(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 701 354**

(21) Número de solicitud: 201731043

(51) Int. CI.:

C12N 15/52 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

21.08.2017

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

21.02.2019

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE CASTILLA LA MANCHA (100.0%)
Pza. De La Universidad, 2
02071 ALBACETE ES

(72) Inventor/es:

GÓMEZ GÓMEZ, Lourdes;
AHRAZEM EL KADIRI, Oussama;
DIRETTO, Gianfranco y
RUBIO MORAGA , Ángela

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel;

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

(54) Título: **MÉTODO DE OBTENCIÓN DE COMPUESTOS DERIVADOS DE APOCAROTENOIDES EN MICROORGANISMOS Y PLANTAS PARA SU USO EN APLICACIONES AGRÍCOLAS Y FARMACÉUTICAS**

(57) Resumen:

Método de obtención de compuestos derivados de apocarotenoides en microorganismos y plantas para su uso en aplicaciones agrícolas y farmacéuticas. La presente invención se refiere a un método enzimático de obtención de derivados de apocarotenoides, concretamente de crocetina y picrocrocina, que comprende una serie de reacciones enzimáticas llevadas a cabo por enzimas vegetales en un sistema huésped y otros cultivos importantes.

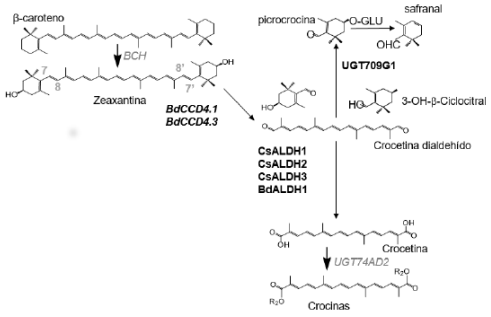


FIG.1

ES 2 701 354 A1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE COMPUESTOS DERIVADOS DE APOCAROTENOIDES EN MICROORGANISMOS Y PLANTAS PARA SU USO EN APLICACIONES AGRÍCOLAS Y FARMACÉUTICAS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. Más concretamente, se refiere a la obtención de apocarotenoides, concretamente crocetina y picrocrocina, mediante métodos biotecnológicos para su uso en aplicaciones agrícolas y farmacéuticas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los carotenoides para su uso en la industria se obtienen normalmente mediante síntesis química. Sin embargo, los altos costes de producción, la dependencia de combustibles fósiles para obtener energía y para el suministro de especies moleculares orgánicas reactivas adecuadas, y los impactos perjudiciales percibidos por el público sobre el medio ambiente, han dado como resultado esfuerzos intensificados para encontrar métodos de producción alternativos, particularmente a partir de fuentes biológicas.

Los organismos capaces de sintetizar carotenoides incluyen a todas las plantas fotosintéticas, protistas y bacterias, así como a algunas bacterias heterótrofas y algunos hongos. En plantas, los carotenoides son esenciales para el desarrollo y crecimiento de la planta; las mutaciones que bloquean la acumulación de los carotenoides generan efectos pleiotrópicos sobre el desarrollo de la biogénesis del cloroplasto y el desarrollo de las semillas. Los carotenoides son los pigmentos accesorios en los complejos antena del cloroplasto, donde actúan incrementando la capacidad de captación de la luz, adsorbiendo en la región azul-verde del espectro visible (450-550 nm) y transfiriendo la energía a la clorofila.

Los carotenoides también participan en los procesos de fotoprotección en plantas, y poseen funciones como antioxidantes. Otras de las funciones de los carotenoides están relacionadas con su intenso color, siendo responsables de las intensas coloraciones y pigmentaciones de flores y frutos, actuando como atrayentes de polinizadores y de animales que ayuden a la dispersión de las semillas. Los carotenoides son también responsables de la pigmentación de invertebrados, aves y peces. En el caso de las aves, existe una relación directa entre pigmentación debida a carotenoides y atractivo sexual.

En plantas, la biosíntesis de los carotenoides ocurre en el interior de los cloroplastos, cromoplastos, y amiloplastos, plástidos genéticamente idénticos, pero con una arquitectura de membranas internas muy distinta, por enzimas codificadas por genes nucleares. Los carotenoides mayoritarios en los cloroplastos son el β-caroteno y las xantofilas. En los cromoplastos no fotosintéticos la composición y distribución de los pigmentos carotenoides varía de forma considerable de una especie vegetal a otra. Pero, además, la composición de los compuestos carotenoides presentes en cada especie vegetal se ve alterada a su vez, por los cambios en las condiciones ambientales.

La mayoría de los carotenoides poseen esqueletos de 40 átomos de carbono, que consisten en ocho unidades de isopreno. Sin embargo, algunos carotenoides tienes esqueletos con un número inferior de 40 carbonos. La mayoría de ellos son el resultado de la degradación de uno o ambos extremos de la molécula de 40 carbonos, y son denominados apocarotenoides o diapocarotenoides.

La variedad de apocarotenoides viene determinada por la elevada cantidad de los precursores carotenoides (más de 600 han sido identificados), las variaciones en el sitio de corte dentro del esqueleto, y las subsiguientes modificaciones que éste sufre tras el corte. A pesar de su importancia, se conoce poco sobre los factores que regulan su producción en plantas.

Uno de los pigmentos más valiosos comercialmente, la crocetina, se obtiene a partir de estigmas de azafrán. Tanto los pigmentos del azafrán como los principales componentes del aroma y del sabor se forman por la oxidación biológica de la zeaxantina. A partir de la zona central con dobles enlaces conjugados se forma la crocetina. Primeramente, se produce una oxidación a dialdehido, y luego a diácido. Una vez producida, la crocetina se une de forma sucesiva a unidades de glucosa, dos en cada extremo (el disacárido gentobiosa) formando la crocina, que es el principal pigmento del azafrán. Debido a la presencia de los grupos de azúcar en los extremos de la cadena, la crocina es soluble en agua.

Las transformaciones enzimáticas de los carotenoides en estos productos son catalizadas por oxigenasas de corte de carotenoides (CCO). Las CCO están presentes en todos los organismos vivos y difieren en la especificidad del sustrato y en el sitio de corte. Las CCO de las plantas se dividen en dos subfamilias. Las dioxigenasas 9-cis-epoxicarotenoides (9-cis-epoxycarotenoiddioxygenases, NCEDs) implicadas en la biosíntesis de ácido abscísico (ABA) y las dioxigenasas de corte de carotenoides (CCDs) que incluyen a todas los demás enzimas de la familia de las CCO que no participan en la formación de ABA.

Estas enzimas parecen tener una elevada especificidad en cuanto al punto de corte, catalizando la ruptura en distinto dobles enlaces, agrupándose en distintas subfamilas: por ejemplo las CCD1, aisladas en *Arabidopsis*, azafrán, tomate, uva y melón, entre otras (Schwartz et al. 2001. Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. J Biol Chem 276, 25208-25211; Simkin et al. 2004a The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles beta-ionone, pseudoionone, and geranylacetone. Plant J. 40, 882-892; Mathieu et al. 2005 A Carotenoid Cleavage Dioxygenase from Vitis vinifera L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C13-norisoprenoid accumulation. J. Exp. Bot. 56, 2721-2731; Ibdah et al. 2006 Functional characterization of CmCCD1, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. Phytochem. 67, 1579-1589).

Un ejemplo es la patente ES2334423B1, en la cual se describen secuencias de las enzimas CsCCD4a y CsCCD4b, enzimas dioxigenasas aisladas de *Crocus Sativus* (azafrán), que catalizan la ruptura del enlace 9-10 en los apocarotenoides, liberando sustancias volátiles que contribuyen al aroma y sabor de dicha especie.

En *Crocus Sativus* se han caracterizado una CCD, CCD2, con punto de corte en los enlaces 7-8 y 7'-8' que utiliza zeaxantina como sustrato (Frusciante S, Diretto G, Bruno M, Ferrante P, Pietrella M, Prado-Cabrero A, Rubio-Moraga A, Beyer P, Gomez-Gomez L, Al-Babili S, Giuliano G. Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Aug 19;111(33):12246-51. doi: 10.1073/pnas.1404629111).

La patente WO2016012968A1 describe una CCD, concretamente la CCD2, para la producción biotecnológica en microorganismos y plantas de compuestos derivados del azafrán, específicamente el crocetina dialdehído y crocetina procedentes de la ruptura de los dobles enlaces en posición 7,8 y 7', 8'. CCD2 escinde estos enlaces de la zeaxantina, pero también otros sustratos de carotenoides que contienen un anillo 3-OH-β en el extremo proximal de la molécula. Sin embargo, no se detectaron enzimas que catalicen la transformación del 2,6,6-trimetil-4- hidroxi-1-carboxaldehído-1-ciclohexeno (4-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carbaldehyde, HTCC) en picrocrocina. La picrocrocina es la responsable del sabor ligeramente amargo del azafrán. A partir de la picrocrocina se forma, durante el secado de la especia, el safranal, uno de los componentes fundamentales del aroma del azafrán.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un método de obtención de apocarotenoides, concretamente de crocetina y picrocrocina, en microorganismos y plantas que comprende una serie de reacciones enzimáticas de la zeaxantina y compuestos intermedios. Se identificaron enzimas vegetales que catalizan la producción de crocetina y picrocrocina que pueden ser explotados para la producción de estos dos apocarotenoides en otro sistema huésped y otros cultivos importantes, satisfaciendo la creciente demanda de pigmentos naturales con propiedades saludables añadidas.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica un péptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO:1.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica un péptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO:2.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una enzima codificada a partir de la secuencia de nucleótidos, la cual tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

Las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 corresponden con las secuencias de enzimas *BdCCD4.1 y BdCCD4.3*, respectivamente, enzimas dioxigenasas aisladas de en *B. davidii* que están involucrados en la producción de crocetin dialdehído en flores de *B. davidii*. Ambas enzimas catalizan específicamente la escisión de los dobles enlaces en posición 7,8, 7 ', 8' de zeaxantina produciendo crocetin dialdehído. La escisión oxidativa de los carotenoides es un proceso generalizado, que se espera tenga lugar no sólo en todos los organismos que son capaces de sintetizar carotenoides, sino también en animales que obtienen carotenoides de su dieta. Esta reacción está mediada por CCDs que inician la síntesis de compuestos biológicamente importantes en animales, hongos y plantas, tales como ácido retinoico, ácidos trispóricos, ácido abscísico y estrigolactonas.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica un péptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO:3.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica un péptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO:4.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica un péptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO:5.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica un péptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO:6.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una enzima codificada a partir de la secuencia de nucleótidos, la cual tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

Las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5, corresponden con las secuencias de enzimas *CsALDH1, CsALDH2 y CsALDH3,* respectivamente, enzimas aldehído deshidrogenasas aisladas de *C. Sativus (*azafrán), mientras que la secuencia SEQ ID NO:6 corresponde con la secuencia de enzima *BdALDH1,* enzima aldehído deshidrogenasa aisladas de *B. davidii.* Estas cuatro enzimas son capaces de convertir crocetina dialdehído en crocetina.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica un péptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO:7.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una enzima codificada a partir de la secuencia de nucleótidos, la cual tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7.

La secuencia aminoacídica SEQ ID NO:7 corresponden con la secuencia de la enzima *UGT709G1*, enzima glucosiltransferasa (Uridinadiphosphate glucuronyltransferase, UGT) que reconoce y glucosila HTCC para producir picrocrocina. La enzima aislada *UGT709G1* permite la producción biotecnológica de picrocrocina, el precursor del sabor safranal, presente en una forma estable no volátil para varias aplicaciones.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método de obtención de derivados de apocarotenoides en microorganismos y plantas que comprende la expresión en dichos microorganismos y/o plantas de la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 para la obtención de crocetina dialdehído.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método de obtención de derivados de apocarotenoides en microorganismos y plantas que comprende la expresión en dichos

microorganismos y/o plantas de la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 para la obtención de crocetina.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método de obtención de derivados de apocarotenoides en microorganismos y plantas que comprende la expresión en dichos microorganismos y/o plantas de la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 para la obtención de picrocrocina.

TEXTO LIBRE DEL LISTADO DE SECUENCIAS

A continuación, se aporta una traducción del texto libre en inglés que aparece en la lista de secuencias.

SEQ ID NO: 1. Proteína BdCCD4.1

SEQ ID NO: 2. Proteína BdCCD4.3

SEQ ID NO: 3. Proteína CsALDH1

SEQ ID NO: 4. Proteína CsALDH2

SEQ ID NO: 5. Proteína CsALDH3

SEQ ID NO: 6. Proteína BdALDH1

SEQ ID NO: 7. Proteína UGT709G1

SEQ ID NO: 8. Cebador para RACE-PCR 3' y 5'- Directo-BdCCD4.1

SEQ ID NO: 9. Cebador para RACE-PCR 3' y 5'- Inverso-BdCCD4.1

SEQ ID NO: 10. Cebador para RACE-PCR 3' y 5'- Directo-BdCCD4.3

SEQ ID NO: 11. Cebador para RACE-PCR 3' y 5'- Inverso-BdCCD4.3

SEQ ID NO: 12. Cebador para RACE-PCR 3' y 5'- Directo-BdALDH1

SEQ ID NO: 13. Cebador para RACE-PCR 3' y 5'- Inverso-BdALDH1

SEQ ID NO: 14. Cebador para RACE-PCR 3' y 5'- Directo-CsALDH1

SEQ ID NO: 15. Cebador para RACE-PCR 3' y 5'- Inverso-CsALDH1

SEQ ID NO: 16. Cebador para RACE-PCR 3' y 5'- Directo-CsALDH2

SEQ ID NO: 17. Cebador para RACE-PCR 3' y 5'- Inverso-CsALDH2

SEQ ID NO: 18. Cebador para RACE-PCR 3' y 5'- Directo-CsALDH3

SEQ ID NO: 19. Cebador para RACE-PCR 3' y 5'- Inverso-CsALDH3

SEQ ID NO: 20. Cebador para amplificación de cDNAs de longitud completa-Directo-BdCCD4.1

SEQ ID NO: 21. Cebador para amplificación de cDNAs de longitud completa-Inverso-BdCCD4.1

SEQ ID NO: 22. Cebador para amplificación de cDNAs de longitud completa-Directo-BdCCD4.3

SEQ ID NO: 23. Cebador para amplificación de cDNAs de longitud completa-Inverso-BdCCD4.3

SEQ ID NO: 24. Cebador para amplificación de cDNAs de longitud completa-Directo-BdALDH1

SEQ ID NO: 25. Cebador para amplificación de cDNAs de longitud completa-Inverso-BdALDH1

SEQ ID NO: 26. Cebador para amplificación de cDNAs de longitud completa-Directo-CsALDH1

SEQ ID NO: 27. Cebador para amplificación de cDNAs de longitud completa-Inverso-CsALDH1

SEQ ID NO: 28. Cebador para amplificación de cDNAs de longitud completa-Directo-CsALDH2

SEQ ID NO: 29. Cebador para amplificación de cDNAs de longitud completa-Inverso-CsALDH2

SEQ ID NO: 30. Cebador para amplificación de cDNAs de longitud completa-Directo-CsALDH3

SEQ ID NO: 31. Cebador para amplificación de cDNAs de longitud completa-Inverso-CsALDH3

SEQ ID NO: 32. Cebador para la clonación en vectores de expresión-Directo-BdCCD4.1

SEQ ID NO: 33. Cebador para la clonación en vectores de expresión-Inverso-BdCCD4.1

SEQ ID NO: 34. Cebador para la clonación en vectores de expresión-Directo-BdCCD4.3

SEQ ID NO: 35. Cebador para la clonación en vectores de expresión-Inverso-BdCCD4.3

SEQ ID NO: 34. Cebador para la clonación en vectores de expresión-Directo-UGT709G1

SEQ ID NO: 35. Cebador para la clonación en vectores de expresión-Inverso-UGT709G1

SEQ ID NO: 38. Cebador para la clonación en vectores de expresión-Directo-BdALDH1

SEQ ID NO: 39. Cebador para la clonación en vectores de expresión-Inverso-BdALDH1

SEQ ID NO: 40. Cebador para la clonación en vectores de expresión-Directo-CsALDH1

SEQ ID NO: 41. Cebador para la clonación en vectores de expresión-Inverso-CsALDH1

SEQ ID NO: 42. Cebador para la clonación en vectores de expresión-Directo-CsALDH2

SEQ ID NO: 43. Cebador para la clonación en vectores de expresión-Inverso- CsALDH2

SEQ ID NO: 44. Cebador para la clonación en vectores de expresión-Directo-CsALDH3

SEQ ID NO: 45. Cebador para la clonación en vectores de expresión-Inverso- CsALDH3

SEQ ID NO: 46. Cebador para qRT-PCR-Directo-BdCCD4.1

SEQ ID NO: 47. Cebador para qRT-PCR-Inverso-BdCCD4.1

SEQ ID NO: 48. Cebador para qRT-PCR-Directo-BdCCD4.3

SEQ ID NO: 49. Cebador para qRT-PCR-Inverso-BdCCD4.3

SEQ ID NO: 50. Cebador para qRT-PCR-Directo-UGT709G1

SEQ ID NO: 51. Cebador para qRT-PCR-Inverso-UGT709G1

SEQ ID NO: 52. Cebador para qRT-PCR-Directo-BdALDH1

SEQ ID NO: 53. Cebador para qRT-PCR-Inverso-BdALDH1

SEQ ID NO: 54. Cebador para qRT-PCR-Directo-CsALDH1

SEQ ID NO: 55. Cebador para qRT-PCR-Inverso-CsALDH1

SEQ ID NO: 56. Cebador para qRT-PCR-Directo-CsALDH2

SEQ ID NO: 57. Cebador para qRT-PCR-Inverso- CsALDH2

SEQ ID NO: 58. Cebador para qRT-PCR-Directo-CsALDH3

SEQ ID NO: 59. Cebador para qRT-PCR-Inverso- CsALDH3

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1 Ruta biosintética de obtención de crocetina y picrocrocina, donde se encuentran resaltadas las enzimas de la invención que intervienen en cada etapa de la ruta para obtener los productos derivados de apocarotenoides.

Figura 2. Niveles de crocina y zeaxantina en diferentes etapas de desarrollo de flores blancas de *B. davidii.*

Figura 3. Árbol filogenético no ramificado de las proteínas CCD basado en la similitud de secuencias.

Figura 4. Niveles de expresión de BdCCD4.1 y BdCCD4.3 en las diferentes etapas de desarrollo floral en *B.davidii.*

Figura 5. Cromatograma obtenido del análisis HPLC-DAD de los plásmidos de *E.coli* pThio-BdCCD4.1, pThio-BdCCD4.3, pThio-control (1 y 2) que contiene Zeaxantina y una muestra de crocetina dialdehído (C). Se destaca la presencia de un pico (P1) en el cromatograma de pThio-BdCCD4.1 y pThio-BdCCD4.3 que indica la presencia de crocetina dialdehído (C).

Figura 6. Árbol filogenético no ramificado de las proteínas ALDH basado en la similitud de secuencias.

Figura 7A y B. Niveles de expresión de las CsALDHs y niveles de crocina y crocetina en las diferentes etapas de desarrollo del estigma.

Figura 8. Árbol filogenético no ramificado de la proteína UGT basado en la similitud de secuencias.

Figura 9. Espectros UV y tiempos de retención para evaluar la actividad enzimática in vitro de UGT709G1 sobre HTCC.

Figura 10A y B. Niveles de expresión de UGT y niveles de HTCC y picrocrocina en las diferentes etapas de desarrollo del estigma.

DESCRIPCIÓN DE MODOS DE REALIZACIÓN

Habiendo descrito la presente invención, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1. Biosíntesis y acumulación de crocetina y crocina durante el desarrollo de flores blancas de *B. davidii.*

Se analizó el proceso de biosíntesis y acumulación de crocetina y crocina durante el desarrollo de flores blancas de *B. davidii*. Un total de cinco etapas de desarrollo fueron seleccionadas y definidas:

- Etapa I corresponde al capullo cerrado y completamente blanco.
- Etapa II corresponde al capullo cerrado con un tubo de corola amarillento.
- Etapa III corresponde a la etapa de la antesis con flores mostrando un tubo de corola anaranjada.
- Etapa IV corresponde a la etapa post-antesis con flores mostrando un tubo de corola anaranjado oscuro.
- Etapa V corresponde a etapa de senescencia.

Se analizaron las flores en las etapas de desarrollo seleccionadas para la acumulación de crocetina y crocina. Las crocinas ya se detectaron en la etapa I, pero a niveles muy bajos en comparación con la etapa V, que mostró un aumento de 30 veces en el contenido de crocina y permitió la caracterización de la crocina. Por el contrario, los niveles de zeaxantina, el precursor de la crocetina, fueron mayores en la etapa I, y sus niveles disminuyeron a medida que la flor se desarrolla, con los niveles más bajos en la etapa V (Figura 2).

Ejemplo 2. Identificación de un gen candidato para la formación de crocetina en flores *B. davidii.*

Los ADNc parciales se obtuvieron por RT-PCR usando oligonucleótidos degenerados para las enzimas CCD. Las secuencias obtenidas se usaron para el diseño de oligonucleótidos específicos para RACE-PCR. Dos cDNAs de longitud completa se obtuvieron a partir de flores en la antesis y denominados como BdCCD4.1 y BdCCD4.3 según su identidad con otras plantas con enzimas CCD.

BdCCD4.1 codifica una proteína de 580 aminoácidos con una masa molecular de 64,56 kD. La proteína BdCCD4.1 (SEQ ID NO:1) mostró la identidad más alta, 66%, a una enzima

CCD4 putativa de *Sesamum indicum* (XP_011082281.1) y 55% de identidad con *VvCCD4a* (AGT63321.1), la escisión de carotenoides dioxigenasa 4a de *Vitis vinifera*.

BdCCD4.3 codifica una proteína de 579 aminoácidos con una masa molecular de 64,39 kD. La proteína BdCCD4.3 (SEQ ID NO:2) mostró la mayor identidad, 68%, a una enzima CCD4 putativo de Scutellaria baicalensis (AGN03860.1). Las dos secuencias se utilizaron para construir un árbol filogenético con el fin de determinar su posición en las diferentes sub-familias de CCDs en plantas (Figura 3). BdCCD4.1 y BdCCD4.3 aparecen en un grupo fuera de grupo principal de CCD4 de especies de dicotiledóneas.

Las secuencias de CCDs se analizaron para la presencia de señales N-terminal y C-terminal y para señales de anclaje de membrana usando programas web basados en ChloroP 1.1 y TargetP v1.1. Se predijo que BdCCD4.1 y BdCCD4.3 tenían un péptido señal N-terminal para dirigirse a plástidos.

Ejemplo 3. Análisis de expresión de BdCCD durante el desarrollo floral en *B.davidii*

Se analizaron los patrones de expresión de los genes BdCCD durante el desarrollo de *B. davidii* flores. Para tal propósito, se seleccionaron las cinco etapas de desarrollo caracterizadas para la acumulación de crocina (descritas en el ejemplo 1) para PCR cuantitativa en tiempo real. A partir de este análisis, BdCCD4.1 y BdCCD4.3 mostraron niveles de expresión relativamente altos y sus niveles de expresión siguen la acumulación de crocina en las flores. Los niveles máximos de expresión para BdCCD4.1 y BdCCD4.3 se alcanzaron en la etapa de antesis (IV), mientras que no se detectaron transcriptos en flores senescentes (Figura 4).

Ejemplo 4. Actividad de BdCCDs en células de *E. coli*

Se aisló ARN total de corolas y estigmas de *B. davidii* y *C. sativus*, respectivamente, en diferentes etapas de desarrollo usando Ambion PolyAtrack, siguiendo los protocolos del fabricante (Ambion Inc., Austin, TX, USA). Los ADNc de primera cadena se sintetizaron mediante transcripción inversa (RT) a partir de 2 µg de ARN total utilizando un cebador oligo dT de 18 pares de bases y un kit de síntesis de cDNA de primera hebra (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los ADNc de *B. davidii* se emplearon para la reacción de PCR para el aislamiento de CCD. Se utilizaron los cebadores correspondientes (véase Tabla 1), bajo unos parámetros de ciclo térmico fueron de 2 min a 95°C, 10x (30s a 95ºC, 30s a 55 ° C-0,3 °C / ciclos y 1min 30s a

72°C), 35x (30s a 95°C, 30s a 50 °C y 1min 30s a 72°C) y finalmente 5 min a 72°C, para los dos aislamientos.

Los productos de PCR obtenidos en las reacciones se separaron en gel de agarosa al 1%, se purificaron, se ligaron en pSpark-TA (Canvax, Córdoba, España) y luego se introdujeron en *E.coli.*

Los cDNAs de longitud completa se clonaron en el sitio EcoRI del vector pBAD-Thio (Invitrogen) por recombinación usando el kit In-Fusion® HD Cloning Plus CE (Clontech) y cebadores específicos (véase Tabla 1). Los plásmidos de expresión resultantes: pThio-*BdCCD4.1* y pThio-*BdCCD4.3* se secuenciaron para confirmar el montaje correcto y la falta de errores de secuencia. A continuación, los vectores se transformaron en *Escherichia coli* BL21 manipulado con plásmidos para la producción de zeaxantina, licopeno, δ-caroteno y β-caroteno. Los transformantes de *E.coli* se cultivaron durante la noche a 30°C en 4 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100µg/ml) y cloranfenicol (60µg/ml). Las células cultivadas se transfirieron a 100 ml de medio 2xYT suplementado con ampicilina (50 µg/ml) y cloranfenicol (30µg/ml) y se cultivaron adicionalmente a 30°C hasta alcanzar una DO600 de 0,8. Las células se indujeron entonces con arabinosa al 0,2% y crecieron durante la noche a 20ºC. Las células se cultivaron por centrifugación (6.000 rpm durante 10 minutos) y los pigmentos se extrajeron repetidamente con un volumen total de 10 ml de acetona hasta que todos los pigmentos se retiraron visiblemente. El disolvente se evaporó bajo N_2 gas y los pigmentos se resuspendieron con 0,3 ml de MeOH: terc - metil - butil - éter (50:50). Después de la centrifugación (13.000 rpm durante 10 min), los extractos se analizaron por HPLC.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5. Se destaca la presencia de un pico (P1) en el cromatograma de pThio-BdCCD4.1 y pThio-BdCCD4.3 que indica la presencia de crocetina dialdehído (C). Confirmado por HPLC-MS.

Ejemplo 5. Identificación de genes de ALDHs de *C. sativus* y *B. davidii*

Los ALDHs constituyen una superfamilia de oxidorreductasas $NAD(P)^+$-dependientes, ampliamente distribuidas en todo el organismo, que catalizan la conversión de aldehídos en los correspondientes ácidos. Las ALDH eucarióticas se dividen en varias familias, basándose en criterios de homología específicos establecidos por el Comité de Nomenclatura de Genes de ALDH (AGNC). ALDHs comparten un dominio conservado ALDH y difieren en la presencia de aminoácidos variables y extensiones carboxílicas. Para identificar las ALDH implicadas en la biosíntesis de la crocetina, se utilizó una estrategia

basada en la homología, aprovechando los motivos específicos conservados entre las ALDH implicadas en la oxidación de los apocarotenoides.

Se preparó una población de cDNA mediante transcripción inversa de poli(A)$^+$ a partir de ARN total aislado a partir de estigmas de azafrán y de flores de *Buddleja*, y se usaron como molde para la reacción de amplificación. Los productos amplificados obtenidos con los cebadores degenerados se clonaron y analizaron. Los análisis de secuencias de varios productos de PCR revelaron homologías a aldehído deshidrogenasas y se realizó una aproximación RACE-PCR para aislar clones completos. Se obtuvieron cuatro cDNAs: CsALDH1, CsALDH2, CsALDH3 y BdALDH1.

CsALDH1 codifica para una proteína de 537 aminoácidos. La proteína CsALDH1 (SEQ ID NO:3) mostró 83% de identidad con una proteína de *Elaeis guineensis* (XP_010914166.1). CsALDH2 codifica para una proteína de 535 aminoácidos y mostró una identidad del 81% con *Elaeis guineensis* (XP_010914166.1). CsALDH3 codifica para una proteína de 482 aminoácidos, y mostró 79% de identidad con una proteína para *Phoenix dactylifera* (XP_008781593). BdALDH1 codifica para una proteína de 476 residuos de aminoácidos, y mostró 82% de identidad con una proteína de *Sesamum indicum* (XP_011069490.1).

Las secuencias aisladas se utilizaron para construir un árbol filogenético con el fin de determinar los ALDHs implicados en la modificación de los apocarotenoides (Figura 6).

Ejemplo 6. Análisis de actividad de ALDHs en células de *E. coli*

Se aisló ARN total de corolas y estigmas de *B. davidii* y *C. sativus*, respectivamente, en diferentes etapas de desarrollo usando Ambion PolyAtrack, siguiendo los protocolos del fabricante (Ambion Inc., Austin, TX, USA). Los ADNc de primera cadena se sintetizaron mediante transcripción inversa (RT) a partir de 2 µg de ARN total utilizando un cebador oligo dT de 18 pares de bases y un kit de síntesis de cDNA de primera hebra (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los ADNc de *B. davidii* se emplearon para la reacción de PCR para el aislamiento de ALDH. Se utilizaron los cebadores correspondientes (véase Tabla 1), bajo unos parámetros de ciclo térmico fueron de 2 min a 95°C, 10x (30s a 95ºC, 30s a 55 ° C-0,3 °C / ciclos y 1min 30s a 72°C), 35x (30s a 95°C, 30s a 50 °C y 1min 30s a 72°C) y finalmente 5 min a 72°C, para los dos aislamientos. Para la identificación de ALDH de *C. sativus* los cebadores utilizados

fueron los mismos que los utilizados para la identificación de ALDH de *B. davidii,* así como las condiciones de PCR.

Los cDNAs de longitud completa para las 4 ALDHs aisladas (*CsALDH1, CsALDH2, CsALDH3 y BdALDH1*) se clonaron en el sitio EcoRI del vector pET28 por recombinación usando el kit In-Fusion® HD Cloning Plus CE (Clontech) y cebadores específicos (Tabla 1). Los plásmidos de expresión resultantes: pET-*CsALDH1*, pET-*CsALDH2,* pET-*CsALDH3* y pET- *BdALDH1* se secuenciaron para confirmar el montaje correcto y la falta de errores de secuencia. A continuación, los vectores se transformaron en *Escherichia coli* BL21 manipulado con plásmidos para la producción de zeaxantina y hospedar pThio-*BdCCD4.3 o* pBAD/Thio. Se inocularon colonias durante la noche en un medio 2xYT suplementado con ampicilina (50 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml) y cloranfenicol (30µg/ml) y se cultivaron adicionalmente a 30°C hasta alcanzar una DO600 de 0,8. Se indujo la expresión de las proteínas recombinantes mediante la adición de 0,1 mm de isopropil-tio-β-D-galactosido y 0.2% (v/v) de arabinosa y crecieron durante la noche a 20ºC. Las células se cultivaron por centrifugación a 12000g durante 1 minuto y los pigmentos se extrajeron disolviendo “pellets” en 5 ml de acetona, se sonicaron y centrifugaron a 12000g durante 10 minutos. La extracción se repitió, y los extractos fueron combinados, secados y analizados mediante HPLC para la detección de crocetina y crocetina dialdehído.

Ejemplo 7. Expresión de CsALDHs en el tejido del estigma

Los perfiles de expresión del CsADLH1-3 aislado se analizaron durante el desarrollo del estigma y se compararon con los niveles de crocetina, picrocrocina y crocina durante las diferentes etapas de desarrollo. CsALDH2 se expresó en niveles relativamente bajos, y alcanzó un pico de expresión en el rojo etapa, y disminuyó a partir de entonces.

CsALDH1 fue altamente expresado en todas las etapas de desarrollo analizadas y alcanzó los niveles más altos en pre-antesis y antesis (Figura 7). Los niveles de transcripciones de CsALDH3 aumentaron desde el amarillo hasta la etapa de antesis (Figura 7). Comparación de los niveles de expresión de cada CsALDH con los niveles de picrocrocina, crocetina y crocina, mostró una mejor correlación de CsALDH1 con crocetina y CsALDH2 y CsALDH3 mostraron una mejor correlación con los niveles de crocina (Figura 8).

En resumen, se aislaron y analizaron cuatro enzimas ALDH, tres de ellas a partir de *C. sativus* y una cuarta de *B. davidii* y se comprobó que todas ellas son capaces de convertir crocetina dialdehído en crocetina (Figura 1).

Ejemplo 8. Identificación y clonación de genes de UGT709G1

Para identificar UGTs de estigmas de azafrán, se utilizó una estrategia basada en la homología, aprovechando los motivos UGT específicos ubicados en la región C-terminal. Se preparó una población de cDNA mediante transcripción inversa de poli(A)$^+$ a partir de ARN total aislado a partir de estigmas de azafrán y se usó como molde para la reacción de amplificación. Los productos amplificados obtenidos con los cebadores degenerados se clonaron y analizaron. Los análisis de secuencias de varios productos de PCR revelaron homologías a glicosiltransferasas, incluyendo las caracterizadas previamente a partir de azafrán. Se seleccionó un nuevo clon obtenido para el aislamiento de longitud completa. El clon obtenido denominado UGT709G1 (según el Comité de Nomenclatura de UGT), contiene un marco de lectura abierto putativo de 1548 pb que codifica 515 residuos de aminoácidos con una masa molecular calculada de 57,5 kDa. UGT709G1 tenía una secuencia típica de caja-PSPG que incluía residuos clave altamente conservados para el reconocimiento de sustrato y la catálisis de UGTs: un residuo histidina (His-19) altamente conservado entre PSPG actúa como residuo catalítico clave para activar el grupo hidroxi de la molécula aceptora de glucosilo para facilitar la formación de un enlace glucosídico.

El análisis filogenético basado en las secuencias de aminoácidos deducidas de UGT709G1 (SEQ ID NO:7) y otras UGTs de plantas sugirió que UGT709G1 pertenecía al grupo G de la familia de PSPGs (Figura 8). Se caracterizaron funcionalmente miembros del grupo G implicados en la biosíntesis de la geniposide iridoides (GjUGT6) en *Jaminoides gardenia*, del ácido 7-deoxiloganico (CrUGT8) en *Catharanthus roseus*, glucósidos cianogénicos (UGT85B1) en *Sorgo* (Sorghum bicolor), y citoquininas (UGT85A1) en *Arabidopsis thaliana*. Las comparaciones de secuencias de aminoácidos mostraron 43 y 40% de identidad de secuencia con CrUGT8 y GjUGT6 respectivamente, que participan en la glicosilación de metabolitos secundarios relacionados con monoterpenoides. Mientras que la identidad más alta, 54%, se encontró con una proteína no caracterizada de *Elaeis guineensis* (XP_010923185.1).

Para examinar la función catalítica de UGT709G1, su marco de lectura abierta se expresó en *E. coli* como una proteína de fusión GST. Después de la purificación de la UGT

recombinante por cromatografía de afinidad, se ensayó para determinar su actividad O-glucosiltransferasa usando varios metabolitos secundarios y HTCC como sustratos aceptores en presencia del donante UDP-Glc. UGT709G1 rápida y eficientemente convirtió HTCC en un producto con un tiempo de retención y el espectro UV idéntico al de la picrocrocina, mientras que no se detectó dicho producto de reacción con los otros sustratos ensayados (Figura 9). La *E. coli* que alberga el vector de control no produjo productos de glucosilación de HTCC.

Ejemplo 9. Expresión de UGT709G1 en el tejido del estigma

Los niveles de transcripción de UGT709G1 se determinó en los órganos de la planta de azafrán por RT-PCR en tiempo real, utilizando Pfu polimerasa (Promega, Madison, EE.UU.). Las secuencias de oligonucleótidos representadas por las SEQ ID NO:19 y 20 se utilizaron para la clonación de UGT709G1.

El producto resultante se purificó en gel usando el sistema Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega, Madison, EE.UU.). El gen se clonó en el vector pGEX4T2 por recombinación usando el kit In-Fusion® HD Cloning Plus CE (Clontech) y cebadores específicos (Tabla 1). El plásmido de expresión resultante, es decir pGEX-UGT709G1, se secuenció para confirmar el montaje correcto y la falta de errores de secuencia. A continuación, pGEX-UGT709G1 se transformó en células de *Escherichia coli* BL21 (Novagen). Después de la transformación las colonias se seleccionaron en LB que contenía 100 µg/ml de placas de ampicilina. Las colonias individuales se cultivaron durante la noche en 5 ml de medio 2YT con ampicilina (50 µg/ml), a 25ºC, y se utilizaron 2,5 ml del cultivo para inocular 200 ml de medio fresco 2YT-AMP.

Las células se cultivaron a 25ºC hasta que se alcanzó un A600 de 0,8, después de lo cual se indujo el cultivo IPTG 1 mM y se dejó crecer durante 16 h a 25ºC. Las células se cosecharon por centrifugación a 5.000 g durante 10 minutos y se resuspendieron en 10 ml de PBS. Las células resuspendidas se sonicaron con una sonda de microtitulación en hielo hasta que la viscosidad desapareció. Después de la sonicación, las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 30 min. El sobrenadante y el sedimento se analizaron mediante PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) / SDS para la solubilidad de la proteína de fusión mediante tinción con *Coomasie*. La proteína de fusión glutatión S-transferasa (GST) - UGT709G1 se purificó por columna de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE

Healthcare Life Sciences). La concentración de proteína se determinó por Bradford usando albúmina de suero como estándar.

La abundancia relativa se comparó con los niveles de HTCC y picrocrocina en siete etapas de desarrollo de estigma (Figura 10A). En el tejido del estigma la expresión de UGT709G1 fue regulada en el desarrollo, y las transcripciones se detectaron principalmente en las primeras etapas de desarrollo y entre estas etapas se detectaron los niveles más altos de expresión en la etapa naranja (Figura 10B) y disminuyó gradualmente en las siguientes etapas.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para aislamiento, clonación y análisis de CCDs (BdCCD4.1 y BdCC4.3), ALDH (BdALDH1 y CsALDH1-3) y UGT (UGT709G1)

	Cebadores 3' y 5' RACE-PCRs		**Cebadores para amplificación de cDNAs de longitud completa**	
Enzima	**Directo 5'-3'**	**Inverso 5'-3'**	**Directo 5'-3'**	**Inverso 5'-3'**
BdCCD4.1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
BdCCD4.3	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23
BdALDH1	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25
CsALDH1	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
CsALDH2	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29
CsALDH3	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31
	Cebadores para la clonación en vectores de expresión		**Cebadores para qRT-PCR**	
Enzima	**Directo 5'-3'**	**Inverso 5'-3'**	**Directo 5'-3'**	**Inverso 5'-3'**
BdCCD4.1	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 47
BdCCD4.3	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 49
UGT709G	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 51
BdALDH1	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 53
CsALDH1	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 55
CsALDH2	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 57
CsALDH3	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 59

REIVINDICACIONES

1. Polinucleótido aislado que codifica un péptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

2. Polinucleótido aislado que codifica un péptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2.

3. Polinucleótido aislado que codifica un péptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3.

4. Polinucleótido aislado que codifica un péptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4.

5. Polinucleótido aislado que codifica un péptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5.

6. Polinucleótido aislado que codifica un péptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 6.

7. Polinucleótido aislado que codifica un péptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7.

8. Enzima codificada a partir de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

9. Enzima codificada a partir de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 2, que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

10. Enzima codificada a partir de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 3, que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3.

11. Enzima codificada a partir de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 4, que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4.

12. Enzima codificada a partir de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 5, que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5.

13. Enzima codificada a partir de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6.

14. Enzima codificada a partir de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 7, que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7.

15. Método de obtención de derivados de apocarotenoides en microorganismos y/o plantas, caracterizado porque que comprende la expresión en dichos microorganismos y/o plantas de la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 para la obtención de crocetina dialdehído.

16. Método de obtención según la reivindicación 15, caracterizado porque comprende la expresión en dichos microorganismos y/o plantas de la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 para la obtención de crocetina.

17. Método de obtención según las reivindicaciones 15 a 16, caracterizado porque comprende la expresión en dichos microorganismos y/o plantas de la enzima codificada que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 para la obtención de picrocrocina.

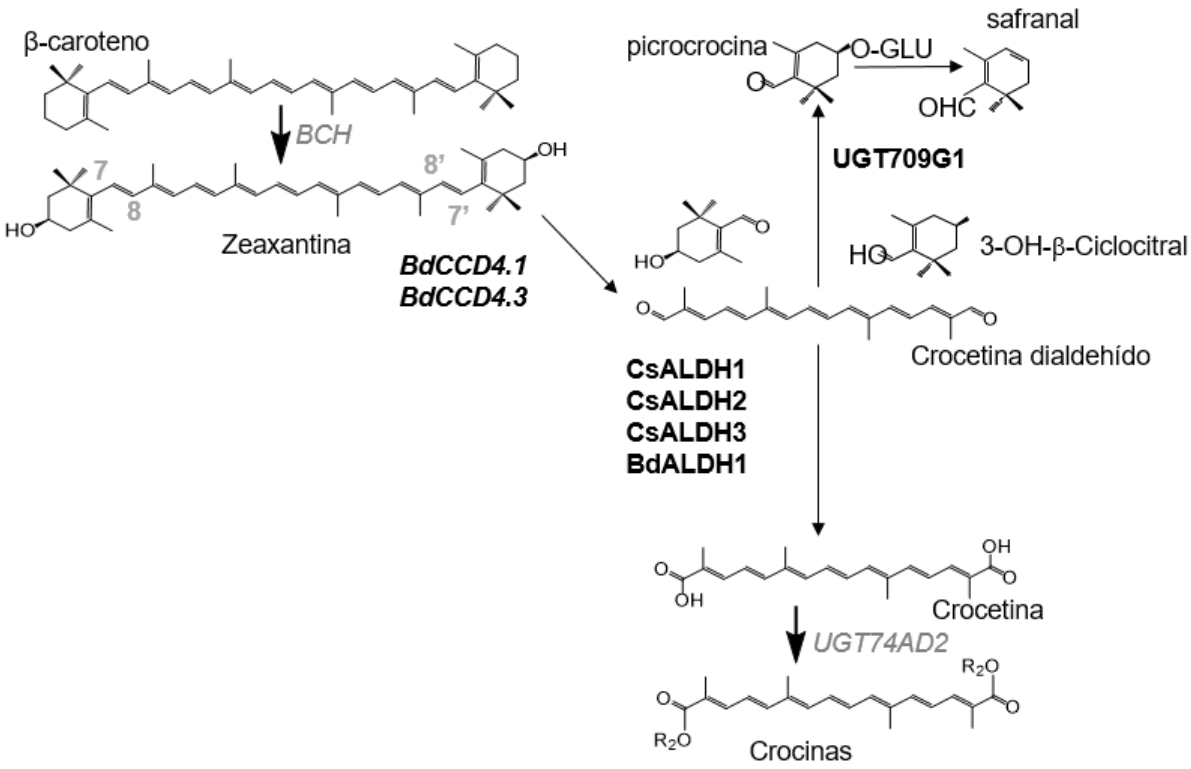

β-caroteno
BCH
Zeaxantina
BdCCD4.1
BdCCD4.3
picrocrocina
O-GLU
safranal
OHC
UGT709G1
3-OH-β-Ciclocitral
Crocetina dialdehído
CsALDH1
CsALDH2
CsALDH3
BdALDH1
Crocetina
UGT74AD2
Crocinas

FIG.1

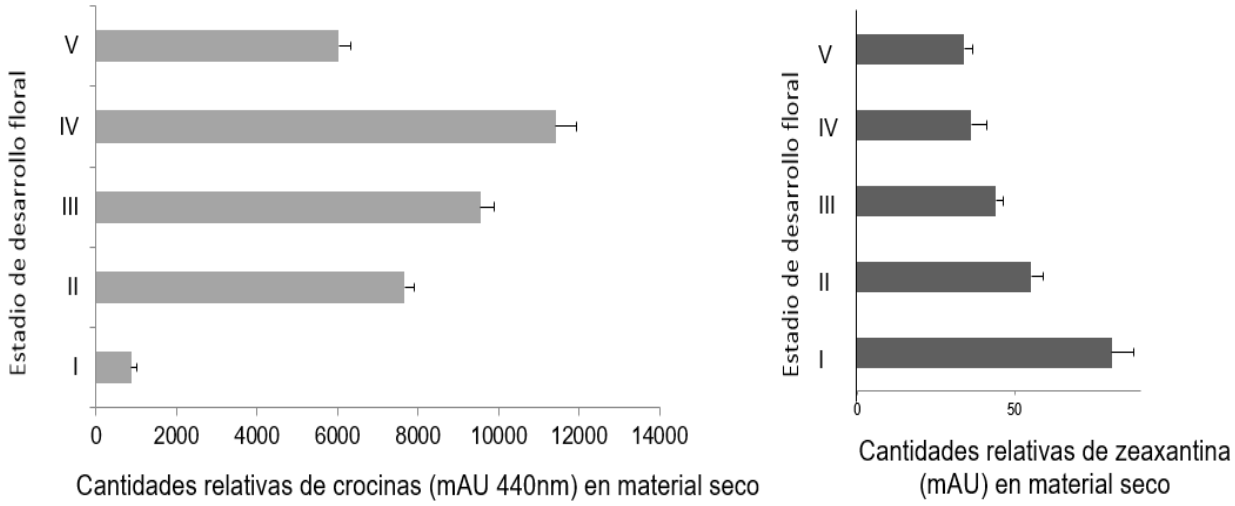

Estadio de desarrollo floral
V
IV
III
II
I
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
Cantidades relativas de crocinas (mAU 440nm) en material seco
50
Cantidades relativas de zeaxantina (mAU) en material seco

FIG.2

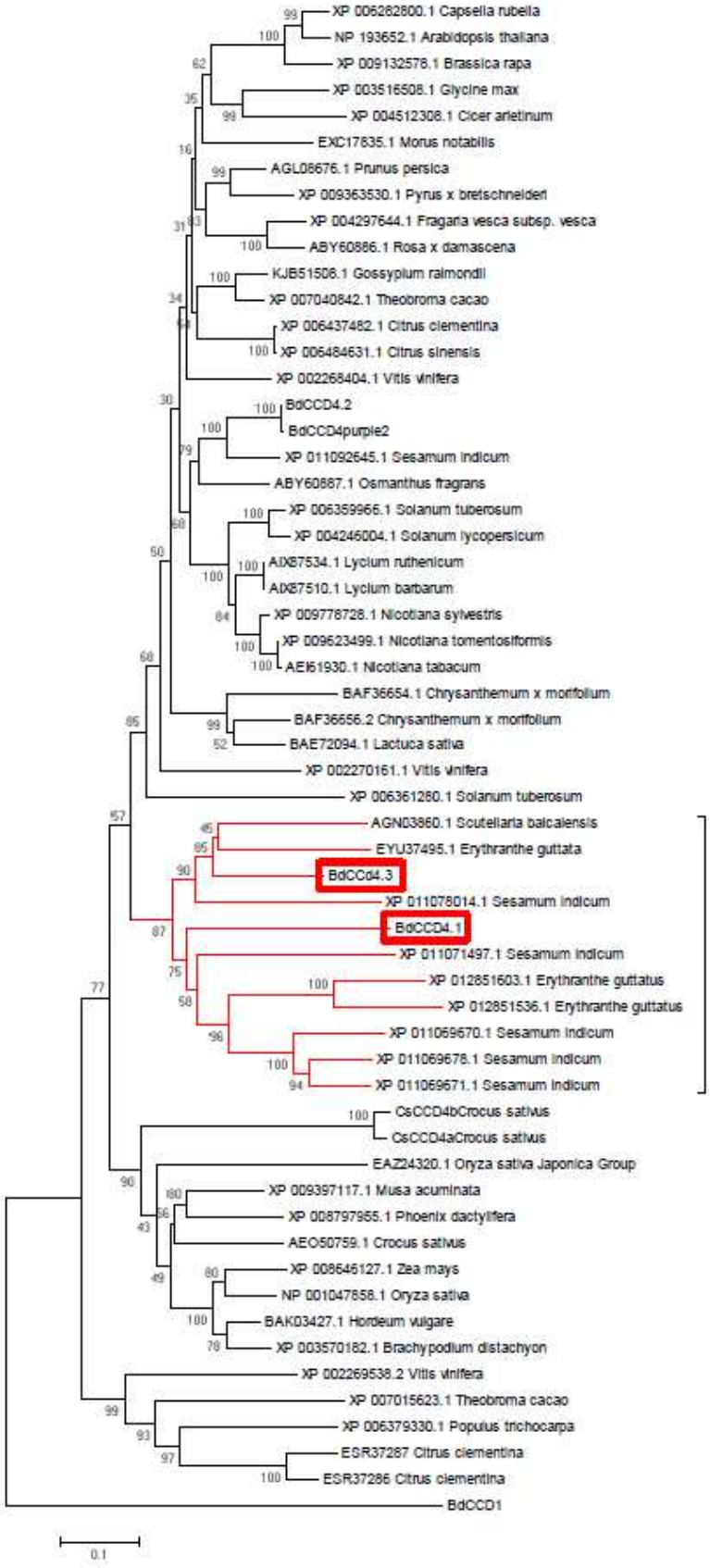

XP 006282800.1 Capsella rubella
NP 193652.1 Arabidopsis thaliana
XP 009132578.1 Brassica rapa
XP 003516508.1 Glycine max
XP 004512308.1 Cicer arietinum
EXC17635.1 Morus notabilis
AGL08676.1 Prunus persica
XP 009363530.1 Pyrus x bretschneideri
XP 004297644.1 Fragaria vesca subsp. vesca
ABY60886.1 Rosa x damascena
KJB51506.1 Gossypium raimondii
XP 007040842.1 Theobroma cacao
XP 006437482.1 Citrus clementina
XP 006484631.1 Citrus sinensis
XP 002268404.1 Vitis vinifera
BdCCD4.2
BdCCD4purple2
XP 011092645.1 Sesamum indicum
ABY60887.1 Osmanthus fragrans
XP 006359966.1 Solanum tuberosum
XP 004246004.1 Solanum lycopersicum
AIX87534.1 Lycium ruthenicum
AIX87510.1 Lycium barbarum
XP 009778728.1 Nicotiana sylvestris
XP 009623499.1 Nicotiana tomentosiformis
AEI61930.1 Nicotiana tabacum
BAF36654.1 Chrysanthemum x morifolium
BAF36656.2 Chrysanthemum x morifolium
BAE72094.1 Lactuca sativa
XP 002270161.1 Vitis vinifera
XP 006361280.1 Solanum tuberosum
AGN03860.1 Scutellaria baicalensis
EYU37495.1 Erythranthe guttata
BdCCd4.3
XP 011078014.1 Sesamum indicum
BdCCD4.1
XP 011071497.1 Sesamum indicum
XP 012851603.1 Erythranthe guttatus
XP 012851536.1 Erythranthe guttatus
XP 011069670.1 Sesamum indicum
XP 011069678.1 Sesamum indicum
XP 011069671.1 Sesamum indicum
CsCCD4bCrocus sativus
CsCCD4aCrocus sativus
EAZ24320.1 Oryza sativa Japonica Group
XP 009397117.1 Musa acuminata
XP 008797955.1 Phoenix dactylifera
AEO50759.1 Crocus sativus
XP 008646127.1 Zea mays
NP 001047858.1 Oryza sativa
BAK03427.1 Hordeum vulgare
XP 003570182.1 Brachypodium distachyon
XP 002269538.2 Vitis vinifera
XP 007015623.1 Theobroma cacao
XP 006379330.1 Populus trichocarpa
ESR37287 Citrus clementina
ESR37286 Citrus clementina
BdCCD1
0.1

FIG.3

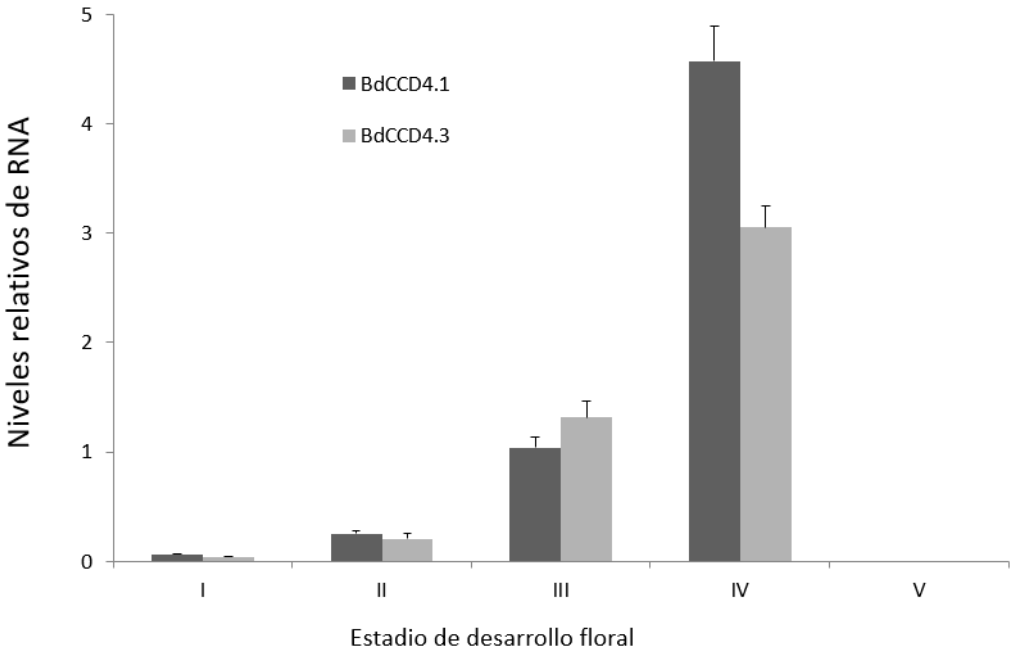

Niveles relativos de RNA
BdCCD4.1
BdCCD4.3
0
1
2
3
4
5
I
II
III
IV
V
Estadio de desarrollo floral

FIG.4

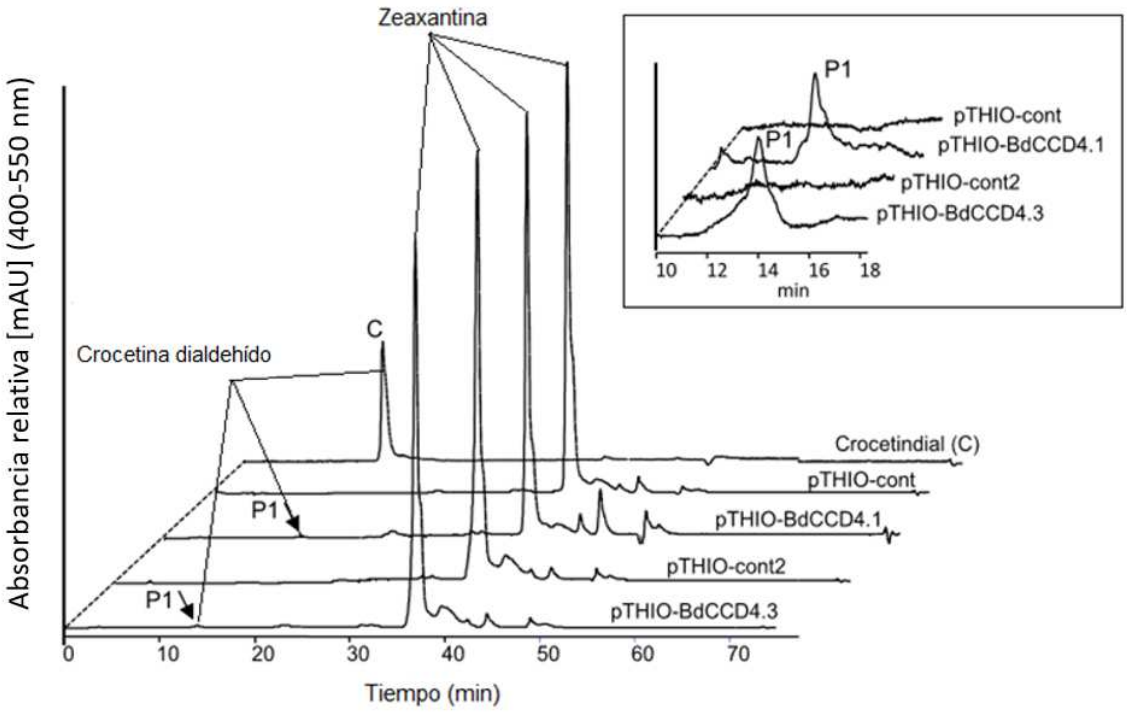

Absorbancia relativa [mAU] (400-550 nm)
Zeaxantina
C
Crocetina dialdehído
P1
P1
Crocetindial (C)
pTHIO-cont
pTHIO-BdCCD4.1
pTHIO-cont2
pTHIO-BdCCD4.3
0
10
20
30
40
50
60
70
Tiempo (min)
P1
pTHIO-cont
pTHIO-BdCCD4.1
pTHIO-cont2
pTHIO-BdCCD4.3
10
12
14
16
18
min

FIG.5

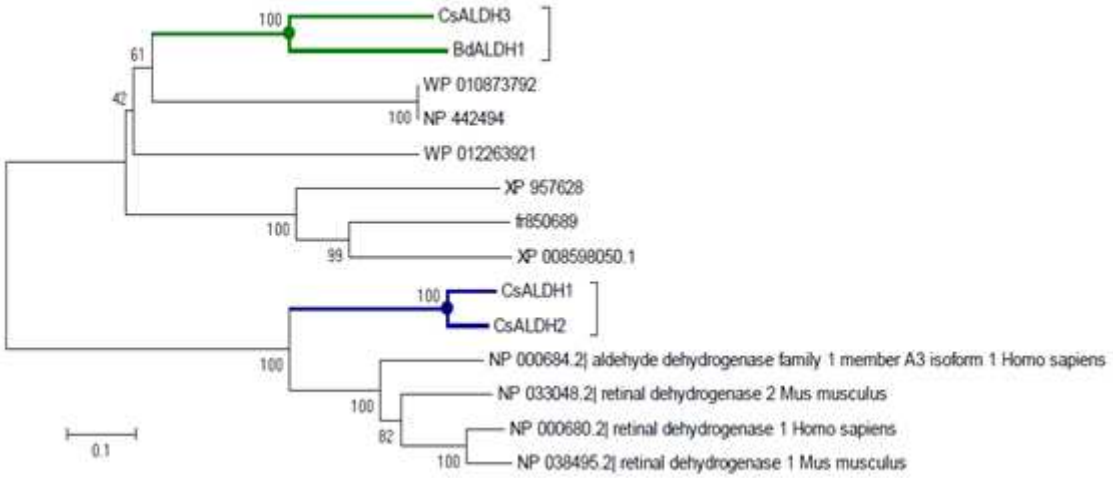

CsALDH3
BdALDH1
WP 010873792
NP 442494
WP 012263921
XP 957628
tr850689
XP 008598050.1
CsALDH1
CsALDH2
NP 000684.2| aldehyde dehydrogenase family 1 member A3 isoform 1 Homo sapiens
NP 033048.2| retinal dehydrogenase 2 Mus musculus
NP 000680.2| retinal dehydrogenase 1 Homo sapiens
NP 038495.2| retinal dehydrogenase 1 Mus musculus
0.1

FIG.6

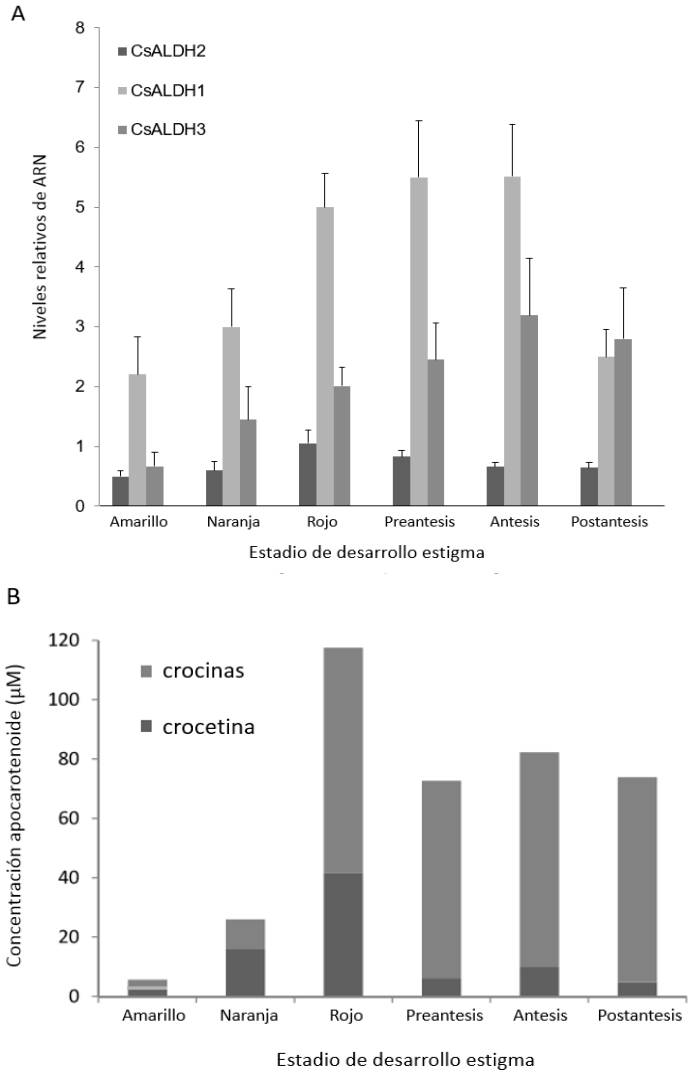
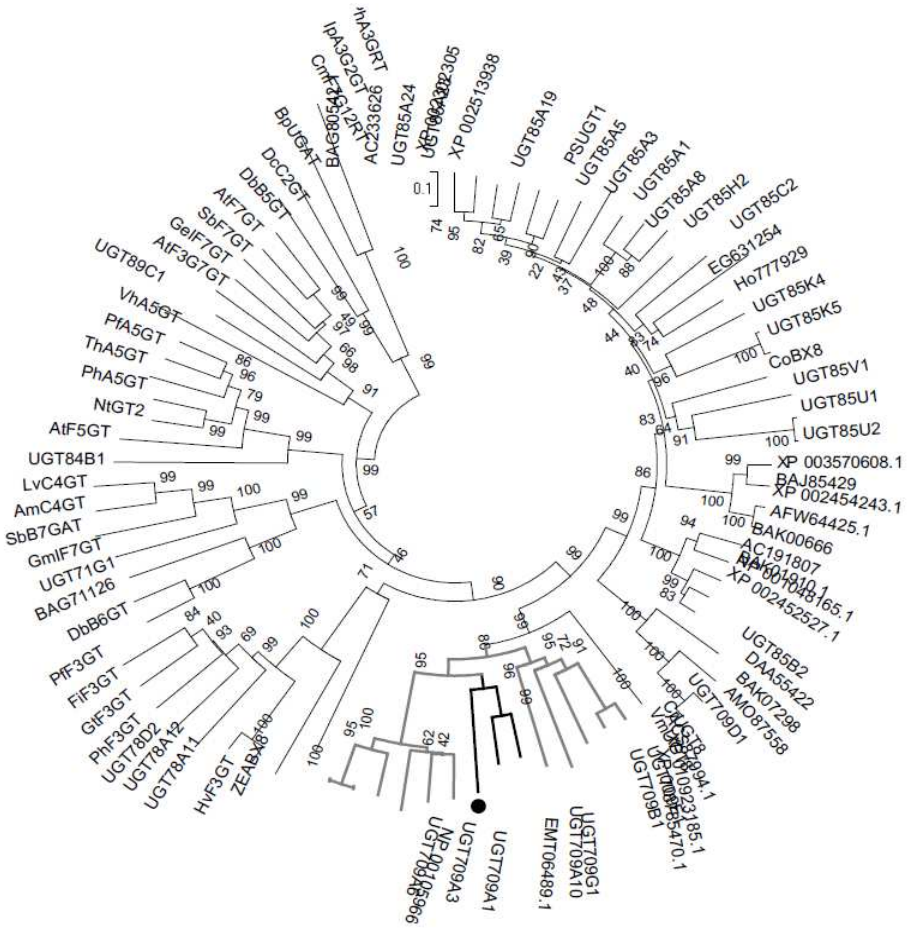
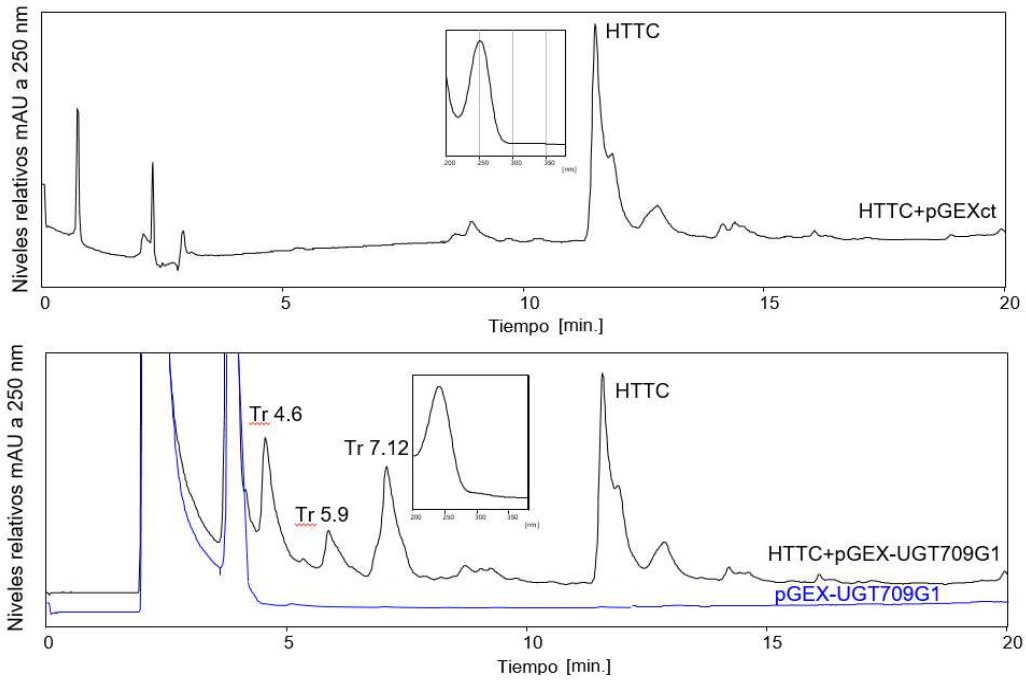

A
CsALDH2
CsALDH1
CsALDH3
Niveles relativos de ARN
Amarillo
Naranja
Rojo
Preantesis
Antesis
Postantesis
Estadio de desarrollo estigma
B
crocinas
crocetina
Concentración apocarotenoide (µM)
Amarillo
Naranja
Rojo
Preantesis
Antesis
Postantesis
Estadio de desarrollo estigma

FIG.7



IpA3G2GT
AC233626
UGT85A24
XP 002513938
UGT85A19
PSUGT1
UGT85A5
UGT85A3
UGT85A1
UGT85A8
UGT85H2
UGT85C2
EG631254
Ho777929
UGT85K4
UGT85K5
CoBX8
UGT85V1
UGT85U1
UGT85U2
XP 003570608.1
BAJ85429
XP 002454243.1
AFW64425.1
BAK00666
AC191807
XP 002452527.1
UGT85B2
DAA55422
BAK07298
AMO87558
UGT709D1
UGT709B1
UGT709G1
UGT709A10
EMT06489.1
UGT709A1
UGT709A3
UGT709A6
HvF3GT
ZEABX8
UGT78A11
UGT78A12
UGT78D2
PhF3GT
GtF3GT
FiF3GT
PfF3GT
DbB6GT
BAG71126
UGT71G1
GmIF7GT
SbB7GAT
AmC4GT
LvC4GT
UGT84B1
AtF5GT
NtGT2
PhA5GT
ThA5GT
PfA5GT
VhA5GT
UGT89C1
AtF3G7GT
GelF7GT
SbF7GT
AtF7GT
DbB5GT
DcC2GT
BpUGAT

FIG.8



Niveles relativos mAU a 250 nm
HTTC
HTTC+pGEXct
0
5
10
15
20
Tiempo [min.]
Niveles relativos mAU a 250 nm
Tr 4.6
Tr 7.12
Tr 5.9
HTTC
HTTC+pGEX-UGT709G1
pGEX-UGT709G1
0
5
10
15
20
Tiempo [min.]

FIG.9

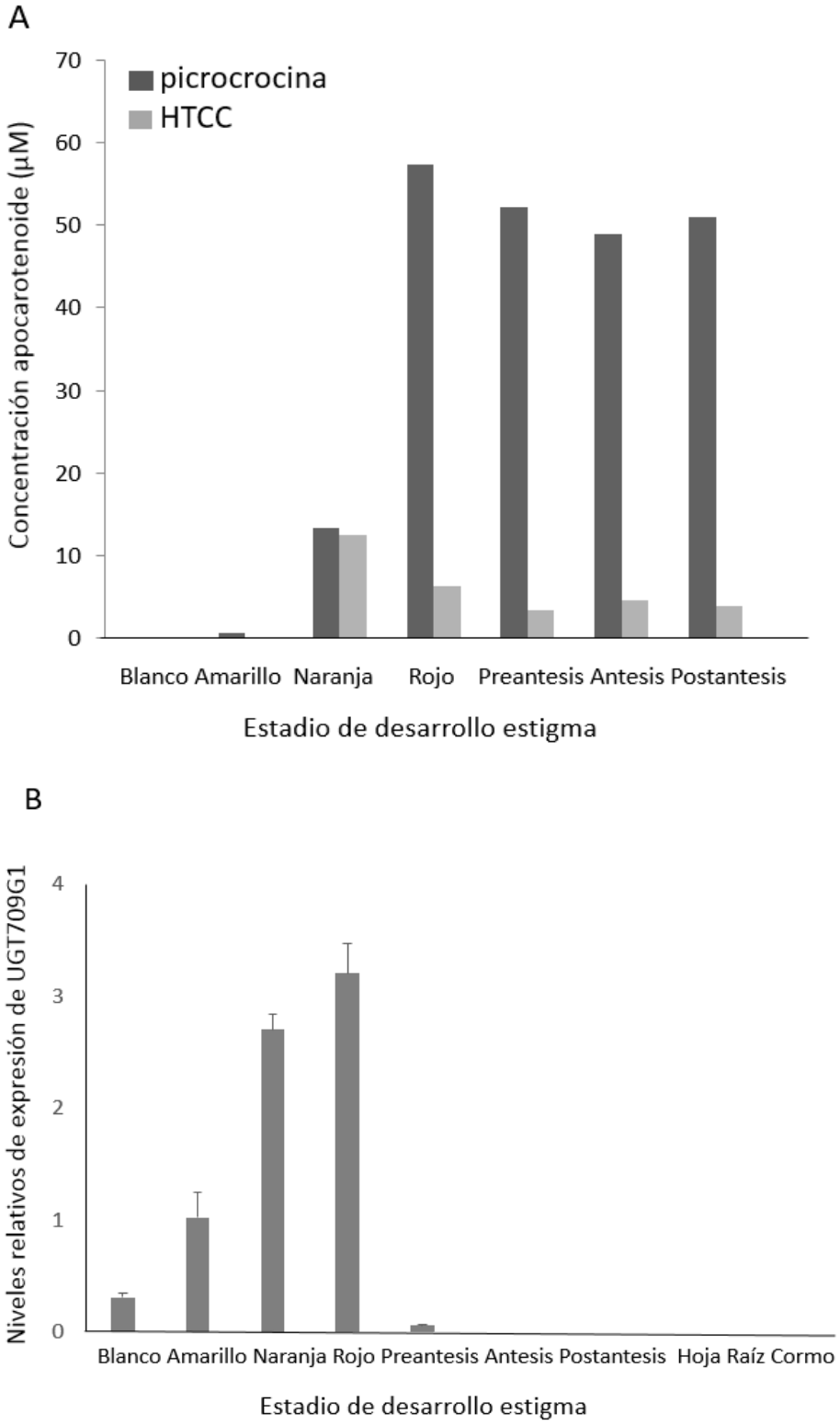

A
picrocrocina
HTCC
Concentración apocarotenoide (µM)
70
60
50
40
30
20
10
0
Blanco Amarillo Naranja Rojo Preantesis Antesis Postantesis
Estadio de desarrollo estigma
B
Niveles relativos de expresión de UGT709G1
4
3
2
1
0
Blanco Amarillo Naranja Rojo Preantesis Antesis Postantesis Hoja Raíz Cormo
Estadio de desarrollo estigma

FIG.10

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201731043

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 21.08.2017

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***C12N15/52*** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
A	WO 2016012968 A1 (ENEA ENTE NUOVE TEC) 28/01/2016, reivindicaciones	1-17
A	ES 2334423 A1 (UNIV CASTILLA LA MANCHA) 09/03/2010, reivindicaciones	1-17
A	FRUSCIANTE S et al. Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 20140819 National Academy of Sciences. , 19/08/2014, Vol. 111, Nº 33, Páginas 12246 - 12251, ISSN 0027-8424, <DOI: doi:10.1073/pnas.1404629111>, resumen	1-17

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
23.03.2018	I. Rueda Molíns	1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBL-EBI