

PAPEL DE LA FENILACETALDEHÍDO REDUCTASA (OePAR) EN EL METABOLISMO FENÓLICO DE LA ACEITUNA

Bahamonde Pereira, Cristina (1), Herrera, M^a Begoña (2), Sánchez, M^a Rosario (1) y Pérez, Ana Gracia (1)

(1)Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Productos Vegetales. Instituto de la Grasa, CSIC. Sevilla.

(2)Área de Fisiología Vegetal. Dpto. de Fisiología, Anatomía y Biología Celular. Universidad Pablo de Olavide. Sevilla.

Introducción

✓ V^oB^o Begoña Herrera

El aceite de oliva virgen (AOV) es muy rico en compuestos fenólicos beneficiosos para la salud [1] y claves para las propiedades organolépticas del AOV [2]. La oleuropeína, un compuesto secoiridoideo complejo con hidroxitirosol, es el compuesto fenólico más abundante en el mesocarpo de la aceituna y, además, es el precursor de los fenoles más importantes encontrados en el AOV [3]. En este estudio se ha completado la caracterización bioquímica de dos fenilacetaldehído reductasas (OePAR 1.1 y 1.2) relacionadas con la biosíntesis de hidroxitirosol y tirosol en olivo. Estas enzimas usan como sustrato el 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (3,4-DHPAA) y el 4-hidroxifenilacetaldehído (4-HPAA) para formar hidroxitirosol (figura 1) y tirosol, respectivamente [3,4].

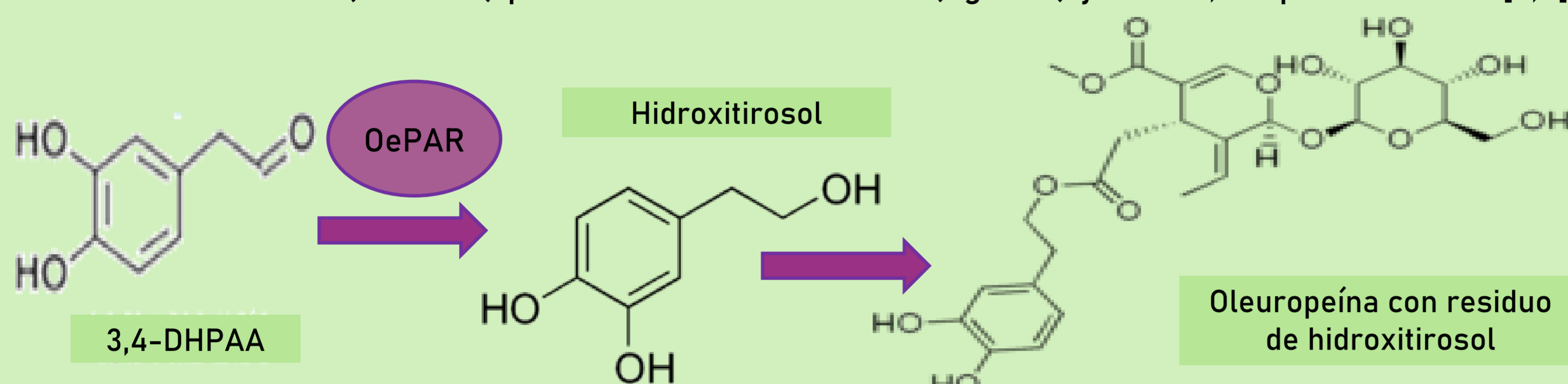


Figura 1. Formación del hidroxitirosol mediante la reducción del 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (3,4-DHPAA) para formar posteriormente oleuropeína.

Metodología

Se han identificado dos genes que codifican enzimas con actividad putativa fenilacetaldehído reductasa a partir de un transcriptoma de olivo obtenido de siete variedades de olivo con diferentes perfiles fenólicos [3]. Ambos han sido sintetizados, clonados en el vector pET-28a(+)-TEV y expresados en *Escherichia coli* (cepa BL21). Se ha optimizado la extracción y la purificación por cromatografía de afinidad (His SpinTrap) de sus proteínas recombinantes (figura 2). La pureza de las proteínas se evaluó mediante electroforesis (SDS-PAGE) y densitometría y su concentración mediante el ensayo de Bradford. La identidad funcional de estas proteínas se ha determinado mediante ensayos de actividad *in vitro* analizados por HPLC para cuantificar sustratos y productos y completar la caracterización cinética de ambas proteínas.

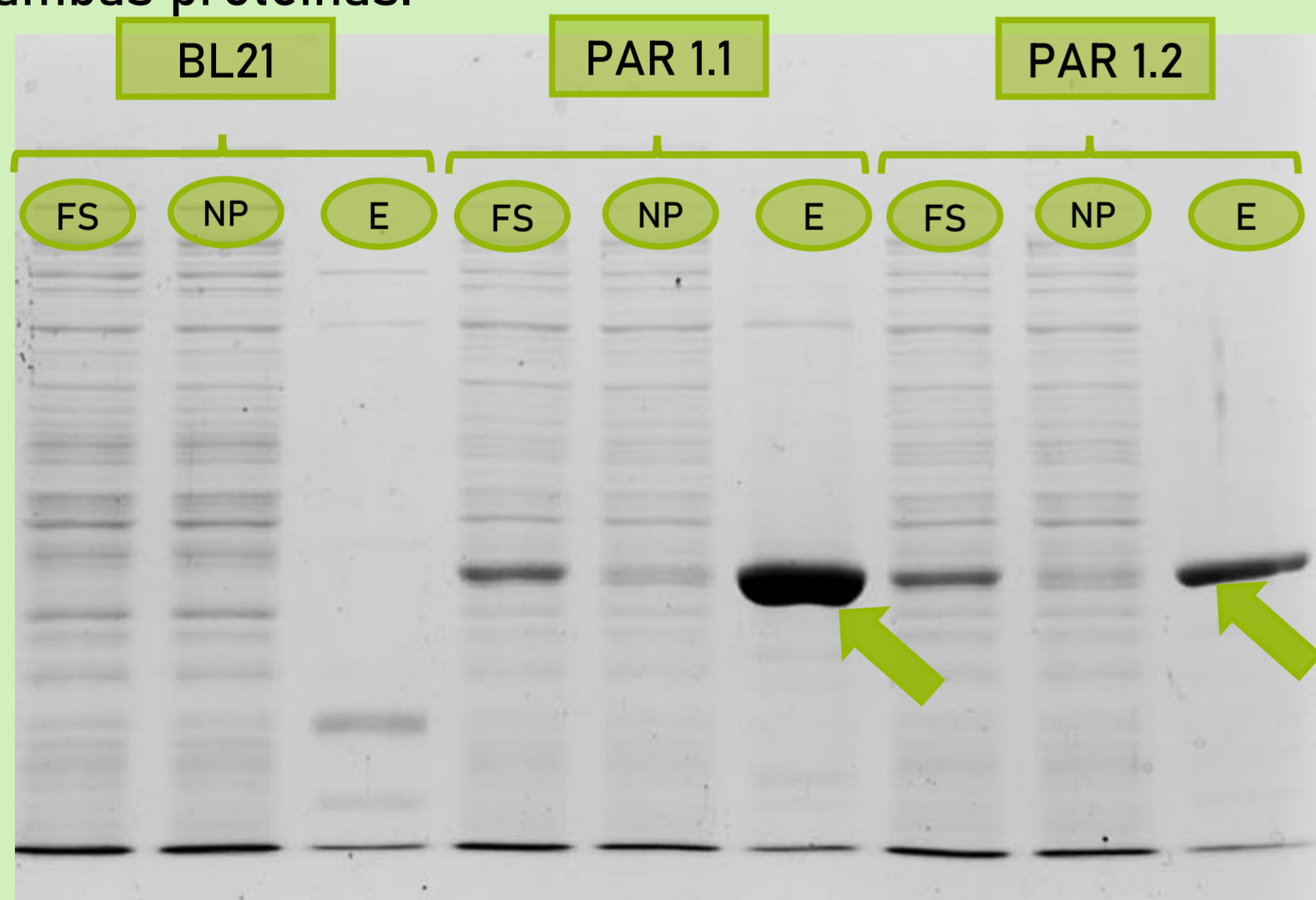


Figura 2. SDS-PAGE con la fase soluble (FS) del extracto crudo de proteínas tras la rotura de *E. coli*, y la fracción no pegada (NP) y la eluida (E) después de someterlo a cromatografía de afinidad para la purificación del extracto control (BL21), *E. coli* sin el vector pET-28^a (+), y del de *E. coli* transformada con las construcciones *OePAR 1.1* y *1.2*. Las flechas indican las proteínas *OePAR* purificadas.

Resultados y discusión

Las dos proteínas recombinantes muestran actividad reductasa formando hidroxitirosol después de su incubación con 3,4-DHPAA (figura 3).

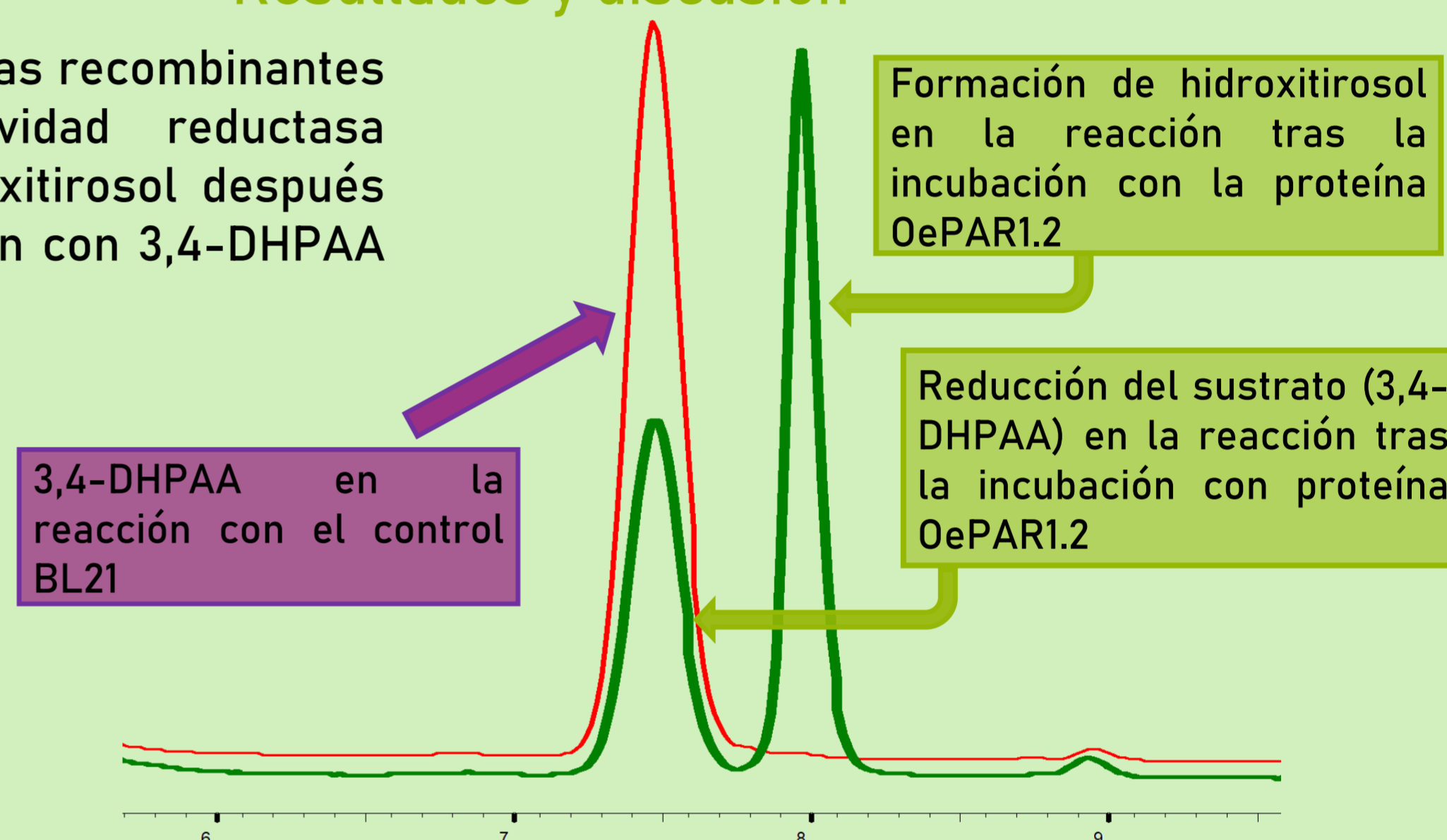


Figura 3. Fragmento de cromatograma que muestra la formación de hidroxitirosol tras la incubación de *OePAR1.2* con 3,4-DHPAA

La reacción es óptima a tiempos cortos de incubación (5 minutos) y a pH 6.5. Además, *OePAR1.2* posee una actividad específica significativamente mayor que *OePAR1.1* (figura 4), siendo su velocidad máxima aproximadamente 2,5 veces mayor, sin embargo, *OePAR1.1* tiene mayor especificidad por el sustrato mostrando una K_m menor (tabla 1).

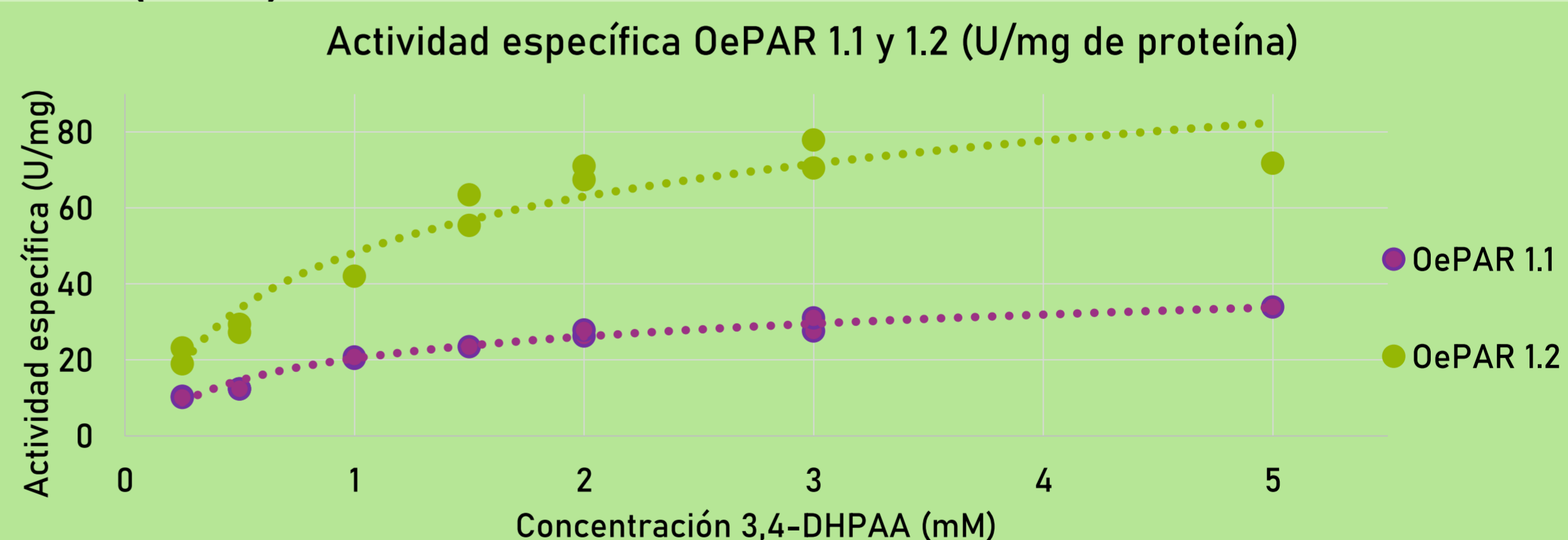


Figura 4. Actividad específica (U/mg de proteína) de *OePAR 1.1* y *1.2* a diferentes concentraciones (mM) de sustrato (3,4-DHPAA).

Proteínas	Vel. máx (μmoles totales de Hty/min.)	K_m (mM)
<i>OePAR 1.1</i>	0,068023	0,63866
<i>OePAR 1.2</i>	0,17441	0,84446

Conclusiones

Se han identificado dos genes de olivo que codifican para dos enzimas reductasas clave en la formación de hidroxitirosol, compuesto con propiedades funcionales muy importantes, completándose así su ruta biosintética y mostrándose una alta especificidad enzimática siendo sus K_m inferiores a 1 mM en ambas isoformas.

Referencias:

- [1] Parkinson, L. and Cicerale, S. (2016). The Health Benefiting Mechanisms of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds. *Molecules*, 21(12), 1734. doi:10.3390/molecules21121734
- [2] Mateos, R., Cert, A., Pérez-Camino, M. and García, J. (2004). Evaluation of virgin olive oil bitterness by quantification of secoiridoid derivatives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(1), pp.71-75. https://doi.org/10.1007/s11746-004-0859-x
- [3] Sánchez, R., García-Vico, L., Sanz, C. and Pérez, A. (2019). An Aromatic Aldehyde Synthase Controls the Synthesis of Hydroxytyrosol Derivatives Present in Virgin Olive Oil. *Antioxidants*, 8(9), 352. doi:10.3390/antiox8090352
- [4] Torrens-Spence, M., Pluskal, T., Li, F., Carballo, V. and Weng, J. (2018). Complete Pathway Elucidation and Heterologous Reconstitution of *Rhodiola* Salidroside Biosynthesis. *Molecular Plant*, 11(1), pp.205-217. doi:10.1016/j.molp.2017.12.007