

RUPTURA BIO-OXIDATIVA DE LUTEÍNA POR UNA PEROXIDASA DE *GEOTRICHUM* SP.

Ángeles Sánchez-Contreras¹, Elia Rufino¹, Ezequiel Jänsch¹, Sergio Sánchez² y Manuel Jiménez-Estrada¹, 1. Instituto de Química, 2. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México Cp. 04510 Fax 56162217 ansancon@correo.unam.mx

Luteína, peroxidasas, *Geotrichum* sp

Introducción. *Geotrichum* sp. se aisló por su capacidad para degradar luteína y generar compuestos volátiles. Cuando este microorganismo actúa en conjunto con *Paenibacillus amilolitico*, la degradación de luteína es mayor y los compuestos volátiles que se forman tienen un fuerte aroma a tabaco. Sin embargo, encontramos que las proteínas responsables de la ruptura bio-oxidativa de la luteína son inducibles en *Geotrichum* sp. y se excretan al medio de cultivo debido a la presencia de luteína. De las proteínas excretadas al medio de cultivo, se ha logrado identificar una peroxidasa de aproximadamente 88.5 kDa y los compuestos que se han obtenido *in vitro* por la degradación enzimática de la luteína son beta-ionona y 3-hidroxi-beta-ionona.

Metodología. Las fermentaciones se realizaron como se reportó antes por Sánchez-Contreras et. al.¹ A las 36 h de fermentación, del medio de cultivo libre de células, se obtuvo proteína enriquecida por precipitación fraccionada con sulfato de amonio (0-60%), la proteína precipitada se dializó y se concentró empleando membranas de centricon, los extractos proteicos se resuspendieron en buffer de fosfatos (0.1mM), pH=7.0 y se cuantificaron por el método de Lowry. Los extractos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con y sin SDS. A los geles nativos, se les realizó un zimograma para determinar la actividad de peroxidasa (POD), para ello se adaptó el método reportado por Civello et al.². A la enzima aislada, con actividad de peroxidasa, se le determinó la capacidad de degradar luteína *in vitro*, se determinó la actividad de degradación de luteína (LUT) y adicionalmente, se usó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/SM) para identificar los compuestos volátiles generados *in vitro*. La degradación *in vitro* se realiza a pH 7 y temperatura ambiente midiendo por espectrofotometría durante 60 min.

Resultados y discusión. Cuando *Geotrichum* sp. es crecido en presencia de luteína se excretan al medio de cultivo proteínas de diferente peso molecular (fig 1A). En los zimogramas con geles nativos se detectó la actividad de peroxidasa para una proteína de aproximadamente 88.5 kDa. Esta enzima semipurificada (fig 1B) tiene una actividad específica de POD de 0.82U. Esta actividad es relativamente alta si la comparamos con una peroxidasa comercial como la de la raíz de rábano blanco (*Armoracia rusticana*). De las peroxidasas reportadas, aisladas principalmente de soya, se sabe que alcanzan una actividad específica entre 10-100 veces menor a la que alcanza la peroxidasa de rábano. En este sentido es relevante mencionar que la peroxidasa de *Geotrichum* sp. alcanza cerca del 50 % de la actividad que alcanza la peroxidasa de rábano blanco.

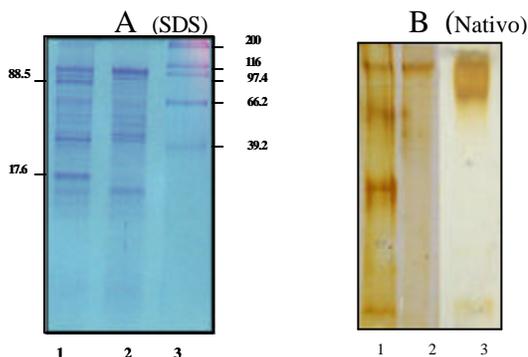


Fig.1 Gel de poliacrilamida 12 %, proteína enriquecida del medio de cultivo de *Geotrichum* sp (A) (1) con luteína y (2) sin luteína. (3) Marcador de peso molecular (B)(1) extracto crudo (2) semipurificación (3) enriquecimiento.

La actividad de LUT se resume en el cuadro 1 y aunque la degradación es muy lenta, los compuestos que se obtienen por la degradación enzimática de la luteína *in vitro* son los mismos productos de la degradación reportados antes, la 3-hidroxi-beta-ionona y la beta-ionona¹.

Cuadro 1. Actividad específica de degradación de luteína.

	LUT (U)	POD (U)
Extracto crudo	0.0126	0.15
Extracto semi purificado	0.0328	0.82
Extracto enriquecido	0.0370	0.85

(1U deLUT) = 1µmol de luteína degradada/min.mg de proteína

(1U de POD) = 1µmol de tetraguayacol/min.mg de proteína

Conclusiones. *Geotrichum* sp. es capaz de degradar luteína y zeaxantina, fragmentando la molécula en la posición 9,10 para producir beta-ionona y 3-hidroxi-beta-ionona. La peroxidasa se induce por la presencia de luteína en el medio de cultivo y es de tipo extracelular.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado por el proyecto PAPIT-IN212201.

Bibliografía

- Sánchez-Contreras, A., Jiménez, M., Sánchez, S., (2000) Bioconversión of lutein to products with aroma Appl Microbiol Biotechnol 54:528-534.
- Civello P.M., Martínez G. A., Chaves A. R., Añón M.C., (1995) Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial purification and determination of some properties J. Agric. Food Chem. 43, 2596-2601.