 2009).

La restricción a cultivos de cinco días puede justificarse por razones prácticas, pero la interacción fisiológica puede ocurrir en cultivos más jóvenes, con más antelación a los cambios morfológicos. Las variaciones temporales facilitan además la comprensión de las rutas biosintéticas.

2.3.1.2 Diferencias entre cultivos simples y mixtos

Para estimar cuantitativamente los apocarotenoides a partir de sus absorbancias (Tabla 1, 3 y 4) necesitaríamos datos detallados de todos ellos. No hemos podido obtener coeficientes de extinción de apocarotenoides en nuestro laboratorio, pero vamos a aproximar el de los trisporoides por el del ácido trispórico C (Bu'lock *et al.*, 1972), el de los ciclofarnesoides por los del ciclofarnesol R (Sutter *et al.*, 1981) y el 2,4,6-octatrieno y el de los metilhexanoides por el del ácido sórbico (2,4-hexadienoico). Esto nos permite estimar la abundancia relativa de las tres familias de apocarotenoides (Tabla 6).

Medina (2013) estimó que la cantidad total de apocarotenoides es, aproximadamente, doce veces mayor en cultivos mixtos que en simples de cinco días de edad. En nuestros cultivos de dos días de edad es aproximadamente el doble.

Hay que tener en cuenta que en estos primeros días de cruzamiento los trisporoides no se encuentran en los cultivos simples y en los cultivos mixtos son mucho menos abundantes que los demás. Como las tres familias de apocarotenoides se producen en cantidades equimoleculares por corte del β -caroteno en tres fragmentos (Polaino *et al.*, 2009 y 2012; Medina *et al.*, 2011) debe haber un mecanismo de degradación de los trisporoides en cultivos simples de ambos sexos. Este mecanismo se inhibiría, total o parcialmente, durante la interacción sexual, permitiendo la detección de los trisporoides. Una propuesta similar se encuentra en Medina (2013) para explicar sus resultados con cultivos de cinco días.

Tabla 6. Abundancia relativa de las familias de apocarotenoides de *Phycomyces*. Suma de las absorbancias de 200 a 900 nm (AU s/L de cultivo) divididas por los coeficientes de extinción molar estimados para cada familia de apocarotenoides: metilhexanoides, 20.000; ciclofarnesoides, 11.000; trisporoides, 17.000.

Familia	Cultivos simples		Cultivos mixtos		
	NRRL1555 (-)	A56 (+)	NRRL1555 (-) x A56 (+)		
	2 d		2 d	3 d	5 d
Metilhexanoides	23	16	56	54	227
Ciclofarnesoides	55	73	109	182	682
Trisporoides	0	0	12	210	326
Total	78	89	177	446	1235

2.3.1.3 Evolución temporal

Al aumentar la edad de los cultivos mixtos aumenta mucho la cantidad total de apocarotenoides, que es siete veces mayor a los cinco días que a los dos días. Los trisporoides aumentan proporcionalmente más que los demás. Esto refuerza nuestra propuesta de una degradación específica de los trisporoides para explicar la ausencia de trisporoides en los cultivos simples, su aparición en los cultivos mixtos de dos días de edad y su gran aumento en el tercer día.

La cantidad total de los ciclofarnesoides es mayor que la de los otros, el doble que la de los trisporoides y el triple que la de los metilhexanoides. Esto sugiere diferencias en la eficacia de extracción, la estabilidad o el catabolismo de las tres familias de apocarotenoides e incluso la posibilidad de transferencias de unas a otras.

2.3.2 Apocarotenoides de *Blakeslea*

El método seguido para estimar la concentración de los apocarotenoides en el exudado del cultivo mixto (Tabla 5) es muy diferente del seguido con *Phycomyces*. Observamos que las cantidades de ciclofarnesoides y de trisporoides en el medio son equiparables, lo que coincide con la hipótesis de que deben de encontrarse en cantidades equimoleculares. Los metilhexanoides son más abundantes que los trisporoides y los ciclofarnesoides, e incluso que la suma de ambos. Es posible que el método de separación sobrestime los metilhexanoides si la cromatografía líquida no los separa de otros ácidos presentes en el medio y con propiedades cromatográficas similares. El método de separación aplicado no fue diseñado especialmente para estos ácidos. El medio de cultivo de *Phycomyces* es particularmente rico en ácidos orgánicos (Barrero *et al.*, 1996) y lo mismo parece ocurrir con otros mucorales.

El apocarotenoide de 13 carbonos (Figura 26) constituye una familia aparte, mucho menos abundante que las otras. Es posible que se produzca por el corte de alguna de las oxigenasas conocidas, por otra enzima o incluso por una actividad no enzimática.

2.3.3 Apocarotenoides de mucorales

Todos los ciclofarnesoides y la mayoría de los trisporoides de *Phycomyces* y *Blakeslea* que hemos identificado en este trabajo (Figuras 28 y 29) tienen un grupo hidroxilo (-OH) en el extremo de la cadena de polieno. Esto debe ser consecuencia de una actividad enzimática muy eficaz y muy conservada en los mucorales, ya que solo el ácido trispórico D y el trisporol D, compuestos minoritarios en los cultivos mixtos de *Phycomyces*, tienen un grupo aldehído en esa posición.

En cultivos mixtos de *Phycomyces* encontramos trisporoides de las familias C, D y E (Figura 28). En *Blakeslea* solo hemos identificado el ácido trispórico C (Tabla 6), que es el trisporoide mayoritario en *Phycomyces* (Tabla 3). Esto sugiere que las enzimas que producen el ácido trispórico C a partir de β -apo-13-carotenona, el primer trisporoide, deben estar conservadas en los mucorales.

Blakeslea carece de apocarotenoides hidroxilados en los carbonos C2 y C3 del anillo y, por tanto, de las enzimas que catalizan estas reacciones en *Phycomyces* (Figuras 28 y 29). Se puede pensar en una hidroxilasa para el C3 específica para los trisporoides y otra para el C2 de los ciclofarnesoides, responsables, respectivamente, de los trisporoides E y de todos los ciclofarnesoides. Una falta de especificidad de esta última enzima podría dar lugar a las pequeñas y erráticas concentraciones de trisporoides D (Tabla 3).

Todos los apocarotenoides detectados en *Phycomyces* y *Blakeslea* tienen algún sustituyente en el C4 del anillo (Figuras 28 y 29), pero los precursores hipotéticos de los trisporoides y los ciclofarnesoides no los tienen, ya que se cortan directamente del β -caroteno. Tampoco se han detectado trisporoides que no tengan saturado el doble enlace 11,12. Esto sugiere que la hidroxilasa de C4 y la hidrogenasa del doble enlace 11,12 deben estar conservadas en los mucorales y ser muy eficientes.

En *Blakeslea* y en *Phycomyces* hemos detectado los ciclofarnesoles R y S, respectivamente. Este último era hasta ahora desconocido. La actividad enzimática que transforma las ciclofarnesinas en ciclofarnesoles podría ser la hidroxilasa que convierte las trisporinas en trisporoles; este proceso sería muy eficiente en los apocarotenoides de *Blakeslea* y en los trisporoides de *Phycomyces*, pero no en sus ciclofarnesoides, ya que se detecta más sustrato que producto. En *Blakeslea* también hemos detectado el ácido ciclofarnesoico R, también un compuesto nuevo. Este producto podría ser obra de

las mismas enzimas que transforman los trisporoles a ácidos trispóricos, pero serían más eficaces en el caso de los trisporoides que en el de los ciclofarnesoides.

La 4-dihidrociclofarnesina S y la 4-dihidrociclofarnesina T, identificados en este trabajo, son nuevos compuestos para la ciencia. Ambos se habían hipotetizado anteriormente como precursores en la ruta biosintética de los ciclofarnesoides de *Phycomyces* (Polaino *et al.*, 2012; Medina, 2013). El primero sería un precursor central en la ruta, ya que todos los ciclofarnesoides identificados derivarían de él, por uno o varios pasos enzimáticos. El segundo se propuso como precursor de los ciclofarnesoides U.

Algunos ciclofarnesoides identificados en cultivos de tres días y, en mayor cantidad, en los de cinco, podrían generarse espontáneamente en el medio de cultivo a pH ácido a partir de ciclofarnesoides identificados en cultivos más jóvenes. Así, la ciclofarnesina U y el 1,6-ciclofarnes-4,6,8-trieno-2,10,11-triol derivarían de la 4-dihidrociclofarnesina T y de la 4-dihidrociclofarnesina S, respectivamente (Figura 27).

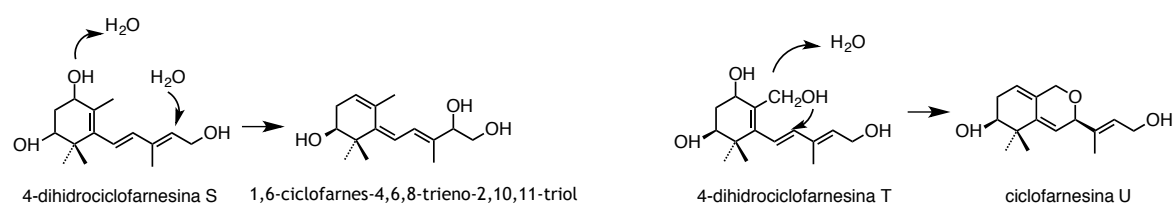


Figura 27. Reacción espontánea de ciclofarnesoides en el medio de cultivo. Las flechas curvas indican los procesos de ganancia o pérdida de agua y la posición en la que ocurren.

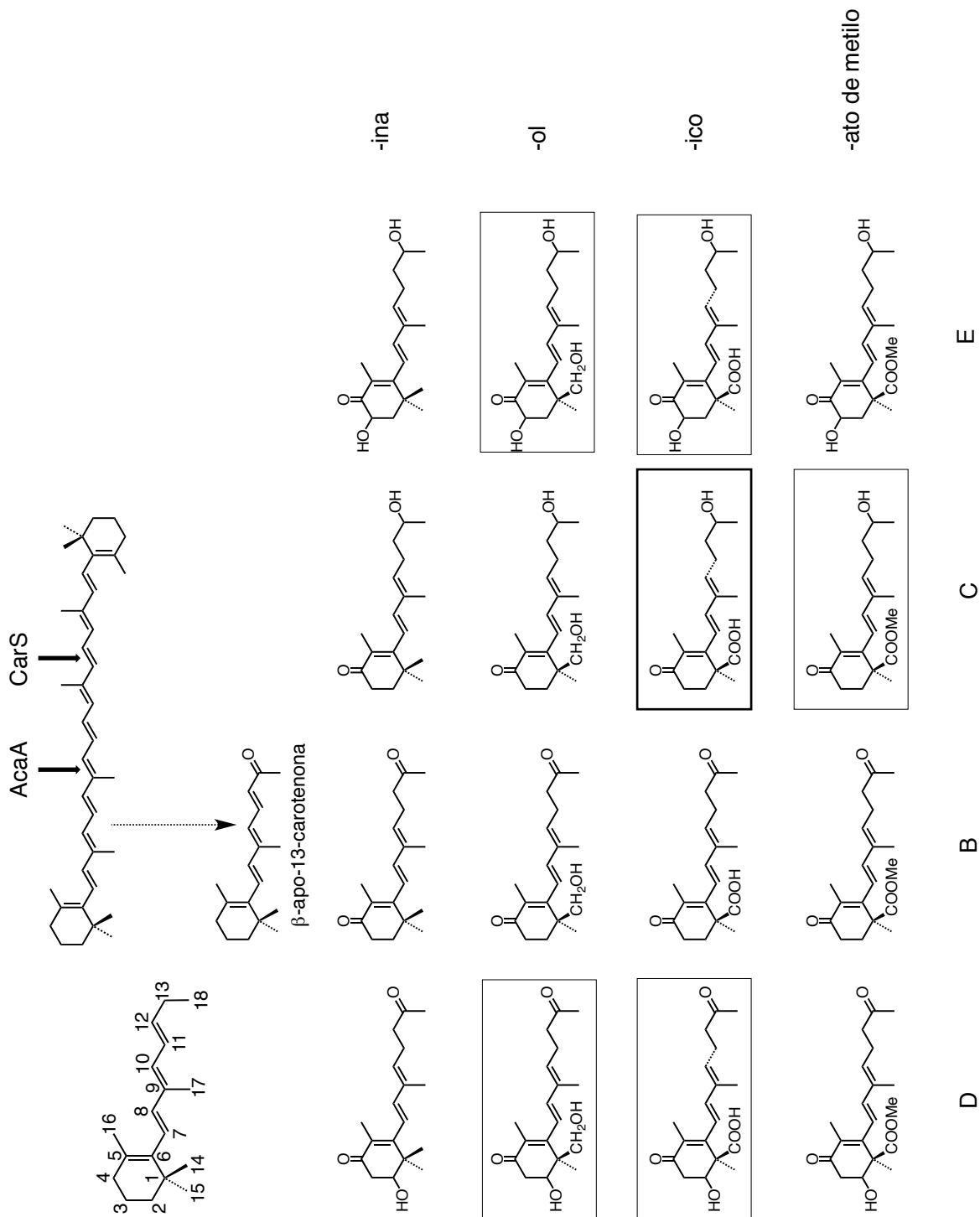


Figura 28. Trisporoides identificados en esta tesis. Las variaciones que afectan a los carbonos C2, C3 y C13 determinan las columnas, designadas por letras mayúsculas. Las filas se definen por el nivel de oxidación del C14 y se designan por sufijos indicados a la derecha. El nombre de cada compuesto se construye con la raíz trispor- y el sufijo y la letra que correspondan. En recuadros finos, identificados en *Phycomyces*; en el recuadro grueso, el identificado en *Phycomyces* y *Blakeslea*.

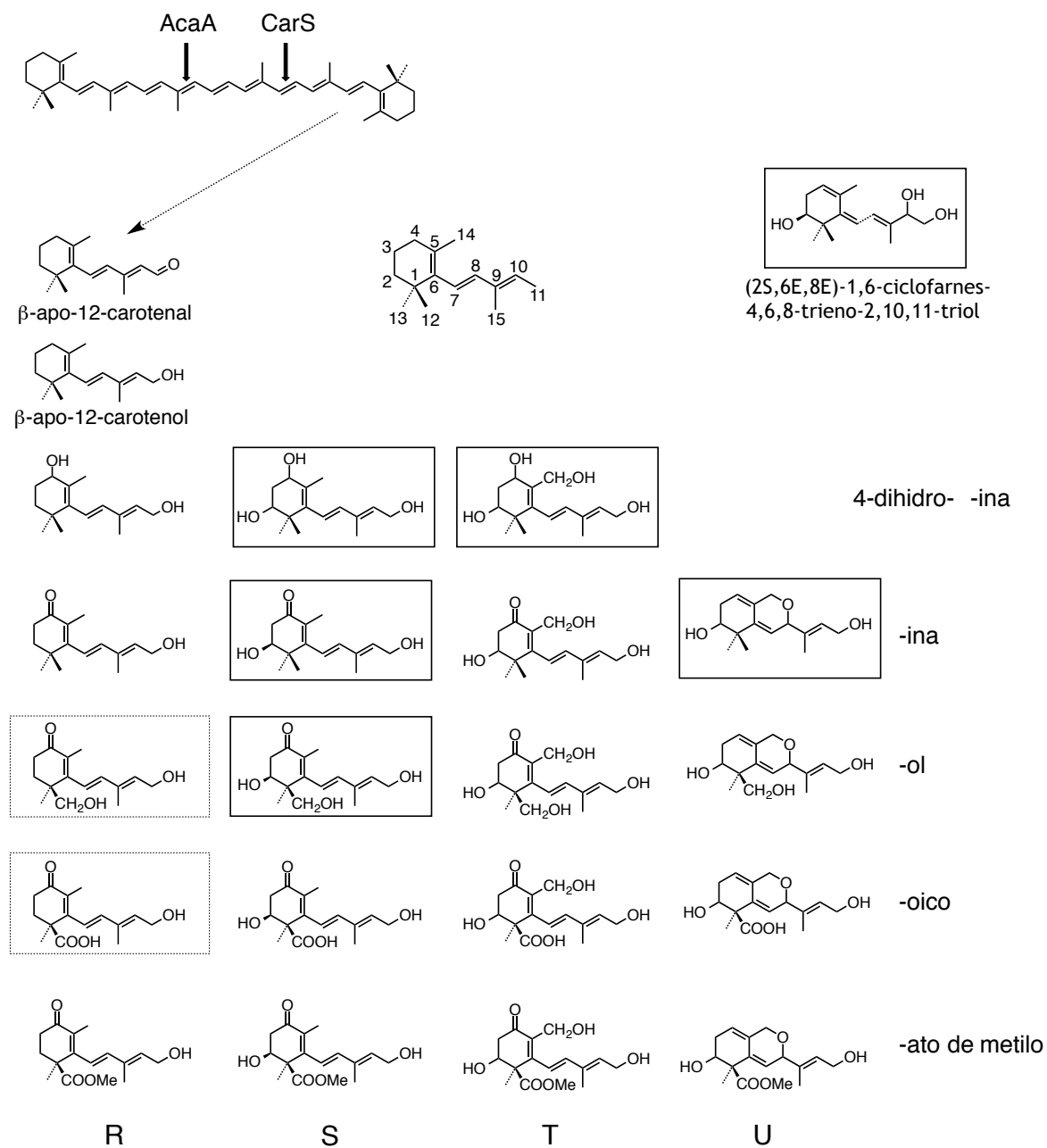


Figura 29. Ciclofarnesoides identificados en este trabajo. Las variaciones que afectan al carbono C2 determinan las columnas R y S, las del C14 la T y la formación del heterociclo la U. Las filas se definen por los niveles de oxidación de los carbonos C4 y C12 y se designan por prefijos y sufijos indicados a la derecha. El nombre de cada compuesto se construye con la raíz ciclofarnes- y el prefijo, el sufijo y la letra que correspondan. Esta nomenclatura no se aplica a los compuestos de la parte superior de la Figura. En recuadros, los ciclofarnesoides identificados (con línea continua, en *Phycomyces*; con línea punteada, en *Blakeslea*).

Capítulo 3

Biotransformaciones de apocarotenoides

3.1 Introducción

La biotransformación es una técnica muy potente para estudiar rutas metabólicas: se suministran sustratos naturales o artificiales a un organismo y se analizan los productos resultantes. Este método puede verse oscurecido por el metabolismo endógeno. Por suerte, en *Phycomyces* disponemos de mutantes carentes de apocarotenoides propios que puedan interferir en las determinaciones de los productos de las biotransformaciones.

En este capítulo analizaremos las biotransformaciones de dos ciclofarnesoides y un trisporoide sintetizados por el grupo del Prof. Alejandro Fernández Barrero y sus colegas de la Universidad de Granada.

3.2 Resultados

3.2.1 Biotransformación de ciclofarnesoides

El β -apo-12-carotenol no ha sido detectado como producto natural en ningún organismo, pero es un presunto intermediario en la biosíntesis de ciclofarnesoides. Incubado con cultivos de estirpes mutantes *carB* de *Phycomyces*, se convirtió en tres ciclofarnesoides S (Tabla 7, Figura 30), ya identificados en este organismo (Figura 25, capítulo 2), y no se detectaron derivados de estos, identificados en el capítulo 2 (Figura 29). El sustrato es muy inestable en el medio de cultivo, ya que en un día solo quedó el 2 % de la cantidad original. Incubado en los cultivos desapareció por completo, y solo en

una pequeña proporción (aproximadamente el 8 %) se convirtió en ciclofarnesoides detectados. Cabe alguna duda sobre la identificación de la 4-dihidrociclofarnesina S, ya que en nuestro sistema de cromatografía es muy difícil distinguirla de la ciclofarnesina U y no tenemos confirmación por espectrometría de masas. Tanto los cultivos simples de las estirpes mutantes *carB* de sexo opuesto como los cultivos mixtos de ambas se comportaron igual. No se identificaron compuestos nuevos.

La ciclofarnesina S no se transformó en otros apocarotenoides detectables por nuestro método (Tabla 7). Esta es también inestable, pero no tanto en los cultivos como en el medio, lo que sugiere que se estabiliza por interacción con las células o con metabolitos secretados por ellas. No se observaron diferencias entre los sexos o entre cultivos simples y mixtos.

Tabla 7. Biotransformación de los ciclofarnesoides. Los cultivos, de 25 ml y dos días de edad, se incubaron en presencia del sustrato (1 mg). Para cada compuesto identificado en HPLC se indica la absorbancia (AU s) a 328 nm (ciclofarnesina S) o a 254 nm (los demás).

		Cultivos			
		C5 (-)	S342 (+)	C5 x S342	Medio
Sustrato:	β -apo-12-carotenol				1400
Productos:	β -apo-12-carotenol	-	-	-	28,5
	4-dihidrociclofarnesina S	69	85,6	68,2	-
	4-dihidrociclofarnesina T	16,6	23,1	23	-
	Ciclofarnesina S	15,2	10,2	18,3	-
	Total	100,8	118,9	109,5	28,5
Sustrato:	Ciclofarnesina S				231
Producto:	Ciclofarnesina S	15,4	15,6	16,8	4,2

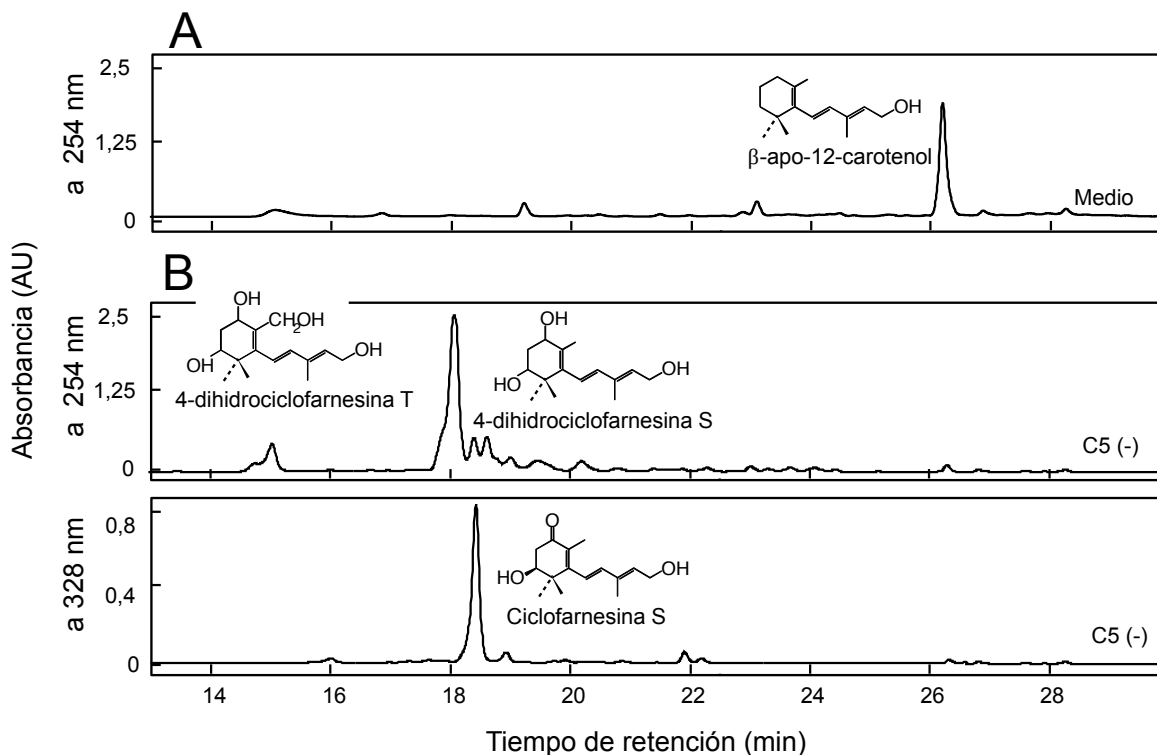


Figura 30. Ejemplo de la biotransformación del β -apo-12-carotenol. Fraccionamientos cromatográficos de extractos neutros de un cultivo simple de una estirpe mutante, incapaz de producir apocarotenoides, incubado en presencia de β -apo-12-carotenol. A, incubación del sustrato durante un día en medio de cultivo; B, incubación durante un día en cultivos de dos días. Para otros detalles ver leyenda de la Tabla 7.

3.2.2 Biotransformación de trisporoides

El cultivo simple de sexo (+) y el cultivo mixto de ambos sexos fueron capaces de transformar la β -apo-13-carotenona (un compuesto C_{18}) en trisporoides (C_{18}) y ciclofarnesoides (C_{15}). El sustrato es muy inestable en el medio de cultivo, ya que tras un día de incubación quedó menos del 0,1 %. En el cultivo simple de la estirpe de sexo (-) no se detectó ningún apocarotenoide. Los ciclofarnesoides fueron los mismos que se transformaron a partir del β -apo-12-carotenol, descritos en el apartado anterior, más el ciclofarnesol S. El principal trisporoide es el ácido trispórico C, con sus dos isómeros 9Z y 9E. El cultivo mixto produjo en pequeña cantidad el ácido trispórico E, no encontrado en el experimento paralelo con el cultivo simple de sexo (+). Las absorbancias indicaban una proporción similar de los ciclofarnesoides en el cultivo simple de sexo (+) y en el cultivo mixto, pero había el doble de ácidos trispóricos en

Tabla 8. Biotransformación de la β -apo-13-carotenona. Los cultivos, de 25 ml y dos días de edad, se incubaron en presencia del sustrato (1 mg). Para cada compuesto identificado en HPLC se indica la absorbancia (AU s) a 254 nm (los tres primeros) o a 328 nm (los demás).

	Cultivos			
	C5 (-)	S342 (+)	C5 x S342	Medio
Sustrato: β -apo-13-carotenona				304
Productos: β -apo-13-carotenona	-	-	-	0,24
4-dihidrociclofarnesina S	-	18,74	18,4	-
4-dihidrociclofarnesina T	-	17,3	15,76	-
Ciclofarnesina S	-	4,63	4,66	-
Ciclofarnesol S	-	1,73	2,08	-
Ácido trispórico C (9E)	-	1,48	3,21	-
Ácido trispórico C (9Z)	-	1,52	3,34	-
Ácido trispórico E	-	-	0,79	-
Total	-	45,4	48,24	0,24

3.2.2.1 Biotransformación de trisporoides por mutantes *carS*

El corte de la β -apo-13-carotenona se puede atribuir a una oxigenasa. En *Phycomyces* tenemos mutantes carentes de la enzima CarS, que se encarga de generar los ciclofarnesoides a partir del β -caroteno. El cultivo mixto de estas estirpes mutantes *carS*, incapaces de cortar el β -caroteno, también transformó la β -apo-13-carotenona en ciclofarnesina S (Figura 32). Por tanto el desvío de sustratos de C₁₈ a C₁₅ debe ser atribuido a una actividad enzimática distinta.

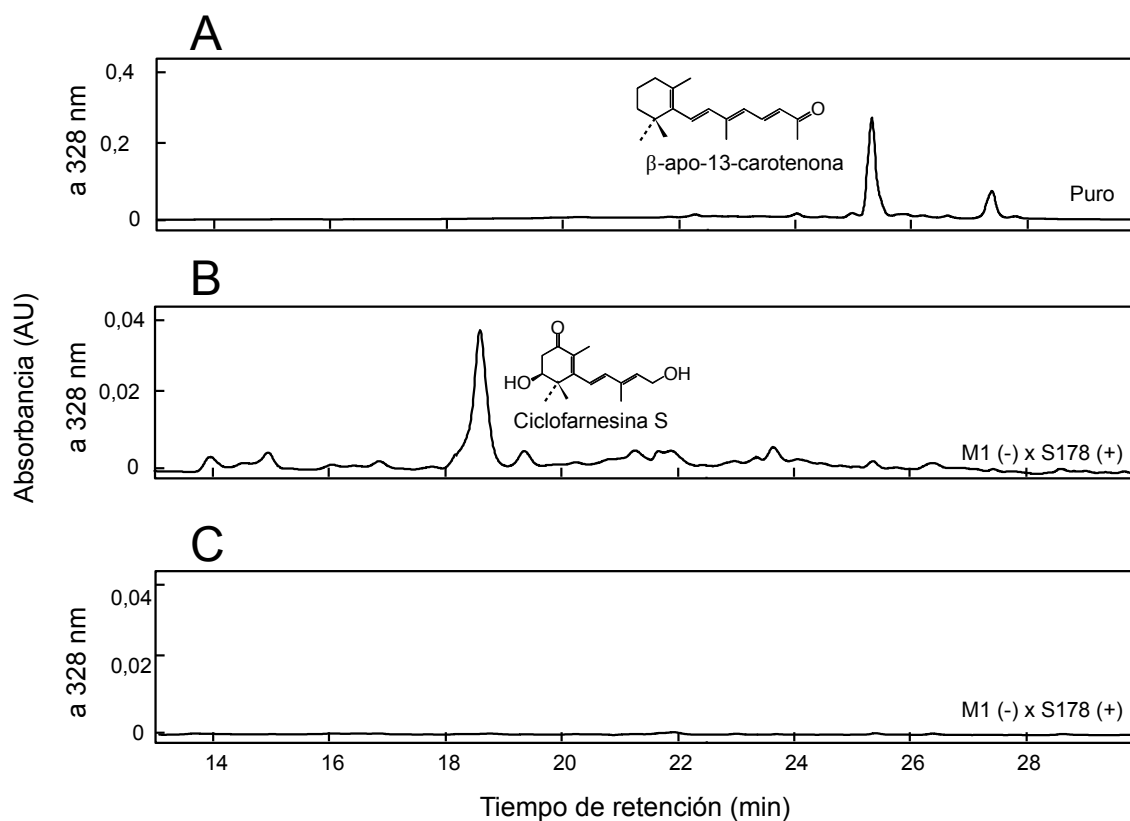


Figura 32. Biotransformación de la β -apo-13-carotenona por mutantes *carS*. Fraccionamientos cromatográficos de extractos neutros de un cultivo mixto de estirpes mutantes, incapaces de producir apocarotenoides, incubado en presencia de β -apo-13-carotenona. A, compuesto puro (0,1 mg); B, incubación del sustrato durante un día en cultivo de dos días; C, cultivo de tres días sin sustrato. La absorbancia a 328 nm de la ciclofarnesina S fue de 0,51 AU s.

3.3 Discusión

En esta tesis hemos desarrollado en *Phycomyces*, por primera vez, la biotransformación de distintos compuestos en mutantes incapaces de producir apocarotenoides. Esta técnica proporciona una herramienta muy potente de análisis del metabolismo de trisporoides y ciclofarnesoides.

Hay que tener en cuenta en este capítulo que la biotransformación de un compuesto no demuestra que este sea un intermediario fisiológico y que las cantidades aplicadas pueden ser muy diferentes de las habituales en las células.

3.3.1 Biotransformaciones de ciclofarnesoides

El primer ciclofarnesoide debe ser el β -apo-12-carotenal, que se debe producir al cortar el β -caroteno por su doble enlace 11',12' (Figura 23). Este ciclofarnesoide sintetizado químicamente es muy inestable y, por este motivo, utilizamos su derivado reducido en el extremo de la cadena de polieno, el β -apo-12-carotenol. Este es un intermediario hipotético de la ruta biosintética de los ciclofarnesoides, ya que dos oxidaciones en C2 y C4 lo transformarían en la 4-dihidrociclofarnesina S (Figura 29). Ambas acciones enzimáticas y la reducción en C11 deben ser muy eficaces, ya que no se encuentran ciclofarnesoides sin grupos hidroxilo en esas tres posiciones.

El primer precursor detectado es la 4-dihidrociclofarnesina S, que, por oxidación en C14, se convierte en la 4-dihidrociclofarnesina T y, por oxidación en C4, en ciclofarnesina S (Figura 30). Ambos productos se acumulan lentamente. En estos experimentos no se encontraron posibles metabolitos de la ciclofarnesina S. Tampoco se encontraron los isómeros Cn121 y Cn122 y la ciclofarnesina U, que creemos derivados espontáneos de compuestos citados en el párrafo anterior (Figura 27). Es posible que el tiempo de incubación, el tercer día de cultivo, sea insuficiente para acumular cantidades detectables de esos compuestos.

3.3.2 Biotransformaciones de trisporoides

La β -apo-13-carotenona es el primer compuesto de la ruta biosintética de los trisporoides y se produce por dos cortes sucesivos del β -caroteno (Medina et al., 2011). Este apocarotenoide no es tan inestable como su homólogo de 15 átomos de carbono (el β -apo-12-carotenal) y pudimos utilizarlo en los ensayos de biotransformación.

El precursor de 18 carbonos ha dado lugar a trisporoides (C₁₈) y a ciclofarnesoides (C₁₅). Este resultado es sorprendente porque nuestro laboratorio demostró que ambos grupos de apocarotenoides proceden directa y separadamente del corte del β -caroteno (Polaino et al., 2009; Medina et al., 2011) y esta tesis (Capítulo 1) amplía el resultado a otro mucoral. Los primeros apocarotenoides de 15 carbonos identificados se supusieron producto del corte de los trisporoides (Sutter y Whitaker, 1981; Sutter y Zawodny, 1984). En esta tesis (Tabla 8) hemos demostrado que la estirpe S342 (+) genera ciclofarnesoides a partir de β -apo-13-carotenona (Figura 31), al menos en las condiciones de estos experimentos de biotransformación. Esta estirpe podría

cortar directamente la β -apo-13-carotenona o un derivado más oxidado. Hay dos sustratos posibles para la enzima que corta el fragmento de tres carbonos: la β -apo-13-carotenona y su hipotético derivado hidroxilado en C4, pero este último debe estar en pequeña cantidad, porque no se ha encontrado. La ruta se volvería más complicada si el sustrato fuera cualquiera de los trisporoides más avanzados, que tuvieran un grupo ceto en C4 o carecieran del doble enlace 11,12 que debería cortarse. Nosotros proponemos que el corte del fragmento de tres carbonos ocurra en el primer trisporoide de la ruta, la β -apo-13-carotenona, y el ciclofarnesoide que se produce se incorporaría a la ruta de los ciclofarnesoides, junto con los que provienen directamente del β -caroteno (Figura 33).

Demostramos que el corte de un fragmento de tres carbonos no lo realiza la enzima CarS (Figura 32), que corta el β -caroteno y genera ciclofarnesoides. Esto nos ha llevado a proponer la existencia de otra enzima con actividad oxigenasa que corte los trisporoides y genere algunos ciclofarnesoides en estirpes de sexo (+). La enzima que corta los trisporoides a ciclofarnesoides podría ser la proteína 64508 de *Phycomyces*, que se parece mucho a la oxigenasa CarS y conserva las características que se consideran necesarias para esa actividad. La proteína 64508 no cortó ninguno de los sustratos ensayados (Medina et al., 2011), pero ya hemos hecho referencia (Capítulo 1) a las limitaciones de estos métodos. Además, en esos trabajos no se detectaron ciclofarnesoides ni metilhexanoides y si una enzima hubiese mostrado baja actividad cortando un trisporoide, para generar un ciclofarnesoide y un C₃, no se habrían detectado los productos ni el descenso de la concentración de trisporoides. Tampoco hay que descartar como candidata la enzima AcaA, aunque su lugar de corte difiere del que sería necesario para esta nueva actividad.

Como propusimos en el Capítulo 2, la oxidación en C12 de la ciclofarnesina S, que da lugar al ciclofarnesol S, podría ser catalizada por la hidroxilasa que transforma las trisporinas en trisporoles. El ciclofarnesol S resultó de la biotransformación de la β -apo-13-carotenona, pero no de la del β -apo-12-carotenol, de 15 átomos de carbono. La diferencia se debería a que la enzima se activaría por la presencia de sustratos de 18 átomos de carbono.

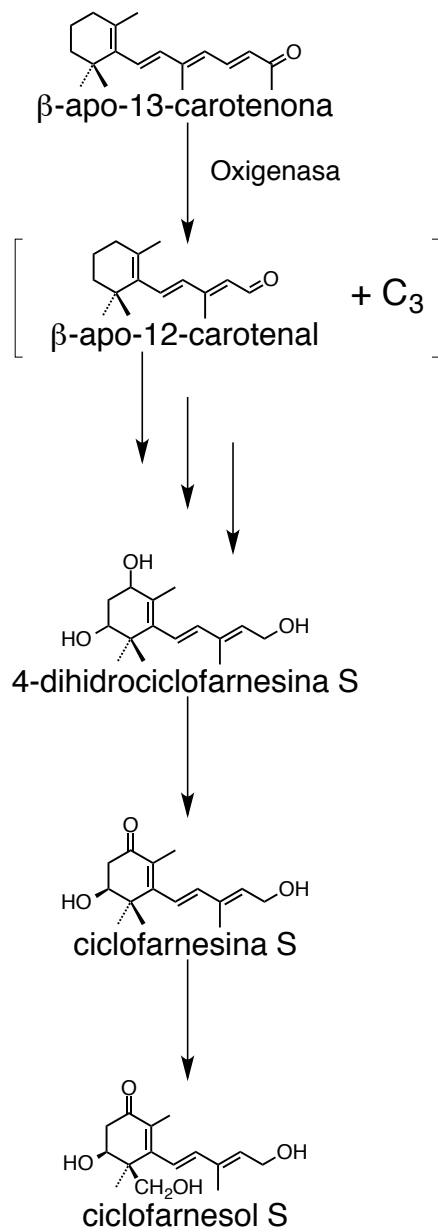


Figura 34. Posible ruta para convertir trisporoides en ciclofarnesoides. Las flechas indican pasos enzimáticos sencillos. Entre paréntesis, compuestos hipotéticos.

4 Discusión general

4.1 Diversidad de apocarotenoides de mucorales

Se ha descrito una gran variedad de apocarotenoides en distintos mucorales (Tabla 2, Capítulo 2). Nosotros hemos contribuido con nuevos miembros en las tres familias, trisporoides, ciclofarnesoides y metilhexanoides, en *Phycomyces* y en *Blakeslea*.

Mucor conserva los mismos mecanismos para cortar el β -caroteno (Capítulo 1) que *Phycomyces* y *Blakeslea*. Actualmente mantenemos una colaboración con el Prof. Isidro González y sus colegas químicos de la Universidad de Cádiz para la identificación de apocarotenoides de *Mucor circinelloides*.

En *Mucor circinelloides* es posible usar técnicas de Biología Molecular que nos permiten interrumpir genes y determinar su función. Al inicio de esta tesis interrumpimos el gen de *Mucor circinelloides* homólogo al gen de *Mucor mucedo* que codifica para una presunta deshidrogenasa de apocarotenoides (Schimek *et al.*, 2005), que también tiene homólogo en *Phycomyces* (Polaino, 2009). Hemos comprobado que su interrupción no tiene efectos en el cruzamiento. Combinar los análisis de apocarotenoides de *Mucor circinelloides* con la Biología Molecular facilitaría la investigación de la biosíntesis de β -caroteno y apocarotenoides.

Medina (2013) hizo un estudio exhaustivo en *Phycomyces* de cultivos simples y mixtos de estirpes silvestres y mutantes de cinco días de edad. En estos análisis se detectaron más de cincuenta apocarotenoides por comparación con estirpes mutantes incapaces de producirlos. Estos trabajos tenían un fuerte componente cuantitativo, pero se identificaron pocos compuestos y solo de forma tentativa. Nuestro trabajo posee un carácter más cualitativo y se ha centrado en los compuestos mayoritarios y con estructura identificada.

En cultivos mixtos de *Blakeslea* hemos identificado nuevos metilhexanoides y ciclofarnesoides (Capítulos 1 y 2), pero no encontramos varios de los encontrados en

otras estirpes (Tabla 2). Esto demuestra que los apocarotenoides en los mucorales no difieren solo entre especies sino entre estirpes de la misma especie.

Todo esto nos indica la existencia de una enorme variedad de apocarotenoides de mucorales y que la lista de compuestos identificados aumentará en los próximos años con el análisis de nuevos organismos y la mejora de los sistemas de detección e identificación. Nuestros esquemas en redes o sistemas periódicos para las familias de apocarotenoides (Figuras 28 y 29) facilitarán la predicción y la clasificación de nuevos compuestos.

La biosíntesis de carotenoides y apocarotenoides, como las de los esteroides, las giberelinas y otros metabolitos secundarios, consisten muy mayoritariamente en reacciones oxidativas que en muchos casos consumen directamente oxígeno molecular. Sirven por tanto de defensa a las células contra el estrés oxidativo. Para esta función la estructura de los productos resultantes tiene poca importancia y la enorme variedad de compuestos es más ventajosa que perjudicial. Algunos de estos han adquirido secundariamente funciones en la célula, frecuentemente como señales dentro de los organismos y entre ellos. Para la evolución es difícilísimo seleccionar en favor de señales indetectadas ni de mecanismos de detección de señales inexistentes. Con el tiempo se produce una coevolución entre la señal y el detector que los vuelve más específicos el uno del otro.

4.2 Ruta biosintética de apocarotenoides de *Phycomyces*

Los apocarotenoides identificados se pueden ordenar en tres rutas metabólicas, cada una de la cuales arranca de uno de los tres fragmentos en que se corta inicialmente el β -caroteno (Figura 34). Para construir las se tienen en cuenta las estructuras moleculares identificadas en este trabajo y las producidas en las biotransformaciones. Se ha tratado de minimizar el número total de reacciones, para lo que son útiles los sistemas periódicos descritos en el capítulo 2.

Las rutas metabólicas propuestas deben confirmarse y ampliarse con nuevas identificaciones de apocarotenoides, con nuevas biotransformaciones de sustratos sintéticos y con el estudio de los genes y las enzimas implicados.

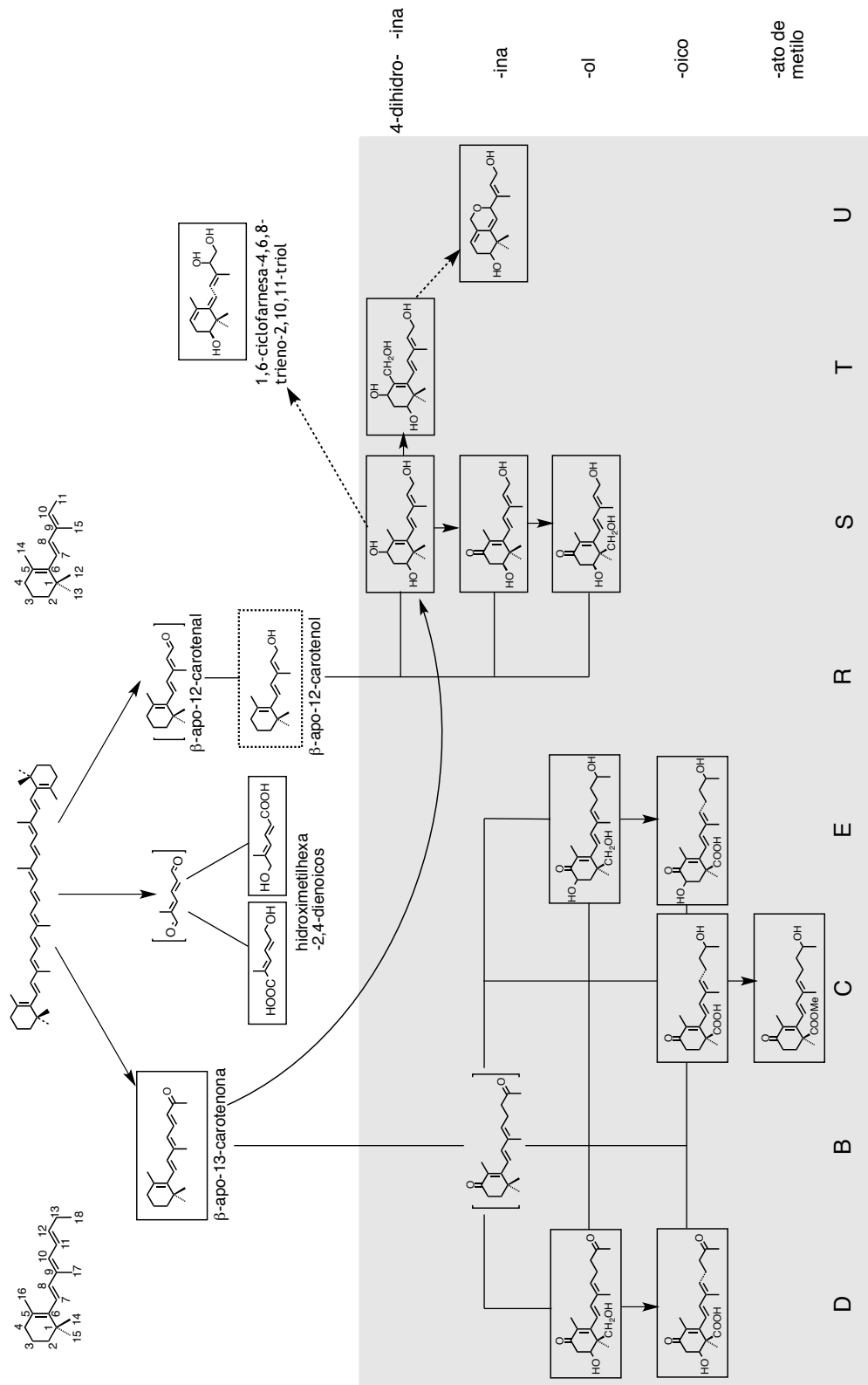


Figura 33. Ruta biosintética de los apocarotenoides de *Phycomyces*. Flechas rectas, reacciones enzimáticas conocidas o muy probables; líneas, posibles vías de la ruta; flecha curva, paso de trisporoides a ciclofarnesoides; flechas discontinuas, posibles reacciones espontáneas; en recuadros, compuestos identificados en esta tesis; en recuadro discontinuo, intermediario hipotético usados en las biotransformaciones; entre corchetes, intermediarios deducidos; en fondo gris, disposición en red o sistema periódico que muestra como contiguos compuestos potencialmente interconvertibles y designados por las reglas de las Figuras 28 y 29 (Capítulo 2).

En nuestros análisis no hay indicios de intercambio de apocarotenoides entre las estirpes de sexos opuestos durante el cruzamiento. Esto debilita la hipótesis de que durante el cruzamiento hay un intercambio de trisporoides entre los sexos, que cooperan para producir los ácidos trispóricos (Sutter, 1987), recogida en numerosos tratados de micología y señalización.

4.3 Feromonas de mucorales

Cada sexo emite una señal específica que tiene que ser un apocarotenoide, como se deduce de que los mutantes carentes de caroteno no estimulan sexualmente a las estirpes silvestres de sexo opuesto, pero son estimuladas por estas (Sutter, 1975). Las feromonas sexuales deben ser apocarotenoides exclusivos de cada sexo.

En trabajos anteriores se sospecharon como posibles candidatos a feromonas del sexo (-) el trisporol B (Medina, 2013) y la trisporina B (Polaino *et al.*, 2012). Los metiltrisporatos C y E han sido propuestos como feromonas del sexo (+) e inductores de la formación de cigóforos en *Phycomyces* (Sutter y Whitaker, 1981a; Drinkard *et al.*, 1982; Miller y Sutter, 1984; Sutter, 1987). Nuestro trabajo debilita estas propuestas, ya que no hemos podido detectar ninguno de estos compuestos en cultivos sencillos de los dos sexos de dos días de edad.

Se forman cigóforos en las puntas de las hifas de un sexo cercanas a las hifas del otro sexo. Es posible que las feromonas sean inestables y poco abundantes, que solo sean detectables cerca del lugar de acción y que por tanto no las hayamos detectado.

4.4 Integración y regulación de las biosíntesis de caroteno y apocarotenoides

4.4.1 Curso temporal

En nuestras condiciones de cultivo la masa seca de *Phycomyces* se estabiliza a partir del cuarto día, cuando se agota la glucosa. El contenido de β -caroteno de los cultivos mixtos aumenta muy despacio a partir del tercer día y alcanza 5,3 mg/L a los 5 días (Kuzina y Cerdá-Olmedo, 2007; Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008). El contenido de apocarotenoides aumenta muy deprisa, incluso después de agotarse la glucosa, y se multiplica por 2,7 durante los días cuarto y quinto de cultivo (Tabla 6). Ambas biosíntesis difieren claramente en cuanto a su curso temporal.

4.4.2 Inducción sexual

Los cultivos mixtos contienen más β -caroteno que los cultivos simples. Este fenómeno, llamado carotenogénesis sexual, ha sido objeto de muchas investigaciones, resumidas en la Sección 0.2.4 de esta tesis. Para los cultivos de tres a cinco días de edad el incremento es de aproximadamente cuatro veces (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976; Kuzina y Cerdá-Olmedo, 2007). Este incremento coincide con el de la capacidad de síntesis en extractos libres de células (Salgado *et al.*, 1991) y con el de la transcripción de los genes estructurales necesarios para la biosíntesis (Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008) y del gen, distinto de *carC*, que codifica para una sintasa de GGPP (Tagua, 2012), precursor de la ruta.

Los apocarotenoides son también más abundantes en los cultivos mixtos que en los simples: unas doce veces en los de cinco días (Medina, 2013) y unas tres veces en los de dos días (Tablas 1, 3 y 4). Tanto la ruta del β -caroteno como su continuación, las de los apocarotenoides, son por tanto inducibles por actividad sexual.

4.4.3 Comparación de flujos metabólicos

La concentración de ácido trispórico se puede estimar a partir de su coeficiente de extinción molar (17×10^3 a 330 nm) y la absorbancia a la misma longitud de onda de los medios de cultivo, una vez deducida la de los mutantes blancos, incapaces de producir β -caroteno. La absorbancia citada es de 7,8 en cultivos mixtos de cinco días y por tanto, la concentración de ácidos trispóricos debe ser de aproximadamente 140 mg/L. Este valor es unas cuarenta veces mayor que el de β -caroteno.

Para estimar la concentración de los demás apocarotenoides tenemos en cuenta los valores relativos de las Tablas 1, 3 y 4 de esta tesis. En cultivos mixtos de cinco días calculamos un total de unos 400 mg/L de apocarotenoides, o sea, algo más de cien veces más que β -caroteno. En cultivos de tres días esa relación es de casi cincuenta veces.

Es preciso por tanto cambiar la visión muy extendida de la *ruta de los carotenos* por el de la *ruta de los apocarotenoides*, en la que el β -caroteno y otros carotenos mucho menos abundantes que él no son más que compuestos muy minoritarios.

El β -caroteno no puede ser relegado al mero papel de intermediario metabólico. Aunque el crecimiento vegetativo de los mutantes blancos es muy parecido al de las

estirpes silvestres y a que, contra lo que podía suponerse, muestran exactamente la misma resistencia a daños oxidativos que las estirpes silvestres o supercoloreadas (Martín-Rojas *et al.*, 1996), el β -caroteno desempeña funciones fisiológicas en la morfogénesis y en las respuestas a la luz (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1990).

Las estirpes de *Blakeslea* que usamos fueron seleccionadas por la Dr. I. N. Obraztsova en nuestro laboratorio por su buena producción de β -caroteno, entre otros caracteres deseables. Sus cultivos mixtos se parecen a los de *Phycomyces* en cuanto a contenido de apocarotenoides, con unos 200 mg/L a los tres días (Tabla 5), pero los aventajan en β -caroteno, con 31 mg/L (Kuzina y Cerdá-Olmedo, 2007), más de seis veces más. También en *Blakeslea*, los apocarotenoides son los productos claramente mayoritarios.

Una situación parecida se da en cultivos sencillos, de un solo sexo. Las mismas fuentes citadas permiten calcular que los cultivos de cinco días de la estirpes silvestre NRRL1555 contienen 0,94 mg/L de β -caroteno y unos 30 mg/L de apocarotenoides.

4.4.4 Agregados enzimáticos y compartimentos subcelulares

Se ha demostrado que las enzimas dedicadas especialmente a la producción de β -caroteno en *Phycomyces* forman agregados enzimáticos de funcionamiento muy ordenado (De la Guardia *et al.*, 1971; Aragón *et al.*, 1976; Candau *et al.*, 1991). Toda la síntesis, desde su primer precursor, el acetato, ocurre en un compartimento especializado, completamente independiente de otro que produce esteroides y ubiquinona (Kuzina *et al.*, 2006); una situación parecida se había demostrado para *Fusarium fujikuroi* (Domenech *et al.*, 1996). Una parte del β -caroteno producido se destina a funciones fisiológicas, descritas en la Sección anterior, y otra parte se almacena en glóbulos coloreados visibles al microscopio (Ripley y Bramley, 1976).

El considerable flujo de caroteno necesario para producir los apocarotenoides debería ser llevado eficazmente del compartimento donde se produce aquel al lugar donde se produzcan estos. Llama la atención que el β -caroteno producido por incubación del micelio con mevalonato marcado radioactivamente conserva su radioactividad durante la subsiguiente incubación en medio no radioactivo, y por tanto no es usado para producir apocarotenoides (Murillo *et al.*, 1981; Bejarano *et al.*, 1992). Los productos inmediatos de la rotura del β -caroteno y los intermediarios de las primeras reacciones de las rutas especializadas de los apocarotenoides no se han

encontrado ni en los análisis de los cultivos (Capítulo 2) ni en los ensayos de biotransformación (Capítulo 3). Estas y otras consideraciones nos llevan a proponer que toda la biosíntesis de β -caroteno y las primeras reacciones, al menos, de las de los apocarotenoides ocurren en el mismo compartimento (Figura 34). Esta propuesta permite imaginar una eficaz transferencia de sustratos a lo largo de muchas reacciones diferentes, con muy escasas pérdidas de intermediarios.

4.4.5 Regulación general de las rutas

Los agentes que estimulan la carotenogénesis en *Phycomyces* forman cuatro grupos con mecanismos de acción separados e independientes (Bejarano *et al.* 1988); un quinto mecanismo puede estar representado por el gen *carF* (Mehta *et al.*, 1997). La interacción sexual aumenta la transcripción de los genes estructurales *carRA* y *carB* (Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008) y de los genes *carS* y *acaA*, responsables de las oxigenasas que cortan el β -caroteno para producir los apocarotenoides (Medina *et al.*, 2011). El estímulo sexual tiene que ser un apocarotenoide, ya que los cultivos mixtos de mutantes *carR* de sexo opuesto contienen el mismo licopeno que los cultivos sencillos y solo lo aumentan si al menos uno de los mutantes es rezumante (Murillo *et al.*, 1978).

Un grupo de agentes carotenogénicos comprende las mutaciones *carRA*, *carB* y *carS* (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976) y los inhibidores químicos de la deshidrogenasa del fitoeno y la ciclasa del licopeno (Bejarano *et al.*, 1987; Candau *et al.*, 1991). Tienen en común el bloqueo de la producción de apocarotenoides y el aumento del contenido de β -caroteno o de sus precursores hasta unos 25 mg/L (Murillo *et al.*, 1981; Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1992; Kuzina *et al.*, 2006). Este aumento no requiere activación de la ruta, sino mera acumulación en el lugar de interrupción, ya que equivale aproximadamente a la cantidad de apocarotenoides que dejan de producirse. Un aumento similar del β -caroteno es producido por el retinol (Eslava *et al.*, 1974) y sus análogos (Cerdá-Olmedo y Hüttermann, 1986), que no tienen sin embargo efecto sobre los mutantes *carB*, *carRA* y *carS*. Esto sugiere que el nivel de β -caroteno en el tipo silvestre depende de un apocarotenoide lo bastante similar al retinol para que este pueda ser su antagonista. Esta regulación actuaría sobre CarA, la sintasa del fitoeno, como indica el aislamiento de dos mutantes que responden muy poco al retinol, uno de ellos del gen *carA* y otro en un gen separado, *carI* (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982).

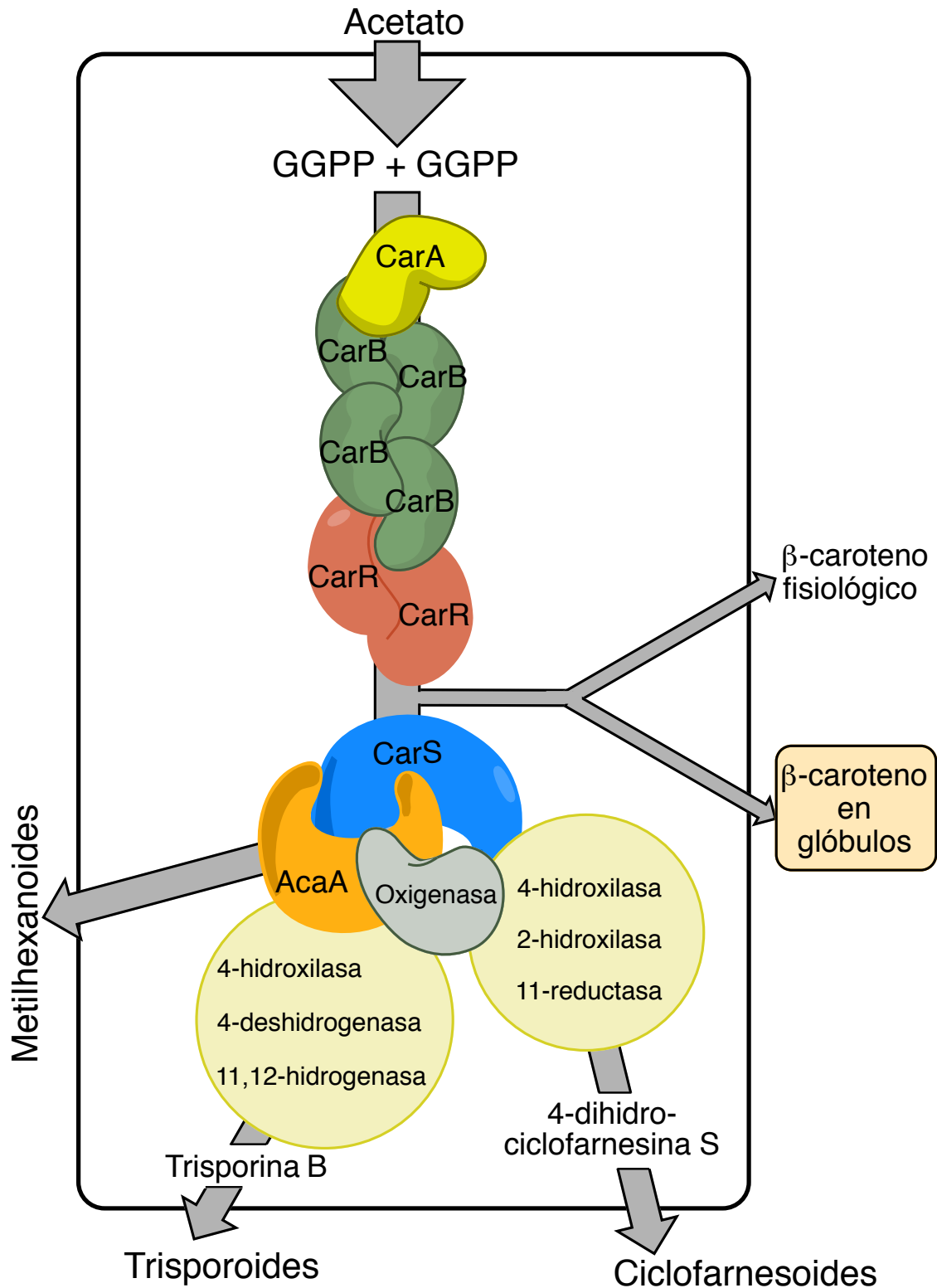


Figura 33. Complejo enzimático hipotético para la síntesis de β -caroteno y apocarotenoides. El β -caroteno es un intermediario y un producto menor de la ruta, que en parte se exporta para cumplir funciones fisiológicas y para almacenarse. Las enzimas propuestas para los primeros pasos de las rutas de los trisporoides y los ciclofarnesoides podrían formar agregados que a su vez podrían estar integrados con los agregados carotenogénicos en mismo compartimento subcelular.

Desde Murillo y Cerdá-Olmedo (1976) se ha propuesto que una retroregulación de la ruta por su producto final, el β -caroteno, mediada por la proteína CarS. Esta hipótesis fue contradicha por el descubrimiento de la función del gen *carS* (Tagua *et al.*, 2012). En su lugar se propuso (Medina, 2013) que el regulador fuera el β -apo-12'-carotenal (C_{25}). Este compuesto es un producto de la acción de CarS sobre el β -caroteno (Medina *et al.*, 2011) y funciona como un intermediario de la ruta (Capítulo 3), pero no se encuentra en nuestros análisis (Capítulo 2), lo que debilita su posible papel regulador.

La interacción sexual, que activa la ruta realmente, aumenta el contenido de β -caroteno, pero más el de apocarotenoides (sección 4.4.2). Su combinación con las mutaciones *carS* y otras interrupciones de la ruta exige mantener un nivel mínimo de apocarotenoides, por rezumancia de la interrupción. Un nivel aún mayor se alcanza introduciendo otras mutaciones. Las estirpes que combinan mutaciones *carS* y *carF* con interacción sexual contienen β -caroteno a unos 250 mg/L a los cuatro días (Mehta *et al.*, 1997). Todos los niveles citados están limitados por la baja concentración de glucosa en el medio, solo 20 g/L, y aumentan en condiciones industriales apropiadas.

5 Materiales y métodos

5.1 Estirpes

5.1.1 Bacterias

Las células de la estirpe DH5 α de *Escherichia coli* se utilizaron para mantener y multiplicar plásmidos. Las células competentes se obtuvieron siguiendo el método descrito por Hanahan (1983), modificado por Inoue *et al.* (1990), y las recomendaciones descritas en el manual de Sambrook *et al.* (2001).

Las proteínas quiméricas se expresan en las células Tuner DE3 (Studier *et al.*, 1990) (Novagen). En estas células el nivel de inducción es alto porque la mutación en la permeasa *lacY* facilita la entrada de isopropil- β -D tiogalactósido (IPTG), un análogo de lactosa. Además, estas células llevan el plásmido pGro7 (Nishihara *et al.*, 1998) (Takara Bio, Chiga, Japan), que ayuda al pliegue correcto de las proteínas porque expresa las chaperonas GroES–GroEL bajo el promotor BAD, inducible por arabinosa.

En los ensayos de actividad enzimática se usaron células TOP10 de *E. coli* que acumulan licopeno o β -caroteno. Las que producen licopeno se obtuvieron por transformación con un plásmido que contenía los genes biosintéticos *crtE*, *crtB* y *crtI* de *Erwinia herbicola* (Hundle *et al.*, 1994; Estrada *et al.*, 2008); para producir β -caroteno el plásmido contenía además el gen *crtY* del mismo microorganismo (Prado–Cabrero *et al.*, 2007b). Ambas estirpes fueron proporcionadas por el Dr. S. Al Babili, del laboratorio del Prof. Dr. P. Beyer, en la Universidad de Friburgo, Alemania.

5.1.2 Mucorales

Las estirpes de mucorales usadas en esta Tesis se indican en la Tabla 9. Su nomenclatura sigue las reglas de Demerec *et al.* (1966).

Tabla 9. Mucorales usados en esta tesis. Los sexos se designan (+) y (-). Los genotipos *car*, *geo* y *mad* designan mutaciones que afectan a la carotenogénesis, el geotropismo y el fototropismo, respectivamente. El genotipo *nicA101* designa la mutación que causa auxotrofia para el ácido nicotínico. En el origen de las estirpes, x separa los parentales de los cruzamientos; * separa los genotipos de los núcleos de los heterocariontes; ng indica exposición a *N*-metil-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidina; esp, mutante espontáneo. Las estirpes se designan con una o más letras mayúsculas según su procedencia. Las estirpes silvestres de *Phycomyces* designadas con NRRL se obtuvieron del Northern Regional Research Laboratory (ahora llamado National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL, EE.UU.). La estirpe A56 procede de la colección del Prof. A. Pérez Eslava, Universidad de Salamanca. La estirpe mutante C5 procede de la colección que tuvo el Prof. Max Delbrück, California Institute of Technology (Pasadena, CA, EE.UU.). Las estirpes mutantes designadas con S son originales de nuestra colección en el Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla. La estirpe M1 procede de la colección del Prof. R. P. Sutter, University of West Virginia (Morgantown, WV, EE.UU.).

Estirpe	Genotipo	Origen	Referencia
<i>Phycomyces blakesleanus</i>			
NRRL1555	(-)	Silvestre	
A56	(+)	Isogénica a NRRL1555	Álvarez <i>et al.</i> , 1983.
C5	<i>carB10 geo-10</i> (-)	NRRL1555ng	Cerdá-Olmedo y Reau, 1970; Gutiérrez-Corona y Cerdá-Olmedo, 1988.
S342	<i>carB10 nicA101</i> (+)	((UBC21 x NRRL1555ng) x NRRL1555ng) x (((UBC21 x NRRL1555ng) x (C9*((UBC21 x NRRL1555ng) x NRRL1555ng) x (C115*NRRL1555ng)))) * (C5esp)	
M1	<i>carS43</i> (+)	NRRL1554ng	Sutter, 1975.
S178	<i>carS153 madB104</i> (-)	(NRRL1555ng)ng	Bejarano <i>et al.</i> , 1988.
<i>Blakeslea trispora</i>			
F921	(-)	Silvestre	
F986	(+)	Silvestre	
<i>Mucor circinelloides</i>			
CBS277.49	(-)	Silvestre	Schipper, 1976

5. 2 Cultivos generales

Las estirpes se cultivaron por separado (cultivos simples) o juntas (cultivos mixtos de estirpes de sexo opuesto) sobre cajas de Petri que contenían 25 mL de agar mínimo (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987) suplementado con extracto de levadura (2 g/L).

Las esporas de *Phycomyces* se activaron a 48 °C durante 15 min. Las cajas se inocularon con 2,5 mL de agar agua que contenían 10⁴ esporas para análisis de apocarotenoides; en el caso de cultivos mixtos fueron la mitad de cada sexo. Las esporas de *Blakeslea* y *Mucor* se inocularon del mismo modo y en la misma concentración que las de *Phycomyces*, pero no requieren activación. Los cultivos se incubaron en oscuridad, a 22 °C los de *Phycomyces*, a 30 °C los de *Blakeslea* y a 26 °C los de *Mucor*. Las muestras se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80 °C.

5.3 Secuencias

Los números de acceso de las secuencias utilizadas para la comparación son AAY89370 para NCED1 de *Citrus sinensis*; Q8LP14 para NCED4 de *Pisum sativum*; AAT68187 para CCD1A y O24023 para NCED1, ambas de *Solanum lycopersicum*; Q94IR2.1 para NCED2 de *Phaseolus vulgaris*; AAX48772 para CCD1 de *Vitis vinifera*; AAT68189 para CCD1 de *Petunia hybrida*; Q84KG5.1 para CCD de *Crocus sativus*; Q93FA4 para SIM14 de *Streptomyces antibioticus*; Q53353 para LSD, Q8RQW2 para LSDA y Q52008 para LSDB, las tres de *Sphingomonas paucimobilis*; Q28175.3 para RPE65 de *Bos taurus*; Q9YGX2.1 para RPE65 de *Gallus gallus*; Q8AXN9.3 para RPE65 de *Cynops pyrrhogaster*; Q9YI25.3 para RPE65 de *Ambystoma tigrinum*; CAD33263 para LCO de *Bixa orellana*; y otras publicadas (Giuliano *et al.*, 2003; Brefort *et al.*, 2011).

Los números de identificación de las proteínas predichas de los Mucorales se tomaron de los genomas de las estirpes NRRL1555 de *Phycomyces blakesleeanus* (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/searchGM?db=Phybl2>); 99-880 de *Rhizopus oryzae* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/rhizopus_oryzae/MultiHome.html) y CBS277.49 de *Mucor circinelloides* (<http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.home.html>).

5.4 Extracción y análisis de apocarotenoides

5.4.1 Obtención de exudados y extracción

El exudado del medio de cultivo se obtuvo por congelación de los cultivos a - 80 °C durante una noche, descongelación a 22 °C durante una hora y presión sobre el agar. Los exudados se filtraron a través de un filtro de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro de poro (Type HA, Millipore). Como el volumen de los exudados es próximo a

la mitad del de los cultivos, las concentraciones en estos se estimaron duplicando las cantidades encontradas en aquellos.

Posteriormente los extractos iniciales se alcalinizaron a pH 8 con KOH 1 mol/L y se extrajeron con acetato de etilo (extractos neutros); el resto se acidificó a pH 2 con HCl y se volvió a extraer con acetato de etilo (extractos ácidos). Los extractos resultantes se evaporaron a 77 °C en un rotaevaporador (R-200, Büchi Labortechnik) conectado a una bomba de vacío (Gast Manufacturing) y se resuspendieron en 1,5 mL de metanol. Posteriormente se secaron en una centrífuga de vacío y se resuspendieron en 50 µL de metanol para su análisis cromatográfico. Todas las manipulaciones se hicieron bajo luz tenue para minimizar la fotodegradación de los apocarotenoides.

5.4.2 Análisis de los apocarotenoides

5.4.2.1 Análisis por cromatografía líquida

Los apocarotenoides se fraccionaron inyectando una alícuota de 20 µl del extracto en metanol en un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC 1100, Hewlett-Packard) equipado con un detector G1315A, un inyector automático de muestras G1313A, una bomba cuaternaria G1311A, un desgasificador G1322A, una precolumna de 12,5 mm (Agilent Technologies) y una columna de 250 mm (Waters Corporation), ambas de 4,6 mm de diámetro y rellenas de partículas de gel de sílice de 5 µm recubiertas con octadecilsilano (C18, Spherisorb-ODS2). Las muestras se eluyeron a temperatura ambiente con un flujo de 1 ml/min de metanol y agua mezclados (1:4 en vol.) durante los primeros 6 min y sucesivamente en gradiente lineal hasta llegar a metanol puro a los 25 min, metanol puro hasta los 40 min y en gradiente lineal hasta volver a la mezcla inicial a los 45 min.

5.4.2.2 Análisis de apocarotenoides en LC-MS

Los apocarotenoides se fraccionaron inyectando 5 µL del extracto en metanol en un cromatógrafo líquido de alta presión (Agilent 1200), usando la columna descrita en el apartado anterior, mantenida a 25°C y con un flujo constante de 1 ml/min. Los solventes y sus tiempos de uso están descritos en el apartado anterior. A los solventes se

les añadió ácido trifluoracético 0,1 ml/L. Los espectros de absorción de 200 a 900 nm se obtuvieron con un conjunto de diodos.

El espectrómetro de masas (Bruker maXis HR-QTOF) se acopló al cromatógrafo descrito en el párrafo anterior. Los solventes de elución se separaron con un separador estático y la ionización se realizó con un flujo de gas de secado de 11 L/min a 200°C y un nebulizador de presión a 0,38 MPa. El voltaje de capilaridad se ajustó a 4000 V. Se colectaron los espectros de masa de 50 m/z a 700 m/z en modo positivo.

5.5 Clonación

Los oligonucleótidos utilizados para las clonaciones (Tabla 10) se diseñaron con los programas Oligo Calc (Oligonucleotide Properties Calculator) (Kibbe, 2007) y Primer Express (Applied Bio systems, Warrington, Reino Unido).

Tabla 10. Cebadores utilizados en esta Tesis. D y R, secuencias directa y reversa.

Cebador	secuencia	gen
mucarS-D	5'-CATGATCACTCCCGCTGAAG-3'	carS
mucarS-R	5'- TTAATTGACGGCAATGCCTC -3'	carS
muacaS-D	5'- CAAGATGATTGTAGGATTGCTTAC -3'	acaA
muacaA-R	5'- CATTTTAATTGATATTGATAGAC -3'	acaA
mu114475-D	5'- CATGTCTGATTTGAACAAGGTC -3'	114475
mu114475-R	5'- CTCTAGTTTTCTCGAAGTCG -3'	114475

El ADNc total, usado para rastrear los genes *carS*, *acaA* y *114475* de *Mucor*, fue sintetizado a partir de ARNm aislado de micelio cultivado sobre agar mínimo durante 48 h en oscuridad y expuesto a luz azul 17 kJ/m² durante 30 min (Rodríguez-Romero y Corrochano, 2004).

Los tres genes se amplificaron por PCR con la enzima Expand High Fidelity (Roche, Mannheim, Alemania) (Barnes, 1994). La mezcla de reacción se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante y las recomendaciones del manual de Sambrook *et al.* (2001). La amplificación se llevó a cabo aplicando 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 50-53 °C, y 90 s a 72 °C, seguidos de 5 min a 72 °C, en un termociclador Techne FTC3/02 (Bibby Scientific, Stone, Staffs., Reino Unido).

Los productos de PCR se fraccionaron por electroforesis en gel de agarosa (8 g/L) y se purificaron siguiendo el protocolo Illustra GFX (Vogelstein y Gillespie, 1979) (GE Healthcare).

Los productos de PCR purificados se ligaron por separado al plásmido pGEM-T Easy (Promega) con ligasa de T4 (Promega), siguiendo las recomendaciones del manual de Sambrook *et al.* (2001).

Las construcciones pGEM-T Easy-*carS* (4893 pb), pGEM-T Easy-*acaA* (4780 pb) y pGEM-T Easy-114475 (5204 pb) se utilizaron para transformar por separado células de la estirpe DH5 α de *E. coli*. La introducción de las construcciones, por choque térmico, y la selección de transformantes se llevó a cabo como se describe en el manual de Sambrook *et al.* (2001). Varios presuntos transformantes se inocularon por separado en 3 mL de medio LB con ampicilina 100 mg/L. El cultivo se incubó a 37 °C en agitación, a 250 rpm, toda la noche. La suspensión de células se concentró por centrifugación a 12000 x g durante 5 min, se mezcló con glicerol estéril (85:15 en vol.), se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

El ADN plasmídico se aisló con el protocolo Wizard Plus SV Minipreps (Guntelberg y Otteson, 1954; Aehle *et al.*, 1993) (Promega) y se corroboró por secuenciación.

5.6 Construcción de plásmidos

Todas las reacciones se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del manual de Sambrook *et al.* (2001).

Los genes *carS*, *acaA* y 114475 se obtuvieron de los plásmidos pGEM-T Easy-*carS*, pGEM-T Easy-*acaA* y pGEM-T Easy-114475, respectivamente, por digestión con SacII y Ecl136II y se insertó cada uno en un plásmido pBAD-Thio-Topo (LaVallie *et al.*, 1993) (Invitrogen), dando los plásmidos pThio=CarS (6467 pb), pThio=AcaA (6354 pb) y pThio=114475 (6778 pb). Estos vectores expresan en *E. coli* bajo el promotor BAD una quimera de tiorredoxina y la proteína clonada, lo que aumenta la solubilidad de esta.

5.7 Producción heteróloga de enzimas

5.7.1 Expresión heteróloga

Los plásmidos de expresión se usaron para transformar células Tuner DE3 (Studier *et al.*, 1990) (Novagen). Una muestra de 1 µg de ADN plasmídico se añadió a 100 µL de células competentes. La mezcla se mantuvo en hielo durante 30 min y se esparció sobre cajas de Petri (8 mm de diámetro interno) que contenían 25 mL de agar LB con ampicilina 100 mg/L y cloranfenicol 20 mg/L y se incubó a 37 °C toda la noche. Una colonia de células transformantes se inoculó en 4 mL del mismo medio selectivo, se incubó a 37 °C en agitación, a 150 rpm, toda la noche, se vertió en un matraz que contenía 50 mL de medio 2YT (Sambrook *et al.*, 2001) suplementado con arabinosa 100 mg/L, ampicilina 50 mg/L y cloranfenicol 10 mg/L y se incubó a 28 °C en agitación (180 rpm) hasta alcanzar 0,5–0,7 de densidad óptica a 600 nm. Para inducir las proteínas quiméricas se añadieron 10 µL de IPTG 1 mol/L y se mantuvieron las condiciones durante 6 h. Las células se recuperaron por centrifugación a 9000 × g durante 5 min en una Sorvall RCSC (Thermo Electro Corporation) y se almacenaron a –20 °C.

5.7.2 Obtención de lisados crudos

Para obtener los lisados crudos se suspendió la biomasa de 50 mL de cultivo en 1 mL de reactivo de Lew (NaH₂PO₄ 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, lisozima 1 g/L (Carl Roth), ditiotreititol 1 mmol/L y Triton X-100 1 mL/L, a pH 8), se mantuvo en hielo durante 30 min y se lisó con ultrasonidos (tres pulsos de 30 s, Bradson Sonifier 250). Los restos celulares se separaron por centrifugación a 12000 × g a 4 °C durante 30 min en una Eppendorf 5810 (Eppendorf AG). El sobrenadante se recuperó y se mantuvo en hielo.

5.8 Ensayos enzimáticos *in vitro*

5.8.1 Sustratos

Las muestras de isómeros *trans* de β-apo-8'-carotenal (C₃₀), β-apo-10'-carotenal (C₂₇), apo-12'-licopenal (C₂₅), β-apo-14'-carotenal (C₂₂) y

β -apo-15'-carotenal (C₂₀), proporcionadas generosamente por BASF y el β -caroteno y el licopeno (Sigma-Aldrich) se purificaron por cromatografía en capa fina en placas de óxido de silicio (20 × 20 cm, Merck) colocadas en cubetas de vidrio (Desaga) con una mezcla de éter de petróleo/dietiléter/acetona (4:4:1 en vol.) como fase móvil. Para otros detalles ver Ruch *et al.* (2005).

La zeaxantina se purificó de *Synechocystis sp.* PCC 6803 (Scherzinger y Al-Babili, 2008).

El β -apo-12'-carotenal, un C₂₅, se extrajo con acetona/metanol (7:3 en vol.) de células de *E. coli* superproductoras de β -caroteno que se transformaron con pThio=CarS y se purificó por cromatografía en capa fina en una mezcla de éter de petróleo/dietiléter/acetona (40:10:7 en vol.).

Los sustratos se cuantificaron a partir de sus coeficientes de extinción (Barua y Olson, 2000; Davies, 1976). La absorbancia se midió en un espectrofotómetro CPS-240 A (Shimadzu Corporation).

5.8.2 Ensayos

Se siguieron técnicas precedentes (Scherzinger y Al-Babili, 2008; Scherzinger *et al.*, 2006) con algunas variaciones: repurificación del licopeno y el apo-12'-licopenal (Prado-Cabrero *et al.*, 2007b); la mezcla de 50 μ L de sustrato con 50 μ L de lisado crudo en 200 μ L de mezcla de reacción se incubó a 28 °C en un agitador Thermomixer 21516 (Eppendorf) a 200 rpm y oscuridad durante 4 h; extracción con 0,6 mL de benceno/dietiléter (1:4 en vol.) y disolución final en 70 μ L de triclorometano.

Los productos se analizaron por cromatografía líquida (Scherzinger y Al-Babili, 2008; Scherzinger *et al.*, 2010) eluyendo con soluciones A (metanol/2-metoxi-2-metilpropano, 1:1 en vol.) y B (metanol/2-metoxi-2-metilpropano/agua, 30:1:10 en volumen).

5.9 Ensayos en células de *E. coli* que contienen carotenoides

Las construcciones pThio se transformaron en células TOP10 de *E. coli* que acumulan licopeno y β -caroteno, respectivamente, como se describe más arriba (apartado 5.7.1).

Los cultivos se vertieron en 50 mL de medio LB con ampicilina 50 mg/L o kanamicina 25 mg/L y se incubaron a 28 °C en agitación (150 rpm) hasta alcanzar de 0,5–0,7 de densidad óptica a 600 nm.

La expresión de las proteínas quiméricas se indujo con L-arabinosa 2 g/L. Se incubaron a 28 °C en agitación (150 rpm) durante al menos 6 h antes de cosechar las células.

La biomasa resuspendida en 5 mL de agua destilada se mezcló y agitó con 7 mL de metanol/triclorometano (1:2 en vol.), se lisó con ultrasonidos y se centrifugó dos veces a 9000 x g durante 5 min en una Sorvall RCSC, descartando el precipitado. Para el licopeno se usó metanol/acetona (10 mL, 3:7 en vol.) en la primera centrifugación y éter de petróleo en la segunda. En ambos casos el sobrenadante se secó por evaporación rotatoria a baja presión y el extracto se disolvió en 1 mL triclorometano; se volvió a centrifugar a 12000 x g durante 1 min y a secar y el producto se disolvió en 50 µL de triclorometano.

Los productos se analizaron por cromatografía líquida seguida de otra cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (Scherzinger y Al-Babili, 2008; Scherzinger *et al.*, 2010). Las dos cromatografías difirieron en la columna y en los solventes. En la primera cromatografía los solventes A y B fueron los del apartado 5.9.2, pero con mezcla 10:1:9 en B. En la segunda ambos solventes fueron metanol/2-metoxi-2-metilpropano/agua, con mezcla 10:1:9 en A y 27:70:3 en B.

5.10 Ensayos de biotransformación de apocarotenoides

Los cultivos incubados 2 días en oscuridad a 22 °C en cajas de Petri con 25 ml de medio mínimo suplementado con 2 g de extracto de levadura se inocularon con 1 mg de precursor disuelto en metanol y mezclado con 2 ml de agua destilada y se extendieron sobre el micelio con un esparcidor de vidrio. Posteriormente se incubaron un día en oscuridad a 22 °C y se congelaron a - 80 °C hasta su análisis cromatográfico.

Bibliografía

- Abdel-Aal, E.S.M., Akhtar, H., Zaheer, K. y Ali, R. (2013) Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. *Nutrients* 5: 1169–1185.
- Aehle, W., Sobek, H., Amory, A., Vetter, R., Wilke, D. y Schomburg, D. (1993) Rational protein engineering and industrial application: structure prediction by homology and rational design of protein-variants with improved ‘washing performance’–the alkaline protease from *Bacillus alcalophilus*. *J. Biotechnol* 28: 31–40.
- Agardh, C. A. (1817) Synopsis algarum Scandinaviae, adjecta dispositione universali algarum. Ex. Officina Berlingiana, Lundae, p. 46.
- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., López, R.C. y Gómez-Gómez, L. (2010) The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors. *J Exp Bot* 61: 105–109.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. y Blackwell, M. (1996) Introductory mycology.
- Almeida, E.R.A. y Cerdá-Olmedo, E. (2008) Gene expression in the regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Curr Genet* 53: 129-137.
- Alvarez, M.I., Ootaki, T. and Eslava, A.P. (1983) Mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism induced by ICR-170. *Mol Gen Genet* 191: 507–511.
- Aragón, C.M.G., Murillo, F.J., De la Guardia, M.D. y Cerdá-Olmedo E. (1976). An enzyme complex for dehydrogenation of phytoene in *Phycomyces*. *Eur J Biochem* 63: 7175.
- Arrach, N., Fernández-Martín, R., Cerdá-Olmedo, E. y Avalos, J. (2001) A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1687–1692.
- Auldridge, M.E., McCarty, D.R. y Klee, H.J. (2006) Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol* 9: 315–321.

- Austin, D.J., Bu'Lock, J.D. y Winstanley, D.J. (1969) Trisporic acid biosynthesis and carotenogenesis in *Blakeslea trispora*. *Biochem J* 113: 34.
- Austin, D.J., Bu'Lock, J.D. y Drake, D. (1970) The biosynthesis of trisporic acids from β -carotene via retinal and trisporol. *Experientia* 26: 348-349.
- Barnes, W.M. (1994) PCR amplification of up 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2216-2220.
- Barnett, H.L., Lilly, V.G. y Krause, R.F. (1956) Increased production of carotene by mixed (+) and (-) cultures of *Choanephora cucurbitarum*. *Science* 123: 141.
- Barrero, A.F., Herrador, M.M., Arteaga, P., Gil, J., González, J.A., Alcalde, E. y Cerdá-Olmedo E. (2011) New apocarotenoids and β -carotene cleavage in *Blakeslea trispora*. *Org Biomol Chem* 9: 7190-7195.
- Barrero, A.F., Oltra, J.E. y Poyatos, J.A. (1996) Acidic metabolites from *Phycomyces blakesleeanus*. *Phytochemistry* 42: 1427-1433
- Barua, A.B. y Olson J. A. (2000) β -carotene is converted primarily to retinoids in rats *in vivo*. *J Nutr* 130: 1996-2001.
- Bejarano, E.R., Avalos, J., Lipson, E.D. y Cerdá-Olmedo, E. (1991) Photoinduced accumulation of carotene in *Phycomyces*. *Planta* 183: 1-9.
- Bejarano, E.R. y Cerdá-Olmedo, E. (1992) Independence of the carotene and sterol pathways of *Phycomyces*. *FEBS Lett* 306: 209-212.
- Bejarano, E.R., Parra, F., Murillo, F.J. y Cerdá-Olmedo, E. (1988) End-product regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Arch Microbiol* 150: 209-214.
- Bergman, K., Eslava, A.P. y Cerdá-Olmedo, E. (1973). Mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism. *Mol Gen Genet* 123: 116.
- Blakeslee, A.F. (1904) Sexual reproduction in the Mucorineae. *Proc Amer Acad Arts Sci* 40: 205-319.
- Blakeslee, A.F. (1906) Zygosporic germinations in the Mucorineae. *Ann Mycol* 4: 1-28.

- Bouvier, F., Dogbo, O. y Camara, B. (2003a) Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science* 300: 2089–2091.
- Bouvier, F., Suire, C., Mutterer, J. y Camara, B. (2003b) Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: Identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD y CsZCD genes involved in *Croccus* secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell* 15: 47–62.
- Bouvier, F., Isner, J.C., Dogbo, O. y Camara, B. (2005) Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. *Trends Plant Sci* 10: 187–194.
- Brefort, T., Scherzinger, D., Limón, M.C., Estrada, A.F., Trautmann, D., Mengel, C., Avalos, J. y Al-Babili, S. (2011) Cleavage of resveratrol in fungi: Characterization of the enzyme Rco1 from *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* 48: 132–143.
- Bu'Lock, J.D., Drake, D. y Winstanley, D.J. (1972) Specificity and transformations of the trisporic acid series of fungal sex hormones. *Phytochem* 11: 2011–2018.
- Bu'Lock, J.D., Jones, B.E. y Winstanley, N. (1976) The apocarotenoid system of sex hormones and prohormones in Mucorales. *Pure & Appl Chem* 47: 191–202.
- Burgeff, H. (1925) Über Arten und Artkreuzung in der Gattung *Phycomyces kunze*. *Flora*. 118–119: 40–46.
- Burgeff, H. (1912) Über Sexualität, Variabilität und Vererbung bei *Phycomyces nitens*. *Ber Dtsch Bot Ges* 30: 679–685.
- Burgeff, H. (1924) Untersuchungen über Sexualität und Parasitismus bei Mucorineen. *Bot. Abh* 4: 1–135.
- Burgeff, H. (1928) Variabilität, Vererbung und Mutation bei *Phycomyces blakesleeanus* Bgff. *Z Vererbungslehre* 49: 26–94.
- Caglioti, L., Cainelli, G., Camerino, B., Mondelli, R., Prieto, A., Quilico, A., Salvatori, T. y Selva, A. (1966) The structure of trisporic-C acid. *Tetrahedron Suppl* 22: 175–187.
- Cainelli, G., Grasselli, P. y Selva, A. (1967) Structure of trisporic acid B. *Chim Ind (Milan)*, 49: 628–629.

- Carnoy, J.B. (1870) Recherches anatomiques et physiologiques sur les champignons. *Bull Soc R Bot Belg* 9: 157-321.
- Cerdá-Olmedo, E. (2001) *Phycomyces* and the biology of light and color. *FEMS Microbiol Rev* 25: 503-512.
- Cerdá-Olmedo, E. y Corrochano, L.M. (2001) Genetics of *Phycomyces* and its responses to light. In: Photomovement (Häder, D.P. and Lebert, M., Ed.), pp. 589-620. Elsevier Science.
- Cerdá-Olmedo, E. y Hüttermann, A. (1986). Förderung und Hemmung der Carotinsynthese bei *Phycomyces* durch Aromaten. *Angew Botanik* 60: 59-70.
- Cerdá-Olmedo, E. y Lipson, E.D. (1987) *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Cerdá-Olmedo, E. y Reau, P. (1970) Genetic classification of the letal effects of various agents on heterokaryotic spores of *Phycomyces*. *Mutat Res* 9: 369-384.
- Ciegler, A. (1965) Microbial carotenogenesis. *Adv Appl Microbiol* 7: 1-35.
- Corrochano, L.M. y Cerdá-Olmedo, E. (1990) Photomorphogenesis in behavioural and colour mutants of *Phycomyces*. *J Photoch Photobio B* 6: 325-335.
- Corrochano, L.M. y Cerdá-Olmedo, E. (1992) Sex, light and carotenes: the development of *Phycomyces*. *Trends Genet* 8: 268-274.
- Corrochano, L.M. y Garre, V. (2010) Photobiology in the Zygomycota: Multiple photoreceptor genes for complex responses to light. *Fungal Genet Biol* 47: 893-899.
- Davies, B.H. (1976) Carotenoids. In: Goodwin TW (ed) Chemistry and biochemistry of plant pigments, Academic Press, London, 2: 38-165.
- De la Guardia, M.D., Aragón, C.M.G., Murillo, F.J. y Cerdá-Olmedo, E. (1971) A carotenogenic enzyme aggregate in *Phycomyces*: evidence from quantitative complementation. *Proc Natl Acad Sci* 68: 2012-2015.
- Demerec, M., Adelberg, E.A., Clark, A.J. y Hartman, P.E. (1966) A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* 54: 61-76.

- Drinkard, L.C., Nelson, G.E. y Sutter, R.P. (1982) Growth arrest: a prerequisite for sexual development in *Phycomyces blakesleeanus*. *Exp Mycol* 6: 52–59.
- Ershov, I.V., Dmitrovskii, A.A. y Bykhovskii, V. (1993) Properties of beta-carotene-15, 15'-dioxygenase, stabilized during purification with lutein and dithiothreitol. *Biokhimiia* 58: 416–423.
- Eslava, A.P. y Cerdá-Olmedo, E. (1974) Genetic control of phytoene dehydrogenation in *Phycomyces*. *Plant Sci Lett* 2: 9–14.
- Eslava, A.P., Álvarez, M.I. y Cerdá-Olmedo, E. (1974) Regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces* by vitamin A and β -ionone. *Eur J Biochem* 48: 617–623.
- Estrada, A.F., Brefort, T., Mengel, C., Díaz-Sánchez, V., Alder, A., Al-Babili, S., Avalos, J. (2009) *Ustilago maydis* accumulates β -carotene at levels determined by a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Fungal Genet Biol* 46: 803–813.
- Estrada, A.F., Maier, D., Scherzinger, D., Avalos, J. y Al-Babili, S. (2008) Novel apocarotenoid intermediates in *Neurospora crassa* mutants imply a new biosynthetic reaction sequence leading to neurosporaxanthin formation. *Fungal Genet Biol* 45: 1497–1505.
- Eugster, C.H. y Märki-Fischer, E. (1991) The chemistry of rose pigments. *Angew Chem Int* 30: 654–672.
- Fester, T., Hause, B., Schmidt, D., Halfmann, K., Schmidt, J., Wray, V., Hanse, G. y Strack, D. (2002) Occurrence and localization of apocarotenoids in arbuscular mycorrhizal plant roots. *Plant Cell Physiol* 43: 256–265.
- Finkelstein, R., Gampala, S. L. y Rock, D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14: 15–45.
- Fraser P.D., y Bramley P.M. (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* 43: 228–265.
- Galland, P. y Lipson, E.D. (1984) Photophysiology of *Phycomyces blakesleeanus*. *Photochem Photobiol* 40: 795–800.

- Gelb, M.H., Brunsveld, L., Hrycyna, C.A., Michaelis, S., Tamanoi, F., Van Voorhis, W.C. y Waldmann, H. (2006) Therapeutic intervention based on protein prenylation and associated modifications. *Nat Chem Biol* 2: 518–528.
- Giuliano, G., Al-Babili, S. y von Lintig, J. (2003) Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. *Trends Plant Sci* 8: 145–149.
- Goodwin, T.W. y Lijinski, W. (1951). Studies in carotenogenesis: 2. Carotene production by *Phycomyces blakesleeanus*; the effect of different amino-acids when used in media containing low concentrations of glucose. *Biochem J* 50: 268–273.
- Govind, N.S. y Cerdá-Olmedo, E. (1986) Sexual activation of carotenogenesis in *Phycomyces blakesleeanus*. *J Gen Microbiol* 132: 2775–2780.
- Guntelberg, A.V. y Ottesen, M. (1954) Purification of the proteolytic enzyme from *Bacillus subtilis*. *Compt Rend Trav Lab Carlsberg* 29: 36.
- Gutiérrez-Corona, F. y Cerdá-Olmedo, E. (1988) Genetic determination of sporangiophore development in *Phycomyces*. *Dev Genet* 9: 733–741.
- Gutiérrez, A., López-García, S., y Garre, V. (2011) High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *J Microbiol Meth* 84: 442–446.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J Mol Biol* 166: 557–580.
- Hawksworth, D.L. (1995) The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95:641-655
- Huang, F.C., Horvath, G., Molnar, P., Turcsi, E., Deli, J., Schrader, J., Sandmann, G., Schmidt, H. y Schwab, W. (2009) Substrate promiscuity of RdCCD1, a carotenoid cleavage oxygenase from *Rosa damascena*. *Phytochemistry* 70: 457–464.
- Hundle, B., Alberti, M., Nievelstein, V., Beyer, P., Kleinig, H., Armstrong, G.A., Burke, D.H. y Hearst, J.E. (1994) Functional assignment of *Erwinia herbicola* Eho10 carotenoid genes expressed in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 245: 406–416.

- Inomata, M., Hirai, N., Yoshida, R. y Ohigashi, H. (2004) The biosynthetic pathway to abscisic acid via ionylideneethane in the fungus *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 65: 2667–2678.
- Inoue, H., Nojima, H. y Okama, H. (1990) High efficiency transformation of with plasmids. *Gene* 96: 23–28.
- Iturriaga, E.A., Velayos, A., Eslava, A.P. y Alvarez, M.I. (2001) The genetics and molecular biology of carotenoid biosynthesis in *Mucor*. *Recent Res Dev Genet* 1: 79–92.
- Iturriaga, E.A., Papp, T., Breum, J., Arnau, J. y Eslava, A.P. (2005) Strain and culture conditions improvement for β -carotene production with *Mucor*. En: *Methods in Biotechnology : Microbial Processes and Products*. J.L. Barredo (Ed.), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA 18: 239–256.
- Kamoda, S., Terada, T. y Saburi, Y. (2003) A common structure of substrate shared by lignostilbenedioxygenase isozymes from *Sphingomonas paucimobilis* TMY1009. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1394–1396.
- Khrabrova, A.M. y Zhdanov, V.G. (1979) Study of sex defective *Blakeslea trispora* mutants. *Mikrobiologiya* 48: 863–866.
- Kibbe, W.A. (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* 35: 43–46.
- Kiefer, C., Hessel, S., Lampert, J.M., Vogt, K., Lederer, M.O., Breithaupt, D.E. y von Lintig, J. (2001) Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J Biol Chem* 276: 14110–14116.
- Kiser, P.D., Golczak, M., Lodowski, D.T., Chance, M.R. y Palczewski, K. (2009) Crystal structure of native RPE65, the retinoid isomerase of the visual cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 17325–17330.
- Klingner, A., Bothe, H., Wray, V. y Marner, F.J. (1995) Identification of a yellow pigment formed in maize roots upon mycorrhizal colonization. *Phytochemistry* 38: 53–55.

- Kloer, D. y Schulz, G. (2006) Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cell Mol Life Sci* 63: 2291–2303.
- Kunze, G. (1823) *Phycomyces*, *Mycologische Hefte* 2: 113–116.
- Kuzina, V. y Cerdá-Olmedo, E. (2007) Ubiquinone and carotene production in the Mucorales *Blakeslea* and *Phycomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 991–999.
- Kuzina, V., Domenech, C. y Cerdá-Olmedo, E. (2006) Relationships among the biosyntheses of ubiquinone, carotene, sterols, and triacylglycerols in Zygomycetes. *Arch Microbiol* 186: 485–493.
- Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W. y Croteau, R. (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci* 97: 13172–13177.
- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. y McCoy, J.M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnol* 11: 187–193.
- Lee, P. y Schmidt-Dannert, C. (2002) Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 1–11.
- Leuenberger, M.G., Engeloch-Jarret, C. y Woggon, W.D. (2001) The reaction mechanism of the enzyme-catalyzed central cleavage of beta-carotene to retinal. *Angew Chem Int* 40: 2613–2617.
- Li, C.H., Cervantes, M., Springer, D.J., Boejhout, T., Ruiz-Vázquez, R. M., Torres-Martínez, S.R., Heitman, J. y Lee, S.C. (2011) Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog* 7:e1002086.
- Lindqvist, A. y Anderson, S. (2002) Biochemical properties of purified recombinant human beta-carotene 15,15'-monooxygenase. *J Biol Chem* 277: 23942–23948.
- Lorca-Pascual, J.M., Murcia-Flores, L., Garre, V., Torres-Martínez, S.R. y Ruiz-Vázquez, R.M. (2004) The RING-finger domain of the fungal repressor *crgA* is essential for accurate light regulation of carotenogenesis. *Mol Microbiol* 52: 1463–1474.

- Mackinney, G., Nakayama, T. y Chichester, C.O. (1956) On the biosynthesis of carotenoids. *J Biol Chem* 220: 759.
- Mackinney, G., Nakayama, T., Buss, C.D. y Chichester, C.O. (1952) Carotenoid production in *Phycomyces*. *J Am Chem Soc* 74: 3456.
- Maicas, S. y Mateo, J.J. (2005) Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 322–335.
- Martín-Rojas, V., Gómez-Puerto, A. y Cerdá-Olmedo, E. (1996) Lack of protection by carotenes against gamma-radiation damage in *Phycomyces*. *Radiation and Environmental Biophysics* 35, 193–197.
- Massart, J. (1888) Recherches sur les organismes inférieurs 1. La loi de Weber vérifiée pour l'héliotropisme du champignon. *Bull Acad R Sci Belg* 3: 590-601.
- McGarvey, D.J. y Croteau, R. (1995) Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1015–1026.
- Medina, H.R., Cerdá-Olmedo, E. y Al-Babili, S. (2011) Cleavage oxygenases for the biosynthesis of trisporoids and other apocarotenoids in *Phycomyces*. *Mol Microbiol* 1365–2958.
- Medina, H.R. (2013). Biosíntesis de apocarotenoides en *Phycomyces blakesleanus*. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- Mehta, B.J., Obratsova, I.N. y Cerdá-Olmedo, E. (2003) Mutants and intersexual heterokaryons of *Blakeslea trispora* for production of β -carotene and lycopene. *Appl Environ Microbiol* 69: 4043–4048.
- Mehta, B.J. y Cerdá-Olmedo, E. (1995) Mutants of carotene production in *Blakeslea trispora*. *Appl Microbiol Biotechnol* 42: 836–838.
- Mehta, B.J. y Cerdá-Olmedo, E. (2001) Intersexual partial diploids of *Phycomyces*. *Genetics* 158: 635–641.
- Mehta, B.J., Salgado, L.M., Bejarano, E.R. y Cerdá-Olmedo, E. (1997) New mutants of *Phycomyces blakesleanus* for β -carotene production. *Appl Environ Microbiol* 63: 3657–3661.

- Mendes-Pinto, M.M. (2009) Carotenoid breakdown products: the “norisoprenoids” in wine aroma. *Arch Biochem Biophys* 483: 236–245.
- Messing, S.A.J., Gabelli, S.B., Echeverría, I., Vogel, J.T., Guan, J.C., Tan, B.C., Klee, H.J., McCarty, D.R. y Amzel, L.M. (2010) Structural insights into maize viviparous14, a key enzyme in the biosynthesis of the phytohormone abscisic acid. *Plant Cell* 22: 2970–2980.
- Miller, M.L. y Sutter, R.P. (1984) Methyl trisporate E. A sex pheromone in *Phycomyces blakesleeanus*. *J Biol Chem* 259: 6420–6422.
- Moraga, A.R., Rambla, J.L., Ahrazem, O., Granell, A. y Gómez-Gómez, L. (2009) Metabolite and target transcript analyses during *Crocus sativus* stigma development. *Phytochemistry* 70: 1009–1016.
- Murillo, F.J., Calderón, I.L., López-Díaz, I. y Cerdá-Olmedo, E. (1982) B-carotene producing strains of the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. Patent 4, 318, 987, U.S. Patent Office, 9 de marzo 1982.
- Murillo, F.J. y Cerdá-Olmedo, E. (1976) Regulation of carotene synthesis in *Phycomyces*. *Mol Gen Genet* 148: 19–24.
- Murillo, F.J., Torres-Martínez, S.R., Aragón, C.M y Cerdá-Olmedo, E. (1981) Substrate transfer in carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Eur J Biochem* 119: 511–516.
- Nambara, E. y Marion-Poll, A. (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Ann Rev Plant* 56: 165–185.
- Navarro, E., Lorca-Pascual, J.M., Quiles-Rosillo, M., Nicolás, F.E., Garre, V., Torres-Martínez, S.R. y Ruiz-Vázquez, R.M. (2001) A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Mol Genet Genomics* 266: 463–470.
- Nicolás, F., Torres-Martínez, S.R. y Ruiz-Vázquez, R.M. (2003) Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *EMBO J* 22: 3983 - 3991.
- Nieuwenhuis, M. y Van den Ende, H. (1975) Sex specificity of hormone synthesis in *Mucor mucedo*. *Arch Microbiol* 102: 167–169.

- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H. y Yura, T. (1998) Chaperone coexpression plasmids: Differential and synergistic roles of DnaK–DnaJ–GrpE and GroEL–GroES in assisting folding of an allergen of japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 64: 1694–1699.
- North, H.M., De Almeida, A., Boutin, J.P., Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B. y Marion–Poll, A. (2007) The *Arabidopsis* ABA–deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress–induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J* 50: 810–824.
- Nyilasi, I., Acs, K., Papp, T., Nagy, E. y Vagvolgyi, C. (2005) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Mucor circinelloides*. *Folia Microbiol (Praha)* 50: 415–420.
- Ohmiya, A. (2009) Carotenoid cleavage dioxygenases and their apocarotenoid products in plants. *Plant Biotechnol* 26: 351–358.
- Orlowski, M. (1991) *Mucor* Dimorphism. *Microbiol Rev* 55: 234–258.
- Polaino, S. (2009) Apocarotenoides en la interacción sexual de *Phycomyces*. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- Polaino, S., González–Delgado, J.A., Arteaga, P., Herrador, M.M., Barrero, A.F. y Cerdá–Olmedo, E. (2012) Apocarotenoids in the sexual interaction of *Phycomyces blakesleeanus*. *Org Biomol Chem* 10: 3002–3009.
- Polaino, S., Herrador, M.M., Cerdá–Olmedo, E. y Barrero, A.F. (2010) Splitting of β –carotene in the sexual interaction of *Phycomyces*. *Org Biomol Chem* 8: 4229–4231.
- Prado–Cabrero, A., Estrada, A.F., Al–Babili, S. y Avalos, J. (2007a) Identification and biochemical characterization of a novel carotenoid oxygenase: Elucidation of the cleavage step in the *Fusarium* carotenoid pathway. *Mol Microbiol* 64: 448–460.
- Prado–Cabrero, A., Scherzinger, D., Avalos, J. y Al–Babili, S. (2007b) Retinal biosynthesis in Fungi: Characterization of the carotenoid oxygenase CarX from *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryot Cell* 6: 650–657.

- Prisbylla, M.P., Tabake, K. y White, J.D. (1979) Stereospecific synthesis of (\pm)-trisporol B, a prohormone of *Blakeslea trispora*, and a facile synthesis of (\pm)-trisporic acids. *J Am Chem Soc* 101: 762–763.
- Quiles-Rosillo, M., Ruiz-Vázquez, R.M., Torres-Martínez, S.R. y Garre, V. (2005) Light induction of the carotenoid biosynthetic pathway in *Blakeslea trispora*. *Fungal Genet Biol* 42: 141-153.
- Redmond, T.M., Gentleman, S., Duncan, T., Yu, S., Wiggert, B., Gantt, E. y Cunningham Jr, F.X. (2001) Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *J Biol Chem* 276: 6560–6565.
- Redmond, T.M., Yu, S., Lee, E., Bok, D., Hamasaki, D., Goletz, P., Ma, J.X., Crouch, R.K. y Pfeifer, K. (1998) *Rpe65* is necessary for production of 11-*cis*-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat Genet* 20: 344–351.
- Revuelta, J.L. y Eslava, A.P. (1983). A new gene (*carC*) involved in the regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Mol Gen Genet* 192: 225–229.
- Reyes, P., Chichester, C.O. y Nakayama, T.O.M. (1964) The mechanism of β -ionone stimulation of carotenoid and ergosterol biosynthesis in *Phycomyces blakesleeanus*. *Biochim Biophys Acta* 90: 578.
- Ribes, J.A., Vanover-Sams, C.L. y Baker, D.J. (2000) Zygomycetes in Human Disease. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 236-301
- Ripley, G.J. y Bramley, P.M. (1976) The subcellular distribution of carotenoids in *Phycomyces blakesleeanus* C115 *car-42 mad-107 (-)*. *Biochim Biophys Acta*. 1976 450:429–40.
- Rivero, F. y Cerdá-Olmedo, E. (1994) Spore dormancy mutants of *Phycomyces*. *Exp Mycol* 18: 221–229.
- Robbins, W. J., Kavanagh, V.W. y Kavanagh, F. (1942) Growth substances and dormancy of spores of *Phycomyces*. *Bot Gaz* 104: 224–242.
- Rodríguez-Concepción, M. y Boronat, A. (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plants. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* 3: 1079–1089.

- Rodríguez-Romero, J. y Corrochano, L.M. (2004) The gene for the heat-shock protein HSP100 is induced by blue light and heat-shock in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Curr Genet* 46: 295–303.
- Rodríguez-Sáiz, M., Paz, B., De La Fuente, J.L., López-Nieto, M.J., Cabri, W. y Barredo, J.L. (2004) *Blakeslea trispora* genes for carotene biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 70: 5589–5594.
- Rohmer, M. (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep* 16: 565–574.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B. y Sahm, H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J* 295: 517–524.
- Roncero, M.I.G. y Cerdá-Olmedo, E. (1982) Genetics of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Curr Genet* 5: 5–8.
- Rubio, A., Rambla, J.L., Santaella, M., Gómez, M.D. Orzaez, D., Granell, A. y Gómez-Gómez, L. (2008) Cytosolic and plastoglobule-targeted carotenoid dioxygenases from *Crocus sativus* are both involved in beta-ionone release. *J Biol Chem* 283: 24816–24825.
- Ruch, S., Beyer, P., Ernst, H. y Al-Babili, S. (2005) Retinal biosynthesis in Eubacteria: *in vitro* characterization of a novel carotenoid oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* 55: 1015–1024.
- Ruiz-Hidalgo, M.J., Benito, E.P., Sandmann G., y Eslava, A.P. (1997) The phytoene dehydrogenase gene of *Phycomyces*: regulation of its expression by blue light and vitamin A. *Mol Gen Genet* 253: 734–744.
- Ryle, M.J. y Hausinger, R.P. (2002) Non-heme iron oxygenases. *Curr Opin Chem Biol* 6: 193–201
- Sachs, J. (1879) Über Ausschliessung der geotropischen und heliotropischen Krümmungen während des Wachsens. *Arb Bot Inst Wurzburg* 2: 209–225.

- Saelices, L., Youssar, L., Holdermann, I., Al-Babili, S. y Avalos, J. (2007) Identification of the gene responsible for torulene cleavage in the *Neurospora* carotenoid pathway. *Mol Genet Genomics* 278: 527–537.
- Sakai, S., Kato, M. y Nagamasu, H. (2000) *Artocarpus* (Moraceae)-Gall midge pollination mutualism mediated by a male-flower parasitic fungus. *Am J Bot* 87: 440–445.
- Salgado, L. M., Avalos, J., Bejarano, E. R., Cerdá-Olmedo, E. (1991) Correlation between in vivo and in vitro carotenogenesis in *Phycomyces*. *Phytochemistry*, 30, 2587–2591.
- Salgado, L.M., Bejarano, E.R. y Cerdá-Olmedo, E. (1989). Carotene superproducing mutants of *Pycomyces blakesleeanus*. *Exp Mycol* 13: 332–336.
- Salgado, L.M. y Cerdá-Olmedo, E. (1992) Genetic interactions in the regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Curr Genet* 21: 67–71.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schachtschabel, D. y Boland, W. (2007) Efficient generation of a trisporoid library by combination of synthesis and biotransformation. *J Org Chem* 72: 1366–1372.
- Schachtschabel, D., Schimek, C., Wöstemeyer, J. y Boland, W. (2005) Biological activity of trisporoids and trisporoids analogues in *Mucor mucedo* (-). *Phytochemistry* 66: 1358–1365.
- Scherzinger, D. y Al-Babili, S. (2008) *In vitro* characterization of an ancient carotenoid cleavage dioxygenase from *Nostoc* sp. PCC7120 reveals a novel cleavage pattern, cytosolic localization and induction by stress conditions. *Mol Microbiol* 69: 231–244.
- Scherzinger, D., Ruch, S., Kloer, D.P., Wilde, A. y Al-Babili, S. (2006) Retinal is formed from apo-carotenoids in *Nostoc* sp. PCC 7120: *in vitro* characterization of an apocarotenoid oxygenase. *Biochem J* 398: 361–369.
- Scherzinger, D., Scheffer, E., Bär, C., Ernst, H. y Al-Babili, S. (2010) The *Mycobacterium tuberculosis* ORF Rv0650 encodes a carotenoid oxygenase mediating central and excentric cleavage of conventional and aromatic carotenoids. *FEBS J* 277: 4662–4673.

- Schimek, C., Kleppe, K., Saleem, A.R., Voigt, K., Burmester, A. y Stemeyer, J.W. (2003) Sexual reactions in Mortierellales are mediated by the trisporic acid system. *Mycol Res* 107: 736-747.
- Schimek, C., Petzold, A., Schultze, K. y Wetzels, J. (2005) 4-Dihydromethyltrisporate dehydrogenase, an enzyme of the sex hormone pathway in *Mucor mucedo*, is constitutively transcribed but its activity is differently regulated in (+) and (-) mating types. *Fungal Genet Biol* 42: 804-812.
- Schipper, M.A.A. (1976) On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. *Stud Mycol* 12: 1-40.
- Schmidt, H., Kurtzer, R., Eisenreich, W. y Schwab, W (2006) The carotenase AtCCD1 from *Arabidopsis thaliana* is a dioxygenase. *J Biol Chem* 281: 9845-9851.
- Schmidt, I., Schewe, H., Gassel, S., Jin, C., Buckingham, J., Hümbelin, M., Sadmann, G. y Schrader, J. (2011) Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 555-571.
- Schopfer, W.H. (1934) Les vitamines cristallisées B1 comme hormones de croissance chez un microorganisme (*Phycomyces*). *Arch Mikrobiol* 5: 511-549.
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., McCarty, D.R., Welch, W. y Zeevaart, J.A. (2003) Substrate specificity and kinetics for VP 14, a carotenoid cleavage dioxygenase in the ABA biosynthesis pathway. *Biochim Biophys Acta* 1619: 9-14.
- Schwartz, S.H., Qin, X. y Loewen, M.C. (2004) The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid -derived compound inhibits lateral branching. *J Biol Chem* 279: 46940-46945.
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., Gage, D.A., Zeevaart, J.A.D. y McCarty, D.R. (1997) Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276: 1872-1874.
- Simkin, A.J., Underwood, B.A., Auldridge, M., Loucas, H.M., Shibuya, K., Schmelz, E., Clark, D.G. y Klee, H.J. (2004) Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of beta-ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiol* 136: 3504-3514.

- Shearer, K.D., Stoney, P.N., Morgan, P.J. y Mccaffery, P.J. (2012) A vitamin for the brain. *Trends Neurosci* 35: 733–741.
- Staudinger, H. (1920) Über Polymerization. *Ber Deut Chem Ges* 53: 1073–1085.
- Staudinger, H. y Fritsch, J. (1922) Über Isopren und Kautschuk. 5. Mitteilung. Über die Hydrierung des Kautschuks und über seine Konstitution. *Helvetica Chimica Acta* 5: 785-806.
- Strack, D. y Fester, T. (2006) Isoprenoid metabolism and plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots. *New Phytol* 172: 22–34.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. y Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth Enzymol* 185: 60-89.
- Sutter, R.P. (1970). Effect of light on β -carotene accumulation in *Blakeslea trispora*. *J Gen Microbiol* 64: 215–221.
- Sutter, R.P. (1975) Mutations affecting sexual development in *Phycomyces blakesleeanus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 127–130.
- Sutter, R.P., (1986) Apotrisporin E: A new sesquiterpenoid isolated from *Phycomyces blakesleeanus* and *Blakeslea trispora*. *Exp Mycol* 10: 256–258.
- Sutter, R.P. (1987) Sexual development, p. 317-336. En E. Cerdá-Olmedo, and E. D. Lipson (Ed.) *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory press New York.
- Sutter, R.P., Capage, D.A., Harrison, T.L. y Keen, W.A. (1973) Trisporic acid biosynthesis in separate plus and minus cultures of *Blakeslea trispora*: Identification by *Mucor* assay of two mating-type-specific components. *J Bacteriol* 114: 1074–1082.
- Sutter, R.P., Dadok, J., Bothner-by, A.A., Smith, R.R. y Mishra, P.K. (1989) Cultures of separated mating types of *Blakeslea trispora* make D and E forms of trisporic acids. *Biochem* 28: 4060–4066.
- Sutter, R.P. y Whitaker, J.P. (1981a) Zygophore-stimulating Precursors (Pheromones) of trisporic acid Active in (–) *Phycomyces blakesleeanus*. *J Biol Chem* 5: 2334–2341.
- Sutter, R.P. y Whitaker, J.P. (1981b) Sex pheromone metabolism in *Blakeslea trispora*. *Naturwiss* 68: 147–148.

- Sutter, R.P. y Zawodny, P.D. (1984) Apotrisporin: A major metabolite of *Blakeslea trispora*. *Exp Mycol* 8: 89–92.
- Tagua, V. G. (2012) Una aproximación genómica a la regulación por la luz de la transcripción en *Phycomyces blakesleeanus*. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- Tagua, V. G., Medina, H.R., Martín-Domínguez, R., Eslava, A.P., Corrochano, L.M., Cerdá-Olmedo, E. y Idnurm A. (2012) A gene for carotene cleavage required for pheromone biosynthesis and carotene regulation in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Fungal Genet Biol* 49: 398–404.
- Takahashi, S., Oritani, T. y Yamashita, K. (1988) Total synthesis of (+)-methyl trisporate B, fungal sex hormone. *Tetrahedron* 44: 7081-7088.
- Thaxter, R. (1914) New or peculiar Zigomycetes: III. *Blakeslea*, *Dissophora* and *Haplosporangium*, nova genera. *Bot Gaz* 58: 353–366.
- Torres-Martínez, S.R., Murillo, F.J. y Cerdá-Olmedo, E. (1980) Genetics of lycopene cyclization and substrate transfer in β -carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Genet Res* 36: 299–309.
- Van Heeswijk, R. y Roncero, M.I.G. (1984) High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Res. Commun.* 49: 691-702.
- Velayos, A., Blasco, J.L., Álvarez, M.I., Iturriaga, E.A. y Eslava, A.P. (2000a) Blue-light regulation of phytoene dehydrogenase (*carB*) gene expression in *Mucor circinelloides*. *Planta* 210: 938–946
- Velayos, A., Eslava, A. P. y Iturriaga, E. A. (2000b) A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. *Eur J Biochem* 267: 5509–5519.
- Voigt, K., Vaas, L., Stielow, B. y Hoog, G. (2013) The zygomycetes in a phylogenetic perspective. *Persoonia* 30: i-iv.
- Vogelstein, B. y Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 615–619.

- von Lintig, J. y Vogt, K. (2000) Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving beta-carotene to retinal. *J Biol Chem* 275: 11915–11920.
- von Lintig, J. y Wyss, A. (2001) Molecular analysis of vitamin A formation: cloning and characterization of beta-carotene 15–15'-dioxygenases. *Arch Biochem Biophys* 385: 47–52.
- von Lintig, J. (2010) Colors with functions: Elucidating the biochemical and molecular basis of carotenoid metabolism. *Annu Rev Nut* 30: 35–36.
- Walter, M.H., Floss, D.S., Hans, J., Fester, T. y Strack, D. (2007) Apocarotenoid bioynthesis in arbuscular mycorrhizal roots: contributions from methylerythritol phosphate pathway isogenes and tools for its manipulation. *Phytochemistry* 68: 130–138.
- Walter, M.H. y Strack, D. (2011) Carotenoids and their cleavage products: Biosynthesis and functions. *Nat Prod Rep* 28: 663–692.
- Walther, G., Pawłowska, J., Alastruey-Izquierdo, A., Wrzosek, M., Rodríguez-Tudela, J.L., Dolatabadi, S., Chakrabarti, A. y de Hoog, G.S. (2013) DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. *Persoonia* 30: 11–47.
- Walter, M.H., Floss, D.S. y Strack, D. (2010) Apocarotenoids: hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles. *Planta* 232: 1–17.
- Webster, J. (1993) Introduction to Fungi. 2 ed., Cambridge University Press, Cambridge.
- Werkman, B.A. (1976) Localization and partial characterization of a sex-specific enzyme in homothallic and heterothallic Mucorales. *Arch Microbiol* 109: 209–213.
- Werkman, B.A. y Van den Ende, H. (1973) Trisporic acid synthesis in *Blakeslea trispora*. *Arch Mikrobiol* 90: 365–374.
- Werkman, B.A. y Van den Ende, H. (1974) Trisporic acid synthesis in homothallic and heterothallic Mucorales. *J Gen Microbiol* 82: 273–278.

- Wynn, J.P., Kendrick, A. y Ratledge, C. (1997) Sesamol as an inhibitor of growth and lipid metabolism in *Mucor circinelloides* via its action on malic enzyme. *Lipids* 32: 605–610.
- Wyss, A., Wirtz, G., Woggon, W., Brugger, R., Wyss, M., Friedlein, A., riss, G., Bachmann, H. y Hunziker, W. (2000) Cloning and expression of β, β' -carotene 15–15'-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 334–336.
- Yokoyama, H., Chichester, C.O. y Mackinney, G. (1960). Formation of carotene *in vitro*. *Nature* 185: 687–688.
- Yuldasheva, L.S., Samokhvalov, G.I., y Bekhtereva, M.N. (1972) Physiologically active compounds produced by the fungus *Blakeslea trispora*. *Mikrobiologija* 41: 39–43.
- Zhong, M., Kawaguchi, R., Kassai, M. y Sun, H. (2012) Retina, retinol, retinal and the natural history of vitamin A as a light sensor. *Nutrients* 4: 2069–2096.
- Zycha, H., Siepmann, R. y Linnemann, G. (1969) Mucorales. Eine Beschreibung aller Gattungen und Arten diesr. Pilzgruppee Cramer, Lehre, Alemania.

Conclusiones

1. Las proteínas CarS y AcaA de *Mucor circinelloides*, ortólogas de las de *Phycomyces blakesleeanus* del mismo nombre, son oxigenasas que cortan la cadena del β -caroteno. CarS produce un fragmento de 25 carbonos y otro de 15. AcaA corta el primero de ellos en uno de 18 carbonos y otro de 7. Los tres fragmentos resultantes son los precursores de las tres familias de apocarotenoides de mucorales: los trisporoides, los ciclofarnesoides y los metilhexanoides. El corte del β -caroteno parece ser un proceso conservado en los hongos mucorales.
2. Hemos identificado nuevos compuestos químicos en *Phycomyces* y en *Blakeslea trispora*. La gran variedad de apocarotenoides que se encuentran en los mucorales difiere no solo entre las especies sino entre las estirpes. Hemos establecido una red o sistema periódico de los apocarotenoides que facilita la clasificación y la predicción de nuevos compuestos y el establecimiento de rutas metabólicas.
3. Proponemos rutas biosintéticas para las tres familias de apocarotenoides basadas en análisis, identificaciones y biotransformaciones. No hemos encontrado indicios de una cooperación entre las estirpes de distintos sexos en la ruta biosintética de los trisporoides, una idea propuesta y extendida desde hace un cuarto de siglo.
4. La reductasa y la deshidrogenasa que modifican los metilhexanoides de *Phycomyces* deben actuar conjuntamente, sea como heterodímero o como una proteína bifuncional. Hay más metilhexanoides distintos en *Blakeslea* que en *Phycomyces*, pero se producen de una manera parecida, con frecuencia por reducir el extremo más cercano al metilo lateral. La reductasa de *Blakeslea* puede actuar también independientemente de la deshidrogenasa.
5. *Phycomyces* y *Blakeslea* comparten muchos aspectos de las biosíntesis de trisporoides y de ciclofarnesoides. *Phycomyces* tiene hidroxilasas que oxidan los carbonos C2 de trisporoides y ciclofarnesoides y C3 de trisporoides. *Blakeslea* carece de ellas. Muchos apocarotenoides son inestables y algunos parecen generarse espontáneamente en medio de cultivo ácido.

6. Los trisporoides son muy escasos en cultivos de un solo sexo pero aparecen durante los primeros días de la interacción sexual y se acercan a la equimolaridad con los metilhexanoides y los ciclofarnesoides.
7. Los mutantes blancos de ambos sexos, incapaces de producir apocarotenoides, convierten eficazmente el β -apo-12-carotenol, un compuesto de 15 átomos de carbono, en los ciclofarnesoides usuales de las estirpes silvestres. En los mutantes de sexo (-) la β -apo-13-carotenona, un compuesto de 18 átomos de carbono, desaparece sin dar derivados detectables. En los mutantes de sexo (+) la β -apo-13-carotenona da lugar a ácidos trispóricos y a 4-dihidro-ciclofarnesina S y derivados suyos.
8. La conversión del precursor de 18 carbonos en un compuesto de 15 no es mediada por la oxigenasa CarS, que cataliza un corte similar en el β -caroteno.
9. Los apocarotenoides son mucho más abundantes que los carotenos en *Phycomyces* y *Blakeslea*, por lo que se debe pensar en una masiva ruta biosintética de los apocarotenoides, en la que el β -caroteno es un intermediario y un producto minoritario. Se propone la hipótesis de que la biosíntesis de apocarotenoides, al menos en sus primeras etapas, ocurre en los compartimentos subcelulares especializados en la producción de β -caroteno y asociada a los agregados enzimáticos que lo sintetizan.
10. La interrupción mutacional o química de la producción de caroteno no modifica el flujo metabólico total de la ruta; el contenido de β -caroteno o de otros intermediarios aumenta a costa de la desaparición de los apocarotenoides. La interacción sexual aumenta la producción neta de caroteno y de apocarotenoides.
11. Al menos tres apocarotenoides aún no identificados intervienen en la regulación de los mucorales. Uno media el incremento del contenido de β -caroteno por activación sexual; y otros dos son las feromonas específicas de sexo que inducen la formación de cigóforos, comienzo del ciclo sexual.

Resumen

La interacción sexual y la producción de caroteno en hongos mucorales son procesos complejos de comunicación y regulación celular mediados por apocarotenoides y explotados por la industria.

Esta tesis estudia la diversidad de los apocarotenoides y sus rutas biosintéticas en *Phycomyces blakesleeanus* y *Blakeslea trispora* y las etapas iniciales de su producción en *Mucor circinelloides*. Para ello combina técnicas de Genética, Biología Molecular, Enzimología y Química Orgánica e introduce la biotransformación de apocarotenoides en mutantes incapaces de producirlos.

Blakeslea conserva las tres familias de apocarotenoides identificadas en *Phycomyces* (trispóroides, ciclofarnesoides y metilhexanoides) y *Mucor* corta el β -caroteno con enzimas parecidas a las de *Phycomyces*. Hemos encontrado nuevos apocarotenoides en *Phycomyces* y en *Blakeslea* y observamos que la diversidad de los apocarotenoides no solo depende de las especies, sino de las estirpes dentro de ellas. Hemos dispuesto los apocarotenoides en una red o sistema periódico que ayuda a clasificarlos y a predecir nuevos compuestos y hemos propuesto sus probables rutas biosintéticas. No hemos encontrado indicios de una complementación metabólica entre las estirpes de distintos sexos para producir trispóroides.

La estirpe de sexo (+) de *Phycomyces* convierte la β -apo-13-carotenona en ácidos trispóricos y en 4-dihidro-ciclofarnesina S y derivados suyos. De esta manera los ciclofarnesoides proceden directamente del fragmento inicial de 15 carbonos del β -caroteno e indirectamente por pérdida de 3 carbonos del fragmento inicial de 18.

Los apocarotenoides son mucho más abundantes que el β -caroteno y sus precursores en *Phycomyces* y *Blakeslea*. En la masiva ruta biosintética de los apocarotenoides, el β -caroteno es un intermediario y un producto minoritario. Se propone la hipótesis de que la biosíntesis de apocarotenoides, al menos en sus primeras etapas, ocurre en los compartimentos subcelulares especializados en la producción de β -caroteno y asociada a los agregados enzimáticos que lo sintetizan. La interrupción mutacional o química de los genes estructurales o la inhibición de las mismas retiene el flujo como β -caroteno o precursores suyos. La interacción sexual aumenta los flujos netos independientemente de las interrupciones.