

PAPEL DE LA POLIFENOL OXIDASA EN EL METABOLISMO DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL OLIVO

Arroyo Morales, Laura (1), Herrera Rodríguez, María Begoña (3), Sánchez Rodríguez, Rosario (2) y Pérez Rubio, Ana Gracia (1)

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

(2) Servicio de Biología Molecular. Instituto de la Grasa, CSIC. Sevilla.

(3) 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 la principal grasa de la dieta mediterránea y posee numerosos beneficios nutricionales y excelentes propiedades organolépticas debido, principalmente, a los compuestos fenólicos presentes en su composición. El contenido fenólico del AOV depende del contenido de glucósidos fenólicos presentes en la aceituna, que son transformados mediante reacciones hidrolíticas y oxidativas [1].

La enzima más importante en la degradación oxidativa de los compuestos fenólicos durante el proceso de extracción del AOV es la **polifenol oxidasa (PPO)**. Esta enzima puede tener actividad mono o difenolasa (Figura 1), por lo que está implicada tanto en la degradación de compuestos fenólicos como en la síntesis de ortodifenoles [1].

El **objetivo** de este trabajo es caracterizar estas enzimas para comprender mejor el metabolismo y la degradación de los compuestos fenólicos.

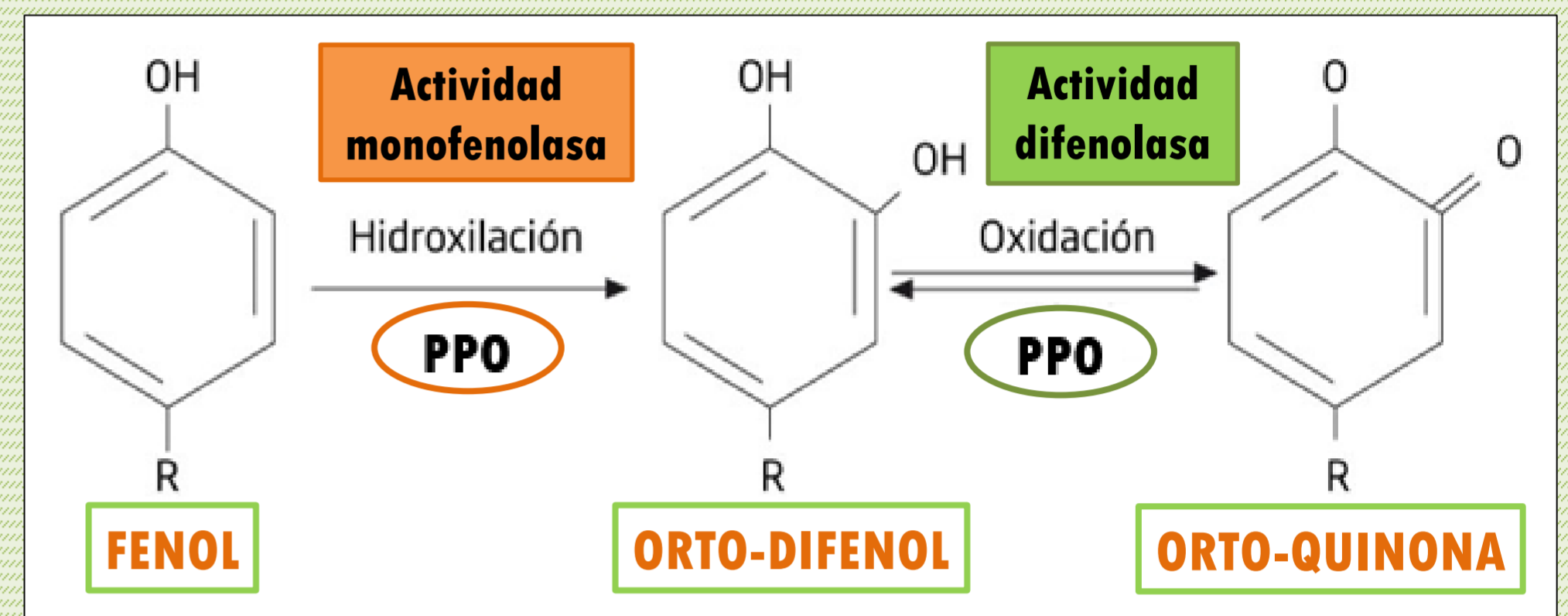


Figura 1. Reacciones que cataliza la polifenol oxidasa (PPO).

METODOLOGÍA

Se han extraído los compuestos fenólicos de aceitunas de diferentes variedades, estadios de maduración y diferentes condiciones experimentales, así como de sus correspondientes AOVs [1] y han sido analizados mediante HPLC [2].

Se han identificado 2 genes de polifenol oxidasa (**OePPO1** y **OePPO2**) a partir de un transcriptoma obtenido con distintas variedades de olivo, seleccionadas por su distinto perfil fenólico y sometidas a diferentes estreses bióticos y abióticos [3]. Ambos genes se han sintetizado, clonado en el vector pGEX6p.1 y expresado en *E. coli* (cepa BL21).

Se ha optimizado la extracción y purificación de las proteínas recombinantes (**PPO1** y **PPO2**) utilizando cromatografía de afinidad (Glutathion Sepharose 4B) [4]. La pureza de las proteínas se ha calculado mediante electroforesis (SDS-PAGE) y análisis densitométrico, y su concentración estimada mediante el método de Bradford. Se han caracterizado funcionalmente ambas proteínas recombinantes utilizando métodos espectrofotométricos y cromatográficos (HPLC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto PPO1 como PPO2 se han obtenido con altos porcentajes de pureza. Sin embargo, como se observa en la Figura 2, se consigue una mayor solubilización de PPO2 que de PPO1 (FS), lo que permite obtener mayor cantidad de PPO2 (E). En el caso de PPO1 se observa una doble banda (E) debido a una baja inducción, que provoca un plegamiento incorrecto de la proteína, por lo que se obtiene una mezcla de moléculas mal plegadas (banda superior) y moléculas que sí se han plegado de manera correcta (banda inferior), siendo estas las que poseen actividad [5].

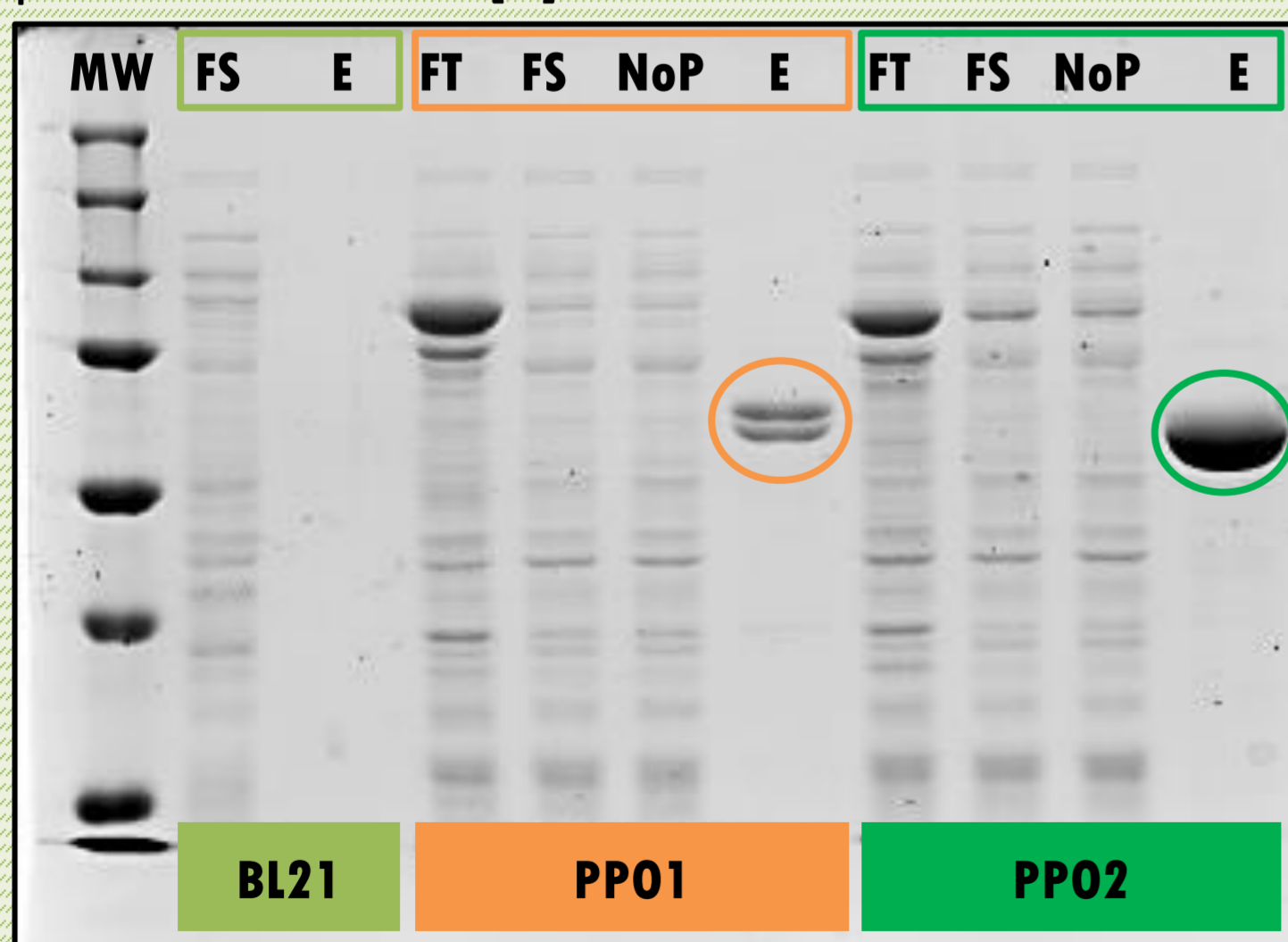


Figura 2. Gel (SDS-PAGE) con los extractos tras la rotura de *E. coli* (FT, fracción total y FS, fracción soluble) y tras la purificación de las proteínas recombinantes PPO1 y PPO2 (NoP, no pegado y E, eluido). Se utiliza BL21 como control.

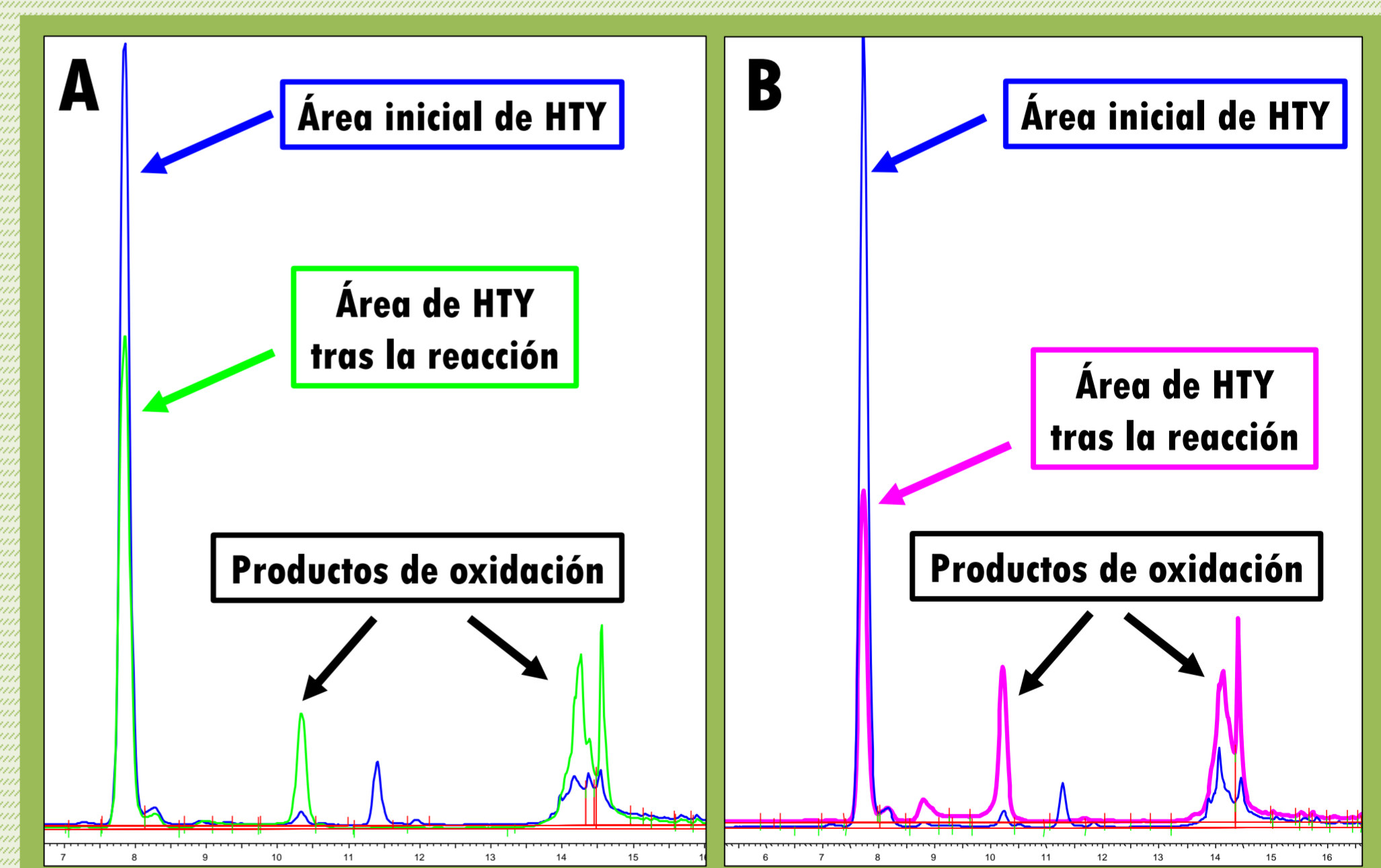


Figura 3. Fragmento del cromatograma tras la reacción de PPO1 (A) y PPO2 (B) con 2,5 mM HTY, obtenido mediante HPLC.

Se ha demostrado que PPO1 y PPO2 son activas frente al **hidroxitiroso (HTY)**, el *o*-difenol más importante del AOV, por lo que es posible afirmar que ambas proteínas recombinantes poseen **actividad difenolasa** (Figura 3). En ambos casos, tras la reacción, se observa una disminución de HTY y la aparición de diversos productos de oxidación. Se ha completado la caracterización cinética de ambas enzimas por métodos espectrofotométricos, usando terbutilcatecol como sustrato.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) García-Rodríguez, R., Romero-Segura, C., Sanz, C., Sánchez-Ortiz, A., and Pérez, A. G. (2011). Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Res. Int.* 44, pp.629–635
- (2) Mateos, R., Espartero, J.L., Trujillo, M., Ríos, J.J., León-Camacho, M., Alcudia, F., and Cert, A. (2001) Determination of phenols, flavones and lignans in virgin olive oils by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *J Agric Food Chem* 49, pp. 2185-2192.
- (3) Sánchez, R., García-Vico, L., Sanz, C., and Pérez, A. G. (2019). An Aromatic Aldehyde Synthase Controls the Synthesis of Hydroxytyrosol Derivatives Present in Virgin Olive Oil. *Antioxidants* 8(9), 352.
- (4) Kampatsikas, I., Bijelic, A., Pretzler, M., and Rompel, A. (2017). Three recombinantly expressed apple tyrosinases suggest the amino acids responsible for mono- versus diphenolase activity in plant polyphenol oxidases. *Scientific Reports* 7(1), 8860.
- (5) Dirks-Hofmeister, M. E., Kolkenbrock, S., and Moerschbacher, B. M. (2013). Parameters That Enhance the Bacterial Expression of Active Plant Polyphenol Oxidases. *PLoS ONE* 8(10), e77291.