

## PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA $\beta$ -IONONA REDUCTASA DE *PAENIBACILLUS AMYLOLYTICUS*

Gabriela Maldonado-Robledo<sup>1</sup>, Eduardo Rodríguez-Bustamante<sup>1</sup>, Roberto Arreguín-Espinosa<sup>2</sup>, Sergio Sánchez Esquivel<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Depto. De Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UNAM  
Ciudad Universitaria, México, D.F., C.P. 04510, Fax (55)56223855, e-mail sersan@servidor.unam.mx

*Palabras clave:*  $\beta$ -ionona reductasa, *Paenibacillus amylolyticus*, compuestos con aroma a tabaco.

**Introducción.** Los carotenoides son los pigmentos más ampliamente distribuidos en la naturaleza. Su principal función es proporcionar color y ser pigmentos accesorios de la fotosíntesis. Además, se sabe que pueden ser precursores de compuestos con aroma y sabor presentes en flores y frutos (1). Entre dichos compuestos se encuentran las iononas, que son muy apreciadas como aditivos en las industrias alimentaria, tabacalera y de perfumería. Actualmente, dichos compuestos se obtienen por síntesis orgánica, proceso que en ocasiones resulta costoso. Es por eso que se han buscado alternativas biotecnológicas para producir estos compuestos de 13 átomos de carbono.

Se aisló a una bacteria, identificada como *Paenibacillus amylolyticus*, la cual es capaz de crecer en un medio complejo adicionado con  $\beta$ -ionona y transformarla en derivados reducidos con un mayor valor agregado. Se detectó una actividad enzimática dependiente de NADPH en el extracto intracelular del microorganismo, la cual se determinó espectrofotométricamente por desaparición de la coenzima a 340 nm. El objetivo del presente trabajo es el de purificar y caracterizar dicha enzima.

**Metodología.** Se realizó una fermentación del microorganismo en medio complejo adicionado con  $\beta$ -ionona. Luego de 48 h se eliminó el medio de cultivo y las células se rompieron por sonicación, eliminando los restos celulares. La porción intracelular se precipitó fraccionadamente con sulfato de amonio. Posteriormente la fracción que presentaba la actividad se sometió a isoelectrofoque (Rotofor, Biorad) y la fracción en donde se encontró la mayor actividad fue separada por HPLC, utilizando una columna de intercambio catiónico (sulfopropilo, Biorad). Una vez obtenida la enzima pura, se obtuvieron sus parámetros bioquímicos, pI, T y pH de máxima actividad, Km y Vmax. El peso molecular de la enzima se determinó por la técnica de MALDI-TOF, así como la secuencia de los primeros 8 aminoácidos del extremo amino-terminal. Por otro lado, se extrajo el producto de reacción de la enzima, mismo que se caracterizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

**Resultados y discusión.** El proceso de purificación de la enzima, se resume en la Tabla 1. El punto isoelectrónico resultó ser de 4, la máxima actividad se obtiene a pH 7 y 40°C. Se determinaron los valores de Km y Vmax realizando una determinación de actividad enzimática a diferentes concentraciones de sustrato. A partir de estos datos, se

obtuvo el regráfico de Lineaweaver-Burke, obteniéndose un valor de Km de 0.016 mM y una Vmax de 33815.3 U/mg proteína.

Cuadro 1. Tabla de purificación de la  $\beta$ -ionona reductasa

Paso de purificación	Proteína (mg/mL)	A vol (U/mL)	A esp (U/mg)	F. P.	% Rendimiento
Extracto inicial	5.16	333	65	1.0	100
Pp por salado	0.78	296	382	5.9	89
Rotofor	0.19	246	1257	19.5	74
Recirculación Rotofor	0.095	222	2338	36.3	67
HPLC	0.0033	76	22985	356.5	23

A vol = Actividad volumétrica; A esp = Actividad específica; F.P.= Factor de purificación

La enzima, tiene un peso molecular de aproximadamente 57 kDa, siendo su secuencia amino terminal LPSRATVN. El producto de la reacción fue caracterizado como 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona, primer compuesto reducido derivado de la  $\beta$ -ionona en la ruta de biotransformación de este compuesto a los compuestos presentes en el perfil del aroma a tabaco, por lo que se sugiere la presencia de dos enzimas reductoras en dicha ruta (2)

**Conclusiones.** La enzima se purificó a homogeneidad aproximadamente 356 veces. Se obtuvieron sus parámetros bioquímicos más importantes, así como los primeros 8 aminoácidos del extremo amino terminal. El producto de reacción corresponde a la reducción del doble enlace exocíclico de la  $\beta$ -ionona, 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona, por lo que se piensa que la segunda reducción hasta 7,8-dihidro- $\beta$ -ionol, es llevada a cabo por otra enzima.

### Bibliografía.

- Winterhalter P. (1996) Carotenoid-derived aroma compounds: biogenetic and biotechnological aspects. En *Biotechnology for improved foods and flavors*. Takeoka, G.R., et al. (eds). ACS Symposium Series 637. American Chemical Society, USA. 120-123
- Sánchez-Contreras A., et al. (2000). Bioconversion of lutein to products with aroma. *Appl Microbiol Biotechnol*. 54: 528-534