

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**Selección de una esterasa bacteriana con  
propiedades regioselectivas para la obtención de  
compuestos bioactivos**

Leyre Sánchez Barrionuevo

Sevilla, 2019



Memoria que presenta la Lcda. en Biología Leyre  
Sánchez Barrionuevo para optar al grado de  
Doctora por la Universidad de Sevilla





ENCARNACIÓN MELLADO DURÁN, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA Y DAVID CÁNOVAS LÓPEZ PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, AMBOS DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**INFORMAN:** Que la Tesis Doctoral titulada: “Selección de una esterasa bacteriana con propiedades regioselectivas para la obtención de compuestos bioactivos”, presentada por la Lcda. en Biología LEYRE SÁNCHEZ BARRIONUEVO para optar al título de Doctora, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología y Departamento de Genética, ambos de la Universidad de Sevilla, bajo nuestra dirección, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, expedimos y firmamos el presente informe en Sevilla, a 05 de junio de 2019

Fdo.: Encarnación Mellado Durán

Fdo.: David Cánovas López



MIGUEL ANGEL CAVIEDES FORMENTO, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA Y LUÍS MARÍA CORROCHANO PELÁEZ, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, AMBOS DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**INFORMAN:** Que la Tesis Doctoral titulada: “Selección de una esterasa bacteriana con propiedades regioselectivas para la obtención de compuestos bioactivos”, presentada por la Lcda. en Biología LEYRE SÁNCHEZ BARRIONUEVO, para optar al título de Doctora, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología y Departamento de Genética, ambos de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de los Doctores Dña. ENCARNACIÓN MELLADO DURÁN y D. DAVID CÁNOVAS LÓPEZ.

Y para que así conste, expedimos y firmamos el presente informe en Sevilla, a 05 de junio de 2019

Fdo.: Miguel Ángel Caviedes Formento

Fdo.: Luís María Corrochano Peláez

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente financiada mediante las ayudas de los siguientes Proyectos de Investigación:

Desarrollo de sistemas biológicos para la obtención de energías renovables (Biodiésel) (P08-RNM-3515). Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía. 2009-2012.

Extremozimas lipolíticas como catalizadores regioselectivos útiles en la síntesis de carbohidratos y polifenoles lipófilos (P11-CVI-7427 MO). Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía. 2013-2016.

Parte de los resultados de esta Tesis han sido publicados en los siguientes medios:

## 1. Artículos científicos

- a. **Sánchez Barrionuevo, Leyre**, González Benjumea, Alejandro, Escobar Niño, Almudena, García Gutiérrez, María Teresa, López López, Oscar, et. al.: A Straightforward Access to New Families of Lipophilic Polyphenols by Using Lipolytic Bacteria. *En: PloS One*. 2016. Vol. 11. Núm. 11. 10.1371/journal.pone.0166561

## 2. Comunicaciones y ponencias presentadas a congresos

- a. Título: Utilización de una Acetilesterasa (AE-6L) de *Bacillus* sp. HR21-6 para la síntesis de compuestos de interés en la industria.  
Co-autores: **Sánchez Barrionuevo, Leyre**, Mellado Durán, Encarnación, González Benjumea, Alejandro, M Guzmán, M, Cánovas López, David, et. al.:  
Tipo de participación: Póster PS104.  
Congreso: VI Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana.  
Lugar de celebración: León (España)  
Fecha: septiembre 2016
- b. Título: regioselective synthesis of acylated carbohydrates and polyphenols with a novel acetylerase (AE-6L) from *Bacillus* sp. HR21-6  
Co-autores: **Sánchez Barrionuevo, Leyre**, Mellado Durán, Encarnación, González Benjumea, Alejandro, M Guzmán, M, Cánovas López, David, et. al.:  
Tipo de participación: Comunicación y póster PS104.  
Congreso: XI Reunión del Grupo de Microbiología Molecular de la SEM  
Lugar de celebración: Sevilla (España)  
Fecha: septiembre 2016
- c. Título: Síntesis química y enzimática de antioxidantes fenólicos lipofílicos derivados del olivo.  
Co-autores: González Benjumea, Alejandro, Begines Aguilar, Paloma, Escobar Niño, Almudena, **Sánchez Barrionuevo, Leyre**, Cánovas López, David, et. al.:  
Tipo de participación: Póster PS104.  
Congreso: I Congreso Ibérico de Olivicultura. 2016  
Lugar de celebración: Sevilla (España)  
Fecha: 2016
- d. Título: A regioselective synthesis of acylated carbohydrates and polyphenols from *B. pumilus* HR21-6 sp.

Co-autores: Mellado Durán, Encarnación, **Sánchez Barrionuevo, Leyre**, González Benjumea, Alejandro, M Guzmán, María, Fernández-Bolaños Guzmán, José María, et. al.:

Tipo de participación: Póster PS104.

Congreso: Congreso BIOIBEROAMERICA - BIOTECNOLOGIA INTEGRANDO CONTINENTES

Lugar de celebración: Salamanca (España)

Fecha: Julio 2016

- e. Título: Síntesis quimioenzimática regioselectiva de carbohidratos acetilados a partir de lipasas.

Co-autores: **Sánchez Barrionuevo, Leyre**, M Guzmán, M, Cánovas López, David, Escobar Niño, Almudena, Fernández-Bolaños Guzmán, José María, et. al.:

Tipo de participación: Comunicación y póster PS104.

Congreso: Congreso Jornadas Españolas de Biocatálisis

Lugar de celebración: Madrid (España)

Fecha: Julio 2015

- f. Título: Regioselective Synthesis of Acylated Carbohydrates and Polyphenols with a new lipase from *B. Pumilus*

Co-autores: Fernández-Bolaños Guzmán, José María, Mellado Durán, Encarnación, Guzmán, María, González Benjumea, Alejandro, **Sánchez Barrionuevo, Leyre**, Escobar Niño, Almudena, et. al.:

Tipo de participación: Póster PS104.

Congreso: 7th Spanish Portuguese Japanese Organic Chemistry Symposium

Lugar de celebración: Sevilla (España)

Fecha: 2015

### 3. Patentes:

- a. Cepas bacterianas y sus usos en reacciones de acilación y/o desacilación

A. Escobar, **L. Sánchez**, D. Cánovas, E. Mellado, A. González, O. López, I. Maya, J.M. Fernández- Bolaños

Patente española P201400374 (2014)

“Bacterial strains and their use in acylation and/or deacylation reactions”

Solicitud internacional en virtud del Tratado de Cooperación de Patentes (PCT)  
PCT/ES2015/000062 (2015)



*Wege verzweigen.*

*Prüfung im Leben.*

*Gedanken ziehen Kreise.*

*Im Alltag verstrickt.*

*Weggefährten auf Zeit.*

*Bestärken. Irritieren.*

*Gefühl nährt Erkenntnis.*

*Schwere weicht.*

*Wertvoll der Moment.*

*Ein Meilenstein.*

*Auf dem Weg zum Selbst.*

*Freiheit in sich.*

Barbara Hamid-Delgado (2019)

*“No juzgues tu día por lo que coseches, si no por las semillas que siembres”*



A mi familia

A Manu

A mi manera...

---

## AGRADECIMIENTOS

---

Llegado este momento de balances y valoraciones, de síntesis de 5 años de una vida en un folio, te das cuenta de que el corazón se divide en mil partes para poder agradecer ese grano de arena o esa playa que algunas personas formaron durante este camino.

Gracias a mis directores de Tesis. Al Dr. David Cánovas, por acogerme, por dejarme dar ese primer paso en su laboratorio, por despertar en mí esa curiosidad que se convirtió en pasión, por tenderme su mano dentro y fuera del laboratorio. Recuerdo como si fuese ayer cuando lo fui a buscar entre todas las opciones de TFM porque trabajaba con Biodiesel, yo quería trabajar en eso por encima de todo (bendita ingenuidad), y ahí estaba él, escéptico y desconfiado por esa insistencia por mi parte. Gracias por arriesgarte. Gracias también por abrirme una pista de aterrizaje en Viena, por entenderme, por tu implicación a nivel personal, por tu estar ahí. Cómo no, gracias la Dra. Encarnación Mellado, por su cercanía, por transmitirme esa templanza que a mí siempre me faltó, por regalarme esa calidez de las personas cercanas. Gracias por creer y confiar en mí cuando quería salirme del tiesto, por ponerme los pies en la tierra, por darme esta oportunidad. Gracias por todo lo aprendido. A los dos, gracias por ayudarme a crecer y a crecer con vosotros.

Al grupo del Dr. José María Fernández Bolaños y en especial al Dr. Alejandro González, por toda la ayuda prestada y por volver a introducirme en el maravilloso mundo de la química orgánica (nótese la ironía).

A la Dra. Doris Marko por acogerme en su laboratorio de Viena y darme la oportunidad de tener esa experiencia en esa maravilla de ciudad. Gracias a todos los miembros de su equipo: George, Lydia, Eva, Giorgia, a Jessica y Cornelia por toda su ayuda en la cuenta atrás y en especial a Ebru, por enseñarme tanto, por su dedicación, su comprensión y su amistad.

Gracias a Bárbara por dedicarme y regalarme esas palabras tan bonitas que tengo el orgullo de lucir en páginas anteriores. Por alentarme a vivir. Por ser mi hogar en la distancia. Por recogerme con ese cariño.

Gracias a Kiko por hacer que me pierda para poder encontrarme. “Qué suerte que te cruzaras por mi camino...”

A Sanuy, ese pequeño gran hombre que tanto despertó en mí.

A Desiré, por ser mi más fiel compañera y mi refugio. Nunca olvidaré nuestra incondicional “*bier*” en “Vapiano”, donde tan grandes nos hicimos...

A todos, gracias por hacerlo todo más fácil lejos de casa y con ese frío infernal.

A mi Deivid. ¡Tú! Mi talón de Aquiles... Mi criptonita... Tú... Mi “buenos días bonita” más esperado, mi refugio cuando llueve en Sevilla, mi hombro para llorar y mi saco de pelea. Nunca quise y odié a nadie tanto como a ti. Gracias por hacerlo todo más fácil. Qué bonito que aparecieses, y qué bonito qué estés.

A Sara. Mi amiga, mi compañera, mi psicóloga personal, mi guía y mi amparo cuando me pierdo. Tu si vives conmigo este viaje desde el principio. Quién nos iba a decir hace doce años

en aquella clase de primero de biología que terminaríamos compartiendo poyata y vida de esta manera. Gracias por apartar las piedras del camino o al menos avisar de que siguen ahí. Gracias por tu amistad tan de verdad para mí. ¡Ya solo queda dejar crecer el pelo hasta la cintura Sari!

A Mari Toñi, Por hacer de mí una mujer en este mundo tan difícil que escogimos. Gracias por esos dardos envenenados que descongestionaron el antes para el después. Gracias por tu empujón y por proyectar ese entusiasmo científico en mí. Eres una de las personas más luchadoras que conozco.

A Ale, mi paso obligatorio para empezar el día con una enorme sonrisa. Gracias por tus consejos, por tu disposición para ayudarme siempre, por tu tiempo y tu dedicación por sacarme de mi rincón.

A Lucía, por ser un ejemplo de entereza, de seguridad y forma de llevar una vida.

Al resto de mis compañeros de Departamento, a Duli, a María Olmedo, a Alex, María del Mar, José Miguel, Eva, Sabas, Julia, Javi... entre todos conseguimos ser una gran familia. No podía olvidarme de Almudena, María y Ana, gracias por dar los primeros pasos conmigo, por enseñarme tanto y por vuestra amistad.

Gracias a Manuel, por creer en mí de esa manera tan tuya y que me hace tan capaz. Gracias por ser un muro de contención en mi vida, gracias por tu incondicionalidad. A Laura, por ser compañera de vida. Gracias por estar.

A Romu, gracias por creer en mi mejor versión, gracias por regalarme tu optimismo, tu alegría de vivir, gracias por insuflarme vida.

A los pilares de mi vida:

A mi familia. A mis padres. Por hacerme guerrera de mil batallas. Por darme esa fuerza de muros indestructibles, por hacer de mí quién soy. A mi hermano, mi pequeño tan grande en mi vida.

A Manu, a ti, mi compañero de viaje, mi apoyo más incondicional e incombustible, mis ganas y mi motor cuando las fuerzas flaqueaban, mi recompensa al final del camino, mi hogar... Gracias por cogerme de la mano, por hacer que valga nuestra pena.

A todos, gracias por acompañarme.

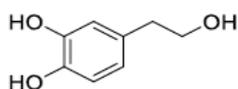




---

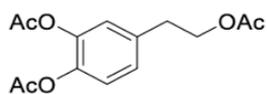
## NUMERACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

---



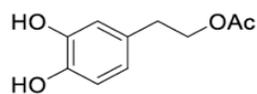
**1**

Hidroxitirosol



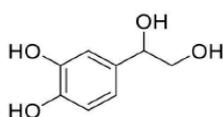
**2**

Hidroxitirosol  
peracetilado



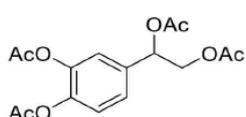
**3**

Derivado  
monoacetilado



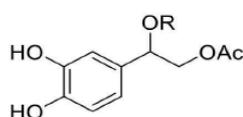
**4**

DHPG



**5**

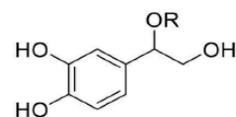
DHPG  
peracetilado



**6**

Derivados eterificados

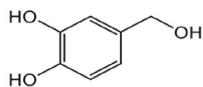
6a R = Me  
6b R = Et  
6c R = Pr  
6d R = Bu



**7**

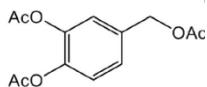
Derivados

7a R = Me  
7b R = Et  
7c R = Pr  
7d R = Bu



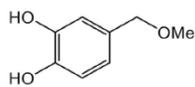
**8**

Alcohol  
protocatecuico



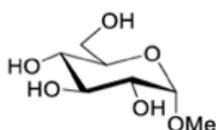
**9**

Alcohol  
protocatecuico  
peracetilado



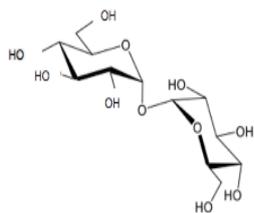
**10**

Derivado  
metílico

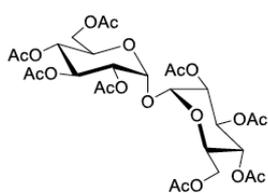


**11**

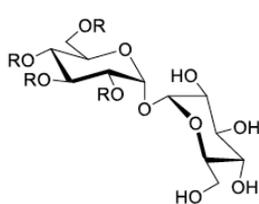
metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido



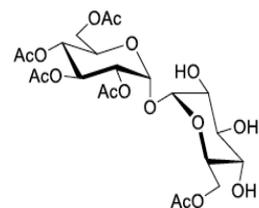
**12**  
 $\alpha,\alpha$ -  
trehalosa



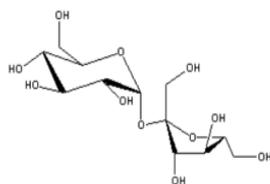
**13**  
 $\alpha,\alpha$ -trehalosa  
peracetilada



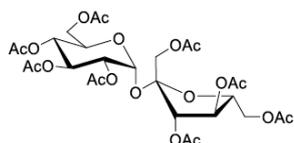
**14**  
2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-  $\alpha,\alpha$ -trehalosa



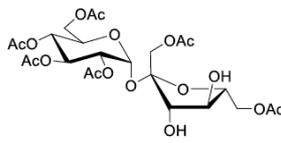
**15**  
2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetil- $\alpha,\alpha$ -  
trehalosa



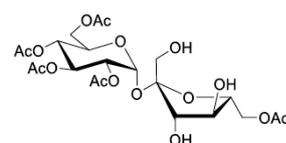
**16**  
sacarosa



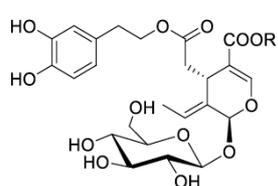
**17**  
sacarosa



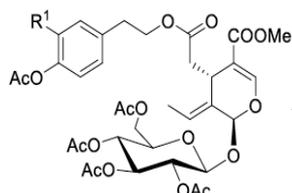
**18**  
2,3,4,6,6'-penta-*O*-  
acetilsacarosa



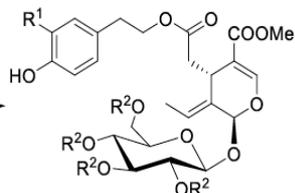
**19**  
2,3,4,6,1',6'-hexa-*O*-acetil  
sacarosa



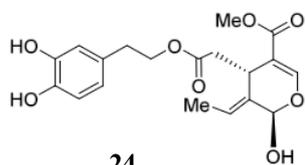
**20**  
Oleuropeína



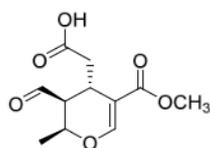
**21**  
Oleuropeína  
peracetilada



**22**  $R^1=H, R^2=Ac$   
**23**  $R^1=OH, R^2=Ac$   
**20**  $R^1=OH, R^2=H$



**24**  
Aglicón de la  
oleuropeína



**25**  
ácido  
elenólico

---

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

---

A:	Adenina
Abs:	Absorbancia
aas:	Aminoácidos
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ARN:	Ácido Ribonucleico
ATP:	Adenosina Trifosfato ( <i>Adenosin Tri-Phosphate</i> )
BCL:	Lipasa producida por <i>Burkholderia cepacia</i>
BLAST:	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA:	Albúmina de suero bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
C:	Concentración de proteína soluble (mg/ml)
°C:	Grado centígrado
CALB:	Lipasa producida por <i>Candida antárctica</i>
DCF:	Diclorofluoresceína
Dex:	Dexametasona
DHPG:	3,4-dihidroxifenilglicol
Ce:	Coefficiente de extinción molar
DMSO:	Dimetil sulfóxido
dNTPs:	Desoxi nucleótidos trifosfato
DO:	Densidad Óptica
EM:	Espectometría de masa mejorada
EDTA:	Ácido etilendiaminetetracético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
ER:	Resolución mejorada
EXPASY:	Sistema de análisis de proteínas ( <i>Expert Protein Analysis System</i> )
fd:	Factor de dilución
HT:	Hidroxitirosol
IF:	Muestras de lisado (fracción insoluble) ( <i>Insoluble Fraction</i> )
FS (d):	Fracción soluble dializada ( <i>Soluble Fraction</i> )
FSEP:	Fracción extracelular soluble libre ( <i>Free Soluble Extracellular Fraction</i> )
g:	Gramo
Glu:	Glucosa
gyrA:	Subunidad A de la girasa
h:	Hora
HEPES:	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico ( <i>4-(2-hydroxyethyl) 1-piperazineethanesulfonic acid</i> )
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )

IPTG:	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
kb:	Kilobase
KDa:	Kilodalton
Km:	Kanamicina
L:	Litro
LB:	Medio de cultivo Luria Bertani
LBT:	Medio LB adicionado con tributirina
LC-MS/MS:	Cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masa en tándem <i>Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry</i> )
LPS:	Lipopolisacárido
M:	Molar
MALDI-MS:	Método de desorción/ionización láser asistida por matriz ( <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> )
Mb:	Megabases
3MB:	3-metilbenzoato
MMTS:	Metil Metanotiosulfonato
mg:	Miligramo
min:	Minuto
ml:	Mililitro
mm:	Milímetro
mM:	Milimolar
MRM:	Monitoreo de múltiples reacciones ( <i>Multiple Reaction Monitoring</i> )
$\mu$ l:	Microlitro
$\mu$ M:	Micromolar
NCBI:	Centro nacional de información biotecnológica ( <i>National Center for Biotechnology Information</i> )
OMV:	Fracción unida a las vesículas de membrana ( <i>Outer Membrane Vesicles</i> )
ORF:	Fase abierta de lectura ( <i>Open Reading Frame</i> )
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida ( <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
pbs:	Pares de bases
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDB:	Medio de cultivo de patata y dextrosa ( <i>Potato Dextrose Broth</i> )
PEG:	PoliEtilenGlicol
<i>p</i> -NP:	<i>para</i> -Nitrofenil
<i>p</i> -NPP:	<i>para</i> -Nitrofenil Palmitato
PSPEP:	<i>Proteomics System Performance Evaluation Pipeline</i>
p/p:	Relación peso/peso
p/v:	Relación peso/volumen
PYB:	Medio de cultivo PYB

PYBT:	Medio de cultivo PYB adicionado con tributirina
RMN:	Resonancia Magnética Nuclear
ROS:	Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
rpm:	Revoluciones por minuto
<i>rpoB</i> :	Subunidad $\beta$ de la ARN polimerasa bacteriana
RT:	Retrotranscripción
RT-qPCR:	Retrotranscripción-PCR cuantitativa
SB:	Tampón de ácido bórico
SDS:	Dodecilsulfato sódico ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
seg:	Segundo
SF:	Muestra de fracción soluble ( <i>Soluble Fraction</i> )
Sm:	Estreptomina
SRB:	Sulforodamina B
TAE:	Tris-ácido Ácético glacial-EDTA
TB:	Medio de cultivo ( <i>Terrific Broth</i> )
TCA:	Ácido tricloroacético ( <i>Trichloroacetic acid</i> )
TE:	Tris-EDTA
TEAB:	Bicarbonato de TriEtilAmonio ( <i>Tetraethylammonium tetrahydroborate</i> )
TEMED:	N, N, N', N'- tetrametil etilendiamino
TLL:	Lipasa producida por <i>Thermomyces lanuginosus</i>
TPK:	Tampón fosfato potásico
Tris:	Tris (hidroximetil) aminometano
U:	Unidad internacional de actividad
UV:	Ultravioleta
VC:	Volúmenes de columna
Vc:	Volumen total de la cubeta
v/v:	Volumen/volumen
Vf:	Volumen de fracción celular
Vt:	Volumen total
WST-1:	Sales de tetrazolium ( <i>Water-soluble tetrazolium</i> )
YPD:	Medio de cultivo YPD

---

## ÍNDICE DE TABLAS

---

- Tabla 1.** Clasificación simplificada de los distintos tipos de polifenoles
- Tabla 2.** Genes y enzimas del género *Bacillus* con interés industrial
- Tabla 3.** Cepas bacterianas
- Tabla 4.** Plásmidos utilizados
- Tabla 5.** Composición de los medios utilizados en el aislamiento de microorganismos lipolíticos
- Tabla 6.** Composición de la Solución 9K
- Tabla 7.** Composición del medio TB
- Tabla 8.** Soluciones de compuestos antimicrobianos
- Tabla 9.** Composición de tampones
- Tabla 10.** Cebadores diseñados para la amplificación y secuenciación del ADN
- Tabla 11.** Componentes de la mezcla de reacción de PCR
- Tabla 12.** Cebadores utilizados en la RT-qPCR
- Tabla 13.** Características de los derivados del *p*-nitrofenil (*p*NP) utilizados
- Tabla 14.** Composición de geles SDS-PAGE
- Tabla 15.** Cebadores diseñados para la mutagénesis dirigida del gen que codifica la proteína AE6L. Los nucleótidos introducidos están señalados en minúscula y negrita.
- Tabla 16.** Distribución de los microorganismos lipolíticos aislados en las diferentes muestras
- Tabla 17.** Valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de transesterificación
- Tabla 18.** Datos de secuenciación y filtración de datos del genoma de *Bacillus* HR21-6
- Tabla 19.** Proteínas aisladas de las fracciones FSEP y OMV de *Bacillus* sp. HR21-6 y número de péptidos encontrados en cada una de ellas con un índice de confianza del 95%
- Tabla 20.** Semejanza de la proteína AE6L con otras proteínas homólogas en diferentes especies del género *Bacillus* depositadas en las bases de datos

**Tabla 21.** Tampones y sus correspondientes pH utilizados en la selección del pH más óptimo

**Tabla 22.** Parámetros cinéticos de la enzima AE6L frente al sustrato *p*-NP acetato

**Tabla 23.** Aminoácidos de AE6L reemplazados

**Tabla 24.** Actividad específica (U/mg) de la proteína AE6L y de los mutantes utilizando los diferentes *p*-NP.

**Tabla 25.** *O*-desacetilación regioselectiva utilizando AE6L

**Tabla 26.** Valores de Log P

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

**Figura 1.** Reacciones catalizadas por enzimas lipolíticas

**Figura 2.** Estructura del dominio de las  $\alpha/\beta$ -hidrolasas (lipasas y esterasas). Las láminas  $\beta$  (1-8) se muestran como flechas grises y las hélices  $\alpha$  (A-F) como cilindros. La posición relativa de los residuos de la triada catalítica Ser-Asp-His se muestra en círculos azules.

**Figura 3.** Mecanismo de reacción de esterasas.

**Figura 4.** Mecanismo de activación interfacial de las lipasas.

**Figura 5.** Distribución de la estructura secundaria en (a) la RGAE de *Aspergillus aculatus* (familia II) y (b) un pliegue típico de lipasas hidrolasa  $\alpha/\beta$  hidrolasas

**Figura 6.** Orientación de los residuos de la tríada catalítica con respecto al pliegue total. (a).Estructura de la dienolactasa hidrolasa (Pathak and Ollis 1990) una  $\alpha/\beta$  hidrolasa, vista desde el lado N-terminal de la hoja  $\beta$  central. Los tres residuos catalíticos se alinean aproximadamente en paralelo a la hoja  $\beta$  central (b) RGAE perteneciente a la familia II vista desde una orientación similar. Los residuos catalíticos se alinean casi perpendiculares a la hoja  $\beta$  central.

**Figura 7.** Estructura general de flavonoides (A) y de isoflavonas (B)

**Figura 8.** Estructura del hidroxitirosol

**Figura 9.** Obtención del hidroxitirosol **1** a partir de la oleuropeína **20**

**Figura 10.** Estructura del DHPG

**Figura 11.** Estructura química del glicósido  $\beta$ -hidroxiacteósido (A) y del orobanchósido (B)

**Figura 12.** Estructura química de la oleuropeína

**Figura 13.** a) Estructura lineal de la D-Glucosa. b) y c) Estructura cíclica de los anómeros de la glucosa

**Figura 14.** Prueba de hidrólisis de tributirina en placa

**Figura 15.** Esquema de la reacción de transesterificación del *p*-NPP con etanol en condiciones no acuosas (A). Esquema de la reacción de hidrólisis del *p*-NPP en condiciones acuosas (B)

**Figura 16.** Estructura química de los derivados del *p*-nitrofenol utilizados

- Figura 17.** Estructura de compuestos fenólicos procedentes del olivo
- Figura 18.** Estructura de los compuestos hidroxitirol peracetilado (2), 3,4 dihidroxifenilglicol peracetilado (5) y alcohol protocatecuico peracetilado (9)
- Figura 19.** Estructura de los compuestos 3, 6a-d y 10
- Figura 20.** Estructura de la oleuropeína (20)
- Figura 21.** Esquema de la construcción pMAB-AE6L bajo los sistemas Cascade o T7
- Figura 22.** Estrategia seguida para el diseño de los cebadores
- Figura 23.** Compuestos fenólicos utilizados en el estudio de bioactividad
- Figura 24.** Proceso de marcaje con la sonda diclorofluoresceína (DCF). La sonda reducida, esterificada y no fluorescente (DCFH-DA) atraviesa la membrana. Una vez dentro, las esterases la hidrolizan (DCFH) y los ROS intracelulares la oxidan para convertirla a la forma fluorescente DCF.
- Figura 25.** Relaciones filogenéticas de las cepas aisladas que muestran actividad lipolítica con respecto a otras especies del género *Bacillus*. *Streptococcus pneumoniae* se utilizó como grupo bacteriano externo. Las bacterias aisladas en este trabajo se marcan en negrita. La barra representa un 0,05% de sustituciones por sitio en el alineamiento.
- Figura 26.** Relaciones filogenéticas de la cepa HR21-6 con respecto a otras especies tipo del género *Bacillus*. El ARNr de *Streptococcus pneumoniae* se utilizó como grupo bacteriano externo. Los ARNr utilizados corresponden a 1380 pbs. La barra representa un 0,02% de sustituciones por sitio en el alineamiento.
- Figura 27.** Valores de la actividad transesterificadora específica de proteínas solubles en el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6 crecido en medios LB y PYB, y LB y PYB adicionados con tributirina (LBT y PYBT) a distintos tiempos. Las barras de error muestran el error estándar de n=3.
- Figura 28.** Valores de la actividad transesterificadora específica del sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6 crecido en PYB a 37°C durante 48 h y analizado a distintas temperaturas de reacción. Las barras de error muestran el error estándar de n=3.
- Figura 29.** Compuestos fenólicos Hidroxitirosol **1**, 3,4-dihidroxifenilglicol **4**, alcohol protocatecuico **8**
- Figura 30.** Carbohidratos modelo no reductores. metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido **11**,  $\alpha,\alpha$ -trehalosa **12**, sacarosa **16**
- Figura 31.** Desacetilación regioselectiva del hidroxitirosol peracetilado **2** catalizada por el extracto enzimático de *Bacillus* sp. HR21-6, dando como resultado hidroxitirosol monoacetilado **3**

- Figura 32.** Desacetilación regioselectiva del DHPG peracetilado **5** catalizado por el extracto enzimático de *Bacillus* sp. HR21-6, dando como resultado los diferentes derivados esterificados y monoacetilados **6a-d** y sus correspondientes derivados desacetilados **7a-d**
- Figura 33.** Deacetilación regioselectiva del alcohol protocatecúico peracetilado **9** catalizado por el extracto enzimático de *Bacillus* sp. HR21-6, dando como resultado éter metílico del alcohol protocatecúico en la posición 2 (compuesto **10**)
- Figura 34.** *O*-Desacetilación regioselectiva de la trehalosa peracetilada **13** catalizada por el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6, dando como resultado 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha,\alpha$ -trehalosa **14** y el 2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetil- $\alpha,\alpha$ -trehalosa **15**
- Figura 35.** *O*-Desacetilación regioselectiva de la sacarosa peracetilada **17** catalizada por el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6, dando como resultado 2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetilsacarosa **18** y 2,3,4,6,1',6'-hexa-*O*-acetilsacarosa **19**.
- Figura 36.** *O*-Desacetilación regioselectiva de la oleuropeína peracetilada **21** utilizando el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6, dando como resultado oleuropeína desacetilada y los derivados tetraacetilados en la unidad de glucosa **22** ó **23**
- Figura 37.** Gel SDS-PAGE teñido con nitrato de plata, donde se muestra las proteínas presentes en las FSEP y OMV del sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6 recogidas a diferentes tiempos. **M.** Marcador de pesos moleculares. **PYB.** Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *Bacillus* sp. HR21-6
- Figura 38.** RMN de la enzima ramnogalacturonano acetiltransferasa detectada en la fracción FSEP del sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6. FSEP (*Free Soluble Extracellular Fraction*). OMV (*Outer Membrane Vesicles*).
- Figura 39.** Esquema que muestra la posición del dominio conservado SGNH-Hidrolasa de AE6L
- Figura 40.** Árbol filogenético que muestra la posición de AE6L de *Bacillus* sp. HR21-6 con respecto a otras enzimas pertenecientes a diferentes familias de enzimas lipolíticas bacterianas. La escala muestra la distancia correspondiente a un 50% de divergencia. El árbol se construyó utilizando el programa MEGA 5.0 con el algoritmo Neighbor-Joining.
- Figura 41.** Esquema de la estructura secundaria de AE6L utilizando el programa PSIPred. Las hélices alfa ( $\alpha$ ) están representadas por cilindros de color rosa; las hojas plegadas beta ( $\beta$ ) se representan por flechas amarillas. Las barras azules indican el grado de fiabilidad de la predicción. Conf: Fiabilidad de la predicción; Pred: predicción de la estructura secundaria; AA: secuencia de aminoácidos.
- Figura 42.** Plot de Ramachandran que muestra la conformación estereoquímica de los ángulos phi (giro en torno al enlace que une al C alfa con el C del plano anterior) y psi (giro al enlace que une al C alfa con el N del plano posterior) de la estructura tridimensional de

la proteína AE6L. El código de colores indica la fiabilidad de las predicciones, desde las más favorables (verde oscuro) a las no permitidas (blanco). Los residuos se muestran como círculos.

**Figura 43.** Modelo tridimensional de AE6L generado por I-TASSER y visualizado con PyMOL. las hojas plegadas beta ( $\beta$ ) se representan por flechas amarillas, las hélices alfa ( $\alpha$ ) están representadas de color rojo, y los bucles en verde.

**Figura 44.** Estructuras tridimensionales superpuestas de la proteína AE6L (azul) y de la proteína Ideo de *Aspergillus aculeatus* (rojo)

**Figura 45.** Predicción de la presencia de péptido señal según el programa informático SignalP 4.0

**Figura 46.** Predicción de hidrofobicidad de las distintas regiones de AE6L según el programa TMHMM Server

**Figura 47.** Expresión de AE6L a diferentes tiempos del cultivo de *Bacillus* sp. HR21-6. El cálculo de expresión se normaliza utilizando la expresión del gen *gyrA*. Las barras de error muestran el error estándar de n=3.

**Figura 48.** Inducción de AE6L a partir de *E. coli* pMAB-AE6L durante 4 h a dos temperaturas diferentes (30°C y 20°C). Gel SDS-PAGE al 12 % teñido con azul de coomassie. **M**, marcador de pesos moleculares. -, BL21(DE3) pMAB-AE6L sin inducir. **1**, BL21(DE3) pMAB-AE6L con 0,2 mM de salicilato. **2**, BL21(DE3) pMAB-AE6L con 1 mM de salicilato. **3**, pMAB-AE6L con 1 mM de salicilato + 3-metilbenzoato. **4**, pMAB-AE6L con 1 mM de IPTG.

**Figura 49.** Actividad lipolítica relativa de la enzima AE6L en presencia de los diferentes tampones. Las barras de error muestran el error estándar de n=3.

**Figura 50.** Gel SDS-PAGE al 12 % teñido con azul de coomassie que muestra la solubilidad de AE6L. *E. coli* BL21(DE3) pMAB-AE6L fue inducida con 1 mM de salicilato a 30°C. **M**, Marcador de pesos moleculares. -, Cultivo total sin inducir. +, cultivo total inducido. **IF**, fracción insoluble. **SF**, fracción soluble.

**Figura 51.** Gel SDS-PAGE al 12% donde se muestran las distintas fracciones del proceso de purificación empleando una columna Ni-IMAC y eluyendo la proteína AE6L con imidazol. **M**, marcador de pesos moleculares. **FI**, fracción insoluble. **FS**, fracción soluble. **FT**, fracción total inducida -, BL21(DE3) pMAB-AE6L sin inducir. **E1-E20**, eluciones obtenidas en el proceso de purificación.

**Figura 52.** Gel SDS-PAGE al 12% donde se muestra la purificación Ni-IMAC eluyendo AE6L con gradiente de pH. **M**, Marcador de pesos moleculares. **FS**, Fracción soluble. **FT**, Fracción total. **W1**, Lavado de la columna. **W2**, Lavado de la columna. **E1-E16**, eluciones obtenidas en el proceso de purificación.

**Figura 53.** Western blot con un anticuerpo anti-6xHis de las fracciones eluidas en gradiente de pH. **M**, Marcador de pesos moleculares. **NI**, Proteína total de cultivo no inducido. **C+**, BL21(DE3) pMAB-AE6L inducida y sin purificar. **I**, Proteína total de cultivo inducido con 1 mM salicilato a 30°C correspondiente a los ensayos de expresión. **IF**, muestra de fracción insoluble. **SF**, muestra de fracción soluble. **FT**, fracción que ha pasado por la resina y que no se ha unido a ella. **W**, Lavado de la columna. **E11-E17**, fracciones de elución.

**Figura 54.** Especificidad de AE6L frente a *p*-nitrofenoles de diferente longitud de cadena, *p*-NP acetato (C2), *p*-NP butirato (C4), *p*-NP hexanoato (C6), *p*-NP octanoato (C8), *p*-NP decanoato (C10), *p*-NP laurato (C12), *p*-NP miristato (C14), *p*-NP palmitato (C16) y *p*-NP estereato (C18). Los datos se muestran relativos a la actividad de la enzima AE6L frente a los distintos *p*-NP. Las barras de error muestran el error estándar de n=3.

**Figura 55.** Actividad relativa de la enzima AE6L pura a diferentes temperaturas. La actividad se determinó usando el *p*-NP acetato como sustrato. Las barras de error muestran el error estándar de n=3.

**Figura 56.** Termoestabilidad de AE6L a diferentes temperaturas, expresadas como porcentaje de la actividad específica residual. Las barras de error muestran el error estándar de n=3.

**Figura 57.** Efecto de diferentes disolventes orgánicos en la actividad de la enzima AE6L. Las barras de error muestran el error estándar de n=3.

**Figura 58.** Alineamiento de la proteína AE6L de *Bacillus* sp. HR21-6 con proteínas homólogas realizado con el programa T-COFFE v.1. Para ello se emplearon las proteínas *Rhamnogalacturonan acetylerase* de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (O31523.1), *Rhamnogalacturonan acetylerase* de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 (O31528.1), *Rhamnogalacturonan acetylerase* de *Dickeya chrysanthemi* (O32563), *Rhamnogalacturonan acetylerase* de *Aspergillus aculeatus* (Q0017.1), *Rhamnogalacturonan acetylerase* de *Aspergillus aculeatus* (1DEO-A), *Rhamnogalacturonan acetylerase* de *Bacillus subtilis* YvqK (2O14-A), *Rhamnogalacturonan acetylerase* de *Bacillus halodurans* C-125(BAB04834.1). En azul se muestran los residuos seleccionados por ser parte de los posibles centros activos, en verde se muestran los residuos conservados elegidos a partir del alineamiento y en amarillo se muestran los residuos relacionados con la especificidad de sustrato.

**Figura 59.** Predicción de la estructura tridimensional de la enzima AE6L. A) Localización de los aminoácidos que podrían estar implicados en la actividad catalítica de la enzima y que forman parte de las secuencias conservadas en las esterasas GDSL subfamilia hidrolasas-SGNH. B) Localización de los aminoácidos relacionados con el reconocimiento de sustrato. C) Localización de los aminoácidos Glu26 y Ser96 seleccionados por su especificidad en AE6L.

**Figura 60.** Gel SDS-PAGE donde se muestra la expresión de AE6L expresada en BL21(DE3) (pMAB-AE6L) y de los diferentes mutantes. Todas las cepas fueron inducidas con 1 mM de salicilato durante 4 horas a 30°C. **M**, Marcador de pesos moleculares. **C**, BL21(DE3) pMAB-AE6L sin inducir. **C+**, AE6L purificada a partir de BL21(DE3)

pMAB-AE6L. WT, AE6L expresada en BL21(DE3) pMAB-AE6L. S10A, pMAB-AE6L<sup>S10A</sup>. G45A, pMAB-AE6L<sup>G45A</sup>. N77A, pMAB-AE6L<sup>N77A</sup>. D182A, pMAB36-AE6L<sup>D182A</sup>. H185A, pMAB-AE6L<sup>H185A</sup>. S96A, pMAB<sup>S96A</sup>. E26Q, pMAB36<sup>E26Q</sup>. T184A, pMAB<sup>T184A</sup>. T11A, pMAB<sup>T11A</sup>.

**Figura 61.** Western blot de la proteína AE6L expresada en BL21(DE3) (pMAB-AE6L) y de los diferentes mutantes incubados con el anticuerpo anti-histidina. M, Marcador de pesos moleculares. C-, BL21(DE3) pMAB-AE6L sin inducir. C+, AE6L purificada a partir de BL21(DE3) pMAB-AE6L. WT, pMAB-AE6L. S10A, pMAB-AE6L<sup>S10A</sup>. G45A, pMAB-AE6L<sup>G45A</sup>. N77A, pMAB-AE6L<sup>N77A</sup>. D182A, pMAB-AE6L<sup>D182A</sup>. H185A, pMAB-AE6L<sup>H185A</sup>. S96A, pMAB-AE6L<sup>S96A</sup>. E26Q, pMAB-AE6L<sup>E26Q</sup>. T184A, pMAB-AE6L<sup>T184A</sup>.

**Figura 62.** Actividad relativa (%) de los mutantes con respecto a AE6L (WT) a 37°C frente a diferentes derivados del *p*-NP y una vez normalizada al restar la actividad del control negativo, *E. coli* BL21. Los sustratos utilizados fueron *p*-NP acetato (C2), *p*-NP butirato (C4), *p*-NP octanoato (C8), *p*-NP decanoato (C10), *p*-NP laurato (C12), *p*-NP miristato (C14), *p*-NP palmitato (C16) y *p*-NP estereato (C18). Las diferencias significativas con respecto al control de AE6L (WT) para cada sustrato se indican con asteriscos (\*=  $p > 0,05$ ; \*\*=  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*=  $p \leq 0,001$ ). A los datos se les sometió a un análisis de varianza (ANOVA de un factor) utilizando el software PRISM 6.

**Figura 63.** Actividad relativa (%) a distintas temperaturas de los mutantes con respecto a AE6L a 37°C y una vez normalizada al restar la actividad del control negativo, *E. coli* BL21. Las diferencias significativas con respecto al control para cada sustrato se indican con asteriscos (\*=  $p > 0,05$ ; \*\*=  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*=  $p \leq 0,001$ ). A los datos se les sometió a un análisis de varianza (ANOVA de un factor) utilizando el software PRISM 6. Las barras de error muestran el error estándar de  $n=3$ .

**Figura 64.** Termoestabilidad (porcentaje de actividad residual relativa) de los distintos mutantes incubados a 30°C y una vez normalizada al restar la actividad del control negativo, *E. coli* BL21. La reacción para determinar la actividad catalítica se realizó a 37°C utilizando *p*-NP acetato como sustrato. Las barras de error muestran el error estándar de  $n=3$ .

**Figura 65.** Termoestabilidad (porcentaje de actividad residual relativa) de los distintos mutantes incubados a 37°C y una vez normalizada al restar la actividad del control negativo, *E. coli* BL21. La reacción para determinar la actividad catalítica se realizó a 37°C utilizando *p*-NP acetato como sustrato. Las barras de error muestran el error estándar de  $n=3$ .

**Figura 66.** Termoestabilidad (porcentaje de actividad residual relativa) de los distintos mutantes incubados a 45°C y una vez normalizada al restar la actividad del control negativo, *E. coli* BL21. La reacción para determinar la actividad catalítica se realizó a 37°C utilizando *p*-NP acetato como sustrato. Las barras de error muestran el error estándar de  $n=3$ .

**Figura 67.** Termoestabilidad (porcentaje de actividad residual relativa) de los distintos mutantes incubados a 50°C y una vez normalizada al restar la actividad del control negativo, *E. coli* BL21. La reacción para determinar la actividad catalítica se realizó a 37°C utilizando *p*-NP acetato como sustrato. Las barras de error muestran el error estándar de n=3.

**Figura 68.** *O*-Desacetilación regioselectiva del compuesto **2** catalizada por AE6L

**Figura 69.** *O*-Desacetilación regioselectiva del compuesto **5** catalizada por AE6L

**Figura 70.** *O*-Desacetilación regioselectiva del compuesto **21** catalizada por AE6L

**Figura 71.** Medidas de WST-1 sobre la viabilidad celular después de 24 horas de tratamiento con los diferentes compuestos fenólicos. Todas las gráficas muestran el DHPG sin modificar a efectos comparativos. Las diferencias significativas con respecto al control del disolvente (DMSO 2%) usado como control negativo (Ctrl) se indican con asteriscos (\*=  $p > 0.05$ ; \*\*=  $p > 0.01$ ; \*\*\*=  $p > 0.001$ ) y las diferencias entre concentraciones se representan mediante las letras a y b. Las mediciones en el ensayo WST-1 se realizaron en al menos tres réplicas biológicas, cada una por triplicado técnico (exceptuando el derivado OEt OH a 0,1  $\mu$ M; n=1). Las barras de error muestran el error estándar. T/C [%]: Total de células metabólicamente activas/Control.

**Figura 72.** Medidas de SRB sobre la viabilidad celular de HCEC después de 24 horas de tratamiento con los diferentes compuestos fenólicos. Todas las gráficas muestran el DHPG sin modificar a efectos comparativos. Las diferencias significativas con respecto al control del disolvente (DMSO 2%) usado como control negativo (Ctrl) se indican con asteriscos. (\*=  $p > 0.05$ ; \*\*=  $p > 0.01$ ; \*\*\*=  $p > 0.001$ ). Las barras de error muestran el error estándar de n=3. T/C [%]: Total de masa celular/Control.

**Figura 73.** Ensayo DCF (pro-oxidativo). Influencia de los distintos compuestos fenólicos en la generación de ROS en células HCEC después de 1-3 h de co-incubación. Los datos se expresan como media + desviación estándar de al menos 4 experimentos independientes (exceptuando los compuestos; hidroxitirosol, PrAC n=1). Las diferencias significativas con respecto al control del disolvente (DMSO 2%) usado como control negativo (Ctrl) se calcularon mediante ANOVA de un factor, seguido por LSD de Fisher ( $p < 0.05$ ) y se indican con asteriscos (\*=  $p > 0.05$ ; \*\*=  $p > 0.01$ ; \*\*\*=  $p > 0.001$ ). T/C [%]: Total de fluorescencia de DCF/Control.

**Figura 74.** Efecto protector de los distintos compuestos fenólicos en la generación de ROS. El ensayo se realizó utilizando la línea celular HCEC e incubando los compuestos durante 1 h con 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos se expresan como media + desviación estándar de al menos 4 experimentos independientes. Las diferencias significativas con respecto al control del disolvente (DMSO 2%) usado como control negativo (Ctrl) se calcularon mediante ANOVA de un factor, seguido por LSD de Fisher ( $p < 0.05$ ) y se indican con asteriscos (\*=  $p > 0.05$ ; \*\*=  $p > 0.01$ ; \*\*\*=  $p > 0.001$ ). T/C [%]: Total de fluorescencia de DCF/Control.

**Figura 75.** Efecto protector de los distintos compuestos fenólicos frente a estrés oxidativo. El ensayo se realizó incubando células HT-29 con 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos se expresan como media + desviación estándar de al menos 4 experimentos independientes. Las diferencias significativas con respecto al control del disolvente (DMSO 2%) usado como control negativo (Ctrl) se calcularon mediante ANOVA de un factor, seguido por LSD de Fisher ( $p < 0.05$ ) y se indican con asteriscos (\* =  $p > 0.05$ ; \*\* =  $p > 0.01$ ; \*\*\* =  $p > 0.001$ ). T/C [%]: Total de fluorescencia de DCF/Control.

**Figura 76.** Actividad anti-inflamatoria de los distintos compuestos fenólicos después de 2 h de incubación sobre la inflamación inducida por 1 µg/ml LPS de lipopolisacárido de *E. coli* en monocitos humanos. Todos los derivados fenólicos figuran junto al DHPG y el hidroxitirosol con efectos comparativos. Los datos se expresan como media + desviación estándar de al menos 4 experimentos independientes. Las diferencias significativas con respecto al control del disolvente (DMSO 2%) usado como control negativo (Ctrl) se calcularon mediante ANOVA de un factor, seguido por LSD de Fisher ( $p < 0.05$ ), y se indican con asteriscos (\* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) y \*\*\* ( $p < 0,001$ )). Las diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas, se calcularon usando la prueba t de Student y se están indicados con "a", "b" o "c". T/C [%]: Total de fosfatasa alcalina/Control.



---

## ÍNDICE

---

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>I.1. ENZIMAS LIPOLÍTICAS: LIPASAS Y ESTERASAS</b> .....	<b>9</b>
<b>I.1.1. Características de las enzimas lipolíticas</b> .....	<b>9</b>
I.1.2. Características estructurales de las enzimas lipolíticas .....	10
I.1.3. Mecanismo catalítico de las enzimas lipolíticas .....	11
I.1.4. Distinción entre lipasas y esterasas .....	12
<b>I.2. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS LIPOLÍTICAS BACTERIANAS</b> .....	<b>13</b>
I.2.1 Familia I o lipasas verdaderas .....	14
I.2.2. Familia II o GDSL .....	15
I.2.3. Familia III .....	17
I.2.4. Familia IV .....	17
I.2.5. Familia V .....	17
I.2.6. Familia VI .....	17
I.2.7. Familia VII .....	17
I.2.8. Familia VIII .....	18
I.2.9 Familias IX - XVI.....	18
I.2.10. Nuevas familias de enzimas lipolíticas.....	18
<b>I.3. COMPUESTOS FENÓLICOS</b> .....	<b>19</b>
I.3.1. Clasificación de los compuestos fenólicos.....	19
I.3.1.1. Flavonoides.....	19
I.3.1.2. No flavonoides.....	21
I.3.1.3. Otros polifenoles.....	21
I.3.2. Papeles biológicos e implicaciones.....	21
I.3.3. Aceite de oliva .....	22
I.3.4. Hidroxitirosol. Origen, aislamiento y propiedades biológicas .....	22
I.3.5. 3,4-Dihidroxifenilglicol. Origen, aislamiento y propiedades biológicas.....	25
I.3.6. Oleuropeína. Origen, aislamiento y propiedades biológicas .....	26
<b>I.4. LIPOFILIA Y FARMACOCINÉTICA DE COMPUESTOS FENÓLICOS</b> .....	<b>27</b>
<b>1.5. CARBOHIDRATOS</b> .....	<b>28</b>
1.5.1. Estructura de carbohidratos .....	28
<b>I.6. BIOCATÁLISIS VS SÍNTESIS QUÍMICA</b> .....	<b>30</b>
I.6.1. Acilaciones y enzimas implicadas .....	31
<b>I.7. EL GÉNERO <i>Bacillus</i></b> .....	<b>31</b>
1.7.1. Biología y ecología del género <i>Bacillus</i> .....	32
I.7.2. Importancia industrial del género <i>Bacillus</i> .....	32
<b>II. OBJETIVO</b> .....	<b>37</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>III.1. CEPAS BACTERIANAS</b> .....	<b>39</b>
<b>III.2. ENZIMAS COMERCIALES</b> .....	<b>39</b>
<b>III.3. PLÁSMIDOS</b> .....	<b>39</b>
<b>III.4. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO</b> .....	<b>41</b>
III.4.1. Medios de cultivo para la selección de actividad lipolítica.....	41
III.4.2. Medios de cultivo utilizados para la optimización del crecimiento bacteriano y la producción de lipasas .....	43
III.4.3. Medios de cultivo para el crecimiento de las cepas de <i>E. coli</i> .....	43
<b>III.5. COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS</b> .....	<b>44</b>

<b>III.6. MANTENIMIENTO DE BACTERIAS</b> .....	<b>44</b>
<b>III.7. TOMA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUELO</b> .....	<b>44</b>
<b>III.8. TAMPONES Y SOLUCIONES</b> .....	<b>45</b>
<b>III.9. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y MANIPULACIÓN DE ADN</b> .....	<b>45</b>
III.9.1. Extracción y purificación de ADN.....	45
III.9.1.1. Extracción de ADN plasmídico.....	45
III.9.1.2. Extracción de ADN genómico .....	46
III.9.1.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....	46
III.9.1.4. Cuantificación y estimación de la pureza de ácidos nucleicos .....	47
III.9.1.5. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa .....	47
III.9.2. Manipulación del ADN.....	47
III.9.2.1. Restricción de ADN plasmídico con endonucleasas .....	47
III.9.2.2. Ligación de fragmentos de ADN .....	47
III.9.2.3. Eliminación de las endonucleasas de restricción .....	48
III.9.2.4. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> mediante choque térmico.....	48
<b>III.10. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)</b> .....	<b>49</b>
<b>III.11. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE ADN</b> .....	<b>51</b>
III.11.1. Secuenciación de fragmentos amplificados de ADN .....	51
III.11.2. Análisis de la secuencia del ARNr 16S y construcción de árboles filogenéticos.....	51
III.11.3. Secuenciación del genoma de <i>Bacillus</i> sp. HR21-6.....	51
<b>III.12. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ARN</b> .....	<b>52</b>
III.12.1. Extracción de ARN .....	52
III.12.2. Análisis del ARN .....	52
III.12.3. Análisis del ARN por RT-qPCR .....	53
<b>III.13. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS</b> .....	<b>54</b>
<b>III.14. ENSAYOS DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA</b> .....	<b>54</b>
III.14.1. Detección de la actividad transesterificadora .....	55
III.14.2. Derivados del para-nitrofenol .....	56
III.14.3. Hidrólisis de los derivados del p-nitrofenil ( <i>p</i> -NP) .....	58
<b>III.15. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS</b> .....	<b>58</b>
<b>III.16. SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE DERIVADOS LIPÓFILOS DE POLIFENOLES Y CARBOHIDRATOS MEDIADAS POR EL SOBRENADANTE DE <i>Bacillus</i> sp. HR21-6</b> .....	<b>58</b>
III.16.1. Acetilaciones de compuestos fenólicos.....	58
III.16.2. Desacilación de compuestos fenólicos peracetilados .....	59
III.16.3. Reacciones de acetilación de carbohidratos .....	60
III.16.4. Reacciones de desacetilación de carbohidratos .....	60
III.16.5. Reacciones de acilación y/o desacetilación de oleuropeína 20 y derivados.....	60
III.16.6. Reacciones de acilación/desacetilación utilizando la enzima AE6Lpura.....	60
<b>III.17. AISLAMIENTO Y DETECCIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS</b> .....	<b>60</b>
III.17.1. Obtención de las fracciones FSEP y OMV del sobrenadante de <i>Bacillus</i> sp. HR216.....	60
III.17.2. Identificación de proteínas mediante cromatografía Nano LC-QTRAP 5500 MRM ( <i>Multiple Reaction Monitoring</i> ) .....	61
III.17.3. Análisis de los datos.....	62
<b>III.18. CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN QUE CODIFICA LA PROTEÍNA AE6L EN EL VECTOR pMAB36</b> .....	<b>62</b>
<b>III.19. SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS</b> .....	<b>63</b>
<b>III.20. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA AE6L</b> .....	<b>63</b>
III.20.1. Purificación Ni-IMAC de la fracción soluble de la proteína AE6L eluyendo con imidazol.....	63
III.20.2. Purificación Ni-IMAC en gradiente de pH de la fracción soluble de la proteína AE6L.....	64
III.20.3. Pool de fracciones .....	64
III.20.4. Diálisis en el tampón de reacción .....	65
III.20.5. Comprobación solubilidad/insolubilidad .....	65
III.20.6. Escalado de la diálisis.....	65

<b>III.21. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>65</b>
III.21.1. Electroforesis desnaturante de proteínas (SDS-PAGE).....	65
III.21.2. Tinción Coomassie .....	66
III.22. Western-blot .....	66
<b>III.23. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.....</b>	<b>67</b>
<b>III.24. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA AE6L.....</b>	<b>69</b>
III.24.1. Influencia del pH en la hidrólisis del <i>p</i> -NP acetato .....	69
III.24.2. Especificidad de sustrato de la enzima AE6L.....	70
III.24.3. Influencia de distintos disolventes orgánicos.....	70
III.24.4. Influencia de la temperatura .....	70
III.24.5. Termoestabilidad de la enzima AE6L.....	70
III.24.6. Determinación de los parámetros cinéticos.....	70
<b>III.25. ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD DE LOS DIFERENTES DERIVADOS FENÓLICOS.....</b>	<b>71</b>
III.25.1. Líneas celulares y tratamiento.....	71
III.25.2. Fenoles utilizados y tratamiento celular.....	71
III.25.3. Estudio de la citotoxicidad.....	72
Ensayo de citotoxicidad acoplado WST-1 y SRB.....	73
III.25.4. Estudio del estrés oxidativo.....	73
III.25.4.1. Ensayo de diclorofluoresceína (DCF).....	74
III.25.4.2. Ensayo DCF de protección.....	74
III.25.5. Estudio de la capacidad antiinflamatoria .....	75
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>
<b>V.1. RECOGIDA DE MUESTRAS .....</b>	<b>77</b>
<b>IV.2. DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD LIPOLÍTICA (HIDRÓLISIS).....</b>	<b>77</b>
<b>IV.3. DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS TRANSESTERIFICADORES.....</b>	<b>77</b>
<b>IV.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS BACTERIAS TRANSESTERIFICADORAS.....</b>	<b>78</b>
<b>IV.5. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS .....</b>	<b>80</b>
<b>IV.6. SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE DERIVADOS LIPÓFILOS DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CARBOHIDRATOS UTILIZANDO EL SOBRENADANTE DE <i>Bacillus</i> sp. HR21-6 .....</b>	<b>81</b>
IV.6.1. Reacciones de acetilación de polifenoles procedentes del olivo .....	82
IV.6.2. Reacciones de desacetilación en polifenoles procedentes del olivo.....	83
IV.6.2.1. Desacetilación del hidroxitirosol peracetilado .....	83
IV.6.2.2. Desacetilación del DHPG peracetilado .....	83
IV.6.2.3. Desacetilación del alcohol protocatecuico peracetilado.....	84
IV.6.3. Reacciones de acetilación de carbohidratos .....	84
IV.6.4. Reacciones de desacetilación de carbohidratos peracetilados.....	84
IV.6.5. Reacciones de desacetilación de la oleuropeína.....	86
<b>IV.7. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE <i>Bacillus</i> sp. HR21-6 .....</b>	<b>86</b>
IV.7.1. Secuenciación y análisis bioinformático del genoma de <i>Bacillus</i> sp. HR21-6.....	86
IV.7.2. Análisis del secretoma de <i>Bacillus</i> sp. HR21-6 .....	87
<b>IV.8. ANÁLISIS IN SILICO DE LA ENZIMA AE6L.....</b>	<b>91</b>
IV.8.1. Clasificación y dominios de la enzima AE6L .....	91
IV.8.2. Análisis de la estructura secundaria de la enzima AE6L.....	94
IV.8.3. Predicción de la estructura tridimensional de la proteína AE6L .....	94
IV.8.4. Predicción de la localización celular de la enzima AE6L.....	96
IV.8.5. Predicción de la topología de la enzima AE6L .....	97
<b>IV.9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN QUE CODIFICA LA PROTEÍNA AE6L MEDIANTE RT-qPCR .....</b>	<b>97</b>
<b>IV.10. EXPRESIÓN DE LA ENZIMA AE6L EN <i>E. coli</i>.....</b>	<b>98</b>
IV.10.1. Clonación y expresión del gen que codifica la proteína AE6L en <i>E. coli</i> .....	98
IV.10.2. Elección del tampón para la purificación de la enzima .....	99

<b>IV.11. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA AE6L.....</b>	<b>100</b>
<b>IV.12. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA AE6L.....</b>	<b>102</b>
IV.12.1. Especificidad de sustrato de la enzima AE6L.....	102
IV.12.2. Influencia de la temperatura sobre la actividad de la enzima AE6L.....	103
IV.12.2.1. Actividad de la enzima AE6L a diferentes temperaturas .....	103
IV.12.2.2. Termoestabilidad .....	104
IV.12.3. Determinación de los parámetros cinéticos.....	105
IV.12.4. Influencia de distintos disolventes orgánicos sobre la actividad de la enzima AE6L .....	105
<b>IV.13. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES DE LA ENZIMA AE6L Y SU EXPRESIÓN EN <i>E. coli</i> .....</b>	<b>105</b>
IV.13.1. Selección de aminoácidos para la mutagénesis .....	105
IV.13.2. Localización estructural de los aminoácidos seleccionados para la mutagénesis de la enzima AE6L.....	107
IV.13.3. Construcción de mutantes .....	108
IV.13.4. Expresión de los mutantes de AE6L en <i>E. coli</i> .....	108
<b>IV.14. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS MUTANTES .....</b>	<b>110</b>
IV.14.1. Especificidad de sustrato de los mutantes .....	110
IV.14.2. Influencia de la temperatura.....	112
<b>IV.15. DESACETILACIÓN REGIOSELECTIVA DE COMPUESTOS FENÓLICOS USANDO LA ENZIMA AE6L PURA .....</b>	<b>115</b>
<b>IV.16. BIOACTIVIDADES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y SUS DERIVADOS.....</b>	<b>117</b>
IV.16.1. Evaluación de la citotoxicidad .....	117
IV.16.1.1 Ensayo WST-1.....	118
IV.16.1.2. Ensayo SRB.....	119
IV.16.2. Evaluación de la actividad antioxidante .....	120
IV.16.3. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria .....	125
<b>V.DISCUSIÓN .....</b>	<b>130</b>
<b>V.1. SELECCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS CON CAPACIDAD TRANSESTERIFICADORA.....</b>	<b>129</b>
<b>V.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE <i>Bacillus</i> sp. HR21-6. CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDADES DE LA ENZIMA AE6L.....</b>	<b>131</b>
<b>V.3. ANÁLISIS DE MUTANTES DE LA ENZIMA AE6L .....</b>	<b>135</b>
<b>V.4. MODIFICACIÓN REGIOSELECTIVA DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CARBOHIDRATOS A PARTIR DE EXTRACTOS BACTERIANOS .....</b>	<b>136</b>
<b>V.5. BIOACTIVIDADES DERIVADAS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS OBTENIDOS .....</b>	<b>139</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>145</b>



---

## RESUMEN

---

Las proteínas lipolíticas son enzimas ubicuas con importantes funciones fisiológicas en la síntesis o hidrólisis de compuestos que contienen grupos éster. Además, estas enzimas son valiosos biocatalizadores debido a su amplia especificidad de sustrato y su alta quimio-, regio- y estereoselectividad. Actualmente, la biocatálisis, y en particular el uso de enzimas hidrolíticas tales como esterasas, es una alternativa a los métodos de síntesis convencionales y puede ser útil para la protección y desprotección estereo- y regioselectiva de polifenoles y otros compuestos, abaratando y simplificando el proceso.

En este trabajo se ha llevado a cabo la biotransformación de distintos compuestos fenólicos naturales procedentes del olivo como el hidroxitirosol, el alcohol protocatecuico y el 3,4-dihidroxifenilglicol y diferentes azúcares como la metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido,  $\alpha,\alpha$ -trehalosa y sacarosa mediante biocatálisis, con el fin de obtener derivados que posean una mayor biodisponibilidad y manteniendo las mismas propiedades antioxidantes que los polifenoles naturales de partida.

La primera etapa de este trabajo consistió en la descripción de un método de selección de microorganismos lipolíticos a partir de muestras procedentes de diferentes industrias alimentarias. De los 459 microorganismos lipolíticos analizados, se seleccionó una bacteria identificada como *Bacillus* sp. HR21-6 para estudios posteriores. Esta cepa presentó las mejores tasas de conversión en las reacciones de desacetilación en los diferentes compuestos fenólicos y carbohidratos estudiados. En esta primera etapa, el sobrenadante liofilizado libre de células obtenido del cultivo de *Bacillus* sp. HR21-6 fue directamente utilizado como biocatalizador en la síntesis quimio y regioselectiva de compuestos parcialmente acetilados.

El siguiente paso se centró en la identificación de la proteína implicada en las reacciones de acilación y desacilación de los compuestos polifenólicos y azúcares estudiados. Para ello, se obtuvo la secuencia completa de *Bacillus* sp. HR21-6, y después del análisis de su secretoma, se detectó una acetilesterasa (AE6L) en la fracción extracelular soluble (FESP). Esta enzima fue identificada como una carbohidrato esterasa, perteneciente a la familia II o GDSL, subfamilia SGNH.

El gen que codifica la proteína AE6L fue clonado en el vector de expresión pMAB36 con una etiqueta 6xHis con el objetivo de expresar la enzima en células *E. coli* BL21 (DE3). AE6L se expresó totalmente en forma soluble, y su expresión se optimizó para proporcionar la cantidad máxima de enzima después de la purificación. La caracterización de esta enzima reveló que su mayor actividad se alcanza en la hidrólisis de compuestos de *p*-nitrofenol de cadena corta (C2). Su capacidad para realizar acilaciones y desacetilaciones regioselectivas sobre los compuestos fenólicos y azúcares analizados, demostró que al menos AE6L es una de las enzimas presentes en el sobrenadante, responsable de la actividad enzimática detectada, aunque pueden existir otras enzimas que participen, tal y como se sugiere en la discusión.

En la siguiente etapa se llevó a cabo la caracterización molecular de los motivos de aminoácidos críticos de la enzima AE6L desde el punto de vista funcional, además de la construcción de diferentes mutantes con el objetivo de estudiar la influencia de ciertos aminoácidos en la actividad y en el comportamiento bioquímico de esta enzima.

En la última etapa de este trabajo se estudió el potencial biológico y farmacológico de los derivados del hidroxitirosol y del DHPG con el fin de determinar su posible actividad antioxidante y antiinflamatoria. Se concluyó que estos derivados presentaron ligeras mejoras en determinadas actividades (antioxidante y anti-inflamatoria) sin producir efectos tóxicos para la célula.



## INTRODUCCIÓN



---

## I. INTRODUCCIÓN

---

### I.1. ENZIMAS LIPOLÍTICAS: LIPASAS Y ESTERASAS

#### I.1.1. Características de las enzimas lipolíticas

Las enzimas lipolíticas son un grupo de enzimas distribuidas ampliamente en la naturaleza, estando presentes en animales, plantas y microorganismos. Independientemente de su naturaleza, todas catalizan la hidrólisis de enlaces ésteres formados entre un ácido y un alcohol (Ro et al. 2004)

Actualmente, las enzimas bacterianas están experimentando un gran auge debido a las ventajas que proporcionan su utilización (Olempska-Beer et al. 2006). Las enzimas lipolíticas se caracterizan por su capacidad para llevar a cabo reacciones de síntesis, hidrólisis e incluso intercambio de grupos de forma quimio, regio o estereoespecífica sin desarrollar reacciones laterales o generar subproductos en un amplio grupo de sustratos. Sus actividades más óptimas se presentan a pH neutros o básicos, aunque son enzimas altamente estables en un amplio rango de temperaturas, pH y solventes orgánicos. Son además estables frente a diferentes detergentes, iones y agentes químicos, y en general, no requieren cofactores. Debido a estos motivos, al profundo conocimiento sobre estas enzimas, a su disponibilidad, y al hecho de que su utilización origina procesos menos costosos y menos contaminantes que sus correspondientes procesos químicos, las lipasas bacterianas son las enzimas más versátiles y más ampliamente utilizadas en biotecnología (Hasan et al. 2006).

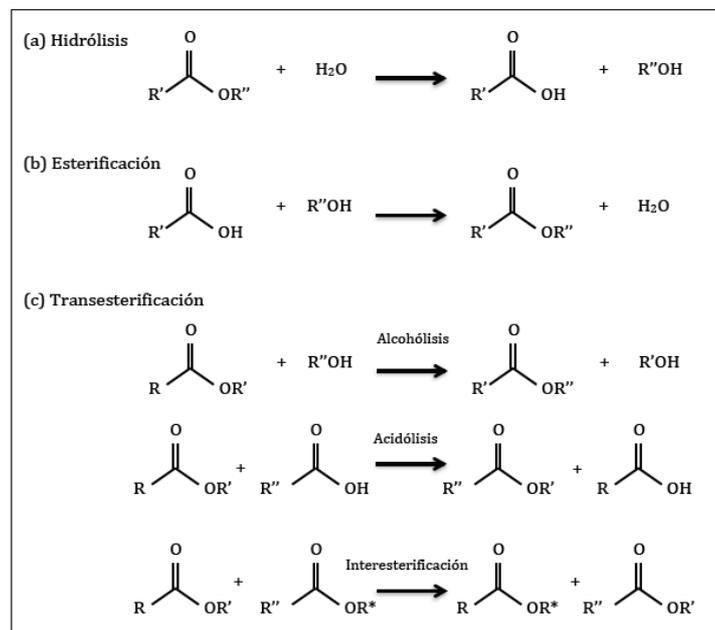
Para comprender la importancia de las enzimas lipolíticas debemos resaltar tres características importantes de las mismas (Kapoor and Gupta 2012; Sharma and Kanwar 2014);

- **Quimioselectividad:** especificidad de reacción según la naturaleza química del sustrato. Se trata de la capacidad enzimática de distinguir los ácidos grasos sobre los que actúan según su longitud de cadena, el número y posición de los dobles enlaces y otras características estructurales.
- **Regioselectividad o selectividad posicional:** una reacción regioselectiva es aquella en la que una dirección de unión o ruptura se produce preferentemente sobre todas las demás direcciones posibles, es decir, es la formación preferente de un isómero estructural respecto a otro. Hay enzimas que pueden hidrolizar los ésteres de ácidos grasos de triglicéridos en cualquier posición al azar y otras que muestran preferencia por los situados por ejemplo en las posiciones C1 y C3.
- **Enantioselectividad:** las enzimas lipolíticas tienen la capacidad de diferenciar los enantiómeros de un sustrato en una mezcla racémica, y muestran preferencia por uno de ellos.

Actualmente, existen diversas empresas especializadas en la producción y búsqueda de enzimas lipolíticas. La utilización de técnicas de mutagénesis dirigida e ingeniería genética están permitiendo el desarrollo de enzimas recombinantes diseñadas para catalizar reacciones químicas muy específicas o resistentes a determinadas condiciones de temperatura, pH o presencia de solventes, así como procesos de enriquecimiento enantiomérico por catálisis enzimática

(Bornscheuer and Kazlauskas 2006; Reetz 2004). Estos condicionantes han llevado a la clonación y caracterización de muchas de estas enzimas, así como al estudio de los mecanismos moleculares que controlan su expresión, su plegamiento y su secreción.

La mayoría de las enzimas lipolíticas pertenecen a la familia  $\alpha/\beta$  hidrolasas, la cual incluye esterasas (EC 3.1.1.x) y lipasas verdaderas (EC 3.1.1.3). Ambos grupos, de gran importancia biotecnológica, catalizan la rotura de un enlace éster entre un alcohol y un ácido carboxílico en medios acuosos. En solventes orgánicos o medios con bajo contenido en agua también pueden llevar a cabo la reacción inversa, la formación de un enlace éster. Las reacciones de síntesis pueden ser de dos tipos: esterificación (síntesis de un éster a partir de un ácido carboxílico y un alcohol) o transesterificación (intercambio de grupos entre un éster y un alcohol, reacción denominada alcoholólisis, un éster y un ácido, acidólisis, o dos ésteres, interesterificación (Figura 1) (Sharma and Kanwar 2014).



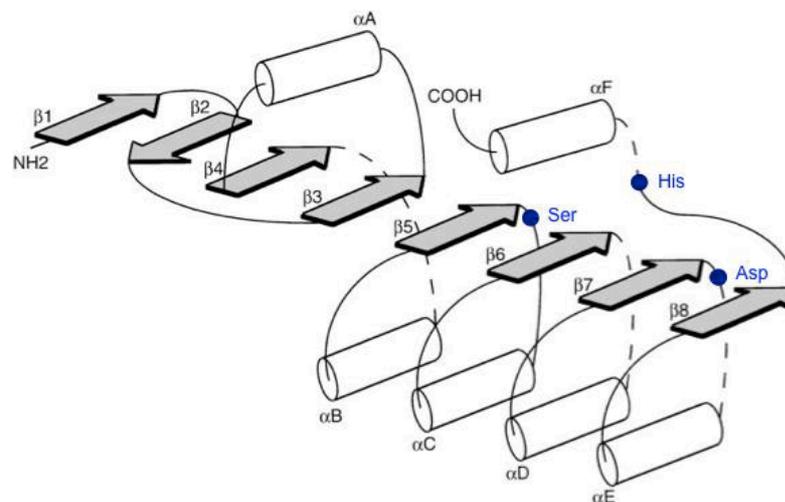
**Figura 1.** Reacciones catalizadas por enzimas lipolíticas. Fuente: Imagen tomada de Sharma and Kanwar (2014)

### 1.1.2. Características estructurales de las enzimas lipolíticas

Gracias a la cristalización de enzimas lipolíticas y la resolución de sus estructuras tridimensionales, se ha determinado que estas proteínas presentan un plegamiento muy similar entre los diferentes subgrupos, a pesar de la baja similitud de sus secuencias de aminoácidos (Jaeger et al. 1999). La estructura tridimensional general de estas enzimas consiste en un plegamiento característico  $\alpha/\beta$ -hidrolasa, compuesto por un conjunto de ocho láminas  $\beta$  paralelas, a excepción de la segunda que es antiparalela, conectadas a través de cinco hélices  $\alpha$ , entre las cuales se encuentra alojado el sitio activo (Figura 2) (Bornscheuer 2002). El centro activo de estas enzimas está integrado por la triada catalítica típica, cuya posición en el plegamiento suele estar conservada y constituida por los residuos Ser-Asp-His, aunque en algunas lipasas aparece glutamato en lugar de aspartato. La serina normalmente actúa como nucleófilo del centro activo y está localizada en un pentapéptido conservado Gly-X-Ser-X-Gly (donde X representa cualquier aminoácido). La función de este pentapéptido conocido también como “*nucleophilic elbow*” es

orientar y estabilizar la serina gracias al giro que origina entre la lámina  $\beta 5$  y la siguiente hélice  $\alpha$ . Se ha descrito un grupo de esterasas que no comparten este patrón común, las esterasas de la familia GDSL (Akoh et al. 2004). En este grupo, el residuo nucleofílico de serina se localiza inmediatamente a continuación de la lámina  $5\beta$ , el residuo aspartato/glutamato en un giro de la lámina  $7\beta$ , y el residuo de la histidina en el bucle situado después de la lámina  $8\beta$  (Ollis et al. 1992; Jaeger et al. 1999).

Además, existen dos aminoácidos que forman parte del bolsillo catalítico “*oxyanion hole*” y que ayudan a estabilizar las formas intermedias durante la reacción enzimática: el que se sitúa inmediatamente después de la serina catalítica y otro al final de la lámina  $3\beta$ . También se han identificado regiones de la cadena proteica responsables del alojamiento de los sustratos, que se sitúan a continuación de las láminas  $\beta$  de la región carboxílico terminal de la enzima. Estas regiones conforman unos sitios de unión al sustrato con longitud y arquitectura muy diversos, de acuerdo con la gran variedad de especificidades de sustrato que presentan las enzimas lipolíticas (Jaeger et al. 1999).

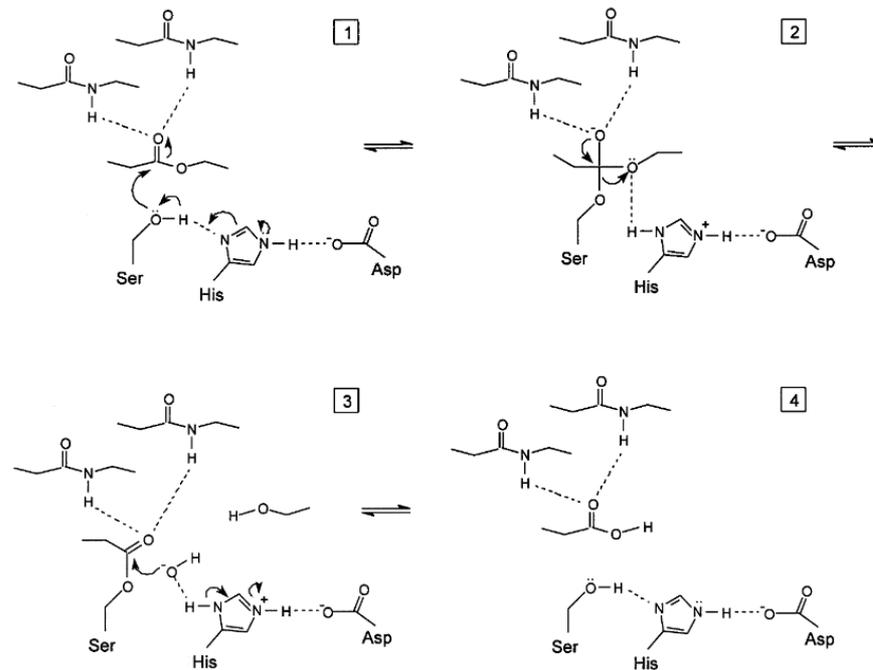


**Figura 2.** Estructura del dominio de las  $\alpha/\beta$ -hidrolasas (lipasas y esterasas). Las láminas  $\beta$  (1-8) se muestran como flechas grises y las hélices  $\alpha$  (A-F) como cilindros. La posición relativa de los residuos de la triada catalítica Ser-Asp-His se muestra en círculos azules. Fuente: Figura tomada de Bornscheuer (2002).

### 1.1.3. Mecanismo catalítico de las enzimas lipolíticas

El mecanismo de las esterasas y lipasas para la síntesis o la hidrólisis de enlaces ésteres es el mismo para ambas y se compone fundamentalmente de cuatro pasos (Jaeger et al. 1999b). Básicamente, durante la reacción, se forma un intermedio tetraédrico que posteriormente da lugar a un complejo acil-enzima (Figura 3). Después de la unión del sustrato, tiene lugar el ataque nucleofílico de la serina catalítica. Este ataque lo lleva a cabo el grupo hidroxilo de la serina sobre el grupo éster del sustrato y es provocado por la protonación de la histidina, la cual estabiliza a la serina a través del puente de hidrógeno que forma con el ácido glutámico. Todo este procedimiento es conocido como sistema de relevos de cargas (*charge relay*) debido a que las interacciones que se llevan a cabo entre estos aminoácidos originan la activación de la serina. Este ataque nucleofílico inicial permite la formación de un tetraedro intermedio (Figura 3.1). La estabilización de este intermediario se origina gracias a la presencia de dos glicinas próximas al centro activo dando lugar al centro oxianiónico (Figura 3.2). Posteriormente, se produce la liberación del alcohol con la ayuda de la histidina protonada originando un complejo acil-enzima (Figura 3.3). Finalmente,

ocurre la desacilación: el ataque nucleofílico (por parte del agua en el caso de hidrólisis, o de un alcohol o éster en (trans)-esterificación) formando de nuevo un intermedio tetraédrico que tras la reacción libera el producto (un ácido o un éster) y la enzima libre se regenera (Figura 3.4) (Jaeger et al. 1999).



**Figura 3.** Mecanismo de reacción de esterasas. Fuente: Imagen tomada de Arpigny and Jaeger (1999).

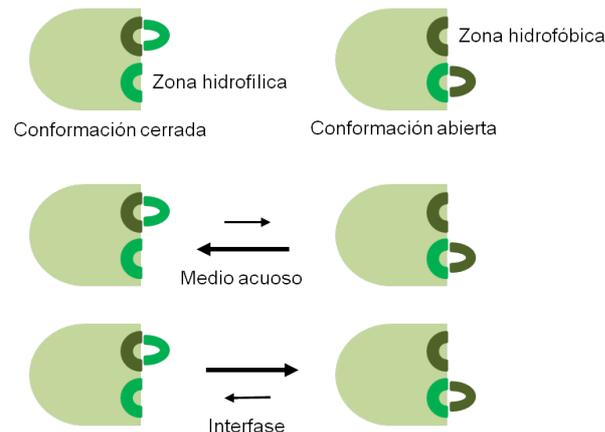
#### 1.1.4. Distinción entre lipasas y esterasas

El primer criterio para distinguir entre lipasas verdaderas y esterasas es la especificidad de sustrato. Las esterasas hidrolizan ácidos grasos de cadena menor de 10 átomos de carbono y su cinética podría ser descrita atendiendo a la ecuación de Michaelis-Menten (Brockerhoff and Jensen 1974; Sarda and Desnuelle 1958). Las lipasas verdaderas, glicerol-éster hidrolasas (EC 3.1.1.3), catalizan la hidrólisis de ácidos grasos de cadena larga (mayores de 10 átomos de carbono) a menudo insolubles en agua, es decir, llevan a cabo la hidrólisis de grasas y aceites con la consiguiente liberación de los ácidos grasos, diglicéridos, monoglicéridos y glicerol (Jaeger et al. 1999).

El cribado de enzimas lipolíticas se realiza habitualmente empleando sustancias cromóforas (por ejemplo, ésteres de *p*-nitrofenilo) o usando placas de agar suplementadas con tributirina. Los organismos que producen estas enzimas activas se identifican por la formación de un halo de hidrólisis en estas placas. Además, las lipasas pueden distinguirse de las esterasas por sus efectos en el sustrato, *p*-nitrofenil palmitato (escindido por lipasas) y *p*-nitrofenil acetato/butirato (escindido por esterasas).

Las lipasas se caracterizan por seguir una cinética con un patrón de curva sigmoidea (Brockerhoff and Jensen 1974), es decir, en presencia de bajas concentraciones de sustrato, la actividad enzimática es baja también, no obstante, cuando la concentración de sustrato aumenta y alcanza la concentración micelar crítica, la actividad catalítica también aumenta bruscamente (Arpigny and Jaeger 1999). La concentración micelar crítica se conoce como la interfase constituida entre las micelas del sustrato hidrofóbico y la fase acuosa hidrofílica que contiene la

lipasa en suspensión. Estas características se deben a la presencia en muchas lipasas de un dominio hidrofóbico  $\alpha$ -hélice flexible (tapa), que expone el sitio activo y orienta la unión del sustrato a la interfase entre el agua y las fases solventes (Winkler et al. 1990). Así, cuando la lipasa se une a una interfase hidrofóbica tiene lugar un cambio conformacional que produce el desplazamiento de la tapa dejando el centro activo accesible (conformación abierta) (Figura 4). De esta forma, la parte hidrofóbica de la tapa queda expuesta a la fase lipídica, favoreciendo las interacciones hidrofóbicas entre la enzima y la superficie lipídica (Jaeger et al. 1999).



**Figura 4.** Mecanismo de activación interfacial de las lipasas. Fuente: Figura tomada de Jaeger et al. (1999)

El centro activo de lipasas y esterasas es bastante similar químicamente, pero se estructura de forma diferente. En las lipasas, el grupo hidroxilo de la serina está orientado con una disposición diferente al encontrado en esterasas. En este grupo se produce una inversión estereoquímica de la triada catalítica, es decir se distribuyen espacialmente de manera inversa (Kapoor and Gupta 2012). Ambas enzimas han demostrado ser estables y activas en solventes orgánicos, pero esta característica es más pronunciada en las lipasas.

En general, las lipasas también se distinguen de las esterasas por tener su actividad óptima a pH más alcalinos (típicamente a pH 8) (Arpigny and Jaeger 1999), mientras que las primeras generalmente presentan su actividad óptima a pH menores (alrededor de pH 6) (Bornscheuer 2002).

## I.2. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS LIPOLÍTICAS BACTERIANAS

Existen diferentes formas de clasificar las enzimas lipolíticas: según la especificidad de sustrato, según las secuencias de aminoácidos conservados o bien según la sensibilidad de estas enzimas a varios inhibidores (Park et al. 2006). La clasificación más aceptada organiza las enzimas lipolíticas en 8 familias en base a la homología de su secuencia aminoacídica y a sus funciones fisiológicas (Arpigny and Jaeger 1999; Jaeger and Eggert 2002).

## I.2.1 Familia I o lipasas verdaderas

Esta familia incluye a todas las lipasas verdaderas y está constituida por ocho subfamilias.

### Subfamilia I.1 y I.2

Estas dos subfamilias están formadas por lipasas de bacterias Gram-negativas y se caracterizan por su secreción a través del sistema de tipo II (Braun et al. 1996; Koster et al. 2000; Abdelmonaem et al. 2010; Pugsley 1992; Tommassen et al. 1992). Otra característica distintiva es la posesión de dos residuos de ácido aspártico que median la unión de un ión  $\text{Ca}^{2+}$  (Nardini et al. 2000).

### Subfamilia I.3

Las enzimas pertenecientes a esta subfamilia también son secretadas mediante un sistema de secreción de tipo II (Arpigny and Jaeger, 1999; Abdelmonaem et al. 2010) Principalmente se caracterizan por presentar una masa molecular de alrededor de 50-65 kDa y por poseer un ión  $\text{Ca}^{2+}$  que se une a la hélice de la tapadera de la lipasa, el cual resulta esencial para la actividad de la enzima (Meier et al. 2007).

### Subfamilia I.4

Estas lipasas son identificadas como triacilglicerol lipasas pequeñas con una masa molecular de aproximadamente 20 kDa (Arpigny and Jaeger, 1999). En esta subfamilia se incluyen varias lipasas del género *Bacillus* que contienen una secuencia pentapeptídica conservada formada por Ala-Met-Ser-X-Gly (Ruiz et al. 2002).

### Subfamilia I.5

Este grupo está formado por lipasas procedentes de diferentes bacterias Gram-positivas pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Geobacillus* y *Clostridium*. Su masa molecular ronda los 45 kDa (Nthangeni et al. 2001) debido a las grandes inserciones que poseen las típicas  $\alpha/\beta$  hidrolasas (Tyndall et al. 2002). Una peculiaridad es que poseen un pH óptimo que difiere notablemente de otras subfamilias, el cual abarca desde pH 7,5 a pH 9,5 (Kim et al. 1998; Lee et al. 1999; Rúa et al. 1997).

### Subfamilia I.6

Las lipasas pertenecientes a esta subfamilia son lipasas producidas por diferentes especies del género *Staphylococcus*. Estas lipasas se expresan como pre-proteínas y presentan una masa molecular de aproximadamente 75 kDa, que producen una enzima madura con una masa molecular de 46 kDa (Götz et al. 1998; Rosenstein and Götz 2000). Estas enzimas son estables en un rango de pH comprendido entre 4 y 9 (Sayari et al. 2001).

### Subfamilia I.7

Estas lipasas muestran cierta similitud con la región central de la estructura primaria de las lipasas de la subfamilia I.2. Se han identificado lipasas pertenecientes a esta subfamilia en las especies *Streptomyces cinnamoneus* (Sommer et al. 1997), *Propionibacterium acnes* (Miskin et al.

1997) *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium adolescentis* (Abdelmonaem et al. 2010).

### Subfamilia I.8

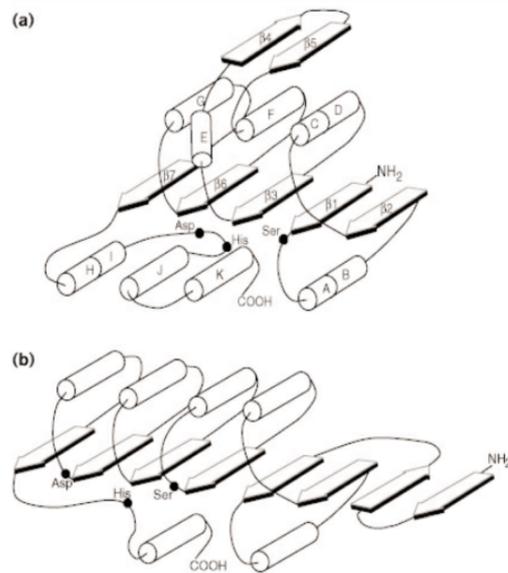
La lipasa Lip1 de la bacteria psicrófila *Pseudoalteromonas haloplanktis* fue la primera lipasa propuesta para esta subfamilia (de Pascale et al. 2008). Lip1 posee una masa molecular de 51 kDa y se caracteriza por carecer de “tapadera” así como del “bolsillo” de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ . Además posee la secuencia Leu-Gly-Gly (Phe/Leu/Tyr) Ser-Thr-Gly como un nuevo motivo consenso de centro activo alrededor de la serina catalíticamente activa (de Pascale et al. 2008).

### I.2.2. Familia II o GDSL

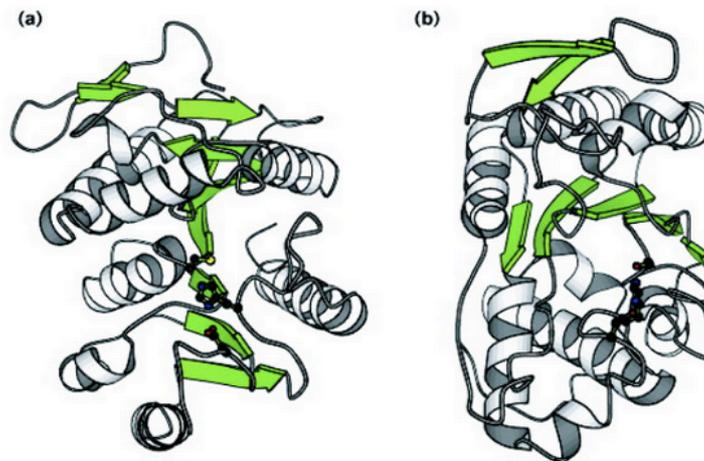
La familia II se caracteriza por poseer un motivo característico de secuencia GDSL distinto del pentapéptido clásico Gly-x-Ser-x-Gly, encontrado en la mayoría de las enzimas lipolíticas. Las enzimas GDSL tienen cinco bloques consenso (I-V) y en cada bloque un aminoácido conservado esencial para la catálisis, normalmente serina, glicina, asparagina, aspártico e histidina. Esta secuencia de aminoácidos da lugar a la subfamilia denominada hidrolasas-SGNH (Akoh et al. 2004). Esta subfamilia engloba a lipasas, proteasas, esterasas, tioesterasas, lisofosfolipasas, arilesterasas, aciltransferasas y carbohidrato esterasas (Alalouf et al. 2011). La secuencia consenso que las da el nombre [GDS(L)] se localiza en el bloque I. La serina catalítica se encuentra en este bloque cercana al N-terminal de la proteína, a diferencia de lo que ocurre con las lipasas con motivo Gly-x-Ser-x-Gly, donde la serina se encuentra en el centro de la proteína (Bornscheuer 2002) En el proceso catalítico, la serina nucleofílica actúa donando un protón al agujero oxianiónico. La glicina y la asparagina son donadores de protones para la formación del agujero oxianiónico, la histidina desprotona a la serina haciéndola más reactiva y el aspártico se encarga de estabilizar la carga positiva de la histidina catalítica (Akoh et al. 2004).

Otra característica esencial de estas enzimas es la ausencia de codo nucleófilo y la presencia de un sitio activo flexible que se adapta a la unión de los diferentes sustratos y que sólo cambia de conformación una vez que el sustrato se ha unido. En este contexto han sido descritas enzimas con actividad lipasa y proteasa motivada por esta alta flexibilidad (Bornscheuer 2002). Debido a esta amplia especificidad de sustrato, estas enzimas poseen un gran potencial para su uso en la hidrólisis y la síntesis de compuestos ésteres de interés farmacéutico, alimentario, bioquímico y biológico (Akoh et al. 2004).

Estas enzimas, además, no tienen homología con las lipasas con plegamiento típico  $\alpha/\beta$ . La estructura descrita para las lipasas/esterasas GDSL está constituida por varias láminas  $\beta$  y hélices  $\alpha$  orientadas de forma alterna, situando el sitio de unión al sustrato entre la lámina  $\beta$  central y una hélice  $\alpha$  (Figura 5). Otra diferencia destacable entre las lipasas  $\alpha/\beta$  hidrolasas y los miembros de la subfamilia II es la orientación de los residuos catalíticos en la estructura de la proteína. En las lipasas de tipo  $\alpha/\beta$  hidrolasas, los residuos de la tríada catalítica se alinean en paralelo a la hoja  $\beta$  central, mientras que en las lipasas GDSL, la línea de la tríada catalítica se localiza perpendicularmente a la hoja  $\beta$  central (Figura 6). Esta disposición no parece afectar a la función catalítica de la enzima debido a que serina nucleofílica en el carbono carbonílico se conserva en su posición (Wei et al. 1995).



**Figura 5.** Distribución de la estructura secundaria en (a) la ramnogalacturonano acetiltransferasa (RGAE) de *Aspergillus aculatus* (familia II) y (b) un pliegue típico de lipasas hidrolasa  $\alpha/\beta$  hidrolasas. Fuente: Figura tomada de Mølgaard et al. (2000a).



**Figura 6.** Orientación de los residuos de la tríada catalítica con respecto al pliegue total. (a) Estructura de la dienolactasa hidrolasa (Pathak and Ollis 1990), una  $\alpha/\beta$  hidrolasa, vista desde el lado N-terminal de la hoja  $\beta$  central. Los tres residuos catalíticos se alinean aproximadamente en paralelo a la hoja  $\beta$  central (b) RGAE perteneciente a la familia II vista desde una orientación similar. Los residuos catalíticos se alinean casi perpendiculares a la hoja  $\beta$  central. Fuente: Figura tomada de Mølgaard et al. (2000a)

En general, las proteínas de la familia GDSL son proteínas con un peso molecular aproximado de 22-60 kDa, aunque algunas tienen múltiples sitios de glucosilación con mayor peso molecular.

### I.2.3. Familia III

A esta familia pertenecen las enzimas extracelulares de las diferentes especies de los géneros *Streptomyces* y *Moraxella* (Cruz et al. 1994; Feller et al. 1990; Pérez et al. 1993). Las lipasas de esta familia tienen una masa molecular de 32-35 kDa y muestran gran similitud con isoformas monoméricas del factor de activación de plaquetas acetilhidrolasa de seres humanos (PAF-AH) (Arpigny and Jaeger 1999).

### I.2.4. Familia IV

Esta familia está constituida por esterases de microorganismos procariotas psicrófilos, mesófilos o termófilos que presentan una elevada similitud con la familia de lipasas sensibles a hormonas de mamíferos (HSL) (Hemilä et al. 1994). Estas enzimas se caracterizan por poseer una secuencia consenso His-Gly-Gly-Gly involucrada en la catálisis de la enzima (De Simone et al. 2000; Manco et al. 1999) y por mostrar actividad solo hacia ácidos grasos de cadena corta (Chahinian et al. 2005). Varias esterases de esta familia (De Simone et al. 2000; De Simone et al. 2001; Zhu et al. 2003; Derewenda et al. 1999) han mostrado una estructura única consistente en una “cubierta” que difiere notablemente de la “tapadera” de las lipasas verdaderas (Wang et al. 2005).

### I.2.5. Familia V

Los miembros de esta familia proceden de bacterias mesófilas (*Pseudomonas oleovorans*, *Acetobacter pasteurianus* y *Haemophilus influenzae*), psicrófilas (*Moraxella sp.*) y termófilas (*Sulfolobus solfataricus*). Una peculiaridad de estas enzimas es que muestran una similitud moderada, que comprende entre el 20% y el 25% con otras enzimas bacterianas no lipolíticas, tales como las dehalogenasas y las haloperoxidasas. Se caracterizan por presentar una triada catalítica formada por residuos de serina, ácido glutámico o aspártico e histidina y el plegamiento característico de las  $\alpha/\beta$ -hidrolasas (Arpigny and Jaeger 1999).

### I.2.6. Familia VI

Esta familia está compuesta principalmente por enzimas con pesos moleculares comprendidos entre 23 y 26 kDa (Arpigny and Jaeger 1999; Kim et al. 2006). Se trata de enzimas que comparten una similitud de aproximadamente el 40% con las lisofosfolipasas de organismos eucariotas. A esta familia también pertenecen enzimas carboxilesterasas caracterizadas por presentar una amplia especificidad de sustrato. Al igual que las familias IV y V, poseen tres bloques característicos con dominios conservados (Arpigny and Jaeger, 1999; Lenfant et al. 2013).

### I.2.7. Familia VII

La familia VII está compuesta por esterases con un peso molecular de aproximadamente 55 kDa. Todas las enzimas de esta familia presentan una elevada homología con acetilcolinesterasas de eucariotas y carboxilesterasas del intestino e hígado (Arpigny & Jaeger, 1999). Todas las enzimas de este grupo son producidas por varias cepas de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Geobacillus* (Nthangeni et al. 2005). Entre los sustratos típicos de estas carboxilesterasas se encuentran triglicéridos y derivados de *p*-nitrofenil con ácidos grasos de cadena corta.

### 1.2.8. Familia VIII

Esta familia está formada por enzimas que tienen una masa molecular de unos 42 kDa y una elevada homología con algunas  $\beta$ -lactamasas de clase C (Elend et al. 2006; Nishizawa et al. 1995; Schütte and Fetzner 2007).

En este grupo, la serina nucleofílica se encuentra en el motivo Ser-X-X-Lys (Petersen et al. 2001). Los miembros de esta familia se caracterizan por presentar alta tolerancia a diferentes disolventes y un motivo adicional en el extremo C-terminal (Elend et al. 2006; Schütte and Fetzner 2007).

### 1.2.9 Familias IX - XVI

Las enzimas pertenecientes a la familia IX contienen un pentapéptido conservado constituido por los residuos Ala-X-SerX-Gly (Handrick et al. 2001). Las pertenecientes a las familias X y XII poseen un pentapéptido conservado formado por los residuos Gly-X-Ser-X-Gly (Bassegoda et al. 2012); Kim et al. 2009; Levisson et al. 2007). Los miembros de las familias XI y XIII se caracterizan por presentar un motivo conservado formado por los residuos Gly-X-Ser-X-Gly-Gly (Ewis et al. 2004; Lee et al. 2006; Liu et al. 2014). La familia XIV posee el pentapéptido Cys-His-Ser-Met-Gly (Rao et al. 2011). Algunas proteínas de la familia XV contienen un pentapéptido conservado Gly-His-Ser-Gln-Gly, mientras que otras contienen una nueva variación de esta secuencia Ser-His-Ser-Gln-Gly (Bayer et al. 2010; Lee et al. 2010). Las enzimas pertenecientes a la familia XVI tienen un plegamiento  $\alpha/\beta$ -hidrolasa típico, con Ser-His-Asp constituyendo la triada catalítica y una “cubierta” muy pequeña que forma una  $\alpha$ -hélice y un lazo desordenado (Fu et al. 2013).

### 1.2.10. Nuevas familias de enzimas lipolíticas

#### Familia XVII

La lipasa extracelular LipJ2 producida por la bacteria halotolerante *Janibacter* sp. R02 fue la primera proteína identificada como miembro de esta nueva familia. Esta proteína consta de un peso molecular de 44 kDa y es homóloga a lipasas producidas por los géneros *Arsenicococcus*, *Dermatophilus* y *Janibacter* (Castilla et al. 2017). Se caracterizan por poseer una triada catalítica típica formada por Ser-His-Asn y un pentapéptido conservado Gly-Tyr-Ser-Gln-Gly alrededor de la serina catalítica.

#### Familia XVIII

La esterasa EstUT1 producida por la bacteria termófila *Ureibacillus thermosphaericus* fue la primera enzima clasificada en la nueva familia XVIII de enzimas lipolíticas (Samoylova et al. 2018). Esta enzima tiene un peso molecular de 28 kDa, y se caracteriza por poseer una triada catalítica compuesta por los residuos típicos Ser-His-Asn y un pliegue  $\alpha/\beta$ -hidrolasa. También se define por su alta especificidad hacia los ésteres de ácidos grasos de cadena corta (C2, C4) y presenta baja actividad hacia ésteres de ácidos grasos de 12 átomos de C.

## Familia XIX

El descubrimiento de la lipasa termoestable LipSm de *Stenotrophomonas maltophilia Psi-1* definió la familia XIX de enzimas lipolíticas (Parapouli et al. 2018). LipSm muestra más de un 48% de identidad con varias enzimas lipolíticas no caracterizadas de los géneros *Pseudomonas geniculata* y *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas pavanii*, *Gordonia* sp. y *Rhodococcus* sp. Esta enzima posee una tríada catalítica típica Ser-His-Asn y un péptido conservado Gly-His-Ser-Gln-Gly-Ala que rodea a la serina catalítica.

En el año 2010 se estimó que debían existir alrededor de 900 enzimas lipolíticas de origen bacteriano (Hausmann and Jaeger 2010). Desde entonces, este número ha ido aumentando de manera constante, superando hoy en día las 5000 enzimas identificadas. Cabe destacar que solo el 10% de estas enzimas han sido caracterizadas bioquímicamente, mientras que más del 90% han sido identificadas solo por similitud de secuencia.

## I.3. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos o polifenoles son un amplio grupo de metabolitos originados a partir del metabolismo secundario de plantas, donde tienen un papel importante en la defensa frente a patógenos debido a su acción antimicrobiana y antifúngica y frente a factores abióticos estresantes como la radiación solar (Soto-Vaca et al. 2012).

### I.3.1. Clasificación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se caracterizan por contener uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo de benceno (Sánchez-Maldonado et al. 2011). Según su estructura estos compuestos se clasifican de forma simplificada en flavonoides y no flavonoides (Tabla 1).

#### I.3.1.1. Flavonoides

Los flavonoides poseen una estructura general compuesta por un esqueleto difenilpirano C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> organizado en dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico. Los átomos de carbono de estos anillos se numeran mediante números ordinarios para los anillos A y C y números primos para el anillo B. Mientras que la gran mayoría de los flavonoides tienen su anillo B unido a la posición C<sub>2</sub> del anillo C (Figura 7A), otros como las isoflavonas poseen su anillo B conectado en las posiciones C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> del anillo C, respectivamente (Figura 7B). El anillo A es sintetizado mediante la ruta de los poliacetatos y el anillo B junto con la unidad C<sub>3</sub> a través de la ruta del ácido siquímico. Todos los flavonoides están compuestos por estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos o lo que es lo mismo, estructuras polifenólicas. Los flavonoides se encuentran en su gran mayoría como glucósidos (moléculas compuestas por un glúcido y un compuesto no glucídico), aunque también pueden aparecer en su forma libre, llamadas agliconas (agrupamiento no glucídico de un heterósido), como sulfatos, dímeros o polímeros. Los glucósidos pueden aparecer de dos formas: como O-glucósidos ligados a carbohidratos a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal), o como C-glucósidos ligados a carbohidratos mediante enlaces carbono-carbono, aunque los O-glucósidos son los componentes naturales mayoritarios.

Debido al patrón de hidroxilación y las variaciones en el anillo C, los flavonoides se pueden dividir en diferentes subgrupos: antocianinas, flavonoles, flavonas, flavanonas e isoflavonoides.

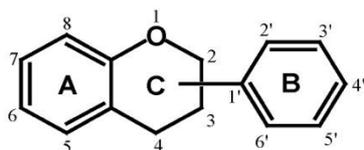
Estos compuestos se diferencian entre sí por el número y la posición de sus grupos hidroxilos y por los distintos grupos funcionales que pueden presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos). Las actividades biológicas de estos compuestos, incluida la actividad antioxidante, dependen tanto de la diferencia estructural como de los patrones de glicosilación.

**Tabla 1.** Clasificación simplificada de los distintos tipos de polifenoles

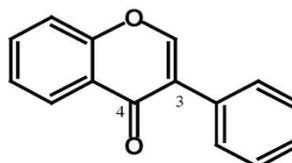
Tipo	Subtipo		Ejemplos	
Flavonoides	Antocianinas		Cianidina, leteolinidina	
	Flavonoles		Kaempferol, Qercetina	
	Flavonas		Apigenina, Luteolina	
	Flavanonas		Naringenina	
	Isoflavonoides	Isoflavonas		Genisteína, Daizdeína
		Isoflavanos		
	Flavanoles	Monómeros		Catequina, Epicatequina
Oligómeros y polímeros			Taninos	
No flavonoides	Ácidos fenólicos	Derivados del ácido cinámico	Ácido <i>p</i> -cumárico, Ácido cafeico, Ácido ferúlico	
		Derivados del ácido benzoico	Ácido gálico, Ácido protocatecuico	
	Alcoholes fenólicos		Hidroxitirosol, 3,4-dihidroxifenil glicol	
	Lignanós		Pinorresinol, 1-acetoxipino-rresinol	
	Estilbenos		Resveratrol	

Fuente: Ebrahimi and Schluesener (2012); Haminiuk et al. (2012)

A)



B)



**Figura 7.** Estructura general de flavonoides (A) y de isoflavonas (B)

### **I.3.1.2. No flavonoides**

Los compuestos fenólicos no flavonoides o ácidos fenólicos se pueden dividir en dos tipos principales de compuestos, los derivados del ácido cinámico y los derivados del ácido benzoico. Los derivados del ácido cinámico son los más abundantes en la naturaleza y aparecen esterificados con azúcares, con alcoholes alifáticos, con ácido quínico (ácido clorogénico), con otros metabolitos secundarios (flavonoides) o amidificados (Kim et al. 2006b; Adom and Liu 2002). Los derivados del ácido benzoico también aparecen de forma abundante en la naturaleza y se presentan en su forma libre, como ácidos o aldehídos (vainillal, anisaldehído), o como combinados en formas heterosídicas. A este último grupo pertenece el ácido gálico, la unidad básica estructural de los taninos hidrolizables.

Existen otros polifenoles no flavonoides presentes en los alimentos y considerados de elevada importancia para la salud humana. Por ejemplo, el resveratrol, perteneciente al grupo de los estilbenos, está presente en numerosas plantas y frutos y, sobre todo, en la uva y el vino tinto; los lignanos, presentes en el lino, sésamo y muchos granos; o el hidroxitirosol, un ácido fenólico descrito como un potente antioxidante presente en el aceite de oliva (Tomás-Barberan et al. 2000).

### **I.3.1.3. Otros polifenoles**

Algunos polifenoles pueden tener sustituyentes funcionales que contienen nitrógeno. Estos compuestos fenólicos son conocidos como amidas polifenólicas y están presentes en alimentos comunes como avenantramidas en la avena (Katarina Bratt et al. 2003) y capsaicinoides presentes en chiles (Davis et al. 2007); estos últimos identificados como potentes antioxidantes y anti-inflamatorios.

## **I.3.2. Papeles biológicos e implicaciones**

Los compuestos fenólicos no son considerados como alimentos esenciales para los humanos, pero su ingesta a través de fuentes naturales como la fruta, la verdura, el vino, el té, el cacao o el aceite de oliva tiene un considerable impacto positivo para la salud, además de influir muy positivamente en la calidad y estabilidad de los alimentos, ya que actúan como colorantes, saborizantes y antioxidantes.

Muchos estudios apoyan la importancia de los polifenoles en la prevención de enfermedades degenerativas, cánceres y enfermedades cardiovasculares (Milner 1994; Duthie and Brown 1994). Otros investigadores han indicado que una dieta rica en compuestos fenólicos está asociada a un mejor funcionamiento del tejido endotelial y a la inhibición de la agregación plaquetaria (Vita 2005) con la consiguiente disminución de problemas coronarios. Su ingesta prolongada también está relacionada con un menor riesgo de padecimiento de enfermedades crónicas como la diabetes tipo II (Xiao and Högger 2015), enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Rodríguez-Mateos et al. 2014) y el cáncer (Vauzour et al. 2010) además, de combatir procesos inflamatorios (Pounis et al. 2016).

Así, por ejemplo, el aceite de oliva virgen extra, rico en polifenoles, es cada vez más importante en la dieta diaria debido a sus efectos beneficiosos sobre la salud humana. Así, existe un creciente interés en este tipo de compuestos, en especial aquellos que pueden ser obtenidos a partir de subproductos generados en la industria alimentaria. En este contexto, destaca el hidroxitirosol, que predomina tanto en las hojas como en el fruto del olivo (*Olea europea*), ya sea libre o en forma de derivado.

### I.3.3. Aceite de oliva

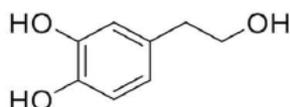
El aceite de oliva virgen es un producto procedente de la aceituna cuya obtención se lleva a cabo sólo mediante procedimientos mecánicos y físicos que no implican la alteración del aceite. Este procesamiento lo diferencia del resto de aceites vegetales, los cuales se someten a procedimientos químicos de refinado para ser aptos para el consumo (López-Beceiro et al. 2011).

Los constituyentes del aceite de oliva pueden diferenciarse en dos grupos. La fracción mayoritaria (98,5-99%), compuesta fundamentalmente por triglicéridos y cantidades reducidas de ácidos grasos libres como mono o diglicéridos y la fracción minoritaria, que incluye a los denominados componentes minoritarios o fracción insaponificable, la cual comprende aproximadamente el 1% del peso (Servili and Montedoro 2002). Esta fracción obtenida tras la saponificación del aceite (Pocklington and Dieffenbacher 1988) está constituida por más de 230 compuestos, entre ellos alcoholes alifáticos y triterpénicos, esteroides, hidrocarburos y compuestos volátiles, todos ellos responsables de la estabilidad del aceite y de sus características organolépticas. Entre estos compuestos minoritarios se distingue una fracción polifenólica que oscila entre 50-800 mg/l, y cuya concentración y contenido depende de factores como las condiciones de cultivo, variedad, grado de maduración del fruto y las condiciones de elaboración y almacenamiento del aceite (Martín-Peláez et al. 2013). Se han aislado gran variedad de compuestos procedentes de esta fracción, entre ellos flavonoides como la apigenina y la luteolina, lignanos como el pinorresinol y el 1-acetoxipinorresinol, alcoholes y ácidos fenólicos, y secoiridoides derivados del 2-(4'-hidroxifenil) etanol (tirosoles, Ty) y 2-(3',4'-dihidroxifenil) etanol (hidroxitirosoles) (Gómez-Rico et al., 2007; Servili et al., 2007).

La elaboración del aceite de oliva virgen ha evolucionado mucho a lo largo del último siglo, trascendiendo desde un sistema de prensado al actual sistema de centrifugación de dos fases (Roig et al. 2006) La producción de aceite mediante este sistema genera un único subproducto denominado alperujo, de consistencia semisólida y con un contenido en agua que oscila entre el 65-70% (Alburquerque et al. 2006).

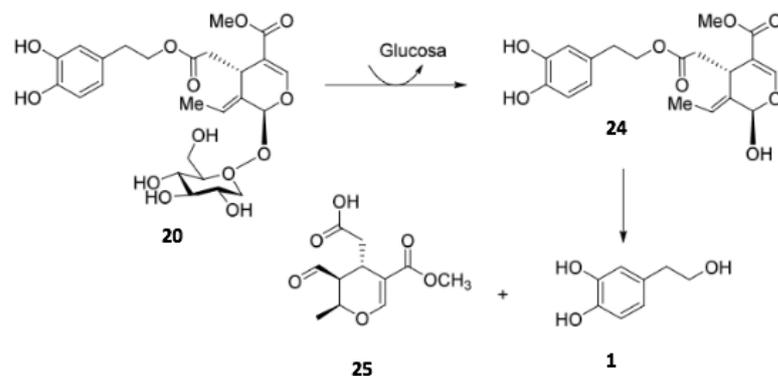
### I.3.4. Hidroxitirosoles. Origen, aislamiento y propiedades biológicas

El hidroxitirosoles es considerado el compuesto con mayor capacidad antioxidante después del ácido gálico y uno de los antioxidantes más potentes entre los compuestos fenólicos presentes en el olivo (Lee Richards, 2014). Este compuesto (Figura 8) deriva directamente de la oleuropeína **20**, la cual, durante el proceso de maduración y molienda de la aceituna se hidroliza dando lugar al aglicón de la oleuropeína **24**, que a su vez se hidroliza a hidroxitirosoles **1** y al ácido elenólico **25**, según el proceso indicado en la Figura 9.



**1**

**Figura 8.** Estructura del hidroxitirosoles



**Figura 9.** Obtención del hidroxitirosol **1** a partir de la oleuropeína **20**

Entre los compuestos fenólicos más abundantes en el alperujo encontramos el hidroxitirosol y el 3,4-dihidroxifenilglicol, por lo que su aislamiento a partir de este abundante subproducto puede dar acceso a grandes cantidades de los mismos. El grupo de investigación dirigido por el Dr. Juan Fernández-Bolaños del Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla) ha desarrollado distintos procedimientos para lograr recuperar estos compuestos con un alto grado de pureza (Fernández-Bolaños et al. 2002; Felizón et al. 2000). Un primer procedimiento consiste en un pretratamiento hidrotermal del alperujo conocido como explosión al vapor (*steam explosion*), consiguiendo maximizar de esta forma el contenido de hidroxitirosol recuperable. Posteriormente, se ha conseguido escalar el proceso de aislamiento y purificación a escala semi-industrial (Fernández-Bolaños et al. 2002). Este proceso consiste en el empleo de un sistema de dos columnas, la primera con relleno de resina intercambiadora aniónica (consiguiendo hidroxitirosol con una pureza del 50%), y una segunda con relleno neutro polar. Esta doble purificación cromatográfica del alperujo tratado al vapor permite acceder al hidroxitirosol en grandes cantidades con una pureza del 99.6%.

La actividad antioxidante del hidroxitirosol viene determinada fundamentalmente por su estructura y se debe tanto a un efecto quelante de iones metálicos como a un efecto captador de radicales libres (Francesco Visioli et al. 1998). Además, este compuesto ha demostrado tener una actividad antioxidante superior a la de otros antioxidantes conocidos como las vitaminas E y C (Gordon et al. 2001; Mateos et al. 2003; Bouaziz et al. 2005). Asociada a esta actividad han derivado multitudes de propiedades terapéuticas atribuidas al hidroxitirosol. Algunas de ellas detalladas a continuación:

#### *Actividad cardioprotectora*

Gran parte de las afecciones cardiacas son causadas debido a la formación de una placa aterosclerótica dentro de las arterias. El desarrollo de esta placa está motivado por la acumulación de LDL (*Light Density Lipoprotein*), el cual atraviesa el endotelio y se acumula en la capa interna de las arterias. Se ha demostrado que el hidroxitirosol puede reducir la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y la prevención de la oxidación de LDL (Fitó et al. 2007; Rafahi et al. 2012). Se cree además que el hidroxitirosol ejerce dicho efecto por otros mecanismos adicionales, inhibiendo o frenando la vía inflamatoria y/o enfermedades tromboticas tales como el infarto de miocardio, paradas cardiacas o muerte súbita cardiaca (Barderas et al. 2013). La EFSA (*European Food & Safety Authority*) aceptó en el año 2012 que el hidroxitirosol ejerce un efecto

protector de LDL frente a la oxidación por los radicales libres y previene el deterioro vascular producido por la arterioesclerosis (Schaffer et al. 2007).

#### *Actividad neuroprotectora*

La capacidad neuroprotectora del hidroxitirosol quedó demostrada tras someter al tejido cerebral de rata a un proceso de hipoxia-reoxigenación. Se comprobó que el hidroxitirosol tenía la capacidad de inhibir de manera dosis dependiente el flujo de lactato dehidrogenasa (LDH) (Cabrerizo et al. 2013; González-Correa et al. 2008). Numerosos estudios indican que el consumo de polifenoles reduce el riesgo de neurodegeneración y el declive cognitivo asociado a la edad. Concretamente, el hidroxitirosol es capaz de proteger a las células cerebrales frente a la peroxidación de los lípidos debido a que puede atravesar la barrera hematoencefálica (Schaffer et al. 2007).

#### *Actividad antimicrobiana*

La actividad antimicrobiana del hidroxitirosol ha sido evaluada *in vitro* frente a bacterias, virus y protozoos implicados en infecciones gastrointestinales y respiratorias (Bisignano et al. 1999). También ha sido comprobada su actividad antimicoplasmática frente a *Mycoplasma pneumoniae*, agente casual de la neumonía, y otras especies de la familia de los micoplasmas (Furneri et al. 2004). Además, se ha determinado que los polifenoles procedentes del aceite de oliva tienen acción bactericida, actuando eficazmente *in vitro* frente a *Helicobacter pylori*, una bacteria relacionada con la formación de úlceras pépticas y con algunos tipos de cáncer de estómago (Concepción Romero et al. 2007).

Se ha probado también que tanto el hidroxitirosol como la oleuropeína son inhibidores del VIH-1. Estos compuestos fenólicos previenen la fusión viral y la entrada del VIH en la célula huésped, constituyendo de esta manera el primer grupo de moléculas pequeñas capaz de llevar a cabo tanto la inhibición de la entrada viral como la integración del virus del SIDA (Liang et al. 2009). Además, se ha demostrado que el hidroxitirosol desactiva otros tipos de virus, como los subtipos H3N2, H5N1, H9N2 y H1N1 del virus de la gripe, éste último correspondiente a la gripe A (Han et al. 2009; Yamada et al. 2009).

#### *Actividad anticancerígena*

El hidroxitirosol y los compuestos fenólicos del aceite de oliva han demostrado actividad en la prevención del cáncer de colon (Guichard et al. 2006), de mama (Sirianni et al. 2010; Bulotta et al. 2013), de próstata (Luo et al. 2013) y del melanoma humano (Stefania D'Angelo et al. 2005).

Se ha demostrado que estos compuestos fenólicos pueden reducir el riesgo de padecer cáncer debido a que minimizan el daño en el ADN, la peroxidación lipídica y la generación de ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Omar 2010). Además, en los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se ha correlacionado el consumo de aceite de oliva y la prevención del cáncer debido a su capacidad para detener el ciclo celular, reduciendo el crecimiento y la proliferación de células cancerosas e induciendo la apoptosis de células HL60 (leucemia promielocítica) y células HT29 (adenocarcinoma de colon) sin afectar a células no cancerosas (Fabiani et al. 2002; Waterman and Lockwood 2007).

### *Osteoporosis*

Se ha determinado que el hidroxitirosol interviene en el mantenimiento óseo, esta cualidad le permite poder ser empleado como un remedio efectivo para paliar diferentes síntomas de osteoporosis, debido a que su consumo favorece la estimulación de los depósitos de calcio e inhibe la formación de osteoclastos multinucleados, única célula capaz de reabsorber la matriz ósea calcificada (Hagiwara et al. 2011).

### *Actividad antiinflamatoria y antiagregante plaquetario*

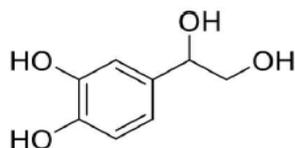
Los efectos del hidroxitirosol también han sido descritos en los procesos inflamatorios y la agregación plaquetaria en sangre de ratas y humanos (González-Correa et al. 2008; Reyes et al. 2013).

La inflamación está directamente relacionada con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y de la aterosclerosis. Diversos estudios han concluido que los compuestos fenólicos reducen los niveles de marcadores de inflamación, tales como CRP (proteína c-reactiva), IL-1 (interleucina-1), IL-6, o TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral) (Wu and Schauss 2012). Se ha comprobado también que el consumo de hidroxitirosol participa en la inhibición de otros procesos como la agregación plaquetaria químicamente inducida, la acumulación del agente pro-agregante tromboxano en suero humano, la producción de leucotrienos y de la araquidonato lipoxigenasa (Francesco Visioli et al. 2002). Recientemente, se ha demostrado que el hidroxitirosol-20, un extracto de aceite de oliva con un contenido en hidroxitirosol del 20%, inhibe la hinchazón inflamatoria y la hiperalgesia, es decir, la sensibilidad al dolor, y suprime la citoquina pro-inflamatoria en modelos llevados a cabo en ratas (Gong et al. 2009).

También se ha estudiado el efecto del hidroxitirosol a través de la medición de iNOS y la COX-2 en macrófagos de ratón J774 previamente estimulados con lipopolisacárido, induciendo un aumento de la iNOS, COX-2 y el nivel de proteínas. La presencia de hidroxitirosol disminuyó los niveles de estos compuestos además de boquear la activación del NF-kB, transductor de la señal nuclear, activador de la transcripción-1 alfa y el factor d1 regulador de interferón (Zhang et al. 2009).

### **I.3.5. 3,4-Dihidroxifenilglicol. Origen, aislamiento y propiedades biológicas**

El 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG) **4** es un compuesto fenólico con una estructura muy similar al hidroxitirosol, pero con un grupo hidroxilo adicional en posición bencílica (Figura 10).

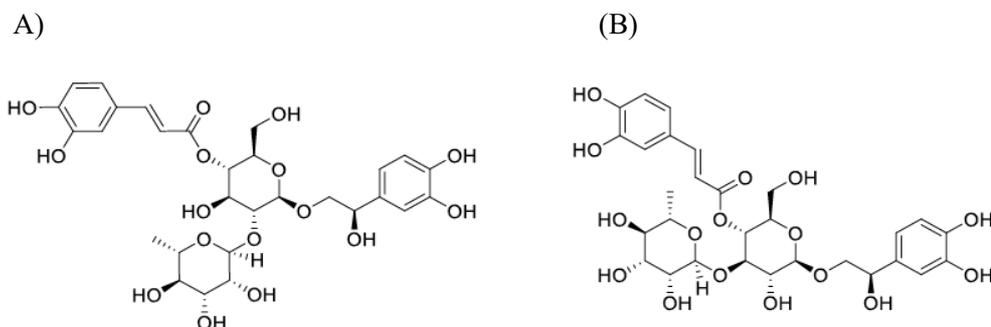


**4**

**Figura 10.** Estructura del DHPG

El DHPG es un componente natural de la aceituna (Rodríguez et al. 2009). Se ha detectado en pequeñas cantidades en el aceite de oliva (Lama-Muñoz et al. 2013) encontrándose en mayor

proporción en el alperujo (Rodríguez et al. 2009). En la aceituna se encuentra fundamentalmente en forma del glicósido  $\beta$ -hidroxiacteósido (Figura 11A). En extractos vegetales del género *Orobache* (Pieretti et al. 1992), muy utilizados por la medicina tradicional oriental (china, japonesa y coreana) debido a sus propiedades antiproliferativas, anti-inflamatorias y neuroprotectoras (Nishibe 2002) el DHPG se encuentra formando parte del orobanchósido (Figura 11B). Es por ello, que resulta de interés no sólo el desarrollo de métodos de aislamiento y purificación del DHPG, sino también de sus derivados.



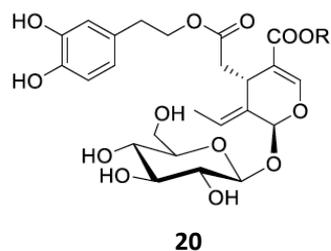
**Figura 11.** Estructura química del glicósido  $\beta$ -hidroxiacteósido (A) y del orobanchósido (B)

Actualmente, existe un único procedimiento de obtención de DHPG a partir de alperujo diluido en agua desarrollado por el grupo del Dr. Juan Fernández-Bolaños a escala de planta piloto. El método permite obtener 10 g de DHPG de alta pureza a partir de 250 kg de alperujo (Fernández-Bolaños Guzmán et al. 2008).

La actividad biológica del DHPG ha sido poco estudiada, aunque hay estudios que confirman que es un potente antioxidante, con una actividad incluso superior a la del hidroxitirosol, entre 2-3 veces superior a la del ácido ascórbico en agua y de actividad similar a la vitamina E en medios lipídicos (Rodríguez et al. 2007). Por este motivo, se pueden predecir ciertas capacidades terapéuticas similares a las del hidroxitirosol atribuido a su potencial para atrapar radicales libres y como agente protector frente al daño oxidativo. El análisis proteómico de sangre y tejidos de ratas demostró que el hidroxitirosol y el DHPG lograban disminuir la actividad de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial y hepática, además de aumentar la actividad de la superóxido dismutasa, todo ello a pesar de que la actividad antioxidante *in vivo* era moderada. Esto sugiere un mecanismo de interacción entre los compuestos fenólicos y las enzimas u otras moléculas que las activen, lo que puede representar un nuevo punto de vista en la forma de entender su actividad biológica más allá de su actividad antioxidante (Rodríguez-Gutiérrez et al. 2012).

### I.3.6. Oleuropeína. Origen, aislamiento y propiedades biológicas

La oleuropeína **20** (Figura 12) es un glucósido secoiridoide que esterifica una unidad de hidroxitirosol. Este compuesto es el responsable del sabor amargo de las aceitunas no procesadas (Shasha and Leibowitz 1961) y constituye el componente fenólico mayoritario de las hojas de olivo, el hueso, el mesocarpio (o pulpa) y la piel de la aceituna. El término secoiridoide hace referencia al fragmento monoterpénico que en la oleuropeína une el hidroxitirosol y la glucosa.



**Figura 12.** Estructura química de la oleuropeína

La oleuropeína se considera precursor de otras biomoléculas presentes en el aceite de oliva y el alperujo como la oleaceína, el aglicón de la oleuropeína y el hidroxitirosol. La acción de enzimas como  $\beta$ -glucosidasas, desmetilasas, descarboxilasas y lipasas presentes en el olivo son directamente las responsables del origen de estas biomoléculas durante la molturación y el batido del fruto.

La obtención de la oleuropeína se lleva cabo mediante la extracción con disolventes a partir de las hojas de olivo secas y trituradas (Romani et al. 2017).

Numerosos estudios demuestran que la oleuropeína es un potente antioxidante (Visioli et al. 1998; Visioli and Galli 1994; Coni et al. 2000) además de poseer propiedades antiinflamatorias (Giamarellos-Bourboulis et al. 2006). Se ha demostrado también que este compuesto está implicado en diferentes efectos beneficiosos relacionados con trastornos cardiovasculares, así como su implicación en procesos vasodilatadores, anti-agregación plaquetaria (Singh et al. 2008) o anti-isquémicos (Andreadou et al. 2006). De manera similar a lo comentado sobre la actividad biológica del hidroxitirosol, la oleuropeína ha demostrado tener efectos anti-proliferativos (Barbaro et al. 2014; Vanella et al. 2012) y pro-apoptóticos (Han et al. 2009) sobre diferentes líneas celulares de cáncer en ratas envejecidas, además de actuar frente a procesos de angiogénesis necesarios para el crecimiento de nuevos tumores (Scoditti et al. 2012). Por otra parte, existen estudios que implican a la oleuropeína en procesos que frenan enfermedades degenerativas. En este contexto, la administración intraperitoneal de oleuropeína, conduce a una disminución de la oxidación lipídica de las neuronas, así como a una mayor supervivencia de las mismas (Sarbishegi et al. 2014).

#### 1.4. LIPOFILIA Y FARMACOCINÉTICA DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Como ya se ha comentado, existen numerosos estudios epidemiológicos y científicos sobre las propiedades beneficiosas de los compuestos fenólicos en la salud. Sin embargo, existe una cierta disparidad entre los resultados encontrados *in vitro* o *ex vivo*, y los obtenidos *in vivo*. Esta discrepancia viene motivada por las evidencias que resaltan que los polifenoles presentan cierta pérdida de efectividad en su acción terapéutica dependiendo de la complejidad del organismo sometido a estudio. En general, para facilitar la secreción de cualquier molécula extraña, las células tienden a aumentar la polaridad del compuesto, consiguiendo con esto minimizar la absorción de las moléculas por parte de los tejidos y órganos de modo que la mayor parte del tiempo quedan disueltos en la sangre hasta ser eliminados por la orina.

La fase I de excreción de fármacos está basada en la ruptura de ésteres por mediación de esterasas, oxidación de cadenas alifáticas, alquenos y anillos aromáticos, procesos llevados a cabo por el citocromo P450, oxidación de heteroátomos como N y S en las que intervienen

monooxigenasas y la reducción de carbonilos y dobles enlaces C-C catalizada por reductasas (Patrick, 2018).

La fase II comprende las reacciones de conjugación (sulfonación, glucuronidación y acilación) de los metabolitos procedentes de la primera fase con sulfato, ácido glucurónico y aminoácidos, entre otros. Estas reacciones catalizadas por distintas transferasas convierten los metabolitos en moléculas mucho más polares y los inactivan por completo (Patrick, 2018).

La rápida eliminación de estas moléculas por la orina impide desplegar parte del potencial terapéutico de los fármacos. Como ejemplo, se ha determinado que la cantidad máxima de hidroxitirosol en sangre es alcanzada tan sólo tras 5-10 minutos después de su ingestión vía oral, a partir de ese momento sufre una rápida disminución (D'Angelo et al. 2001), mostrando una vida media plasmática o vida media de eliminación de 2.4 h (Miro-Casas et al. 2003).

Durante los últimos años se han realizado muchos esfuerzos en la búsqueda de nuevos compuestos fenólicos o en la modificación estructural de los previamente conocidos para incrementar su estabilidad. En este contexto, se ha comprobado que los compuestos fenólicos pueden sufrir modificaciones enzimáticas en su estructura, confiriéndoles una mayor estabilidad, así como propiedades mejoradas respecto a su capacidad antioxidante, manteniendo a su vez las propiedades del compuesto original y mejorando su biodisponibilidad. El aumento de lipofilia confiere finalmente una mayor resistencia a la degradación. En muchas ocasiones, este fenómeno puede ser asociado a un incremento de la biodisponibilidad, suponiendo una optimización de sus propiedades biológicas, hecho que ha sido comprobado recientemente con los éteres derivados del hidroxitirosol (Calderón-Montaña et al. 2013).

## 1.5. CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos representan las biomoléculas más abundantes en la naturaleza y la principal fuente de energía para los seres vivos. Entre sus funciones más relevantes se encuentra su papel en el almacenamiento de energía y ser componentes claves de la pared celular, del exoesqueleto de artrópodos y de diferentes órganos animales (Caffall and Mohnen 2009).

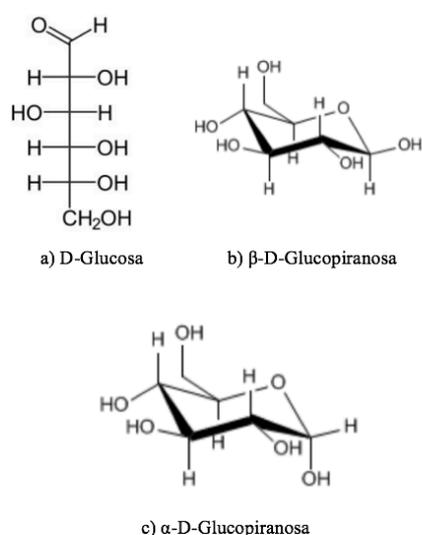
A parte de ser considerados una fuente de energía clave, en la dieta humana están estrechamente relacionados con el desarrollo y mantenimiento de la microbiota intestinal (Porter and Martens 2017), a la vez que participan en la prevención y tratamiento de diferentes enfermedades gastrointestinales (Mima et al. 2017; Wang et al. 2017). Otras aplicaciones en industrias diferentes a la alimentaria van desde las más tradicionales en empresas textiles y papeleras hasta las más novedosas relacionadas con la producción de biocombustibles (Favaro et al. 2017; Goldemberg 2008).

### 1.5.1. Estructura de carbohidratos

Los carbohidratos o hidratos de carbono ( $C_n(H_2O)_n$ ) son moléculas formadas por átomos de carbono y moléculas de agua. Normalmente aparecen en la naturaleza de forma libre o conjugados con proteínas y lípidos (glicoconjugados). En estos glicoconjugados, los carbohidratos son en la mayoría de los casos, responsables de la solubilidad, estabilidad y de las interacciones de la molécula (Ghazarian et al. 2011).

El monosacárido más común es la D-glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) y representa la principal fuente de energía para la mayoría de las células, además de ser un importante intermediario metabólico.

Químicamente puede presentar tres estructuras diferentes; una estructura lineal o abierta (acíclica) y dos estructuras cerradas (cíclica) que forman anillos de 5 o 6 átomos (furanosa y piranosa respectivamente). La forma predominante en la naturaleza es la forma piranosa. Cuando esta molécula se cicla, se crea un nuevo centro de asimetría respecto a la estructura lineal, dando lugar a dos estructuras diferentes, la  $\alpha$ -D-glucopiranososa y la  $\beta$ -D-glucopiranososa (Figura 13). Al C-1 se le denomina carbono anomérico y las formas  $\alpha$  y  $\beta$  son anómeros. Aunque las tres estructuras responden a la misma fórmula molecular, son estructuras químicas diferentes con distintas estabildades relativas. Una estructura prevalece sobre la otra dependiendo del medio en que se encuentren. Así la glucosa cristaliza preferentemente en la forma  $\alpha$ -D-glucopiranososa, siendo también la forma más estable en estado gaseoso, mientras que en disolución acuosa la forma predominante es la  $\beta$ -D-glucopiranososa (Embuscado, 2019).



**Figura 13.** a) Estructura lineal de la D-Glucosa. b) y c) Estructura cíclica de los anómeros de la D-glucosa

La trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil (1,1) - $\alpha$ -D-glucopiranosido) es un disacárido formado por dos moléculas de glucosa. Se trata de un disacárido no reductor y no hidrolizable fácilmente en medios ácidos (Jain and Roy 2009). Esta molécula presenta gran estabilidad debido a la combinación de su estructura molecular y sus propiedades fisicoquímicas (Elbein 1974). La trehalosa es una molécula ampliamente distribuida en la naturaleza y ha sido aislada de gran variedad de organismos como bacterias (Murphy et al. 2005), hongos (Noventa-Jordão et al. 1996), levaduras (De Virgilio et al. 1994) y organismos superiores como plantas (Blázquez et al. 1998). La trehalosa constituye también una de las fuentes de reserva de energía más importantes, además de estar implicada directamente en la protección de las membranas celulares frente a un determinado estrés abiótico (Crowe et al. 1992). Además, se ha comprobado que este disacárido es un componente esencial de los glucolípidos de corinebacterias y micobacterias (Elbein, 1974). La función protectora de esta molécula ha sido atribuida principalmente a sus propiedades en estado sólido y solución acuosa (Jain and Roy 2009). Estas características hacen de la trehalosa una molécula de gran interés en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica debido a su papel en la estabilización de proteínas y lípidos (Komes et al. 2005), además de ser utilizada como estabilizante de enzimas y tejidos (Ohtake and Wang 2011).

La sacarosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) - $\beta$ -D-fructofuranósido) es otro disacárido constituido por una D-glucosa unida mediante un enlace glucosídico a una  $\beta$ -D-fructosa. Este disacárido se encuentra abundantemente en plantas como la remolacha y la caña de azúcar, usada a gran escala para la producción de etanol (Goldemberg 2008). Esta molécula se usa ampliamente en alimentación humana como edulcorante, y en menor medida como sustrato para la síntesis de prebióticos. Se trata de un carbohidrato no reductor, muy soluble en agua y gran capacidad de cristalización. Se extrae industrialmente a partir de la caña de azúcar y de la remolacha (Queneau et al. 2007).

Es bien conocido que los carbohidratos son biomoléculas que intervienen en una amplísima variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Por ejemplo, están involucrados en procesos de señalización celular (Mesnage et al. 2014), infección (Craig-Barnes et al. 2010) o metástasis celular (Van Slambrouck et al. 2014) y poseen una importante capacidad terapéutica ya que actúan como glicomiméticos en enfermedades metabólicas (Compain 2018), como antivirales (Wang et al., 2013), anticancerígenos (Pastuch-Gawolek et al. 2016) o formando parte de vacunas (Jones 2015).

## 1.6. BIOCATALISIS VS SÍNTESIS QUÍMICA

Para obtener determinados compuestos químicos de alto valor añadido como fármacos, productos agroquímicos o cosméticos, es necesario en ciertas ocasiones llevar a cabo una serie de transformaciones altamente regio, quimio y/o estereoselectivas (Bastian et al. 2012). Para ello, es habitual recurrir a largas y tediosas rutas sintéticas basadas en la protección y desprotección selectiva de ciertos grupos funcionales (Wong and Zimmerman 2013), que suponen un gran número de etapas de síntesis y el elevado consumo de catalizadores (Denmark and Ambrosi 2015) y/o reactivos caros y tóxicos. En este contexto, la biocatálisis se convierte en una alternativa útil respecto de los métodos clásicos de síntesis química (Yoshida 2016; Bernini et al. 2008).

En los últimos años, la biocatálisis ha experimentado un intenso desarrollo centrado en la búsqueda de microorganismos (aislados de la naturaleza y modificados genéticamente) que produzcan enzimas de interés biotecnológico. En este contexto, el uso de lipasas/esterasas para obtener derivados lipófilos a partir de compuestos fenólicos puede conllevar un ahorro tanto en el número de etapas sintéticas como en lo económico, facilitando también el uso de reactivos “verdes”. Sin embargo, su uso no se encuentra tan extendido en el campo de los carbohidratos.

En general, las enzimas lipolíticas pueden ser utilizadas como biocatalizadores en transformaciones de interés biotecnológico, razón que ha permitido que sean ampliamente utilizadas en la industria con diferentes aplicaciones:

- En la industria alimentaria, las enzimas lipolíticas se emplean en la modificación de la composición de ácidos grasos en triglicéridos, consiguiendo por ejemplo un producto con las mismas características que la manteca del cacao a partir de aceite de palma, pero con la incorporación de ácidos omega-3 a los lípidos, con la consiguiente mejora en las propiedades saludables. También son utilizadas para la síntesis de ésteres responsables del aroma y el sabor de determinados alimentos (Adlercreutz 2013).
- En la producción de biosurfactantes como el ácido araquidónico de aplicación en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Singh et al. 2007).
- En la industria papelera, para la eliminación de las resinas de pulpa del papel (Sharma and Kanwar 2014).

- En la industria de detergentes, se usan como aditivos para eliminar manchas de grasa en combinación con proteasas y celulasas (Niyonzima and More 2015).
- Es conocido su interés medioambiental en la síntesis de biopolímeros (Nagarajan et al. 2012), producción de biodiesel (Adlercreutz 2013) y en el tratamiento de residuos y biorremediación (Sharma, 2012; Escobar-Niño et al. 2014).
- Construcción de biosensores, por ejemplo, para la determinación de ácidos grasos en alimentos (Schoemaker et al. 1997).
- Resolución de antibióticos como nitroimidazoles (Skupin et al. 1997).

### I.6.1. Acilaciones y enzimas implicadas

La acilación corresponde al proceso químico en el cual se lleva a cabo la adición de grupos acilo a un compuesto concreto con el fin de producir o generar compuestos más estables. Este proceso puede llevarse a cabo mediante biosíntesis química y/o la utilización de enzimas específicas. En comparación con los métodos químicos, el enfoque enzimático es más idóneo para estas modificaciones debido a la regiospecificidad de las enzimas y la posibilidad de finalizar el proceso a temperaturas y presiones moderadas. Entre las enzimas más utilizadas en este proceso se encuentran las acil transferasas, lipasas y estererasas (Chebil et al. 2007).

### I.7. EL GÉNERO *Bacillus*

El género *Bacillus* fue descrito por primera vez en el año 1872 por Ferdinand Cohn (Cohn, 1872). Este género pertenece a la familia *Bacillaceae* (orden *Bacillales*: División *Firmicutes*) (Harwood 1989a). Desde una perspectiva histórica, la taxonomía del género *Bacillus* fue determinada en una primera clasificación basándose en criterios morfológicos, de esporulación y movilidad (Cohn, 1876). En una segunda clasificación descrita en el Manual de Bergey (Winslow 1920) los integrantes de la familia *Bacillaceae* fueron definidos como organismos con morfología de bacilos, productores de endosporas, Gram positivos, con flagelos peritricos, la mayoría de ellos saprófitos, con capacidad para hidrolizar la gelatina, formadores de colonias rizoides y portadores de un sistema enzimático proteolítico.

Desde entonces, se han producido importantes cambios taxonómicos y como consecuencia, actualmente la familia alberga representantes del género *Bacillus* y otros géneros más recientes con una nomenclatura estrechamente relacionada, como por ejemplo *Paenibacillus*, *Geobacillus* y *Halobacillus* (Galperin 2013). Debido a la gran cantidad de nuevas cepas aisladas del medio ambiente, hoy en día se siguen describiendo constantemente nuevos géneros. En el año 2009, se incluyeron 31 géneros pertenecientes a la familia *Bacillaceae* en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Logan et al. 2009), 2 años después, Logan y Halket (Logan and Halket 2011) indicaron la existencia de 5 géneros más en esta familia.

Actualmente, el género *Bacillus*, con 377 especies y 8 subespecies (Caulier et al. 2019) es el género más amplio dentro de la familia *Bacillaceae*. Aún así, existe una continua incorporación de nuevas especies que se reclasifican en nuevos géneros.

El contenido en G+C del DNA del género *Bacillus* varía en un intervalo comprendido entre 32 mol%, correspondiente a la especie *B. cereus* y 69 mol% de *B. thermocatenulatus*. Además de las diferencias genotípicas, existen grandes diferencias fenotípicas (Claus and Berkeley 1986), haciendo de este género un grupo muy heterogéneo genética y fisiológicamente.

Hoy en día, la secuencia parcial del gen del ARNr 16S y los patrones de restricción de ARNr 16S (Joung and Côté 2002) son muy útiles para una rápida identificación o clasificación de especies de este género y géneros relacionados.

Otro carácter a tener en cuenta como criterio quimiotaxonómico para la identificación bacteriana es el patrón de ácidos grasos, ya que difícilmente se ve afectado por mutaciones (Bertone et al. 1996). En el género *Bacillus*, el perfil de lípidos celulares observado tiene un patrón en el que predominan ácidos grasos metil, ramificados en posición *iso* con alrededor de 12 a 17 átomos de carbonos. Los ácidos grasos bacterianos más comunes, mirístico y palmítico, son los menos observados en el género *Bacillus*, aunque la proporción de todos los ácidos grasos varía en función de las características genéticas, fisiológicas y las condiciones de cultivo, así como la fase de crecimiento en la que los microorganismos se encuentren (Kaneda 1977). Por otra parte, con la excepción de las especies *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. insolitus*, *B. psychrophilus* y *B. globisporus*, las especies de *Bacillus* producen una pequeña cantidad de ácidos grasos insaturados (Kaneda 1977).

### 1.7.1. Biología y ecología del género *Bacillus*

Los microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* son bacterias Gram-positivas que poseen una morfología alargada, ubicuas en la naturaleza y que pueden ser tanto aerobias estrictas como anaerobias facultativas. Son organismos tanto de vida libre como especies patógenas e incluso algunas de ellas forman parte de la microbiota intestinal humana (Ilinskaya et al. 2017). Como característica principal, este género posee la habilidad de producir endosporas con morfología oval o cilíndrica bajo condiciones ambientales de estrés (físicas o químicas) (Smith and Gordon, 1952). Estas estructuras poseen la capacidad de diseminarse en el aire y migrar grandes distancias, siendo ubicuas en muchos ambientes.

El género *Bacillus* se encuentra ampliamente distribuido. Suelen encontrarse en el suelo, agua dulce y salada, materia vegetal en descomposición, incluso en desiertos y la Antártida. Además, presentan una amplia diversidad de capacidades fisiológicas, existiendo especies psicrófilas y termófilas, aunque la mayoría son mesófilos. También se han encontrado especies acidófilas, alcalófilas e incluso halotolerantes (Villarreal-Delgado et al. 2018).

### 1.7.2. Importancia industrial del género *Bacillus*

*Bacillus* es uno de los géneros bacterianos con mayor actividad bioquímica referenciada en la literatura científica mediante el uso de los productos de su metabolismo para diferentes procesos industriales. La especie tipo del género es *B. subtilis* (Cohn, 1872). El desarrollo de la genética ha permitido la transformación de esta bacteria (Spizizen 1958), favoreciendo su papel como organismo modelo para muchos estudios de laboratorio en el campo de la biotecnología. Por todo ello, la secuenciación completa de su genoma se hizo esencial (Kunst et al. 1997). Es habitual que los microorganismos presenten unas condiciones de cultivo y producción enzimática específicas difíciles de reproducir, dificultando de esta manera la obtención del producto deseado. Este obstáculo, hace necesaria la búsqueda de microorganismos hospedadores que produzcan estas sustancias deseadas en condiciones y en cantidades adaptadas a la industria. *Escherichia coli*, como

organismo Gram-negativo y *B. subtilis*, como Gram-positivo, son los más utilizados como hospedadores para estos fines biotecnológicos. Mientras que *E. coli* presenta endotoxinas, que complican los procesos (Mamat et al. 2015; Rueda et al. 2014). *B. subtilis* salva este problema hasta el punto de ser considerado como un organismo GRAS (*Generally Recognized As Safe*), siendo muy generalizado su uso en la industria, concretamente en la industria alimentaria (Westbrook et al. 2018). Además, *B. subtilis* es muy útil en biotecnología debido a su capacidad para secretar y exportar directamente proteínas al medio (Zhang et al. 2017). Este hecho unido a que posee una gran diversidad metabólica, una baja incidencia de patogenicidad y a la capacidad de ciertas especies de tolerar amplios márgenes de temperatura y pH, han permitido su uso para una gran variedad de procesos industriales, convirtiendo a este grupo en una importante fuente de enzimas comerciales (Nawawi et al. 2017; Latorre et al. 2016).

Hoy en día las diferentes especies del género *Bacillus* son usadas principalmente para la producción de cuatro principales tipos de productos:

#### 1) Producción de enzimas

Al ser considerados organismos GRAS y debido a su capacidad para la producción de enzimas, a la efectividad de la función y la termoestabilidad que presentan, este género constituye una herramienta muy útil en ingeniería genética (Dong and Zhang 2014). La mayoría de las enzimas producidas por estos organismos son proteasas, las cuales se caracterizan porque se secretan durante las fases post-exponencial y estacionaria y se inducen por determinados compuestos. Su producción es dependiente tanto de componentes del medio como de condiciones físico-químicas (Contesini et al. 2018; Biswanath, 2018). Estas proteínas tienen una importante implicación industrial debido a su participación en diferentes procesos metabólicos celulares y a su capacidad para hidrolizar proteínas (Gupta et al. 2002; Warneck and Wisdom 1994)

Aunque se conocen un gran número de carboxiesterasas del género *Bacillus*, pocas han sido usadas para la síntesis de compuestos puros debido a su tioselectividad. Dentro de este contexto se ha caracterizado una carboxiesterasa de *B. subtilis* utilizada para la resolución de (R,S)-ibuprofeno metilester y (R,S)-naproxen metilester. También se ha determinado la hidrólisis selectiva de esteres etílicos y metílicos de los compuestos mencionados anteriormente por parte de una esterasa producida por *Bacillus thai* (Warneck and Wisdom, 1994).

Se ha determinado también la capacidad de ciertas enzimas producidas por el género *Bacillus* de desacetilar compuestos  $\beta$ -lactámicos. (Mitsushima et al. 1991; Knauseder et al. 1999).

En la tabla 2 se muestran algunos de los genes de interés industrial que son responsables de la producción de carbohidratos, lípidos y proteínas de degradación en el género *Bacillus*.

**Tabla 2.** Genes y enzimas del género *Bacillus* con interés industrial

Gen	Enzima
<i>abfA</i>	$\alpha$ -L-Arabinofuranosidasa
<i>abnA</i>	Arabinan-endo 1,5-L-arabinasa
<i>bglC</i>	Endo-1,4- $\beta$ -glucanasa
<i>bglH</i>	$\beta$ -Glucosidasa

Gen	Enzima
<i>bglS</i>	Endo-1,3- y -1,4- $\beta$ -glucanasa
<i>csn</i>	Chitosanasa
<i>lacA</i>	$\beta$ -Galactosidasa
<i>sacB</i>	Levana sacarasa
<i>sacC</i>	Levanasa
<i>pel</i>	Pectato liasa
<i>pelB</i>	Pectato liasa
<i>yhlE</i>	Glucanasa
<i>yjeA</i>	Endo-1,4- $\beta$ -xylanasa
<i>ykfC</i>	$\alpha$ -amilasa
<i>ykvQ</i>	Chitinasa
<i>ynjF</i>	Endo-xylanasa
<i>yrhO</i>	Cyclodextrina
<i>yvdF</i>	Glucano 1,4- $\alpha$ -maltohidrolasa
<i>yvfO</i>	Arabinogalactano endo-1,4- $\beta$ -galactosidasa
<i>ypaA</i>	Pectato liasa
<i>yxiA</i>	Arabinosidasa
<i>nprE</i>	Metaloproteasa extracelular neutra
<i>aprE</i>	Proteasa extracelular alcalina
<i>epr</i>	Proteasa extracelular
<i>pepT</i>	Peptidasa T
<i>vpr</i>	Proteasa extracelular
<i>yrrN</i>	Proteasa
<i>yrrO</i>	Proteasa
<i>lipA</i>	Lipasa
<i>lipB</i>	Lipasa

Fuente: Schallmey et al. (2004)

En la tabla 2 se muestran algunos de los genes de interés industrial que son responsables de la producción de carbohidratos, lípidos y proteínas de degradación en el género *Bacillus*.

## 2) Producción de antimicrobianos y vacunas

Los primeros análisis destinados a la obtención de vacunas se han centrado en el estudio de *B. subtilis*, más concretamente en el estudio de sus esporas debido a la presencia de antígenos heterólogos en su superficie (Isticato et al. 2001). Además, se ha demostrado que muchas especies del género *Bacillus* producen una amplia variedad de antimicrobianos, aunque aun no se ha determinado concretamente su efecto (Urdaci and Pinchuk, 2004; Caulier et al. 2019).

### 3) *Suplementos alimenticios*

Otra aplicación derivada del uso de esporas de *Bacillus* ha sido la utilización de éstas como probióticos. El uso de estos productos ha tomado recientemente mucha relevancia en la agricultura y la ganadería y como alternativa a los antibióticos. Numerosos productos que contienen esporas de las especies no patógenas de *Bacillus* son usados con diferentes usos clínicos (Zhu et al. 2016; Elshagabee et al. 2017; Xu et al. 2018).

### 4) *Productores de biosurfactantes*

Los biosurfactantes desarrollan un papel crucial en la industria farmacéutica, textil, cosmética y en procesos de recuperación de residuos (Banat et al. 2000). Algunas especies del género *Bacillus* como *B. subtilis*, y *B. pumilus* producen biosurfactantes con propiedades detergentes, emulsificantes, antiespumantes y dispersantes además de reducir la tensión superficial y la interfacial (Heryani and Putra 2017; Sarwar et al. 2018).

## OBJETIVOS

---

## II. OBJETIVOS

---

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido la identificación y el aislamiento de enzimas bacterianas para la modificación y mejora de compuestos bioactivos.

Los objetivos concretos de este trabajo han sido los siguientes:

1. Selección de microorganismos lipolíticos capaces de llevar a cabo biotransformaciones sobre diferentes sustratos abriendo nuevas perspectivas biotecnológicas.
2. Identificación, purificación y caracterización de las enzimas extracelulares de *Bacillus* sp. HR216 responsables de las actividades lipolíticas.
3. Caracterización molecular de los motivos funcionales de la enzima AE6L. Construcción de mutantes de AE6L con actividades catalíticas mejoradas.
4. Modificación enzimática regioselectiva de compuestos fenólicos y carbohidratos con la finalidad de obtener nuevos derivados fenólicos con bioactividades mejoradas.

## MATERIALES & MÉTODOS

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1. CEPAS BACTERIANAS

En la Tabla 3 se muestra las cepas bacterianas utilizadas durante este trabajo.

**Tabla 3.** Cepas bacterianas

Cepas bacterianas	Características	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , lacZ $\Delta$ M15, recA1, hsdR17, supE44 $\Delta$ (lacZYA argF) Nal <sup>R</sup>	Hanahan (1983, 1985)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> ompT hsdSB (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3)	Novagen
<i>Bacillus</i> sp. HR21-6		Sánchez et al., 2016

#### III.2. ENZIMAS COMERCIALES

Se utilizaron 3 enzimas comerciales en este estudio. TLL; lipasa producida por *Thermomyces lanuginosus* (Sigma-Aldrich). CALB; lipasa producida por *Candida antártica* (Sigma-Aldrich). BCL; lipasa producida por *Burkholderia cepacia* (Sigma-Aldrich).

#### III.3. PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 4

**Tabla 4.** Plásmidos utilizados

Plásmido	Hospedador	Características	Referencia
pMAB36	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	T7 promoters, aadA <sup>R</sup>	Biomedal
pMAB36-AE6L-6xHis	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Derivado de pMAB36- AE6L - 6xHis aadA <sup>R</sup> con un fragmento de 26 kDa conteniendo la ORF de la esterasa AE6L de <i>Bacillus</i> sp. HR21-6	Este trabajo

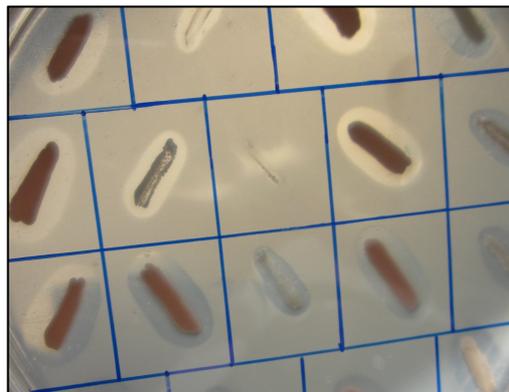
Plásmido	Hospedador	Características	Referencia
pMAB-AE6L <sup>S9A</sup>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Derivado de pMAB-AE6L-6xHis aadA <sup>R</sup> con un fragmento de 26 kb conteniendo la ORF de la esterasa AE6L con una mutación puntual en el aa Ser10	Este trabajo
pMAB-AE6L <sup>G45A</sup>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Derivado de pMAB-AE6L-6xHis aadA <sup>R</sup> con un fragmento de 26 kb conteniendo la ORF de la esterasa AE6L con una mutación puntual en el aa Gly45	Este trabajo
pMAB-AE6L <sup>N77A</sup>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Derivado de pMAB-AE6L-6xHis aadA <sup>R</sup> con un fragmento de 26 kDa conteniendo la ORF de la esterasa AE6L con una mutación puntual en el aa D77	Este trabajo
pMAB-AE6L <sup>D182A</sup>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Derivado de pMAB-AE6L-6xHis aadA <sup>R</sup> con un fragmento de 26 kDa conteniendo la ORF de la esterasa AE6L con una mutación puntual en el aa D182	Este trabajo
pMAB-AE6L <sup>H185A</sup>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Derivado de pMAB-AE6L-6xHis aadA <sup>R</sup> con un fragmento de 26 kDa conteniendo la ORF de la esterasa AE6L con una mutación puntual en el aa D182	Este trabajo
pMAB-AE6L <sup>S98A</sup>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Derivado de pMAB-AE6L-6xHis aadA <sup>R</sup> con un fragmento de 26 kDa conteniendo la ORF de la esterasa AE6L con una mutación puntual en el aa S96	Este trabajo
pMAB-AE6L <sup>E26Q</sup>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Derivado de pMAB-AE6L-6xHis aadA <sup>R</sup> con un fragmento de 26 kDa conteniendo la ORF de la esterasa AE6L con una mutación puntual en el aa E26	Este trabajo
pMAB-AE6L <sup>T184A</sup>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Derivado de pMAB-AE6L-6xHis aadA <sup>R</sup> con un fragmento de 26 kDa conteniendo la ORF de la esterasa AE6L con una mutación puntual en el aa T184	Este trabajo
pMAB-AE6L <sup>T11A</sup>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Derivado de pMAB-AE6L-6xHis aadA <sup>R</sup> con un fragmento de 26 kDa conteniendo la ORF de la esterasa AE6L con una mutación puntual en el aa T11	Este trabajo

### III.4. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

La preparación de los diferentes medios de cultivo se llevó a cabo ajustando el pH con NaOH 1 N (para un pH final de 7-7,5) o con HCl al 37% (para un pH final de 5,5-6) y se esterilizaron posteriormente en un autoclave durante 20 minutos a 120°C. Para la preparación de los medios de cultivo sólidos se añadió Bacto-Agar (Difco) a una concentración del 2 %.

#### III.4.1. Medios de cultivo para la selección de actividad lipolítica

Para el estudio de la actividad lipolítica se utilizaron cinco medios de cultivo adicionados con tributirina 0,5% (p/v). La tributirina es un triglicérido compuesto de ácido butírico y glicerol. Al tratarse de un triacilglicerol insoluble en agua fue necesaria su emulsión con el medio, utilizando un sonicador (Branson Sonifier 250). Los medios usados para el crecimiento de las células lipolíticas y detección de esta actividad fueron Luria Bertani (LB) (Difco), Potato Dextrose Broth (PDB) (Difco), 9KA y 9K Gamp. La solución 9K se preparó según describen Silverman & Lundgren (1959) (Silverman and Lundgren 1959) exceptuando la adición de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Las composiciones de los medios y soluciones utilizados se muestran en la Tabla 5 y 6 respectivamente. Las cepas con actividad lipolítica fueron detectadas directamente en placa con tributirina tras su incubación a 30°C durante 4-5 días, debido a la aparición de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia (Figura 14).



**Figura 14.** Prueba de hidrólisis de tributirina en placa

**Tabla 5.** Composición de los medios utilizados en el aislamiento de microorganismos lipolíticos

Medio	Componente	Cantidad del componente	pH final
9KA	Glucosa	10 g/L	5,5
	Extracto de levadura	10 g/L	
	Solución 9k		
9K Gamp	Glucosa	10 g/L	6
	Extracto de levadura	5 g/L	
	Extracto de malta	10 g/L	
	Ampicilina	20 µg/ml	
	Solución 9K		
PYB	Peptona	1% (p/v)	7,5
	Extracto de levadura	0,5% (p/v)	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1% (p/v)	
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,02% (p/v)	
LB	Extracto de levadura	0,5	7,5
	NaCl	0,5	
	*Glucosa	2	
	Triptona	1	

\*(p/v): peso/volumen

\*Las sales se preparan por separado a 10X y se añaden tras autoclavar.

**Tabla 6.** Composición de la Solución 9K

Solución	Componente	Cantidad del componente	pH final
Solución 9K	KCl	0,1 g/L	5,5
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g/L	
	Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,01 g/L	
	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L	

#### III.4.2. Medios de cultivo utilizados para la optimización del crecimiento bacteriano y la producción de lipasas

Para la optimización de la producción de lipasas bacterianas, las cepas lipolíticas fueron crecidas en dos medios diferentes: PYB y LB y en estos mismos medios adicionados con tributirina 2% (PYBT y LBT). Las cepas fueron cultivadas en matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de medio. El crecimiento se controló midiendo la absorbancia a 600 nm (DO<sub>600</sub>) en un espectrofotómetro Beckman DU640. Finalmente, la actividad de la lipasa se ensayó a 37°C empleando *p*-NP palmitato.

#### III.4.3. Medios de cultivo para el crecimiento de las cepas de *E. coli*

Para el crecimiento y mantenimiento de los clones de *E. coli* DH5α y *E. coli* BL21 (DE3) con los genes que codifican las enzimas lipolíticas se utilizó el medio TB (*Terrific Broth*) (Tabla 7). El medio sólido se preparó añadiendo agar a una concentración final del 2% (p/v). Para el crecimiento y selección de células transformantes resistentes a kanamicina y estreptomycin, se incluyeron estos antibióticos en forma de sal sódica (50 y 25 µg/ml respectivamente).

**Tabla 7.** Composición del medio TB

Componentes	g/l
Extracto de levadura	24
Peptona de caseína (triptona)	12
Glicerol	4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,31
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,54

### III.5. COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS

Los compuestos antimicrobianos (Sigma) utilizados durante este trabajo se incluyeron a los medios de cultivo cuando fue necesario. En la Tabla 8 se muestran los disolventes, la concentración de las soluciones de almacenaje y las concentraciones a las que habitualmente se utilizaron en *E. coli*. Para su esterilización se procedió a la filtración de los mismos. Todas las soluciones se conservaron a -20°C.

**Tabla 8.** Soluciones de compuestos antimicrobianos

Antimicrobiano	Disolvente	Concentración de almacenaje (mg/ml)	Concentración final para <i>E coli</i> (µg/ml)
Estreptomicina (Sm)	Agua destilada estéril	100	20
Kanamicina (Km)	Agua destilada estéril	100	50

### III.6. MANTENIMIENTO DE BACTERIAS

Para el mantenimiento de las cepas bacterianas se realizaron resiembras periódicas en placas de agar LB. Los medios inoculados se incubaron a 37°C durante 24 horas y, una vez crecidos se guardaron a 4°C.

Para su conservación, las bacterias se crecieron en el medio LB y tras centrifugar el cultivo (8000 rpm, 5 minutos), el precipitado fue resuspendido en medio LB con glicerol al 40% (v/v). Alícuotas de 200 µl fueron conservadas a -80°C (Green et al. 2012).

### III.7. TOMA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUELO

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se aislaron en diferentes localidades de las provincias de Badajoz y Huelva (España) en el año 2010. Las muestras HR11 y HR12 consistían en grasas semisólidas procedente de una fábrica de curado de productos cárnicos (38.151216°N, -6.684258°E). En concreto, la muestra HR11 se obtuvo de la grasa que gotea en el suelo de las instalaciones de la fábrica. La muestra HR21 proviene de una fábrica de conservas de pescado (37.20994°N, -7.26167°E), y consistía en el serrín de pescado resultante después de trocearlo (aserrín) antes del enlatado. Todas las muestras se recogieron en tubos de plástico estériles de 50 ml y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Para el procesamiento de las muestras, 7,28 g de aserrín de pescado y 5 ml de las muestras de grasa semisólida fueron suspendidos en 25 y 20 ml de solución salina estéril (NaCl al 0,85% p/v), respectivamente.

### III.8. TAMPONES Y SOLUCIONES

Los tampones se prepararon con la solución del ácido correspondiente a la molaridad deseada, ajustando el pH con el volumen necesario de una solución de NaOH 1N o de HCl al 37%. La composición de los tampones utilizados en este trabajo se detalla en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Composición de tampones

Tampón	Composición
TAE 1X	Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,0
Tris-EDTA 1X	Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 7,3
Electroforesis PAGE	3,02 g Tris-base, 14,4 g glicina, pH 8,8
Transferencia	Tris-glicina-metanol-agua (10:20:70), SDS 0,1% (p/v)
PBS	NaCl 140 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O 10 mM, KCl 2,7 mM. pH 7,4
Fosfato potásico 1M (TPK)	83,42 g K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 67,41 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7
TE	Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0

### III.9. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y MANIPULACIÓN DE ADN

#### III.9.1. Extracción y purificación de ADN

##### III.9.1.1. Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico se siguió el método de lisis alcalina:

1. Se centrifugó 1 ml de cultivo líquido de *E. coli* crecido durante 24 h en LB y su correspondiente antibiótico (1,5 minutos a 7500 rpm).
2. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en el medio restante.
3. Se añadieron 150 µl de Solución I y se resuspendió mediante vortex 5 segundos.
4. Se añadieron 200 µl de solución II y se mezcló 2-3 veces por inversión.
5. Se dejó 2 min a temperatura ambiente.
6. Se añadieron 150 µl de solución III y 10 µl de ClCH<sub>3</sub>.
7. Se mezcló por inversión 2-3 veces y se centrifugó 10 minutos a máxima velocidad.
8. Se recogió sobrenadante y se añadieron 350 µl de 2-propanol.
9. Se mezcló por inversión y se centrifugó 5 minutos a máxima velocidad.
10. Se recogió el precipitado y se lavó con 500 µl de etanol 70%, mezclando cuidadosamente para no arrastrar el precipitado.
11. Se aspiró el sobrenadante con vacío.
12. Se resuspendió el precipitado en 50 µl de TE.

**Solución I:** Glucosa 50 mM-Tris 25 mM pH 8-EDTA 10 mM

**Solución II:** 0,2 mM NaOH- 1% (p/V) SDS

**Solución III:** Acetato de potasio (AcOK) 3 M pH 5

### III.9.1.2. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN bacteriano se llevó a cabo siguiendo un protocolo estándar (Green et al. 2012) que se indica a continuación:

1. Se diluyó un preinóculo de la cepa bacteriana crecida durante toda la noche en medio LB + antibiótico y se incubó hasta fase exponencial.
2. Se centrifugaron 5 ml del cultivo durante 7 minutos a 4000 rpm en un tubo eppendorf de 10 ml.
3. Se eliminó el sobrenadante. El pellet restante fue resuspendido en 400  $\mu$ l de tampón de lisis y se pasó a un eppendorf de 2 ml.
4. Se añadieron 4  $\mu$ l de ARNasa 10 mg/ml y se incubó durante 30 minutos a 37°C.
5. Se añadieron 20  $\mu$ l de proteinasa K y se incubó durante 2 horas a 65°C.
6. Se añadió 1 volumen ( $\approx$ 500  $\mu$ l) de fenol: [cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)] (2:1)], se mezcló por inversión y se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm. Se recogió la fase superior, donde se encuentra el ADN, y se pasó a un nuevo tubo eppendorf. Este paso se repitió hasta hacer desaparecer la fase intermedia.
7. Se añadió 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión. Se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm y se recogió la fase superior. Posteriormente se pasó a un nuevo tubo eppendorf. En este paso fueron eliminados todos los restos de fenol.
8. Se añadió 1/10 volumen de acetato sódico 3M y 2,5 volúmenes de etanol de 96% y se dejó precipitar a -20°C (preferiblemente toda la noche).
9. Se centrifugó a 13000 rpm y 4°C, durante 30 minutos.
10. Se eliminó el sobrenadante, se añadió 1 ml de etanol 70% y se centrifugó 2 minutos a 13000 rpm. Este paso fue repetido dos veces.
11. El precipitado se resuspendió en 30  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O MilliQ o TE 1X.

### III.9.1.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se usaron geles horizontales de agarosa con una concentración variable entre 0,8 y 1% (p/v) preparados y sumergidos en tampón TAE 1X. La visualización del ADN se realizó mediante la tinción con bromuro de etidio, tal y como se describe en el manual de Sambrook and Russell (2001). Los pesos moleculares de los fragmentos de ADN se calcularon mediante comparación con marcadores de pesos moleculares comerciales. El voltaje aplicado fue de 35-100 V.

**Tampón TAE 50x:** Ácido acético glacial, 57,1 ml; EDTA 50 mM pH 8, 100 ml; Tris base, 242 g; agua destilada, csp 1000 ml.

**Tampón de carga:** Azul de bromofenol 0,25% (p/v); sacarosa 40 % p/v; xilén-cianol 0,25% (p/v). Este tampón se conserva a 4°C.

### III.9.1.4. Cuantificación y estimación de la pureza de ácidos nucleicos

La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó espectrofotométricamente a partir de las medidas de absorbancia a 260 y 280 nm. En el caso del ADN de doble hebra se considera que una  $DO_{260} = 1$  corresponde a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$ . Para ARN y ADN plasmídico se considera que una  $DO_{260} = 1$  corresponde a una concentración de 40  $\mu\text{g/ml}$  (Sambrook and Russell 2001). Para calcular la pureza de los ácidos nucleicos se estimó que el cociente  $A_{260/280}$  es indicativo de la calidad de la molécula. Un valor inferior a 1,8 indicaría contaminación por proteínas, mientras que valores superiores a 2 indicarían una posible contaminación con restos de fenol.

### III.9.1.5. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Tras la electroforesis del ADN en geles de agarosa, se recuperaron y purificaron los fragmentos de ADN a partir del gel para utilizarse en aplicaciones posteriores. Para ello se recortaron las bandas deseadas, acotadas en la menor proporción de agarosa posible, con la ayuda de una cuchilla y bajo iluminación con luz UV de baja energía. La purificación se realizó utilizando el kit FavorPrep (*Favorgen Biotech Corp*) o el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (*GE Healthcare*), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

## III.9.2. Manipulación del ADN

### III.9.2.1. Restricción de ADN plasmídico con endonucleasas

Las restricciones de ADN plasmídico se llevaron a cabo a la temperatura recomendada por el fabricante para cada enzima durante 2 horas. El volumen final de las reacciones para cada una de las restricciones fue de 20  $\mu\text{l}$  conteniendo:

**ADN:** 1-20  $\mu\text{g}$ .  
**Tampón de digestión (10X):** 1X del volumen final.  
**Endonucleasa de restricción:** 1 U/ $\mu\text{g}$ .  
**Agua destilada estéril:** Completar hasta el volumen final.

Todas las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo provienen de la casa comercial Takara. Para cada enzima se eligió el tampón óptimo según las indicaciones del fabricante.

### III.9.2.2. Ligación de fragmentos de ADN

La ligación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Promega). La relación molar de vector/inserto varió dependiendo de la naturaleza de los fragmentos a unir.

El volumen final para cada reacción se fijó en 20  $\mu\text{l}$  y se llevaron a cabo en tubos estériles de 0,2 ml conteniendo las cantidades oportunas de vector e inserto, de tampón de la ligasa a una concentración final 1X y de la enzima T4 ADN ligasa, 1  $\mu\text{l}$  (5 U), completando con agua destilada estéril según el volumen final de reacción.

La mezcla de reacción fue incubada a distintas temperaturas dependiendo del tipo de fragmentos:

- En el caso de extremos cohesivos, la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 12 horas o 4°C durante toda la noche.

- Si los extremos eran romos, se incubó a 16°C durante 4-18 horas y en este caso añadíamos doble cantidad de T4 ADN ligasa.

### III.9.2.3. Eliminación de las endonucleasas de restricción

La eliminación de los restos de tampones y enzimas después de cada reacción se llevó a cabo mediante un método de extracción donde se usaron las soluciones de fenol:cloroformo (1:1) y cloroformo (Sambrook and Russell 2001). En aquellos casos en los que fue necesaria una mayor purificación se utilizó el kit GFX PCR DNA and *Gel Purification* (GE Healthcare), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### III.9.2.4. Transformación de células competentes de *E. coli* mediante choque térmico

#### Protocolo de transformación

1. Se inoculó una colonia de *E. coli* en 25 ml de medio LB y se incubó a 37°C toda la noche en un matraz de 250 ml.
2. Se diluyeron las células 40 veces en 1 L de medio LB fresco.
3. Se incubó a 37°C hasta que la  $DO_{600nm}$  alcanzó el valor de 0,4-0,5.
4. Se enfrió el cultivo en hielo durante 30 minutos.
5. Se centrifugó en tubos de 50 ml a 4000 rpm y 4°C durante 5 minutos.
6. Se eliminó el sobrenadante y se colocaron las células en hielo.
7. Se resuspendieron las células de cada tubo de 50 ml en 25 ml de solución A.
8. Se incubaron en hielo 30-60 minutos, con agitación manual ocasional.
9. Se centrifugaron las células durante 10 minutos a 4°C y 4000 rpm.
10. Se eliminó el sobrenadante y se mantuvieron las células en hielo.
11. Se resuspendieron las células con un volumen total de 6,7 ml de solución B para los 8 tubos de 50 ml (6,7 ml solución B/400 ml de cultivo original).
12. Se separaron alícuotas de 0,5 ml de suspensión de células en tubos estériles de 2 ml.
13. Se congelaron los tubos con nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C.

**Solución A:** 0,1 M CaCl<sub>2</sub>

**Solución B:** 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-15% glicerol

Todas las soluciones se prepararon en H<sub>2</sub>O MilliQ

El método rutinario de transformación que se ha utilizado durante el desarrollo de esta Tesis doctoral ha sido el choque térmico descrito por (Hanahan 1983) en células competentes de *E. coli*, en concreto las cepas DH5α y que se resume a continuación:

1. Un vial de 50 µl de células competentes congeladas a -80°C, se descongelaron lentamente en hielo.
2. Se añadió el ADN a transformar, entre 3-5 µl, manteniendo en hielo durante 30 minutos.

3. A continuación, se procedió al “choque térmico” transfiriendo el vial a un baño de 42°C durante 45 segundos, retornándolo seguidamente 2 minutos en hielo.
4. Tras el choque térmico y enfriamiento, se añadió 1 ml de medio Luria-Bertani (LB) para recuperar las células y se incubaron durante 1 hora a 37°C en agitación.
5. Transcurrido este tiempo se inocularon distintas alícuotas (entre 100 y 300 µl) en placas de LB adicionadas del correspondiente antibiótico.
6. Las placas se incubaron a 37°C durante 12-16 horas.

### III.10. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Los cebadores utilizados fueron diseñados en función del fragmento a amplificar. En los casos en los que se pretendía introducir un punto de corte para una determinada enzima de restricción, se modificaron las bases necesarias en el cebador para formar la secuencia de reconocimiento de la enzima. Los cebadores utilizados en este trabajo para la realización de PCRs convencionales se recogen en la Tabla 10.

Las amplificaciones de los fragmentos de ADN se llevaron a cabo mediante el método de PCR siguiendo las indicaciones descritas en el manual de (Sambrook and Russell 2001). El volumen total de las reacciones fue de 50 µl y se llevaron a cabo en un termociclador utilizando tubos Eppendorf de 0,2 ml.

La enzima utilizada para amplificar los fragmentos de ADN fue *Taq* ADN polimerasa (5-PRIME). En aquellos casos en los que fue necesario disminuir los posibles errores en la amplificación, se empleó *Pfu* ADN polimerasa (Stratagene) que proporciona una alta fiabilidad de copia en la reacción de polimerización. La reacción terminó con un ciclo de extensión a 72°C durante 10 minutos con el fin de permitir la elongación de los productos de reacción. La reacción, una vez finalizada, se mantenía a 4°C si no se iba a utilizar en el momento.

En la Tabla 10 se recogen los componentes de la mezcla de reacción para PCR y las concentraciones finales a las que se utilizaron generalmente.

Las amplificaciones de los fragmentos de ADN se llevaron a cabo mediante el método de PCR siguiendo las indicaciones descritas en el manual de Sambrook and Russell (2001). El volumen total de las reacciones fue de 50 µl y se llevaron a cabo en un termociclador utilizando tubos Eppendorf de 0,2 ml.

La enzima utilizada para amplificar los fragmentos de ADN fue *Taq* ADN polimerasa (5-PRIME). En aquellos casos en los que fue necesario disminuir los posibles errores en la amplificación, se empleó *Pfu* ADN polimerasa (Stratagene) que proporciona una alta fiabilidad de copia en la reacción de polimerización. La reacción terminó con un ciclo de extensión a 72°C durante 10 minutos con el fin de permitir la elongación de los productos de reacción. La reacción, una vez finalizada, se mantenía a 4°C si no se iba a utilizar en el momento.

**Tabla 10.** Cebadores diseñados para la amplificación y secuenciación del ADN

Cebador	5'-secuencia-3'	Nº de bases	tm (°C)	% GC	Uso
Acetylerase-F	GCGGGATCCGTGATTCAACCGTTTCATCTTACC	33	64,6	51,5	Amplificación del ORF (incluido codón de inicio) de la esterasa AE6La partir del ADN genómico de <i>Bacillus</i> sp. HR21-6. Genera sitio de restricción <i>NcoI XhoI</i>
Acetylerase-R	GCGAAGCTTAGAACAGGACGAGCACTTTC	29	62,5	51,7	
16F27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20	51	47	Amplificación del ARNr 16S bacteriano, a partir de ADN genómico
16R1488	CGGTTACCTTGTTAGGACTTCACC	24	58	50	

En la Tabla 11 se recogen los componentes de la mezcla de reacción para PCR y las concentraciones finales a las que se utilizaron generalmente.

**Tabla 11.** Componentes de la mezcla de reacción de PCR

Componente de la mezcla*	Cantidad*
Tampón 10x con Mg <sup>+2</sup>	5,0 µl
dNTPs (2,5 mM cada dNTPs)	4,0 µl
Cebador 1 (12 µM)	2,5 µl
Cebador 2 (12 µM)	2,5 µl
Taq ADN polimerasa	1,25 U
ADN (1 mg/µl)	1,0 µl
H <sub>2</sub> O MilliQ estéril	hasta 50 µl

\*En cada caso hay que tener en cuenta las indicaciones del fabricante de la enzima

### III.11. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE ADN

#### III.11.1. Secuenciación de fragmentos amplificados de ADN

La secuenciación de los diferentes fragmentos amplificados se realizó mediante el método de Sanger por la empresa Stab Vida (Oeiras, Portugal). Los oligonucleótidos empleados para la secuenciación se indican en la Tabla 10.

Los cromatogramas de las secuencias de ADN se visualizaron con el programa Chromas Pro-versión 1.5. Para el análisis de las secuencias de ADN se procedió a la comparación de éstas con las secuencias disponibles en las bases de datos (EMBL, GenBank, DDBJ y RDB) con la ayuda del programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al. 1997), alojado en el servidor del NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*).

#### III.11.2. Análisis de la secuencia del ARNr 16S y construcción de árboles filogenéticos

El ADN bacteriano fue aislado siguiendo el protocolo estándar que se explica en el apartado III.9.1.2. El ADN total purificado previamente se utilizó como molde para la amplificación del ARNr 16S mediante PCR, usando los cebadores universales 16SF27 y 16SR1488 (Tabla 10) (Lane 1991). Para la construcción del árbol filogenético se llevó a cabo la secuenciación un fragmento de 650 pbs del ARNr 16S amplificado, correspondiente a las posiciones de la base 39 a la 689 del ARNr 16S de *E. coli*. Esa secuencia parcial se alineó con las secuencias del gen ARNr 16S más similares en la base de datos GenBank, usando el algoritmo de búsqueda BLASTN y con el software disponible en el *Ribosomal Database Project* (RDB). Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias utilizando las secuencias más similares encontradas en GenBank usando el software Clustal W (Thompson and Stout 1997).

Finalmente, los árboles filogenéticos fueron construidos usando el software MEGA5 (Tamura et al. 2007) con el algoritmo *Neighbor-Joining* (Saitou and Nei 1987) y 500 iteraciones (*bootstrap*) para asegurarnos de la fiabilidad de cada rama del árbol. Las distancias evolutivas se calcularon usando el método de *Maximum Composite Likelihood* (Tamura et al. 2004) y se muestran como número de sustituciones de bases por sitio. Para algunos organismos seleccionados, se secuenció el ARNr 16S completo y al igual que con la secuencia parcial, se comparó con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank.

#### III.11.3. Secuenciación del genoma de *Bacillus* sp. HR21-6

La secuenciación del genoma de *Bacillus* sp. HR21-6 se realizó en la Unidad de Genómica Funcional del Servicio General de Biología, Centros de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) utilizando un secuenciador de última generación con tecnología de pirosecuenciación (Genome Sequencer FLX System 454, Roche).

Para llevar a cabo el ensamblaje de los fragmentos obtenidos, primero se filtraron las secuencias eliminando las de baja calidad y las correspondientes a los oligonucleótidos utilizados en la construcción de la librería genética. Posteriormente, los fragmentos resultantes fueron ensamblados en un servidor local y optimizados según los extremos emparejados y las relaciones

de solapamiento, mapeando las lecturas para formar *contigs* y *supercontigs* utilizando para ello el programa ROCHE (GS de novo Assembler 2.9). La anotación se realizó automáticamente utilizando el servidor RAST (Aziz et al. 2008). Tanto el ensamblaje como la anotación automática fue realizada por el Dr. Gabriel Gutiérrez Pozo (Departamento de Genética, Universidad de Sevilla).

### III.12. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ARN

#### III.12.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN de las células bacterianas se llevó a cabo mediante el método de extracción con trizol, indicado a continuación:

1. Homogenizado:
  - 1.1. Las células bacterianas se resuspendieron en 100  $\mu$ l de lisozima (3 mg/ml en tampón Tris-EDTA-Glucosa) y se mantuvieron a temperatura ambiente 15-30 min.
  - 1.2. La muestra se congeló y descongeló, y se añadió 1 ml de trizol, seguidamente se pipeteó varias veces para homogeneizarla.
2. Separación en dos fases:
  - 2.1. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de proteínas.
  - 2.2. Se centrifugó a 4°C durante 10 min a 13000 rpm y se recogió el sobrenadante en un tubo eppendorf limpio. Así se eliminó el ADN genómico.
  - 2.3. Se añadió el mismo volumen de una mezcla fenol:cloroformo (1:1) y se mezcló bien. Posteriormente se centrifugó 5 min a 4°C y 13000 rpm.
  - 2.4. Se recogió la fase superior y se pasó a un tubo eppendorf limpio.
  - 2.5. Se repitieron los dos pasos anteriores hasta que desapareció la interfase.
  - 2.6. Se añadió el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló con vortex.
  - 2.7. Se centrifugó a 4°C, 5 min y 13000 rpm.
3. Precipitación del ARN:
  - 3.1. Se recogió la fase superior y se añadió 2,5 volúmenes de etanol 100% y 1/10 de acetato sódico 3 M pH 5,2.
  - 3.2. Se dejó precipitar a -20°C durante 30 min.
  - 3.3. Se centrifugó durante 30 min a 13000 rpm y 4°C.
  - 3.4. Se lavó el pellet de ARN con 400  $\mu$ l de etanol al 70% invirtiendo manualmente y centrifugando 5 min a 4°C y 13000 rpm.
  - 3.5. Se eliminó el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente.
  - 3.6. Se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua destilada estéril.

#### III.12.2. Análisis del ARN

La pureza del ARN extraído fue comprobada mediante dos procesos: electroforesis en gel de agarosa y en base a los valores de las medidas de absorbancia a 230 y 280 nm y a 260 y 280 nm. Se considera que para ARN la  $Abs_{260nm} = 1,0$  equivale a 40  $\mu$ g/ml.

### III.12.3. Análisis del ARN por RT-qPCR

Los niveles de expresión de los genes se cuantificaron mediante RT-qPCR. Las posibles interferencias con ADN contaminante en las muestras de ARN obtenidas fueron tratadas con ADNasa libre de ARNasas (Promega) según las indicaciones del fabricante. Posteriormente, las muestras obtenidas se ajustaron a 12,5 ng/μl. La reacción de RT-qPCR se llevó a cabo utilizando el kit *One Step SYBR PrimeScript RT-PCR* (Takara Bio Inc.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El equipo utilizado fue el LightCycler 480 y el protocolo el que se indica a continuación:

Un ciclo de retrotranscripción (RT):

1. 5 minutos a 42°C y una rampa de temperatura de 4,8°C/seg.
2. 10 segundos a 95°C y una rampa de temperatura de 4,8°C/seg.

40 ciclos de PCR:

1. 5 segundos a 95°C y una rampa de temperatura de 4,8°C/seg.
2. 20 segundos a 60°C y una rampa de temperatura de 2,5°C/seg.

1 ciclo de disociación:

3. 1 segundo a 95°C y una rampa de temperatura de 4,8°C/seg.
4. Bajada de temperatura hasta 65°C con una rampa de temperatura de 0,11°C/seg.
5. 1 segundo a 95°C y una rampa de temperatura de 4,8°C/seg.

Los cebadores utilizados en la RT-qPCR se indican en la Tabla 12. El diseño de los mismos se llevó a cabo utilizando el programa *Primer Express*, seleccionando una zona de los genes que no correspondiera con un dominio conservado en los mismos con el fin de que no se generasen falsos positivos.

**Tabla 12.** Cebadores utilizados en la RT-qPCR

Cebador	5'-secuencia-3'	Nº de bases
<i>gyrA122F</i>	AATCGAAAAAGGCGAATGGA	20
<i>gyrA122R</i>	TCCGTTTGGAAATCCCTTGTT	21
<i>rpoB122F</i>	AGAATATCTTGGAGCCGCATGA	22
<i>rpoB122R</i>	TAGTGTACGTTTCGCCTTCTGGAT	23
RT-RGAE-F	GTATCGATTTGCTCGGTTTCG	21
RT-RGAE-R	TCCCAGATGCTCGACAACAG	20

### III.13. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

Se llevaron a cabo dos protocolos distintos de preparación de extractos. Uno para la cepa aislada en esta tesis, *Bacillus* sp. HR21-6 y otro para cepas de *E. coli* utilizadas para la expresión de proteínas.

Para la localización de la actividad lipolítica de *Bacillus* sp. HR21-6, el sobrenadante fue obtenido a partir de 25 ml, 100 ml o 2 L según la finalidad del experimento e incubando durante 4, 7, 16, 20, 24, 48 ó 72 horas. Los cultivos de 25 y 100 ml se centrifugaron a 4500 rpm a 4°C durante 10 minutos en una centrífuga Beckman Coulter modelo Allegra X-22R. Para los cultivos de 2 L se utilizó una centrífuga preparatoria Beckman modelo J2-21M y se centrifugaron durante 1 h a 4000 rpm y 4°C, obteniendo con esto la fracción extracelular del cultivo.

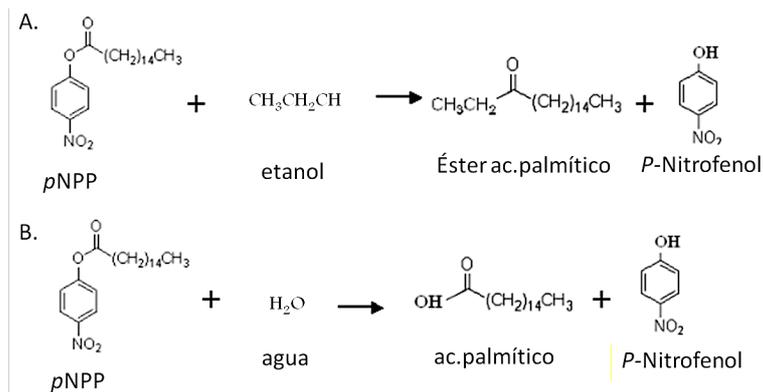
La fracción citoplasmática se extrajo a través de la rotura de las células bacterianas mediante ultrasonidos. Para este fin, las células obtenidas en la fracción extracelular se resuspendieron en un volumen de tampón fosfato potásico 0,05 M pH 7,6, igual al volumen de cultivo del que provenían y se sometieron a un proceso de sonicación en un sonicador Branson Sonifier 250. El programa utilizado fue 6 pulsos de 10 segundos de sonicación, utilizando una intensidad 4, y 50 segundos de reposo en hielo. Después de este proceso, se centrifugó 10 minutos a 4°C y 4000 rpm para eliminar la fracción insoluble, seleccionando el sobrenadante que constituye la fracción intracelular.

Los sobrenadantes se concentraron en bolsas de diálisis (12 kDa, Sigma) toda la noche a 4°C cubiertas con polietilenglicol (8 kDa). Cuando la bolsa estuvo totalmente seca, se retiraron los restos de polietilenglicol con agua destilada y se dializaron con tampón fosfato potásico 0,05 M pH 7,6, a 4°C y agitación magnética. Una vez dializadas, las muestras se congelaron a -80°C y se liofilizaron para ser utilizados en las reacciones sintéticas como cócteles enzimáticos.

La fracción intracelular (FI) en las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) expresando las enzimas lipolíticas de *Bacillus* sp. HR216, se obtuvo a través de un lisado de las células bacterianas utilizando un homogeneizador PANDA (Gea Niro Soavi) a unos 800 bares, recogiendo un volumen que varía según el ensayo (47-50 ml). Para ello, las células obtenidas previamente tras recoger la fracción extracelular, se resuspendieron en un volumen de 20 ml de PBS (20 mM fosfato potásico, pH 8.0, 150 mM NaCl) y se lisaron en un homogeneizador. La fracción intracelular soluble se obtuvo centrifugando 10 ml del lisado celular a 10000 x g, 15 min y 4°C, recogiendo el sobrenadante (intracelular soluble) y el precipitado celular (intracelular insoluble).

### III.14. ENSAYOS DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

La actividad lipolítica de las cepas seleccionadas fue comprobada mediante un ensayo colorimétrico con algunas modificaciones (Teng and Xu 2007). Este método está basado en la liberación de *p*-NP (*4-NitroPhenol*) durante la reacción de transesterificación o hidrólisis del *p*-NPP (*4-Nitrophenol Palmitato*) (Figura 15). Esta coloración amarilla es cuantificable espectrofotométricamente en un rango de 348 a 420 nm (Stuer et al. 1986; Wilhelm et al. 1999).



**Figura 15.** Esquema de la reacción de transesterificación del *p*-NPP con etanol en condiciones no acuosas (a). Esquema de la reacción de hidrólisis del *p*-NPP en condiciones acuosas (b).

### III.14.1. Detección de la actividad transesterificadora

El ensayo de actividad transesterificadora se llevó a cabo liofilizando 0,5-1,8 ml procedentes del sobrenadante o de la fracción intracelular del cultivo seleccionado. El liofilizado resultante, se mezcló con 1 ml de *p*-NPP 10 mM disuelto en *n*-hexano y 60  $\mu$ l de etanol absoluto y fueron incubados a 37°C durante 4-16 h mantenidos en agitación (200 rpm). En el ensayo se realizaron dos controles negativos diferentes:

- 1- **Etanol absoluto + *p*-NPP.** La posible liberación de *p*-NP detectada sería exclusivamente de origen químico y no biológico.
- 2- ***p*-NPP + fracción liofilizada** (sin etanol absoluto). La liberación del *p*-PN proviene de la hidrólisis por contaminación con trazas de agua procedentes de la solución de NaOH, añadida en el momento de la extracción de *p*-NP.

Tras el tiempo de reacción (de 4-16 horas), la muestra obtenida se dejó reposar durante 10 minutos con el fin de favorecer que la lipasa decantase. Posteriormente, se tomaron 25  $\mu$ l del sobrenadante y el *p*-NP producido durante la reacción se extrajo añadiendo 1 ml de NaOH 0,05 M en un tubo eppendorf de 1,5 ml en hielo. Finalmente, la fase acuosa se pasó a una cubeta de 1 ml y se midió su absorbancia a 405 nm, usando un espectrofotómetro Beckman DU 640.

La actividad específica se determinó con la ecuación que se indica a continuación. Esta actividad se expresó como  $\mu$ moles de *p*-NP liberado por cada hora de reacción y mg de proteína soluble. La concentración de proteínas solubles corresponde a la concentración de proteína medida en la mezcla de la reacción de transesterificación.

$$A = \frac{(\Delta \text{abs} \times \text{fd}) / \text{Ce} \times 1000 \times \text{Vt}}{h / C \times \text{Vt}}$$

**A:** Actividad en U/ml

**Abs:** 348-420 nm

**fd:** Factor de dilución.

**Ce:** Coeficiente de extinción molar del sustrato ( $17600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

**1000:** Factor de multiplicación para la conversión de la concentración de *p*-NP de M a mM

**Vt:** volumen total de la reacción de transesterificación (1,06 ml)

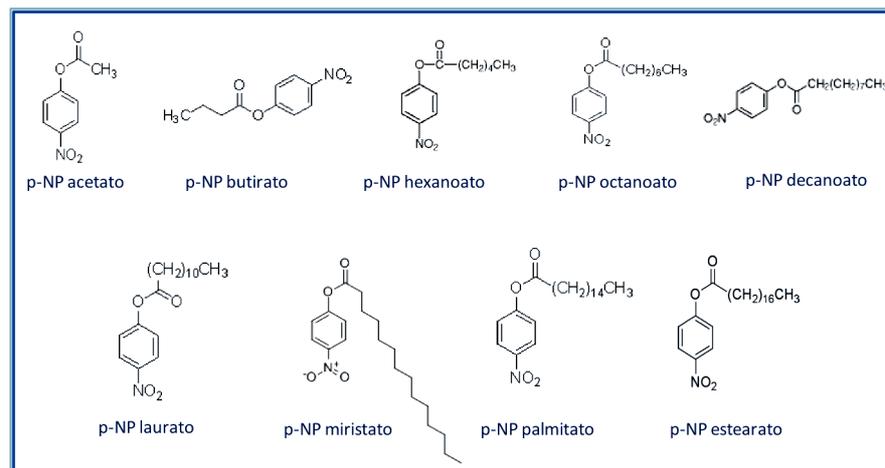
**C:** Concentración de proteína soluble (mg/ml)

### III.14.2. Derivados del *para*-nitrofenol

Para determinar la especificidad de la enzima frente a derivados del *p*-nitrofenol de diferente longitud de cadena se utilizaron los sustratos (Sigma) detallados en la Tabla 13. La estructura química de estos compuestos se detalla en la Figura 16.

**Tabla 13.** Características de los derivados del *p*-nitrofenil (*p*NP) utilizados

Sustrato	Nº de átomos de carbono	PM
<i>p</i> -NP acetato	C2	181,15
<i>p</i> -NP butirato	C4	209,2
<i>p</i> -NP octanoato (caprilato)	C8	265,3
<i>p</i> -NP decanoato (caprato)	C10	293,4
<i>p</i> -NP dodecanoato (laurato)	C12	321,41
<i>p</i> -NP miristato	C14	349,5
<i>p</i> -NP palmitato	C16	377,52
<i>p</i> -NP estearato	C18	405,54



**Figura 16.** Estructura química de los derivados del *p*-nitrofenol utilizados

Para realizar el estudio sobre la especificidad de la enzima frente a estos sustratos, se procedió a la preparación de una solución stock de cada uno de ellos a una concentración final de 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO). Finalmente, los diferentes sustratos fueron diluidos en tampón Tris-EDTA 1X pH 7,3 quedando la solución a una concentración final de 2 mM.

La medida de actividad se realizó en una placa de 96 pocillos *Flat Bottom* (*Greiner bio-one*) con un volumen final de 150  $\mu$ l conteniendo 0,7  $\mu$ g de enzima. La placa se incubó a 37°C durante 30 minutos y se realizó la lectura cada 5 minutos en un espectrofotómetro *Fluostar OMEGA* (*BMG Labtech*).

La actividad, en unidades internacionales por mililitro (UI/ml), se determinó mediante la ecuación que se indica a continuación. Una unidad internacional enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1  $\mu$ mol de sustrato en un minuto, bajo las condiciones descritas anteriormente.

$$A = \frac{(\Delta \text{Abs}/\text{min} \times V_c \times 1000)}{C_e \times V_e}$$

**A:** Actividad en U/m

**Abs/min:** Absorbancia por minuto (348-420 nm)

**1000:** Factor de multiplicación para la conversión de la concentración de *p*-NP de M a mM.

**V<sub>c</sub>:** Volumen total de la cubeta

**C<sub>e</sub>:** Coeficiente de extinción molar del sustrato (5.150 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

**V<sub>e</sub>:** Volumen de la solución enzimática

### III.14.3. Hidrólisis de los derivados del *p*-nitrofenil (*p*-NP)

Para estudiar la hidrólisis de los diferentes derivados del *p*-NP (de 2 a 18C) se utilizaron 25-50 µl de solución de fracción enzimática liofilizada y *p*-NP acetato (Sigma) a una concentración final de 1 mM. La mezcla se incubó a 37°C y la actividad se determinó midiendo el incremento de absorbancia a 405 nm utilizando un espectrofotómetro Genesys 10S Vis (*Thermo Scientific*).

### III.15. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de la concentración de proteínas de las distintas fracciones se llevó a cabo utilizando el método Bradford (Bradford 1976). La cuantificación se determinó en una mezcla que contenía 10-100 µl de fracción o solución de proteínas, 700-790 µl de H<sub>2</sub>O destilada y 200 µl de reactivo Bradford (*Biorad Protein Assay, Microassay Procedure*) y se midió su absorbancia a 595 nm. El cálculo de la concentración de proteínas se llevó a cabo mediante una recta patrón, utilizando albumina de suero bovino (BSA) en H<sub>2</sub>O destilada y extrapolando los resultados a los valores obtenidos en la medición de absorbancia de cada muestra. Si los valores de absorbancia obtenidos para la muestra problema no se encontraban en el rango lineal de la recta patrón, se realizaron diluciones de la muestra hasta conseguir que los valores obtenidos estuvieran en el rango adecuado.

### III.16. SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE DERIVADOS LIPÓFILOS DE POLIFENOLES Y CARBOHIDRATOS

Este apartado se ha realizado en colaboración con el grupo de investigación del Profesor José María Fernández Bolaños del departamento de Química orgánica de la Facultad de Química (Universidad de Sevilla), formando parte también algunos de ellos de la Tesis Doctoral del Dr. Alejandro González Benjumea.

Para estudiar la regioselectividad de los extractos enzimáticos obtenidos, se realizaron biotransformaciones (transesterificación de grupos acetilo) de diferentes compuestos fenólicos procedentes del olivo como el hidroxitirosol, el alcohol protocatecuico y el 3,4-dihidroxifenilglicol. Estos compuestos fueron utilizados como sustratos de partida. En el estudio también se incluyeron carbohidratos hexosas como metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido y dos disacáridos (trehalosa y sacarosa). El resultado de las acilaciones y desacilaciones se cuantificó mediante RMN.

#### III.16.1. Acetilaciones de compuestos fenólicos mediadas por el sobrenadante de *Bacillus sp.* HR21-6

Estas reacciones se realizaron utilizando como sustratos el hidroxitirosol (1), el 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG) (4) y el alcohol protocatecuico (8).

Las *O*-acetilaciones de estos compuestos fenólicos (Figura 17) se realizaron utilizando los extractos bacterianos lipolíticos, en una relación extracto/sustrato 1:1. La mezcla se agitó a 40°C durante 24 h en la oscuridad (Torres de Pinedo et al. 2007).



### III.16.3. Reacciones de acetilación de carbohidratos

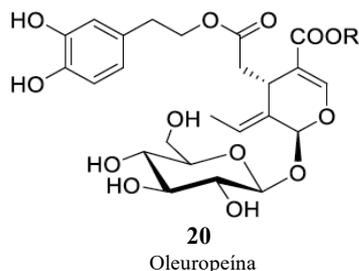
Las reacciones de *O*-acetilación se llevaron a cabo en mono- y disacáridos. Para ello, se seleccionaron como modelo tres carbohidratos no reductores totalmente desprotegidos: metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido (11),  $\alpha,\alpha$ -trehalosa (12) y sacarosa (15). Los tiempos de reacción oscilaron entre las 24 y 200 h y temperaturas relativamente altas para este tipo de reacciones (60°C).

### III.16.4. Reacciones de desacetilación de carbohidratos

La desacetilación regioselectiva se llevó a cabo a temperatura ambiente en MeOH y con una relación enzima/sustrato 1:2 (p/p) en un tiempo variable de reacción según el compuesto y las conversiones obtenidas.

### III.16.5. Reacciones de acilación y/o desacetilación de oleuropeína 20 y derivados

La oleuropeína (20) (Figura 20), es una molécula que contiene en su estructura tanto el fragmento del catecol como una unidad de carbohidrato. Las reacciones de desacetilación de la oleuropeína peracetilada (21) se realizaron utilizando el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6 caletando a 40°C en MeOH.



**Figura 20.** Estructura de la oleuropeína (20)

### III.16.6. Reacciones de acilación/desacetilación utilizando la enzima AE6Lpura

Estas reacciones se llevaron a cabo utilizando los compuestos: hidroxitirosol peracetilado (2), 3,4-dihidroxifenilglicol peracetilado (5) y oleuropeína peracetilada (21), a dos temperaturas, 37°C y 60°C durante 24 h utilizando la relación 1500:1 sustrato/enzima pura.

## III.17. AISLAMIENTO Y DETECCIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS

### III.17.1. Obtención de las fracciones FSEP y OMV del sobrenadante de *Bacillus* sp. HR216

Para la identificación de las enzimas lipolíticas presentes en el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6, se analizó el secretoma de dicha cepa. Para ello, se creció un pre-inóculo de la bacteria en medio PYB durante una noche. Al día siguiente, se utilizó dicho cultivo para inocular 1 L de medio PYB a 30°C y se recogieron muestras a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h). Para el análisis del secretoma se analizaron dos fracciones del sobrenadante: la fracción extracelular soluble libre (FSEP; *Free Soluble Extracellular Fraction*) y la fracción unida a las vesículas de membrana (OMV; *Outer Membranes Vesicles*).

Para la separación de las dos fracciones el cultivo de *Bacillus* sp. HR21-6 recogido a diferentes tiempos se centrifugó a 5000 rpm durante 45 minutos a 4°C. El sobrenadante fue filtrado en una membrana de 0,45 µm, Millipore. El filtrado fue centrifugado en una ultracentrífuga (L-70, BECKMAN). El sobrenadante restante correspondió a la FSEP. El precipitado se trató para la obtención de OMV mediante 2 lavados en tampón PBS, pH 7 y posteriormente fue resuspendido en tampón PBS pH 7,4. La suspensión fue filtrada en una membrana de 0,45 µm.

Ambas fracciones fueron precipitadas con TCA 10% toda la noche a 4°C. El precipitado obtenido se centrifugó a 11500 rpm a 4°C y el pellet fue lavado con acetona fría. Estos precipitados se congelaron a -80°C y se liofilizaron para ser utilizados en un ensayo (LC-MS/MS).

### III.17.2. Identificación de proteínas mediante cromatografía Nano LC-QTRAP 5500 MRM (*Multiple Reaction Monitoring*)

Con el objetivo de identificar las proteínas responsables de las diferentes actividades en el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR216, se realizó una pre-separación en geles de SDS-PAGE con las correspondientes fracciones FSEP y OMV obtenidas en el apartado III.17.1 y se analizaron mediante LC/MS-MS (cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masa en tándem). Dicha identificación se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica del Centro INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.

Para llevar a cabo el análisis mediante LC-MS/MS, 50 mg de cada muestra fueron resuspendidos en tampón TEAB (*Versatile Volatile Buffer Biological*) 0,1 M mediante agitación y sonicación.

La digestión estándar con tripsina se realizó incubando con tripsina durante toda la noche a 37°C. La mezcla de péptidos se desaló, se separó en alícuotas, se secó al vacío y se almacenó a -80°C. Después de la desalinización, 2 µg de la digestión triptica, fueron inyectados en una nano columna C18 (75 µm, 15 cm, con un tamaño de partícula de 3 µm, Acclaim PepMap 100, Thermo Scientific, USA) a una velocidad de flujo de 300 nL/min, utilizando un gradiente específico. El gradiente utilizado comenzó con 5% de tampón B (0,1% de ácido fórmico en 95% de acetonitrilo) durante 3 min, seguido de 40% de tampón B desde el minuto 3 al minuto 120, 95% de tampón B durante 1 min, y manteniendo durante 10 min más, finalmente, se equilibró durante 15 min con 5% de tampón B. Este paso permite la separación de los péptidos según sus polaridades, eluyendo a un tiempo determinado desde el momento en el que se inyecta la muestra (tiempo de retención: RT).

Una vez que se analizaron las muestras en el espectrómetro, los datos obtenidos fueron procesados mediante el programa Skyline 3.1 de Mac Coss Lab. El método de análisis del programa toma como referencia el genoma anotado de *Bacillus* sp. HR216, secuenciado en este trabajo y se establecieron un mínimo de entre 8 y 30 péptidos provenientes de una proteína exclusiva para su detección. Estos péptidos estaban desprovistos de residuos de metionina y triptófano para llevar a cabo un análisis limpio. El programa permite realizar el análisis de los picos de intensidades obtenidos de cada péptido, integrando el área de cada campana de Gauss correspondiente gracias a su altura y anchura. El área obtenida para cada péptido se normaliza comparándola con el área de los picos pesados correspondientes, para así evitar problemas de diferencias de cantidad de proteínas en las muestras.

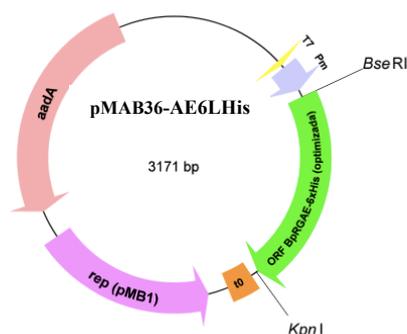
### III.17.3. Análisis de los datos

Los datos brutos procedentes de LS-MS/MS se procesaron utilizando el programa ProteinPilot 3.0 (ABSciex). Para ello se empleó el algoritmo de Paragon que viene predeterminado en el programa, especificando la tripsina como el agente de digestión y MMTS (metil metanotiosulfonato) como modificación fija de cisteína. Se realizó la búsqueda de cada espectro MS/MS en la base de datos PSPEP (*Proteomics System Performance Evaluation Pipeline*). Finalmente, sólo se tuvieron en cuenta las proteínas con al menos un péptido con un nivel de confianza del 95%.

### III.18. CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN QUE CODIFICA LA PROTEÍNA AE6L EN EL VECTOR pMAB36

Para la expresión heteróloga de la enzima AE6L en *E. coli*, se seleccionó el vector de expresión pMAB36. El gen que codifica la proteína AE6L se clonó en este vector, el cual permite la expresión de una proteína de fusión con una etiqueta 6x-his bajo el control del promotor. La secuencia de ADN que codifica la proteína AE6L de 672 pb se obtuvo mediante síntesis de nucleótidos y se insertó en el vector pMAB36 en los sitios de restricción *BseRI* y *KpnI*. La proteína recombinante presentó una masa molecular de 26 kDa.

Una vez obtenido el plásmido, se transformó *E. coli* BL21(DE3)4S2 con la construcción pMAB36- AE6L -6xHis (pMAB- AE6L) (Figura 21) para expresión bajo los sistemas Cascade o T7.



**Figura 21.** Esquema de la construcción pMAB-AE6L bajo los sistemas Cascade o T7

El proceso de inducción se llevó a cabo mediante ensayos de expresión utilizando una combinación de salicilato y 3-metilbenzoato (3MB) (sistema Cascade) o con IPTG (T7), a dos temperaturas, 30°C y 20°C con el fin de encontrar la condición idónea de expresión. Se realizó un gel SDS-PAGE para identificar la condición de expresión más favorable. De esta forma detectamos expresión moderada de una proteína de tamaño compatible al esperado.

El proceso de inducción se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se preparó un pre-inóculo a partir de una colonia de *E. coli* BL21(DE3)4S2 con la construcción pMAB36-AE6L en medio LB kanamicina + estreptomina. Se incubó toda la noche a 37°C y en agitación.
2. Se inculó con 1 ml de este preinóculo un matraz de 250 ml conteniendo 25 ml de medio TB kanamicina + estreptomina y se incubó a 37°C en agitación.

3. Se probaron varios inductores a diferentes concentraciones; Salicilato, a una concentración final de 0,2 y 1 mM y salicilato + 3MB e IPTG a 1 mM. Estos inductores se añadieron al inicio de la fase exponencial del crecimiento ( $DO_{600nm}=0,6$ ) y se incubó durante 4-8 horas a 20 ó 30°C.
4. Se recogieron las células por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos y se congelaron a -80°C.

### III.19. SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS

Para determinar la solubilidad de la enzima AE6L se llevaron a cabo ensayos de solubilidad de cada una de las condiciones de expresión probadas. La lisis de *E. coli* se realizó en el tampón PBS, pH 8.0 (20 mM fosfato potásico, pH 8.0, 150 mM NaCl). Se obtuvieron así las fracciones soluble e insoluble. Para comprobar en qué fracción se localizaba la proteína se realizaron geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie donde se cargaron para todas las condiciones, inducidas y no inducidas, proteína total, fracción insoluble y fracción soluble.

### III.20. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA AE6L

Para llevar a cabo la purificación de la enzima AE6L a partir de su fracción soluble (FS), se llevaron a cabo dos protocolos de elución en columnas Ni-IMAC, uno eluyendo con imidazol y el otro mediante un gradiente de pH.

#### III.20.1. Purificación Ni-IMAC de la fracción soluble de la proteína AE6L eluyendo con imidazol

1. La purificación de la FS se llevó a cabo a partir de 50 ml del cultivo de *E. coli* inducido con 1 mM de salicilato a 30°C.
2. El pellet procedente de estos 50 ml de cultivo se resuspendió en 20 ml de buffer de lisis PBS, pH 8,0 (20 mM fosfato potásico, pH 8,0 + 150 mM NaCl).
3. La lisis se realizó en un homogeneizador a 800 bares.
4. El lisado se centrifugó a 10000 x g, 15 min, a 4°C. Se separaron 0,25 ml de lisado para centrifugar en las mismas condiciones y obtener una muestra de fracción insoluble (FI).
5. Este volumen se dializó frente a 2 L de PBS, pH 8,0 (50 mM fosfato potásico, pH 8.0 + 150 mM NaCl) en membrana de diálisis Spectra/Por Dialysis. MWCO: 6-8,000 (Spectrum labs, Cat. 132 655). Se incubó a 4°C durante toda la noche.
6. Se volvió a dializar con otros 2 L de buffer PBS, pH 8.0, y se incubó durante 1 hora a 4°C.
7. Se separó una muestra de fracción soluble dializada [FS(d)] y el resto se hizo pasar por 1 ml de resina de níquel (ABT, Cat. 6BCL-QHNi-500) (Cross linked 6% beads, loading capacity: 20-40  $\mu$ moles  $Ni^{2+}$ /ml gel) nueva, equilibrada con tampón de equilibrado/lavado (50 mM fosfato potásico, pH 8.0, 400 mM NaCl, 5 mM imidazol), a flujo de 1 ml/min.
8. Se lavó la resina con 15 volúmenes de columna de tampón de equilibrado/lavado a flujo de 1 ml/min.

9. Se eluyó con un flujo 1 ml/min: se recogieron 20 fracciones de elución de 1 ml generadas con un gradiente de elución de 0 a 250 mM de imidazol con las soluciones A (50 mM fosfato potásico, pH 8.0, 100 mM NaCl) y B (50 mM fosfato potásico, pH 8.0, 100 mM NaCl, 250 mM imidazol). Todo el proceso se realizó a una temperatura de 4°C.

### III.20.2. Purificación Ni-IMAC en gradiente de pH de la fracción soluble de la proteína AE6L

1. La purificación se inició a partir de la fracción soluble proveniente de biomasa de 950 ml de cultivo, inducido con 1 mM de salicilato a 30°C.
2. Se centrifugó y el pellet fue resuspendido en 120 ml de tampón de lisis PBS, pH 8,0 (20 mM fosfato potásico, pH 8,0 + 150 mM NaCl).
3. La lisis se realizó en un homogeneizador a 800 bares.
4. El lisado resultante se centrifugó a 10000 x g, 15 min, a 4°C.
5. La fracción soluble se dializó en 4 L de PBS, pH 8.0 utilizando una membrana de diálisis Spectra/Dialysis. MWCO (*Molecular weight cut-off*): 6-8,000 (Spectrum labs, Cat.132 655) y se incubó a 4°C, durante toda la noche. Se repitió la diálisis, esta vez incubando durante 2 horas a 4°C.
6. Se separó una muestra de fracción soluble dializada [FS(d)] y el resto se pasó por 5 mL de resina de níquel (ABT, Cat. 6BCL-QHNi-500) (Cross linked 6% beads, loading capacity: 20-40  $\mu$ moles  $\text{Ni}^{2+}$ /mL gel), nueva, empaquetada en una columna Proteus 5ml FliQ (Generon, GEN-FliQ) y equilibrada con tampón de equilibrado/lavado (50 mM fosfato potásico, pH 8.0, 400 mM NaCl).
7. Se lavó la resina con 15 volúmenes de columna (VC) de tampón de equilibrado/lavado. Luego se lavó con 5 VC de solución de elución A (20 mM acetato, pH 6,5, 0,5M NaCl).
8. Se recogieron las fracciones de elución de 5 ml generadas con un gradiente de pH con las soluciones A (ya indicado) y B (20 mM acetato, pH 4,0, 0,5M NaCl) de elución, de la siguiente manera:
  - 1 VC, gradiente 0% B a 20% B.
  - 12 VC, gradiente 20% B a 50% B.
  - 2 VC, gradiente 50% B a 70% B.

A cada elución obtenida se le añadieron 0,25 ml de Tris-Cl, 1 M, pH 8,0 para neutralizar el pH. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente.

### III.20.3. Pool de fracciones

Para comprobar el éxito de la purificación, los eluyentes obtenidos se cargaron en un gel SDS-PAGE. Finalmente, se unieron las fracciones E11-E14, de unos 5 ml cada una, coincidiendo con las fracciones más puras.

### III.20.4. Diálisis en el tampón de reacción

Para comprobar la estabilidad de la proteína en el tampón de reacción (TE 1X pH 7,3) se dializó 1 ml de la mezcla de fracciones en un casete de diálisis de 3,500 MWCO (Thermo, Prod. 66330) frente a 1 L de este tampón y se incubó a 4°C, durante toda la noche.

Después de esta incubación se hizo un cambio con 1 litro de Buffer Tris-EDTA 1X pH 7,3 (lot 020849) y se incubó a 4°C, 2 h.

### III.20.5. Comprobación solubilidad/insolubilidad

La solubilidad de la proteína se comprobó centrifugando 0,25 ml (de 1 ml total obtenido en la diálisis) a 13000 rpm, 15 min y a temperatura ambiente. Se separó el sobrenadante y el hipotético precipitado (no apreciado a simple vista) se resuspendió en SB 1X pH 8,0 (NaOH, Ac. Bórico).

### III.20.6. Escalado de la diálisis

El escalado de la diálisis se realizó dializando 20 ml de pool obtenido en una membrana de diálisis Spectra/Por Dialysis. MWCO: 6-8,000 (Spectrum labs, Cat. 132 655) y se incubó a 4°C, durante toda la noche, frente a 4 L de TE 1X pH 7,3. Al día siguiente se hizo un cambio por 4 litros de TE 1X y se incubó a 4°C, 2 h.

Tras recoger la diálisis se centrifugó a 10000 x g, 15 min, a 4°C para eliminar posibles agregados y se recuperó el sobrenadante.

## III.21. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

### III.21.1. Electroforesis desnaturizante de proteínas (SDS-PAGE)

La electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) se llevó a cabo mediante el método descrito por Laemmli (1970). Las muestras se desnaturalizaron aplicando calor en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol. El sistema que se utilizó fue el Mini Protean II (BioRad). En la Tabla 14, se detallan los componentes necesarios para la preparación de un gel SDS-PAGE al 12%.

**Tabla 14.** Composición de geles SDS-PAGE

	Gel separador 10%	Gel concentrador 4%
Acrilamida 29:1	2,5 ml	0,5 ml
Tampón Tris HCl	2,5 ml Tris HCl 1M, pH 8,8	1,26 ml Tris HCl 0,5 M, pH 6,8
SDS (10 %)	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O MilliQ	4,29 ml	3,18 ml
<b>Para polimerizar:</b>		
	Gel separador 10%	Gel concentrador 4%
PSA	100 $\mu$ l	25 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l

Una vez finalizada la electroforesis el gel se tiñe con una solución de azul Coomassie. Como marcador de peso molecular se utilizó Precision Plus TM All Blue (Bio- Rad).

Las soluciones utilizadas se indican a continuación:

- **Solución Laemmli 4X:** 240 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% de SDS, 20% glicerol, 0,02% p/v de azul de bromofenol y enrasar con H<sub>2</sub>O destilada.
- **Tampón SDS-Running (10X):** 30,2 g de Tris Base; 144 g de glicina; 10 g de SDS. Ajustar a 1 L con agua destilada. Ajustar pH a 8,6-8,8.
- **Per-Sulfato Amónico (PSA):** 10% (p/v) en H<sub>2</sub>O destilada.
- **Tampón de separación (S):** 51,36 g de Tris Base, añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta 200 ml, ajustar pH a 8,8 con HCl.
- **Tampón de concentración (C):** 17,12 g de Tris Base, añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta 200 ml, ajustar pH a 6,8 con HCl.

### III.21.2. Tinción Coomassie

Los geles de acrilamida obtenidos se tiñeron aplicando una solución de azul brillante de Coomassie (Sigma) incubando durante 1 hora y se destiñeron durante al menos 6 horas en una solución de desteñido. Todas las soluciones se conservaron a temperatura ambiente.

Las soluciones utilizadas fueron:

- **Solución de azul brillante de Coomassie:** azul de Coomassie 0,1% (p/v); metanol 40 % (p/v); ácido acético glacial 10% (v/v).
- **Solución de desteñido:** metanol 20% (v/v); ácido acético glacial 7% (v/v).

### III.22. WESTERN-BLOT

Este procedimiento se usó para la detección de proteínas de fusión expresadas en *E. coli* (Matsudaira 1987). Los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

1. Las proteínas de interés se sometieron a SDS-PAGE sobre geles de acrilamida [bisacrilamida (29:1) al 12].
2. Posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) utilizando el sistema de electroforesis (*Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell*, BioRad).
3. Después de la transferencia, las membranas se lavaron durante 15 minutos antes de realizar el bloqueo usando TBS 1X.
4. El bloqueo se llevó a cabo durante al menos 1 hora con agitación moderada a temperatura ambiente antes de la incubación con el anticuerpo primario.
5. Después del bloqueo se añadió la solución con el anticuerpo primario (Anti-6x-His (His, H8), monoclonal, ThermoFisher) y se incubó toda la noche a 4°C en agitación moderada.
6. Para eliminar los restos de la solución de bloqueo se lavó la membrana durante 15 minutos (3 veces) con tampón TBS 1X.

7. El último paso consistió en la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de la planta *Armoracia rusticana* (rábano).
8. La detección de la peroxidasa se llevó a cabo usando quimioluminescencia (ECL Prime Reagent GE Healthcare).

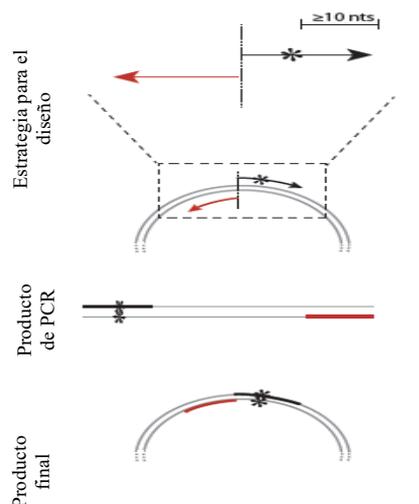
Las soluciones utilizadas se indican a continuación:

- **Tampón de transferencia semi-seca:** Tris Base 20 mM, glicina 150 mM, metanol al 20% (v/v), SDS al 0,05% (p/v).
- **Tampón TBS (10X):** 3,003 g/l Tris HCl base, 58,466 g/l NaCl. Ajustar el pH a 7,5.
- **Solución de bloqueo:** 30 g/l leche en polvo en TBS 1X
- **Solución de anticuerpos:** Anticuerpos diluidos 1:500 en tampón de bloqueo. 40 $\mu$ l de Anti-6x-His (His, H8) y 40 ml solución de bloqueo

### III.23. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Para la construcción de los diferentes mutantes se utilizó el kit de mutagénesis dirigida *Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit* (New England BioLabs).

El diseño de los cebadores se realizó en función de las indicaciones del fabricante (Tabla 15), utilizando el plásmido pMAB-AE6L como molécula parental. Las sustituciones se crearon diseñando un desajuste en el centro del cebador promotor (Figura 22). Se incluyeron al menos 10 nucleótidos complementarios a la molécula parental en el extremo 3' del cebador. El cambio de aminoácido se incorpora en el extremo 5' del cebador promotor. El extremo 5' del cebador reverso comienza en la base más próxima al extremo 5' del cebador promotor, y procederá en la dirección opuesta al complementario. Este segundo cebador puede ser 100% complementario a la secuencia del plásmido o puede contener desemparejamientos, si se desea. La ausencia de superposición asegura que se produzca una amplificación exponencial (en lugar de lineal). El tamaño máximo de la sustitución está dictado en gran medida por las limitaciones de la síntesis de oligonucleótidos



**Figura 22.** Estrategia seguida para el diseño de los cebadores

**Tabla 15.** Cebadores diseñados para la mutagénesis dirigida del gen que codifica la proteína AE6L. Los nucleótidos introducidos están señalados en minúscula y negrita.

Cebador	5'-secuencia-3'	N° de bases	TM (°C)	% G+C	Mutante
S10AF	GGCAGGCGAT <b>gca</b> ACCGTTAGCAG	24	59	63	AE6L <sup>S10A</sup>
S10AR	AGATAAATGGTGGTCATG	18	56	39	
G45AF	TGCAATTGGT <b>gca</b> CGTAGCAGCA	23	62	52	AE6L <sup>G45A</sup>
G45AR	CGATTATCAACGCTAACAC	19	59	42	
D77A	GATGGGTCAT <b>gca</b> GATGCAAGCACC	25	60	56	AE6L <sup>D77A</sup>
D77AR	TGGGTAAACAGCCAATCAC	19	63	47	
D182AF	CGGCATTGAA <b>gca</b> CGTACCCATTTTAC	27	63	448	AE6L <sup>D182A</sup>
D182AR	GTGCTCAGCATAAAAATAGC	19	59	42	
H185AF	AGATCGTACC <b>gca</b> TTTACCAAAGA	36	65	50	AE6L <sup>H185A</sup>
H185AR	TCAATGCCGGTGCTCAGC	18	68	61	
S96AF	CCGTCTGGTT <b>gca</b> CTGG AACTGAAAGA TCTGG	32	63	53	AE6 <sup>S96A</sup>
S96AR	GCAATTGCGTCTGCACCT	18	66	56	
E26QF	TGGTTGGGGT <b>caa</b> TTTCTGCATC	23	63	48	AE6L <sup>E26Q</sup>
E26QR	CCCTGAACCGGACGATCC	18	68	67	
T184AF	TGAAGATCGT <b>gca</b> CATTTTACCAAAGAAG	29	62	38	AE6L <sup>T184A</sup>
T184AR	ATGCCGGTGCTCAGCATA	18	67	56	
T11AF	AGGCGATAGC <b>gca</b> GTTAGCAGCT	23	66	57	AE6L <sup>T11A</sup>
T11AR	GCCAGATAAATGGTGGTCATG	21	64	48	

Los mutantes se obtuvieron mediante el siguiente procedimiento:

### Etapa I: Amplificación exponencial (PCR)

La reacción de PCR, contenía la mezcla de reacción que se detalla a continuación:

	25 $\mu$ l de reacción	Concentración final
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	12,5 $\mu$ l	1X
10 $\mu$ M Cebador 1	1,25 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
10 $\mu$ M Cebador 2	1,25 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
ADN (1–25 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	1-25 ng
Agua estéril	9,0 $\mu$ l	

La PCR llevada a cabo para la mutagénesis constaba de un ciclo inicial a 98°C durante 30 segundos; 25 ciclos 98°C 10 segundos, 50-72°C 10-30 segundos y 72°C 2 minutos; y un último ciclo 4°C 2 minutos.

### Etapa II: tratamiento con quinasa, ligasa y *DpnI*

Esta formulación permite una fosforilación eficiente, ligación intramolecular/circularización y eliminación del molde en una sola etapa.

### Etapa III: Transformación

Se descongeló una alícuota de 50  $\mu$ l de células de *E. coli* químicamente competentes (*E. coli* NEB 5-alpha competente de alta eficiencia NEB # C2987) en hielo y se llevó a cabo la transformación de estas según el fabricante.

## III.24. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA AE6L

### III.24.1. Influencia del pH en la hidrólisis del *p*-NP acetato

Antes de iniciar la caracterización de la enzima AE6L, se procedió a estudiar la influencia del pH en la hidrólisis del *p*-NP con el objetivo de seleccionar el pH óptimo para realizar los ensayos de actividad. La influencia del pH se probó en diferentes tampones. Los tampones utilizados fueron TE 100 mM, pH 7,3, fosfato de potasio 0,05 M (pH 6,5-8,0) y Tris-HCl (pH 7,5- 9,0). Este ensayo se realizó midiendo continuamente el aumento en la absorbancia a 405 nm, durante 1 h, que se producía por la liberación de *p*-nitrofenol en la hidrólisis de *p*-NP acetato 1 mM en ausencia de la enzima.

### III.24.2. Especificidad de sustrato de la enzima AE6L

Para estudiar la especificidad de sustrato de la enzima AE6L se utilizaron *para*-nitrofenoles (*p*-NP) de distinta longitud de cadena tales como: *p*-NP acetato (C2), *p*-NP butirato (C4), *p*-NP octanoato (C8), *p*-NP decanoato (C10), *p*-NP dodecanoato (C12), *p*-NP miristato (C14), *p*-NP palmitato (C16) y *p*-NP estearato (C18) y se midió la actividad lipolítica frente a los distintos sustratos. El ensayo se llevó a cabo en placas microtiter de 96 pocillos con fondo plano (Greiner bio-one) a la temperatura de 37°C durante 30 minutos, donde se obtuvieron medidas cada 5 minutos a una absorbancia de 405 nm. La mezcla de reacción contenía 2 mM de sustrato y proteína (0,7 µg de enzima pura; 1µg de enzima soluble) en tampón Tris-Cl 1X pH 7,3. Como control negativo se utilizó la mezcla de reacción en ausencia de enzima.

### III.24.3. Influencia de distintos disolventes orgánicos

Para el estudio del efecto de diferentes disolventes orgánicos en la estabilidad de la enzima soluble, AE6L fue expuesta a diferentes compuestos que normalmente se utilizan en reacciones de hidrólisis: dimetil sulfóxido (DMSO), N,N-dimetilformamida, metanol, acetonitrilo, etanol, acetona, 2-propanol, (30 % en tampón TE 1X (Tris-EDTA 1X pH 7,3), y hexano (5 % en tampón TE 1X (Tris-EDTA 1X pH 7,3)). El ensayo se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos. Como control positivo se utilizó la enzima soluble en ausencia de disolventes y se midió a una absorbancia de 405 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S VIS (Thermo Scientific)). La actividad se detectó utilizando el *p*-NP acetato como sustrato.

### III.24.4. Influencia de la temperatura

La influencia de la temperatura se estudió en un rango que osciló entre 25 y 49°C manteniendo un valor fijo de pH (pH 7,3). Se midió espectrofotométricamente mediante la liberación de *p*-nitrofenol a partir de *p*-NP acetato (2C) como sustrato en placas microtiter Flat Bottom (Greiner bio-one) a 405 nm bajo las mismas condiciones ensayadas que en el apartado III.24.2. Estas medidas se realizaron en un lector de placa multipocillos (Fluostar Omega, BMG Labtech)

### III.24.5. Termoestabilidad de la enzima AE6L

El perfil de termoestabilidad se realizó incubando la enzima pura y soluble a varias temperaturas (30°C, 37°C, 45°C, 50°C) durante 30 minutos tomando alícuotas cada 5 min. Las alícuotas se enfriaron en un baño de hielo y se analizaron inmediatamente para determinar la actividad de la enzima bajo las mismas condiciones experimentales óptimas previamente fijadas para medir actividad.

### III.24.6. Determinación de los parámetros cinéticos

Para determinar los parámetros cinéticos de la enzima AE6L, se procedió a realizar el ensayo enzimático utilizando concentraciones crecientes (0,25, 0,5, 0,75, 1, 2 y 3 mM) del *p*-NP acetato con el fin de saturar la actividad lipolítica de la enzima. Posteriormente, se procedió a la medida de actividad. Los parámetros cinéticos se dedujeron aplicando la cinética de Michaelis (Lineweaver and Burk 1934) linearizando mediante la ecuación de Hanes-Woolf Plot (Hanes 1932).

### III.25. ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD DE LOS DIFERENTES DERIVADOS FENÓLICOS

#### III.25.1. Líneas celulares y tratamiento

El estudio de las diferentes bioactividades analizadas se llevó a cabo mediante el uso de tres líneas celulares diferentes:

- **Células de carcinoma de colon humano (HT-29)**, adquiridas de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Para el cultivo de estas células se utilizó el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal de ternera 10% (v/v) y con penicilina/estreptomicina al 1% (v/v) (Invitrogen™ Life Technologies (Karlsruhe, Alemania)).
- **Células endoteliales corneales humanas (HCEC 1CT)** cedidas por el Prof. Jerry W. Shay (UT Southwestern Medical Center, Dallas, TX, EE. UU.) Estas células se cultivaron en un medio basal obtenido a partir del medio DMEM suplementado con glucosa 10X 199 (2%), suero fetal bovino (2%), hepes 20 mM, gentamicina (50 µg/ml), insulina-transferrina-selenio-G (10 µl/ml), EGF Reg (20 ng/ml) e hidrocortisona (1 µg/ml).
- **Monocitos humanos TPH-1.** En esta línea celular, THP1-XBlue-CD14 derivada de monocitos humanos, la enzima fosfatasa alcalina se expresa bajo el control del promotor del factor transcripcional de NF-kb. La actividad de la fosfatasa alcalina puede medirse mediante una reacción enzimática con técnicas colorimétricas, de modo que una mayor actividad de fosfatasa alcalina se relaciona directamente con mayor cantidad de NF-kb y por tanto menor efecto anti-inflamatorio. Para el cultivo y mantenimiento de la línea THP-1 se utilizó medio RPMI 1640 con L-Glutamina 2 mM y HEPES 25 mM (GIBCO, USA), suplementado con suero fetal bovino (PAA, Austria) al 10% y 1% de Penicilina/Estreptomicina (PAA).

Todas las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron cultivadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y se analizaron rutinariamente para determinar la ausencia de contaminación por micoplasmas.

#### III.25.2. Fenoles utilizados y tratamiento celular

Los polifenoles utilizados en este trabajo (Figura 23), fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadieron al cultivo celular, dando como resultado las concentraciones finales de los compuestos de ensayo y DMSO al 2% (v/v). Debido a los límites de solubilidad de los compuestos ensayados, las concentraciones máximas para todos ellos se ajustaron a 140 mM. Estas medidas facilitaron la evaluación adecuada de las curvas dosis-respuesta y de las concentraciones efectivas máximas (CE50) en la mayoría de los casos. El control negativo que contenía DMSO al 2% siempre fue ensayado en paralelo.

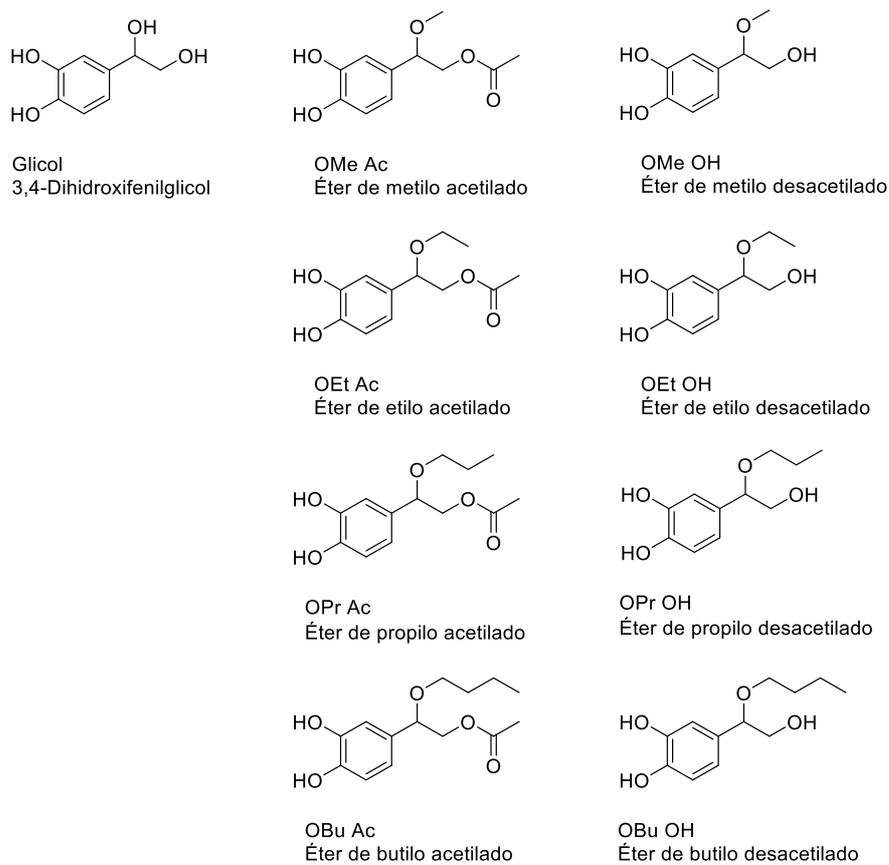


Figura 23. Compuestos fenólicos utilizados en el estudio de bioactividad

### III.25.3. Estudio de la citotoxicidad

Para determinar los posibles efectos citotóxicos de los diferentes polifenoles en diversas líneas celulares, se establecieron dos métodos de análisis de la citotoxicidad basados en la monitorización del crecimiento para analizar los efectos de dichos compuestos. El efecto de la citotoxicidad provocada por los compuestos fenólicos solo fue comprobado en células HCEC.

Los efectos citotóxicos en la actividad mitocondrial (MA) se midieron utilizando el **ensayo WST-1** (tetrazolio soluble en agua). La sal de tetrazolio WST-1 se escinde a formazan por un complejo mecanismo celular que se produce principalmente en la superficie. Esta biorreducción depende principalmente de la producción glucolítica de NAD(P)H en las células viables. Por lo tanto, la cantidad de colorante de formazano se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas en el cultivo. Este ensayo proporciona información sobre el estado metabólico de las células.

En el **ensayo de sulforodamina B (SRB)**, se utiliza una tinción de aminoxanteno de color rosa brillante, este compuesto consta de dos grupos sulfónicos que se unen a residuos de aminoácidos básicos en condiciones ácidas leves, y se disocian en condiciones básicas. Como la unión de SRB es estequiométrica, la cantidad de colorante extraído de las células teñidas es directamente proporcional a la masa celular. Este ensayo se realizó de acuerdo con un método modificado de Skehan et al. (Skehan et al. 1990).

### Ensayo de citotoxicidad acoplado WST-1 y SRB

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo en un ensayo acoplado dividido en dos fases. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 4.000 células por pocillo y se cultivaron durante 48 h. Las soluciones de DMSO (2%) y 0,5% de Triton-X100 (0,5%) se usaron como controles negativos y positivos, respectivamente. Después de una incubación de 24 h de las células HCEC con los diferentes compuestos fenólicos en un rango de concentración de 0,1–200  $\mu\text{M}$ , se preparó la detección. Para ello, las células se lavaron con PBS (solución salina tamponada con fosfato) y una solución de detección que contenía medio DMEN sin suero y 10% de reactivo WST-1. Después de 45 min de incubación se detectó absorción a 450 nm y 650 nm con un lector de placas múltiples PerkinElmer Victor3V. Para la cuantificación, los valores a 650 nm se restaron a los valores obtenidos a 450 nm, y los datos medidos se remitieron al control del disolvente (DMSO al 2% v/v). La absorbancia fue medida a 450 nm y 650 nm como longitud de onda de referencia en un lector de placas (Wallac 1420, PerkinElmer, Turku, Finlandia). Según lo descrito por (Vejdovszky et al. 2016) el efecto de la citotoxicidad fue calculado relacionando los resultados de la absorbancia obtenidos con el control de disolvente como se describe en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ De la actividad mitocondrial del DMSO} = (1 - \text{efecto}) * 100$$

Las curvas de dosis-respuesta de todos los compuestos fenólicos usados fueron valoradas mediante el test estadístico Levenberg-Maraquardt. En él se plantea si hay alguna repercusión del compuesto en la célula que pueda potenciar o disminuir los efectos tóxicos del mismo.

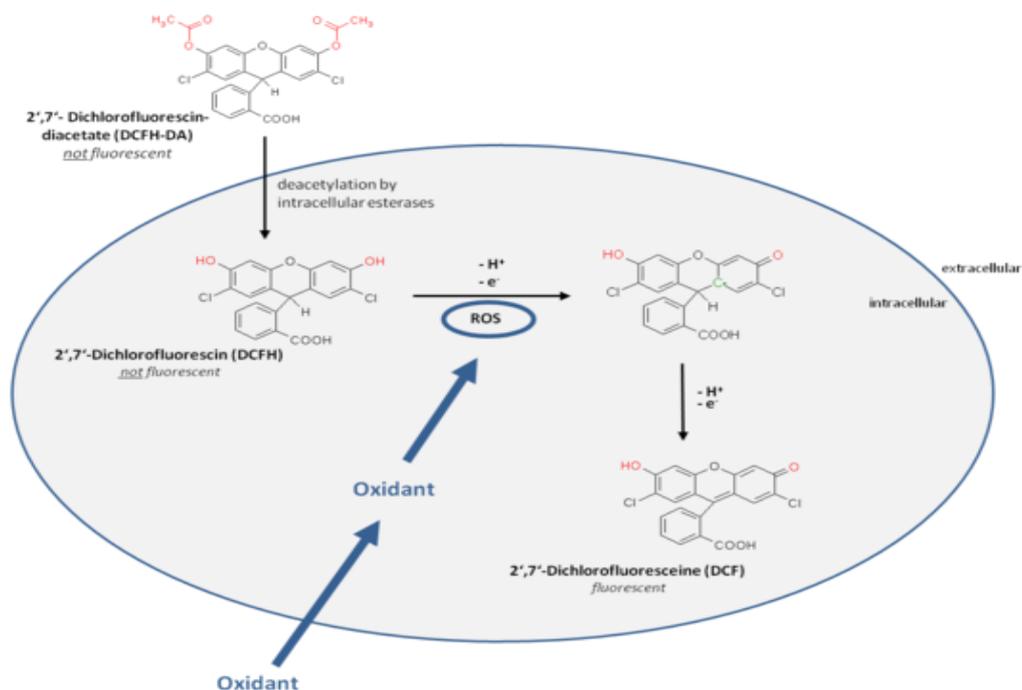
Una vez finalizado el ensayo de WST-1, las mismas placas utilizadas se lavaron dos veces con PBS y se fijaron las células con una solución de ácido tricloroacético al 5%. Tras el lavado, las placas se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente. Luego se tiñeron por incubación con una solución de 0,4% (p/v) de sulforrodamina B (SRB) durante 1 h. Después de lavar con agua y ácido acético al 1% v/v, el color de la tinción se eluyó con un tampón TRIS 10 mM a pH 10. Las absorbancias se midieron a 570 nm y los efectos sobre el crecimiento celular se remitieron al control del disolvente (DMSO al 2% v/v).

La normalidad de los datos se estableció con *Shapiro-Wilk*. Los valores atípicos se corrigieron de acuerdo con Nalimov. Los niveles de significancia se establecieron en 5%. Las diferencias significativas fueron comparadas con el control del solvente y evaluadas a través de ANOVA de un factor y posterior prueba *post hoc* de LSD de Fisher. Las diferencias significativas entre las diferentes concentraciones se determinaron mediante un análisis *t-student* de dos colas. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software OriginPro 9.1 G (Origin Lab, Massachusetts).

#### III.25.4. Estudio del estrés oxidativo

Para la evaluación de estrés oxidativo intracelular se utilizaron dos métodos basados en el reactivo 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), un colorante fluorescente permeable a través de las membranas celulares que mide actividad hidroxilo, peroxilo y otras especies reactivas del oxígeno dentro de la célula. Una vez que el DCFH-DA traspasa las membranas celulares es desacetilado mediante esterasas a un compuesto no fluorescente que no es permeable a través de las membranas (2'-7'-diclorofluoresceína, DCFH). La oxidación posterior a diclorofluoresceína (DCF)

sólo se produce, si el compuesto de estudio es pro-oxidativo y genera especies reactivas de oxígeno intracelulares (ROS). La fluorescencia, cuantificable mediante fluorimetría, es directamente proporcional a la concentración de ROS (Figura 24).



**Figura 24.** Proceso de marcaje con la sonda diclorofluoresceína (DCF). La sonda reducida, esterificada y no fluorescente (DCFH-DA) atraviesa la membrana. Una vez dentro, las esterasas la hidrolizan (DCFH) y los ROS intracelulares la oxidan para convertirla a la forma fluorescente DCF.

#### III.25.4.1. Ensayo de diclorofluoresceína (DCF)

Este estudio se llevó a cabo utilizando la línea celular HCEC. El ensayo se realizó de acuerdo con el método de Keston y Brandt (Keston and Brandt 1965). Para ello se sembraron 10.000 células de HCEC en placas negras de 96 pocillos y se dejaron crecer durante 48 horas. Las células se lavaron con PBS y se incubaron con una solución 50  $\mu$ M de DCF-DA en PBS durante 30 minutos. Después de lavar nuevamente con PBS, para eliminar los restos no absorbidos de DCF-DA, las células se incubaron con las sustancias solas o en combinación con DMEM no coloreado, que contenía DMSO 2% (v/v) y catalasa 100 u/ml. La fluorescencia se midió a 485/535 nm (excitación/emisión) después de 0, 1, 2 y 3 h. Como control positivo se usó una solución de  $H_2O_2$  1 mM en DMEM no coloreado sin catalasa.

#### III.25.4.2. Ensayo DCF de protección

Este estudio se llevó a cabo utilizando dos líneas celulares diferentes: HCEC y HT-29. Una modificación de este ensayo permite probar el efecto antioxidante de un compuesto. Para ello las distintas líneas celulares se incubaron previamente con el compuesto de ensayo. Si el compuesto de estudio aporta capacidad antioxidante se desencadenarán una serie de mecanismos de defensa antioxidantes (por ejemplo, la ruta Nrf2-ARE), por medio de la cual se elimina el exceso de ROS

reduciendo de esta manera la formación de DCF fluorescente. El factor de transcripción 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (NF-E2) (Nrf2), está involucrado en la regulación de la expresión de genes que codifican diversas proteínas antioxidantes y antiestrés. Actúa uniéndose a los elementos de respuesta antioxidante presentes en la región promotora de una gran cantidad de genes que codifican para enzimas citoprotectoras, antioxidantes y detoxificantes de fase II, como NAD(P) H: quinona oxido-reductasa-1 (NQO1), SOD, glutatión S-transferasa (GST), glutatión Peroxidasa (GPx), glutamato-cisteina ligasa (GCL), hemo oxigenasa-1 (HO-1), catalasa y tiorredoxina, regulando así su expresión (Baird and Dinkova-Kostova 2011) y los resultados fisiológicos y fisiopatológicos de la exposición oxidante.

Para llevar a cabo este ensayo se sembraron 20.000 células HT-29 y 10.000 de HCEC por pocillo en placas negras de 96 pocillos y se dejaron crecer durante 24 h. Las células se incubaron con diferentes concentraciones de polifenoles en DMEM (que contiene 10% de FCS, 2% v/v de DMSO y 100 u/ml de catalasa) durante otras 24 h. Los pocillos se lavaron luego con PBS y se incubaron con una solución 50  $\mu$ M de DCF-DA en PBS durante 30 minutos. Después de lavarse nuevamente con PBS, las células se incubaron durante 1 h con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM en DMEM no coloreado que contenía DMSO 2% v/v y sin catalasa durante 1 h. Las mediciones y la cuantificación se realizaron como se describió anteriormente.

### III.25.5. Estudio de la capacidad antiinflamatoria

Para este ensayo se utilizaron monocitos que expresan el gen de la fosfatasa alcalina bajo el control del promotor de NF-kb. Los monocitos se sembraron en placas de 24 pocillos con una densidad de 120.000 células por pocillo. La solución de DMSO (2%) fue utilizada como control negativo y 1  $\mu$ M dexometasona (Dex) como control positivo. La dexametasona, es utilizada como fármaco antiinflamatorio.

La diferenciación en células adherentes tipo macrófago se llevó a cabo adicionando 10  $\mu$ g/ml de PMA (Forbol 12-miristato 14-acetato) e incubando durante 72 h a 37°C. Después de este tiempo los macrófagos se incubaron con cantidades crecientes de los diferentes compuestos fenólicos (0,1–200  $\mu$ M) durante 2h. La estimulación subsiguiente con el lipopolisacárido de *E. coli* (LPS, 1  $\mu$ g/ml) indujo la transcripción génica de NF-kb, y la liberación de citoquinas TNF- $\alpha$  imitando la respuesta inflamatoria.

El estudio de la actividad antiinflamatoria de los extractos de compuestos fenólicos se llevó a cabo midiendo la actividad de la fosfatasa alcalina indirectamente mediante un ensayo colorimétrico con el reactivo quanti-Blue (invitrogen). Este reactivo quanti-Blue contiene el sustrato fosforilado que hidroliza la fosfatasa alcalina. Así, la actividad de la fosfatasa libera un compuesto cromogénico que puede analizarse midiendo la absorbancia a 655 nm. Como la expresión de la fosfatasa alcalina está dirigida por el promotor de NF-kb los resultados de actividad de fosfatasa alcalina son directamente proporcionales a la activación transcripcional de, NF-kb siendo la actividad de la fosfatasa proporcional a la absorbancia. De modo que a mayor actividad de NF-kb mayor absorbancia. Los resultados de la actividad de NF-kb se expresan respecto a las células tratadas con LPS (control positivo).

## RESULTADOS

---

## IV. RESULTADOS

---

### IV.1. RECOGIDA DE MUESTRAS

Para la recogida de muestras se eligieron sitios localizados en industrias alimentarias cuya actividad principal es el procesamiento de alimentos grasos. La muestra HR21 procedente del serrín de pescado, fue tomada de una industria de pescado en Isla Cristina (Huelva, España), (37.20994°N, - 7.26167°E). HR11 y HR12 fueron tomadas de una industria de curado de carne en Higuera la Real (Badajoz, España), (38.151216°N, -6.684258°E) y procedían respectivamente, de la grasa que cubre el jamón y de la grasa que gotea en el suelo durante el secado del mismo.

### IV.2. DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD LIPOLÍTICA (HIDRÓLISIS)

Con el objetivo de aislar microorganismos transesterificadores se diseñó un método de selección en tres pasos.

El primer paso del método de selección diseñado consistió en la detección de microorganismos con actividad lipolítica, para ello, las muestras recogidas fueron sembradas en placas con distintos medios de cultivo suplementados con tributirina tal y como se describe en Materiales y Métodos. Este ensayo permitió detectar la actividad hidrolítica de los microorganismos aislados mediante la visualización directa de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia. En total se obtuvieron más de 4.000 colonias de hongos y bacterias, de los cuales, 459 fueron positivas en la degradación de tributirina (Tabla 16). La mayoría de los microorganismos crecieron en los medios K9A, K9G y K9 Gamp. Curiosamente, no se observaron cepas bacterianas lipolíticas en la muestra HR12, donde el número de microorganismos obtenidos fue 378, la mayoría correspondientes a cepas fúngicas. Finalmente, el estudio se continuó utilizando solamente las cepas bacterianas debido a la alta semejanza morfológica entre las cepas fúngicas.

### IV.3. DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS TRANSESTERIFICADORES

Con el objetivo de seleccionar solo enzimas extracelulares, este segundo paso se llevó a cabo usando exclusivamente los sobrenadantes de las 66 cepas bacterianas detectadas en la primera etapa de selección. Para ello, se empleó un método basado en la transesterificación del *p*-nitrofenol palmitato (*p*-NPP) con etanol para liberar el compuesto *p*-nitrofenol (*p*-NP). Este método requiere que la reacción se realice en condiciones anhidras, por lo que se procedió a la liofilización de los sobrenadantes. En paralelo, se llevaron a cabo las reacciones de control tal como se describe en Materiales y Métodos, cuyo valor máximo obtenido fue 0,119. Todas las cepas bacterianas que mostraron valores de absorbancia por encima del punto de corte de  $DO_{410nm}$  0,119 se consideraron positivas. De los 66 sobrenadantes lipolíticos estudiados, 19 produjeron valores de absorbancia superiores al punto de corte. Según los criterios descritos la mayoría de los sobrenadantes de las

cepas bacterianas mostraron valores entre este punto de corte y el valor de 0,300, y solo 4 de ellos mostraron valores superiores a 0,300 (Tabla 17).

**Tabla 16.** Distribución de los microorganismos lipolíticos aislados en las diferentes muestras

Muestra	Colonias bacterianas	Colonias fúngicas	Total colonias
HR11	3	0	3
HR12	0	378	378
HR21	63	15	78
Total	66	393	459

#### IV.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS BACTERIAS TRANSESTERIFICADORAS

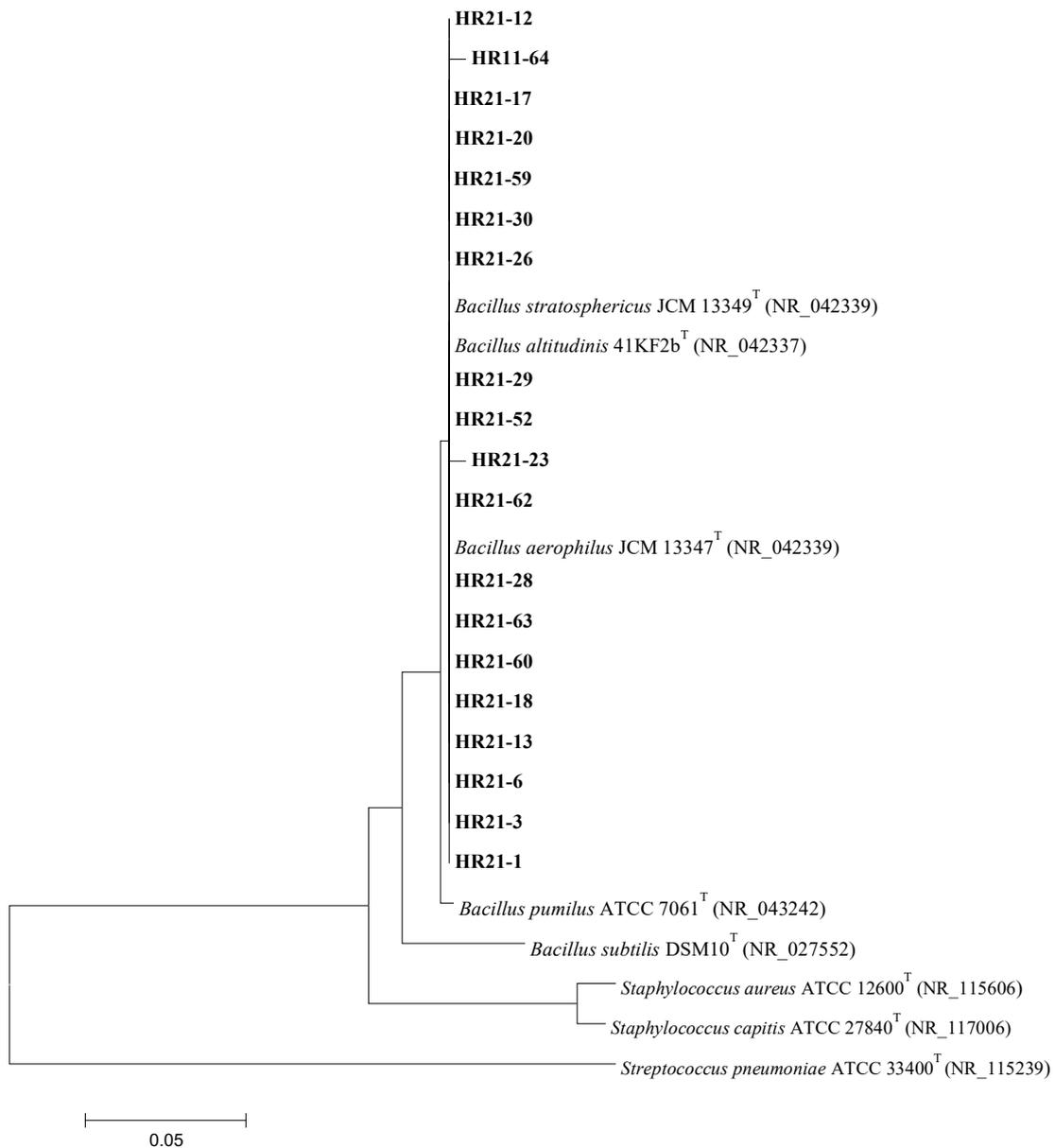
Con el fin de identificar las 19 cepas bacterianas seleccionadas, se realizaron estudios filogenéticos utilizando secuencias parciales de ARNr 16S. Usando los cebadores universales 16F27 y 16R1488 (Tabla 10) se llevó a cabo la secuenciación parcial de un fragmento de 650 pbs del ARNr 16S correspondiente a las posiciones 39 y 689 del gen ARNr 16S de *E. coli*. Tras la búsqueda mediante BLASTn (Altschul et al. 1990) se determinó que todas las cepas aisladas estaban estrechamente relacionadas con el género *Bacillus* con valores de identidad entre el 98% y el 100%. La reconstrucción filogenética llevada a cabo con diferentes métodos fue consistente y sugirió que todas las cepas pertenecen a un taxón que contiene las siguientes especies *Bacillus aerophilus*, *Bacillus stratosphericus* y *Bacillus altitudinis* (Figura 25).

**Tabla 17.** Valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de transesterificación

Cepa	Abs 410 nm	Cepa	Abs 410 nm	Cepa	Abs 410 nm
HR21-1	0,229	HR21-23	0,271	HR21-45	0,001
HR21-2	0,102	HR21-24	0,109	HR21-46	0,023
HR21-3	0,289	HR21-25	0,024	HR21-47	0,067
HR21-4	0,065	HR21-26	0,145	HR21-48	-0,001
HR21-5	0,114	HR21-27	-0,001	HR21-49	0,023
HR21-6	0,203	HR21-28	0,275	HR21-50	0,018
HR21-7	0,096	HR21-29	0,292	HR21-51	0,038
HR21-8	0,095	HR21-30	0,404	HR21-52	0,152
HR21-9	0,088	HR21-31	0,062	HR21-53	-0,018
HR21-10	0,036	HR21-32	0,061	HR21-54	0,05
HR21-11	0,098	HR21-33	0,039	HR21-55	-0,062
HR21-12	0,14	HR21-34	0,084	HR21-56	-0,077
HR21-13	0,462	HR21-35	-0,001	HR21-57	0,023
HR21-14	0,069	HR21-36	-0,046	HR21-58	0,113
HR21-15	0,077	HR21-37	0,118	HR21-59	0,215
HR21-16	0,102	HR21-38	0,001	HR21-60	0,149

Cepa	Abs 410 nm	Cepa	Abs 410 nm	Cepa	Abs 410 nm
HR21-17	0,28	HR21-39	-0,07	HR21-61	0,114
HR21-18	0,258	HR21-40	0,093	HR21-62	0,17
HR21-19	0,087	HR21-41	0,065	HR21-63	0,184
HR21-20	0,327	HR21-42	-0,001	HR11-64	0,317
HR21-21	0,109	HR21-43	0,005	HR11-65	0,108
HR21-22	0,081	HR21-44	0,001	HR11-66	0,101

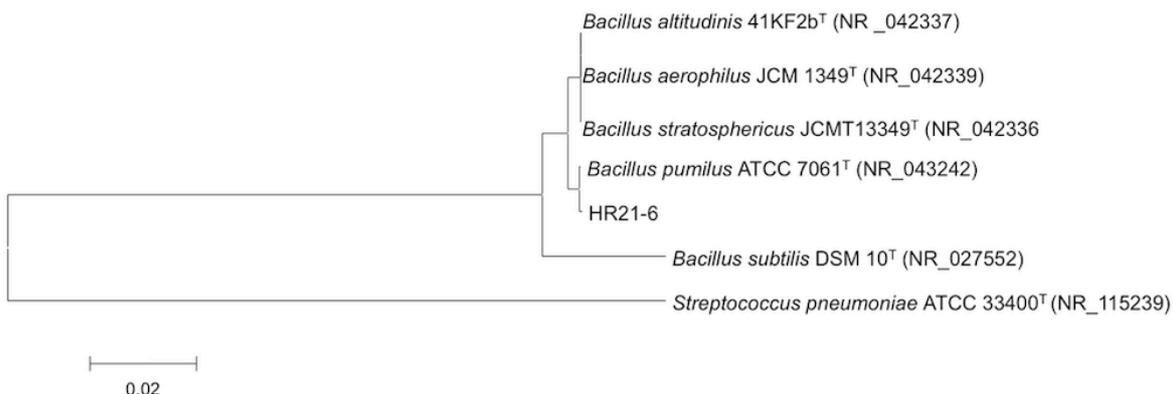
En rojo, las cepas seleccionadas con valores de absorbancia más altos que el control de hidrólisis



**Figura 25.** Relaciones filogenéticas de las cepas aisladas que muestran actividad lipolítica con respecto a otras especies del género *Bacillus*. *Streptococcus pneumoniae* se utilizó como grupo bacteriano externo. Las bacterias aisladas en este trabajo se marcan en negrita. La barra representa un 0,05% de sustituciones por sitio en el alineamiento.

Entre todas las cepas analizadas, HR21-6 fue seleccionada para continuar con el estudio. De todas ellas, ésta presentó el mejor rendimiento en reacciones de transesterificación en compuestos fenólicos (estas reacciones se describen posteriormente en el siguiente apartado).

Debido a que la reconstrucción filogenética utilizando secuencias parciales de ARNr 16S no diferenció claramente entre las especies relacionadas pertenecientes al género *Bacillus*, se procedió a secuenciar el ARNr completo de la cepa HR21-6. Después de un análisis filogenético adicional, la mayor relación filogenética se detectó frente a *B. pumilus* (Figura 26).



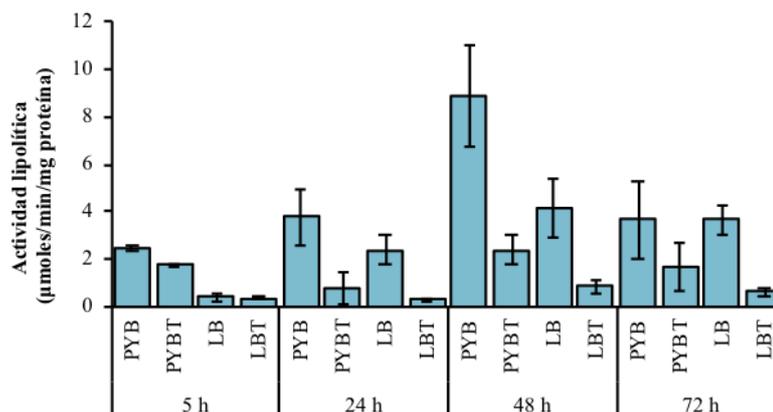
**Figura 26.** Relaciones filogenéticas de la cepa HR21-6 con respecto a otras especies tipo del género *Bacillus*. El ARNr de *Streptococcus pneumoniae* se utilizó como grupo bacteriano externo. Los ARNr utilizados corresponden a 1380 pbs. La barra representa un 0,02% de sustituciones por sitio en el alineamiento.

#### IV.5. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS

En primer lugar, se realizaron estudios de optimización de la producción de lipasas.

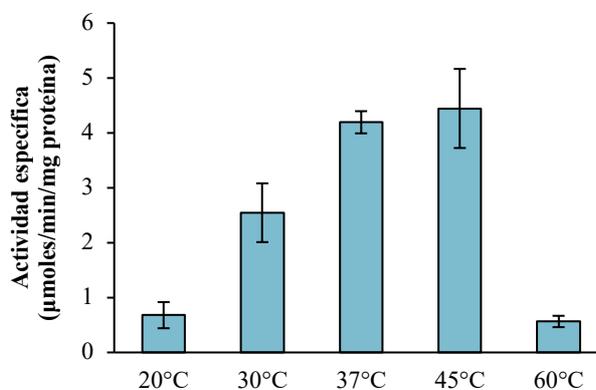
Un factor importante en este estudio fue definir las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa para la producción de un sobrenadante rico en enzimas con capacidad transesterificadora. Para ello se tuvieron en cuenta dos parámetros claves: medio de cultivo y tiempo de incubación. La temperatura de incubación fue de 37°C por ser la temperatura óptima de crecimiento. En esta etapa, aún no estaba definido si las enzimas responsables de la actividad transesterificadora observada eran inducidas por compuestos lipídicos o se expresaban constitutivamente. Por lo tanto, se agregó tributirina a los diferentes medios como posible inductor lipídico. Para realizar estos ensayos de actividad lipolítica se utilizó *p*-NP palmitato como sustrato.

Se determinó que el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6 presentaba su máxima actividad cuando la cepa era cultivada en medio PYB después de 48 h de incubación, correspondiente con la fase estacionaria tardía. En medio LB, la actividad máxima se alcanzó después de 24 h de crecimiento. En ambos casos, la adición de tributirina produjo una disminución en la actividad de las enzimas transesterificadoras (Figura 27).



**Figura 27.** Valores de la actividad transesterificadora específica de proteínas solubles en el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6 crecido en medios LB y PYB, y los mismos medios adicionados con tributirina (LBT y PYBT) a distintos tiempos. Las barras de error muestran el error estándar de  $n=3$ .

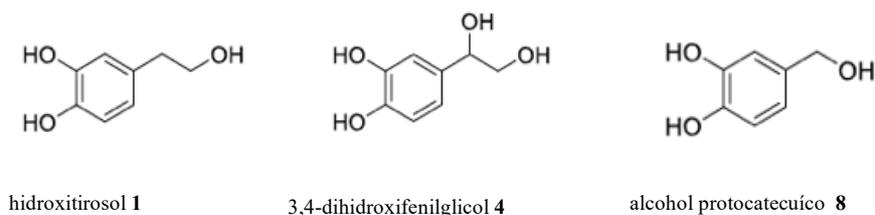
Por otra parte, se determinó la temperatura óptima de reacción. Para ello se creció *Bacillus* sp. HR21-6 en las condiciones óptimas descritas anteriormente. La actividad específica se determinó a partir del sobrenadante liofilizado utilizando *p*-NP palmitato como sustrato a distintas temperaturas de reacción. La temperatura óptima de reacción fue 37°C tal y como se muestra en la Figura 28. Esta elección se vio motivada debido a la alta variabilidad observada a 45°C y por la facilidad que aportaba realizar los ensayos a 37°C.



**Figura 28.** Valores de la actividad transesterificadora específica del sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6 crecido en PYB a 37°C durante 48 h y analizado a distintas temperaturas de reacción. Las barras de error muestran el error estándar de  $n=3$ .

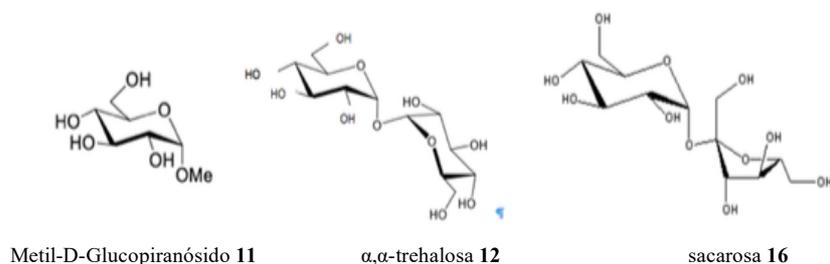
#### IV.6. SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE DERIVADOS LIPÓFILOS DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CARBOHIDRATOS UTILIZANDO EL SOBRENADANTE DE *Bacillus* sp. HR21-6

Este apartado de la Tesis Doctoral fue llevado a cabo en el laboratorio del Prof. José María Fernández Bolaños del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química. Los compuestos fenólicos empleados en este trabajo son moléculas procedentes del olivo con destacada naturaleza antioxidante. Estos compuestos fueron: hidroxitirosol (HT) **1**, 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG) **4** y alcohol protocatecuico **8** (Figura 29).



**Figura 29.** Compuestos fenólicos Hidroxitirosol **1**, 3,4-dihidroxifenilglicol **4**, alcohol protocatecuico **8**

El estudio regioselectivo de carbohidratos se llevó a cabo con tres carbohidratos modelo no reductores y totalmente desprotegidos: el metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido **11**, la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa **12** y la sacarosa **16** (Figura 30).



**Figura 30.** Carbohidratos modelo no reductores. metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido **11**,  $\alpha,\alpha$ -trehalosa **12**, sacarosa **16**

Uno de los objetivos de este apartado fue obtener ésteres fenólicos lipófilos mediante la esterificación de grupos alcohólicos primarios de estos tres polifenoles sin que se vea afectado el grupo catecol, el cual es esencial para mantener la capacidad antioxidante de la molécula.

En un primer ensayo se probaron diferentes de estas cepas transesterificadoras en reacciones de acetilación y desacetilación obteniendo resultados muy similares entre ellos. Además, debido a que el análisis filogenético de estas cepas mostró una gran semejanza entre ellas, solo algunas de estas fueron probadas en las reacciones de acetilación y desacetilación. Finalmente, se decidió seleccionar la cepa *Bacillus* sp. HR21-6 para continuar con el estudio utilizando las condiciones de crecimiento optimizadas para la producción de lipasas, tal como se describe en el apartado anterior.

#### IV.6.1. Reacciones de acetilación de polifenoles procedentes del olivo

Las primeras reacciones planteadas en este trabajo fueron las de transesterificación de grupos acetilo en los compuestos fenólicos **1**, **4** y **8** con el objetivo de obtener derivados parcialmente acilados.

Este tipo de reacciones permiten en una fase inicial determinar la regioselectividad de las enzimas estudiadas. Con fines comparativos, también se estudió en paralelo una lipasa comercial procedente de *Candida antarctica* (CALB).

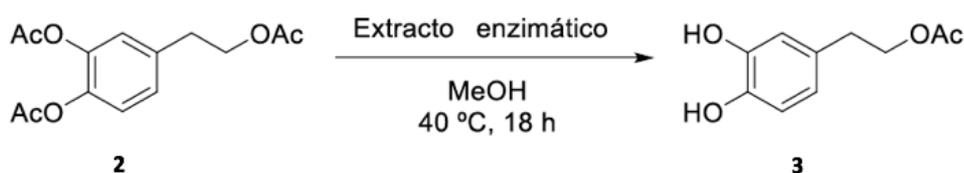
En general, la acetilación de estos compuestos utilizando el extracto de *Bacillus* sp. HR21-6 no fue muy exitosa ya que en su mayoría se obtuvieron conversiones muy bajas, a pesar de que era la mejor de las cepas aisladas. La optimización de las condiciones de cultivo para la producción de lipasas tampoco mejoró los niveles de transesterificación. Debido al poco éxito obtenido se optó por examinar la desacetilación regioselectiva de estos compuestos tras un proceso inicial de peracetilación de los mismos.

#### I.V.6.2. Reacciones de desacetilación en polifenoles procedentes del olivo

Para llevar a cabo la desacetilación selectiva de los compuestos fenólicos analizados, previamente fue necesario llevar a cabo un proceso de peracetilación, descrito en el apartado III.17.1 de Materiales y Métodos.

##### IV.6.2.1. Desacetilación del hidroxitirosol peracetilado

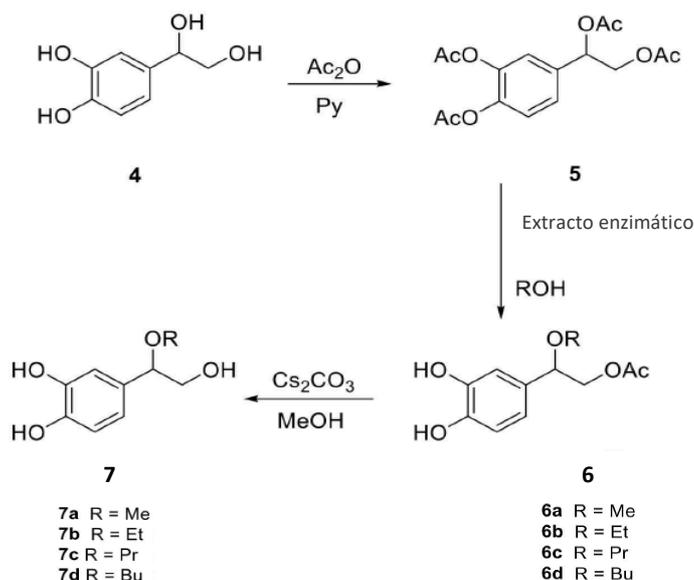
La *O*-desacetilación del hidroxitirosol peracetilado **2** se efectuó usando un alcohol alifático (MeOH) como disolvente y el sobrenadante liofilizado de la cepa *Bacillus* sp. HR21-6. La reacción fue completamente regioselectiva en las posiciones fenólicas, y dio un derivado monoacetilado **3** en la posición alifática con excelentes rendimientos (90%) (Figura 31). El derivado **3** es un compuesto natural presente en el aceite de oliva virgen extra (Brenes et al. 1999).



**Figura 31.** Desacetilación regioselectiva del hidroxitirosol peracetilado **2** catalizada por el extracto enzimático de *Bacillus* sp. HR21-6, dando como resultado hidroxitirosol monoacetilado **3**

##### IV.6.2.2. Desacetilación del DHPG peracetilado

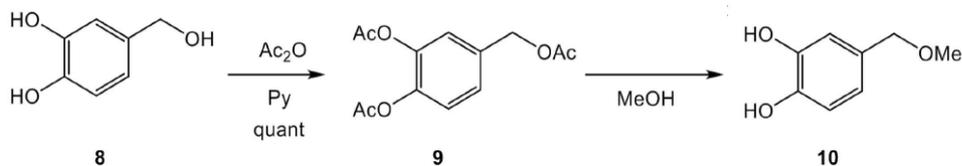
En la desacetilación del DHPG peracetilado el grupo acetoxi en la posición primaria permaneció intacto, mientras que el grupo acetoxi en la posición bencílica fue sustituido por el grupo alcoxi correspondiente. Esto dio como resultado la síntesis de derivados eterificados monoacetilados **6a-d** (Figura 32). Un factor para tener en cuenta es que si las reacciones se producían en presencia del alcohol alifático MeOH como disolvente y el sobrenadante liofilizado de *Bacillus* sp HR21-6 como biocatalizador se llegaba a una conversión completa del DHPG peracetilado (compuesto **5**) al compuesto **6a** con rendimientos de hasta el 79%, mientras que, en presencia de otros alcoholes alifáticos, a medida que aumentaba el número de carbonos del alcohol fueron necesarios tiempos de reacción más altos y mayores cantidades de extracto enzimático. En el siguiente paso, los correspondientes derivados completamente desacetilados **7a-d** se prepararon mediante una metanolisis básica en presencia de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  como base débil con un rendimiento variable.



**Figura 32.** Desacetilación regioselectiva del DHPG peracetilado **5** catalizado por el extracto enzimático de *Bacillus* sp. HR21-6, dando como resultado los diferentes derivados eterificados y monoacetilados **6a-d** y sus correspondientes derivados desacetilados **7a-d**

#### IV.6.2.3. Desacetilación del alcohol protocatecuico peracetilado

En la desacetilación del alcohol protocatecuico peracetilado **9** utilizando MeOH como disolvente (Figura 33), el grupo acetoxi de la posición bencílica fue sustituido por un grupo metoxi, originando el compuesto **10**.



**Figura 33.** Deacetilación regioselectiva del alcohol protocatecuico peracetilado **9** catalizada por el extracto enzimático de *Bacillus* sp. HR21-6, dando como resultado el éter metílico del alcohol protocatecuico en la posición 2 (compuesto **10**)

#### IV.6.3. Reacciones de acetilación de carbohidratos

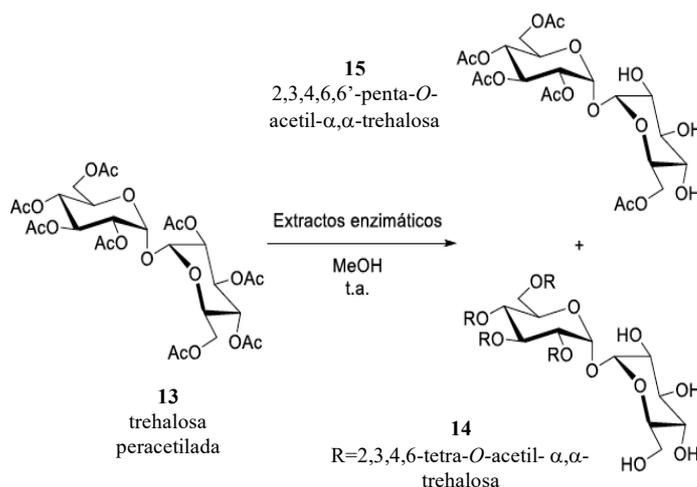
El estudio de los distintos carbohidratos se abordó siguiendo las mismas pautas que para los compuestos fenólicos. De forma similar a lo que ocurría en la acetilación de polifenoles, para los compuestos **11**, **12** y **16**, incluso después de tiempos de reacción largos, no sólo se observó un bajo grado de conversión a los derivados acetilados, sino también una baja regioselectividad, traducida en una mezcla compleja de productos.

#### IV.6.4. Reacciones de desacetilación de carbohidratos peracetilados

Teniendo en cuenta la poca efectividad de las acetilaciones y el éxito de las desacetilaciones en los sustratos fenólicos, se decidió ensayar también las desacetilaciones en los derivados

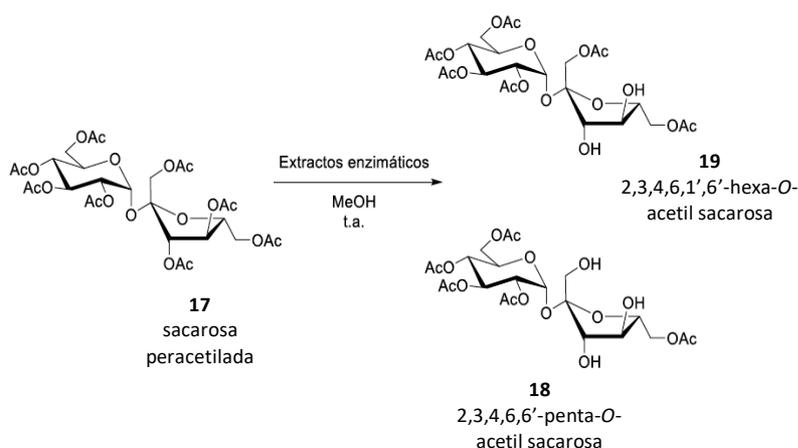
peracetilados de carbohidratos. Lo más destacable en las reacciones de desacetilación usando el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6 fue la pérdida de simetría observada al usar como sustratos tanto la trehalosa y la sacarosa peracetiladas.

En el caso de la trehalosa peracetilada **13**, la desacetilación solo se llevó a cabo en uno de los anillos de glucosa, total o parcialmente, dejando el segundo completamente acetilado, lo que dio lugar a una pérdida de la simetría en la molécula de la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa en dos pasos, peracetilación y desacetilación regioselectiva originando dos productos mayoritarios el 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-  $\alpha,\alpha$ -trehalosa **14** y 2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetil- $\alpha,\alpha$ -trehalosa **15** (Figura 34).



**Figura 34.** *O*-Desacetilación regioselectiva de la trehalosa peracetilada **13** catalizada por el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6, dando como resultado 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-  $\alpha,\alpha$ -trehalosa **14** y el 2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetil- $\alpha,\alpha$ -trehalosa **15**

La desacetilación regioselectiva de la sacarosa peracetilada **17** también originó la pérdida de simetría de la molécula dando los compuestos 2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetilsacarosa **18** y 2,3,4,6,1',6'-hexa-*O*-acetilsacarosa **19** que corresponden a la desacetilación del anillo de fructosa sin alterar el anillo de glucosa (Figura 35).



**Figura 35.** *O*-Desacetilación regioselectiva de la sacarosa peracetilada **17** catalizada por el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6, dando como resultado 2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetilsacarosa **18** y 2,3,4,6,1',6'-hexa-*O*-acetilsacarosa **19**

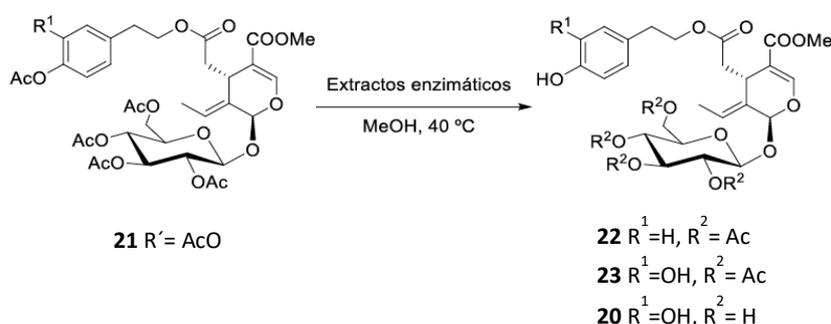
#### IV.6.5. Reacciones de desacetilación de la oleuropeína

La oleuropeína es un secoiridoide aislado de las hojas y los frutos verdes de *Olea europaea*, que confiere el característico sabor amargo al aceite. Este compuesto es de gran interés debido entre otras, a sus propiedades antioxidantes, antiproliferativas y apoptóticas, o su efecto vasodilatador (Vanella et al. 2012; Goldsmith et al. 2018; Omar 2010a).

Teniendo en cuenta que las reacciones de acetilación con los diferentes extractos no fueron altamente regioselectivas tal y como se demostraron en los primeros ensayos se optó por ensayar directamente las reacciones de desacetilación de la oleuropeína peracetilada.

Por otra parte, debido al éxito obtenido en los resultados anteriores, tanto en sustratos fenólicos como en carbohidratos, y teniendo en cuenta la presencia de ambos compuestos en la estructura de la oleuropeína, se decidió probar la actividad del sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6 sobre este sustrato para determinar la quimioselectividad de la reacción.

La desacetilación de la oleuropeína peracetilada **21** procedió en un tiempo de reacción muy corto y con poca selectividad. Se detectó una alta proporción del compuesto completamente desprotegido **20**, junto a una pequeña proporción de los derivados tetraacetilados en la unidad de glucosa **22** ó **23**, y del compuesto peracetilado de partida **21** (Figura 36).



**Figura 36.** *O*-Desacetilación regioselectiva de la oleuropeína peracetilada **21** utilizando el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6, dando como resultado oleuropeína desacetilada y los derivados tetraacetilados en la unidad de glucosa **22** ó **23**

#### IV.7. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE *Bacillus* sp. HR21-6

Para este fin se llevaron a cabo diferentes estrategias: purificación a partir del propio organismo, identificación de las lipasas y esterasas en el genoma de la bacteria y análisis del secretoma. Los intentos de purificación de la proteína de interés a partir del sobrenadante del cultivo del propio organismo mediante columnas hidrofóbicas no condujeron a ningún resultado positivo, por lo que el estudio se centró en el análisis del secretoma de *Bacillus* sp. HR21-6.

##### IV.7.1. Secuenciación y análisis bioinformático del genoma de *Bacillus* sp. HR21-6

Con el objetivo de identificar el gen responsable de la actividad lipolítica en el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6, en un primer paso, se procedió a la secuenciación y ensamblaje del genoma de esta cepa con el objetivo de tener el catálogo completo de genes de dicha estirpe. Esto

fue realizado por la Unidad de Genómica Funcional, Servicio de Biología, CITIUS. Para ello se utilizó una tecnología de secuenciación de última generación a través de un pirosecuenciador (*Genome Sequencer FLX System 454*, Roche). El ensamblaje de la secuencia se realizó usando el programa SOAP de novo, versión 1.05. Tras la optimización del ensamblaje mediante el emparejamiento de extremos y las relaciones de solapamiento para construir *contigs*, se obtuvo el ensamblaje final de la secuencia con un total de 63 *contigs*, un tamaño de 3.727.231 pbs y 41,26% de contenido G+C (Tabla 18). El genoma se anotó utilizando el servidor RAST, el cual realiza anotaciones rápidas utilizando tecnología de subsistemas y se determinó un porcentaje de similitud del 96,12% con *Bacillus pumilus*.

**Tabla 18.** Datos de secuenciación y filtración de datos del genoma de *Bacillus* HR21-6

Nombre de la muestra	Tamaño medio (pbs)	Total de bases secuenciadas	tamaño de ensamblaje (pbs)	Contigs	Genes anotados	Contenido G+C
ADN <i>Bacillus</i> sp. HR21-6	407	84.233.404	3.727.231	63	3.961	41,26%

En el análisis del genoma de *Bacillus* sp. HR21-6 se determinó con una similitud elevada la presencia 5 lipasas y 27 esterases.

#### IV.7.2. Análisis del secretoma de *Bacillus* sp. HR21-6

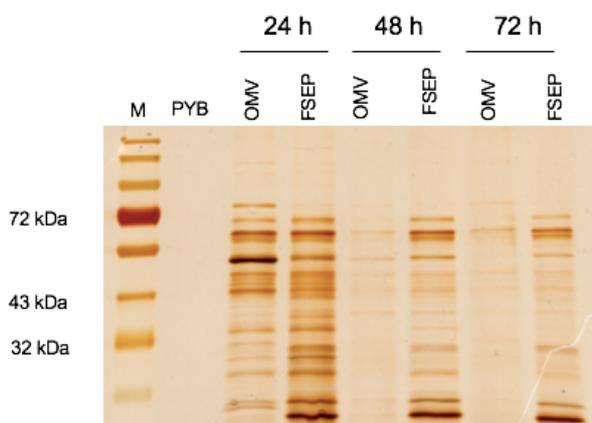
El análisis del secretoma de *Bacillus* sp. HR21-6 se inició con el aislamiento de dos fracciones extracelulares mediante centrifugación diferencial: la fracción extracelular soluble libre (FSEP; *Free Soluble Extracellular Fraction*) y la fracción unida a las vesículas de membrana (OMV; *Outer Membrane Vesicles*). Para ello, esta cepa fue crecida en medio PYB a 37°C y se recogieron muestras a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h) para su análisis.

El siguiente paso tras el aislamiento de las dos fracciones a diferentes tiempos fue comprobar la integridad de estas muestras mediante SDS-PAGE. Para ello se cargaron 2 µg de extracto de proteína total de cada muestra en geles de acrilamida al 10% y se tiñeron con nitrato de plata (Figura 37). Estos geles también fueron usados para la corrección de la cuantificación de proteínas mediante densitometría. Finalmente, tras comprobar un patrón proteico similar en todos los tiempos analizados, se decidió analizar sólo las fracciones obtenidas a las 48 h debido a que en ese punto se encontró muestras con una mayor actividad transesterificadora cuando se cuantificaba el ensayo colorimétrico usando como sustrato *p*-NP palmitato (Figura 37).

Para la identificación de las proteínas secretadas, se analizaron las muestras previamente digeridas con tripsina mediante QTRAP 5500, utilizando enfoques EM ER (*Resolución Mejorada de Masa*). Mediante este procedimiento se identificaron un total de 28 proteínas en la fracción de OMV y 48 en la fracción de FSEP (Tabla 19). De todas las proteínas identificadas sólo una mostraba homología con enzimas lipolíticas: una isoforma de la ramnogalacturonano acetiltransferasa. Esta enzima estaba presente en las fracciones FSEP, pero no en las OMV.

Para confirmar este hallazgo, se realizó un análisis más exhaustivo de esta enzima mediante RMN (Resonancia Magnética Nuclear) en el que se analizaron dos péptidos (carga 2+ y 3+) con al menos tres transiciones cada uno. Mediante este análisis, se detectó que en las muestras FSEP, los picos detectados con la transición deseada para el péptido GATPLLLTPVGR eluyeron en los

mismos tiempos de retención. Estas transiciones magnéticas son originadas en el núcleo de la molécula y es específica para cada péptido. En el caso de las muestras de OMV, no se detectó ningún pico que presentase dicha transición a ese tiempo de retención (Figura 38).



**Figura 37.** Gel SDS-PAGE teñido con nitrato de plata, donde se muestra las proteínas presentes en las FSEP y OMV del sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6 recogidas a diferentes tiempos. **M.** Marcador de pesos moleculares. **PYB.** Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *Bacillus* sp. HR21-6.

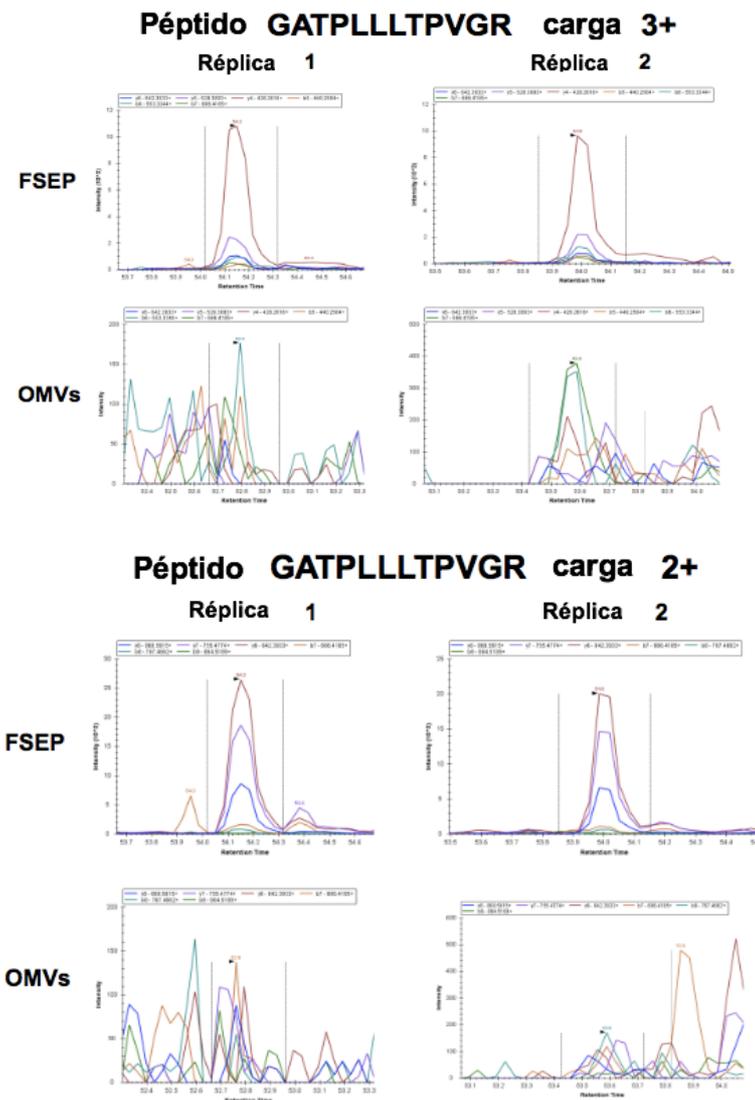
**Tabla 19.** Proteínas aisladas de las fracciones FSEP y OMV de *Bacillus* sp. HR21-6 y número de péptidos encontrados en cada una de ellas con un índice de confianza del 95%

FSEP (Free Soluble Extracellular Fraction) 48 h	Proteína	Nº de péptidos
1	Proteína hipotética	24
2	Catalasa (EC 1.11.1.6)	8
3	Proteína hipotética	7
4	Complejo de la piruvato deshidrogenasa (EC1.8.1.4)	6
5	Oligopéptido	5
6	Subtilisina E (EC:3.4.21.62)	5
7	Fosfopentomutasa (EC 5.4.2.7)	3
8	ATP carboxiquinasa [ATP] (EC 4.1.1.49)	3
9	Oxidoreductasa	2
10	Aldo/ceto reductasa	2
11	Ribonucleasa (EC 3.1.27.-)	2
12	<b>Ramnogalacturonano acetilesterasa</b>	3
13	Proteína de la familia del anclaje de superficie de la pared celular, motivo LPXTG	3
14	Fosfoglicerato mutasa (EC 5.4.2.1)	3
15	Arginasa (EC 3.5.3.1)	2
16	Proteína hipotética	2
17	Leucina deshidrogenasa (EC 1.4.1.9)	1
18	Alanina deshidrogenasa e (EC 1.4.1.1)	1
19	Citosol aminopeptidasa (PepA) (EC 3.4.11.1)	1
20	Proteína de resistencia a telurio (TerD)	1
21	Subtilisina Carlsberg (EC:3.4.21.62)	1

<b>FSEP (Free Soluble Extracellular Fraction) 48 h</b>	<b>Proteína</b>	<b>N° de péptidos</b>
22	Manganeso superóxido dismutasa (EC1.15.1.1)	1
23	Proteína hipotética	1
24	Metionina sintasa II	1
25	Lipoproteína yhcN	1
26	Proteína de unión a ADN (Dps)/ proteína antioxidante de ferritina de unión a hierro / ferroxidasa (EC 1.16.3.1)	1
27	Peptidasa M42	1
28	Tripeptido aminopeptidasa (EC 3.4.11.4)	1
29	Fosfato acetiltransferasa (EC 2.3.1.8)	1
30	Oligoendopeptidasa F	1
31	Inhibidor de proteinasas intracelular (BsuPI)	1
32	Cisteína sintasa (EC 2.5.1.47)	1
33	Peptidasa T (EC 3.4.11.4)	1
34	Proteína anclada a la pared celular (IsdC)	1
35	Familia de proteínas ThiJ/PfpI	1
36	Proteína hipotética	1
37	Factor de reciclaje ribosómico	1
38	4-oxalocrotonato tautómera (EC 5.3.2.-)	1
39	Gamma-glutamyltranspeptidasa (EC 2.3.2.2)	1
40	NADH dependiente de butanol deshidrogenasa A (EC 1.1.1.)	1
41	(3R)-hidroximiristoil-deshidratasa [proteína transportadora de acil] (EC 4.2.1.-)	0
42	Proteína que cataliza la escisión del <i>p</i> -aminobenzoil-glutamato a <i>p</i> -aminobenzoato y glutamato, subunidad A	1
43	Proteína de resistencia a telurio (TerD)	1
44	Proteasa dependiente de ATP (EC 3.4.21.53) LonB Tipo I	1
45	Hidroxilasa del citocromo P450	1
46	GTP ciclohidrolasa I (EC 3.5.4.16)	1
47	Transportador de manganeso ABC, proteína de unión periplásmica SitA	1
48	Proteína hipotética	1

<b>OMV (Outer Membranes Vesicles) 48 h</b>	<b>Proteína</b>	<b>N° de péptidos</b>
1	Catalasa (EC 1.11.1.6)	20
2	Proteína hipotética	14
3	Glutamina sintetasa tipo I (EC 6.3.1.2)	15
4	Dihidrolipoamida deshidrogenasa del complejo piruvato deshidrogenasa (EC 1.8.1.4)	8
5	Peptidasa M42	6
6	Sintasa 6,7-dimetil-8-ribitllumazina (EC 2.5.1.78)	6
7	Transaldolasa (EC 2.2.1.2)	4
8	Arginasa (EC 3.5.3.1)	4
9	Proteasa de serina extracelular	4

<b>OMV (Outer Membranes Vesicles) 48 h</b>	<b>Proteína</b>	<b>N° de péptidos</b>
10	Proteína de unión a ADN Dps / proteína antioxidante de ferritina de unión a hierro / ferroxidasa (EC 1.16.3.1)	4
11	Manganeso superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)	3
12	Proteína hipotética	3
13	Leucina deshidrogenasa (EC 1.4.1.9)	3
14	Amino peptidasa (EC 3.4.11.-)	2
15	Proteína hipotética	2
16	2,3-bisfosfoglicerato fosfoglicerato mutasa (EC 5.4.2.1)	2
17	Manganeso superóxido dismutasa	1
18	Oligoendopeptidasa F	1
19	ATP carboxiquinasa [ATP] (EC 4.1.1.49)	1
20	Transportador de manganeso ABC, proteína de unión al ATP SitB	2
21	Cefalosporina C deacetilasa	1
22	Subunidad translocasa de preproteína YajC (TC 3.A.5.1.1)	1
23	Fosfopentomutasa (EC 5.4.2.7)	2
24	Citosol amino peptidasa (PepA) (EC 3.4.11.1)	1
25	Glutamil amino peptidasa (EC 3.4.11.7)	1
26	Transportador de estafilobactina ABC de Siderforo	1
27	Dihidroneopterina aldolasa (EC 4.1.2.25)	1
28	3-deshidroquinato deshidratasa I (EC 4.2.1.10)	1
28	3-deshidroquinato deshidratasa I (EC 4.2.1.10)	1



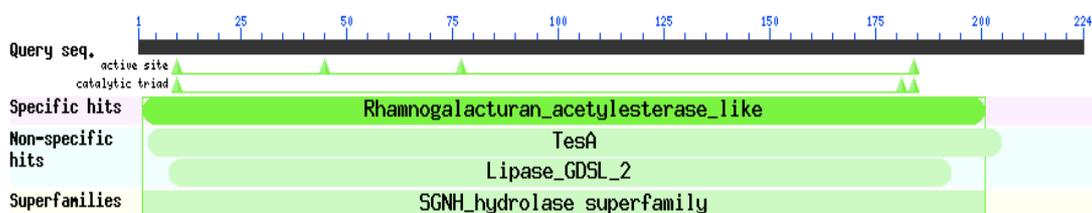
**Figura 38.** RMN de la enzima ramnogalacturonano acetiltransferasa detectada en la fracción FSEP del sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6. FSEP (*Free Soluble Extracellular Fraction*). OMV (*Outer Membrane Vesicles*).

La proteína de *Bacillus* sp. HR21-6 identificada como ramnogalacturonano acetiltransferasa mediante proteómica, fue nombrada como AE6L. El análisis bibliográfico de esta proteína sugirió que tenía potencial para llevar a cabo reacciones de acetilación/desacetilación, y por tanto, podría ser la enzima presente en el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6 responsable de llevar a cabo las reacciones de transesterificación.

## IV.8. ANÁLISIS *IN SILICO* DE LA ENZIMA AE6L

### IV.8.1. Clasificación y dominios de la enzima AE6L

La búsqueda de dominios conservados en esta proteína se realizó utilizando la base de datos CDD (*Conserved Domain Database*) (Marchler-Bauer et al. 2004) e indicó la presencia en AE6L de un dominio conservado común en todas las hidrolasas de la subfamilia SGNH de la familia II o GDSL (Akoh et al. 2004) (Figura 39) con un *score* total de 433 y un *e-value* de  $1e^{-153}$ .



**Figura 39.** Esquema que muestra la posición del dominio conservado SGNH-Hidrolasa de AE6L

Mediante el uso del programa BLAST se determinaron los porcentajes de semejanza de AE6L con algunas de sus proteínas relacionadas disponibles en la base de datos (Tabla 20). El análisis mostró el alto porcentaje de semejanza de AE6L con proteínas pertenecientes a la subfamilia SGNH, como son la proteína de *Bacillus stratosphericus* LAMA 585 (100 %) y de otras especies diferentes del género *Bacillus* (97-99 %).

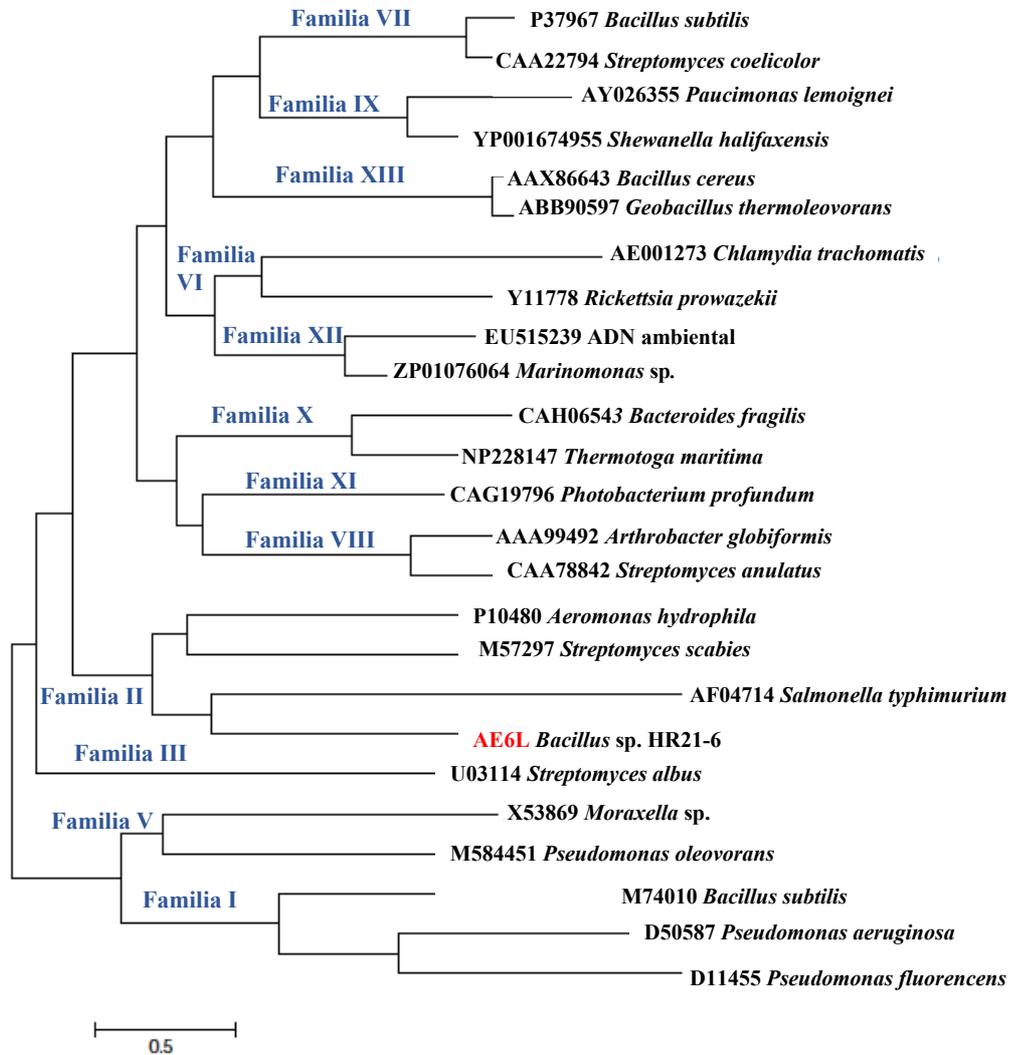
**Tabla 20.** Semejanza de la proteína AE6L con otras proteínas homólogas en diferentes especies del género *Bacillus* depositadas en las bases de datos

Especie	Proteína	Longitud (aas)	% de semejanza	Nº de acceso
<i>Bacillus stratosphericus</i> LAMA 585	ramnogalacturonano acetilsterasa	433	100	EMI14919.1
MULTISPECIES: [ <i>Bacillus</i> ]	ramnogalacturonano acetilsterasa	433	100	WP_017358823.1
MULTISPECIES: [ <i>Bacillus altitudinis</i> complex]	ramnogalacturonano acetilsterasa	432	99	WP_048002709.1
<i>Bacillus pumilus</i>	ramnogalacturonano acetilsterasa	432	99	WP_017366858.1
<i>Bacillus australimaris</i>	ramnogalacturonano acetilsterasa	424	97	WP_060699997.1

Con estos datos podemos clasificar a la enzima AE6L como miembro de la familia II o GDSL según la clasificación de lipasas y esterases bacterianas (Arpigny and Jaeger 1999), las cuales poseen un pentapéptido conservado característico. Esta secuencia conservada no está conformada por la típica secuencia en glicina – X – serina – X - ácido aspártico, en su lugar se establece una glicina, seguido de un ácido aspártico, una serina, una leucina y en algunos casos una serina, de ahí que se le denomine familia GDSLs. Normalmente, como la última serina no se conserva en todas las proteínas de esta familia, se le ha reducido el nombre a familia GDSL.

Llevando a cabo un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas que forman esta familia, se ha visto que algunas tienen conservados en la misma posición cuatro aminoácidos que están implicados en la actividad catalítica de la enzima, dando lugar a una subfamilia. Estos aminoácidos son una serina, un ácido glutámico, una asparagina y una histidina, donde la serina provoca el ataque nucleofílico, el ácido glutámico y la asparagina son donadores de protones y la histidina actúa desprotonando a la serina (Akoh et al. 2004).

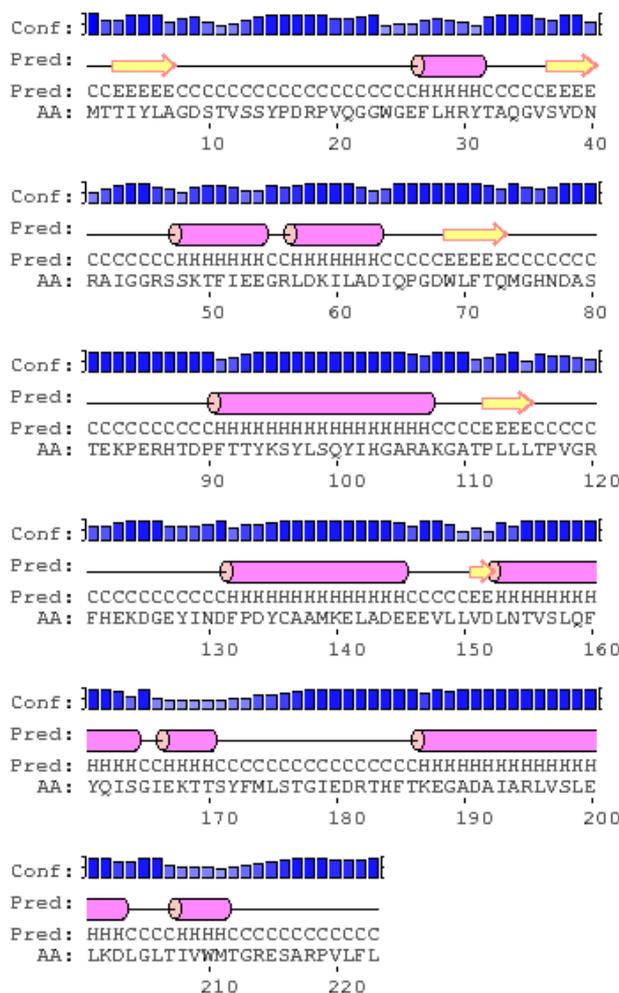
En la Figura 40 se muestra la reconstrucción filogenética que recoge la distancia de AE6L con respecto a otras enzimas lipolíticas pertenecientes a algunas familias de enzimas lipolíticas. Como se observa en esta figura, AE6L se agrupa con otras lipasas de la familia II, tal y como se predijo mediante análisis bioinformáticos.



**Figura 40.** Árbol filogenético que muestra la posición de AE6L de *Bacillus* sp. HR21-6 con respecto a otras enzimas pertenecientes a diferentes familias de enzimas lipolíticas bacterianas. La escala muestra la distancia correspondiente a un 50% de divergencia. El árbol se construyó utilizando el programa MEGA 5.0 con el algoritmo Neighbor-Joining.

#### IV.8.2. Análisis de la estructura secundaria de la enzima AE6L

El análisis de la estructura secundaria de AE6L se llevó a cabo utilizando el programa PSIPred (McGuffin et al. 2000) (Figura 41). Según esta predicción, la proteína AE6L está constituida por 9 hélices alfa (42 %) y 5 hojas plegadas beta (10%).

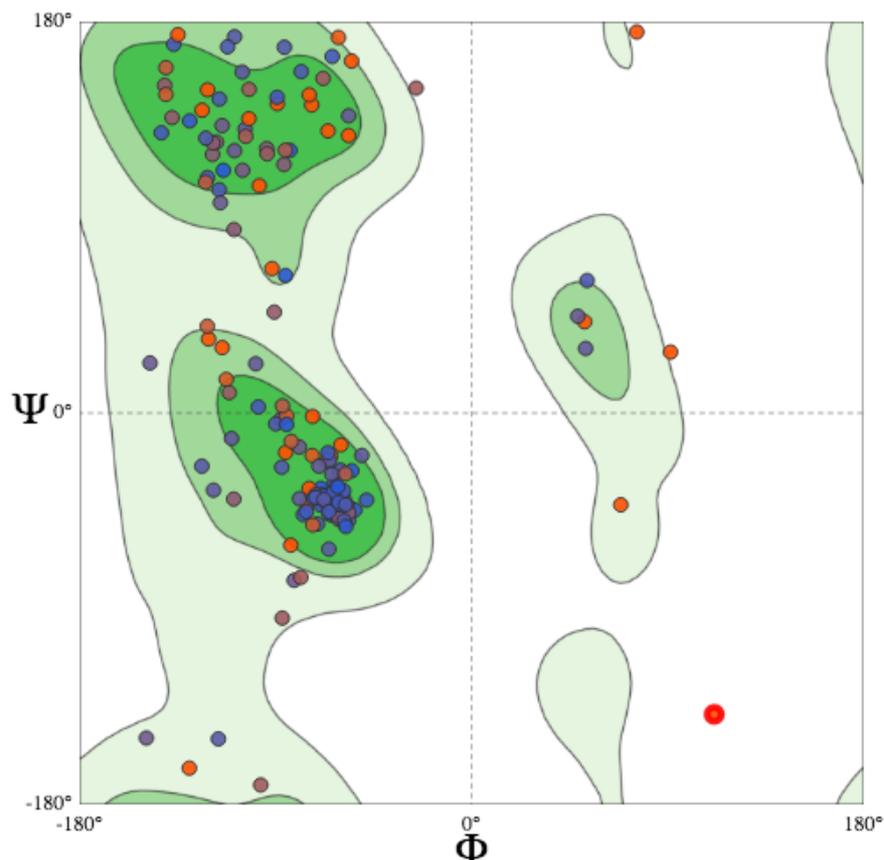


**Figura 41.** Esquema de la estructura secundaria de AE6L utilizando el programa PSIPred. Las hélices alfa ( $\alpha$ ) están representadas por cilindros de color rosa; las hojas plegadas beta ( $\beta$ ) se representan por flechas amarillas. Las barras azules indican el grado de fiabilidad de la predicción. Conf: Fiabilidad de la predicción; Pred: predicción de la estructura secundaria; AA: secuencia de aminoácidos.

#### IV.8.3. Predicción de la estructura tridimensional de la proteína AE6L

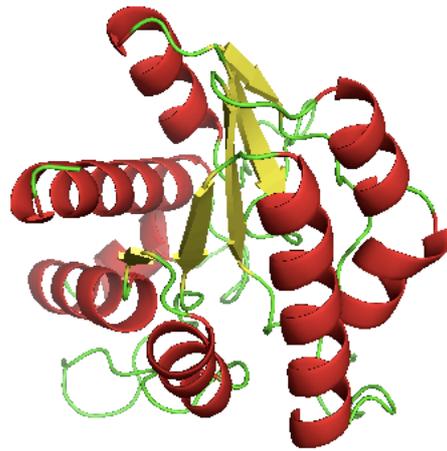
Para generar la estructura tridimensional de la proteína AE6L se utilizó la plataforma I-TASSER (Roy et al. 2010) que permite realizar la predicción automatizada de la estructura y función de proteínas. La estructura tridimensional de la proteína AE6L, se determinó por el método de modelado por homología, el cual utiliza como referencia proteínas con secuencias resueltas y de estructura tridimensional disponibles en PDB (*Protein Data Bank*). La evaluación del modelo se realizó mediante la herramienta “*Structure assessment*” del programa SWISSMODEL (Arnold et al. 2006) determinando la correcta conformación geométrica de la proteína por medio del análisis estereoquímico presentado en el gráfico de Ramachandran, el cual cumplió esencialmente con los

parámetros estereoquímicos de una estructura estable, con un 86.7% de residuos en las regiones más favorables (Figura 42). Los sitios donde hay mayor probabilidad de que los ángulos que conforman la estructura proteica sean reales corresponden a las regiones designadas como más favorables mientras que las que corresponden a sitios con menor probabilidad de acercamiento al ángulo correcto se designan como adicionalmente permitidas, generosamente permitidas y las no permitidas. Al analizar los resultados de la evaluación es posible deducir que el modelo constituye una aproximación a la estructura real de la proteína AE6L.



**Figura 42.** Plot de Ramachandran que muestra la conformación estereoquímica de los ángulos phi (giro en torno al enlace que une al C alfa con el C del plano anterior) y psi (giro al enlace que une al C alfa con el N del plano posterior) de la estructura tridimensional de la proteína AE6L. El código de colores indica la fiabilidad de las predicciones, desde las más favorables (verde oscuro) a las no permitidas (blanco). Los residuos se muestran como círculos.

El modelo final fue visualizado con PyMOL (Delano 2002) y se determinó tanto la predicción de su estructura tridimensional (Figura 43), como las regiones donde hubo coincidencias con la estructura secundaria de la proteína Ideo (ramnogalacturonano acetiltransferasa) de *Aspergillus aculeatus*, con la que se determinó una identidad del 27% (Figura 44).



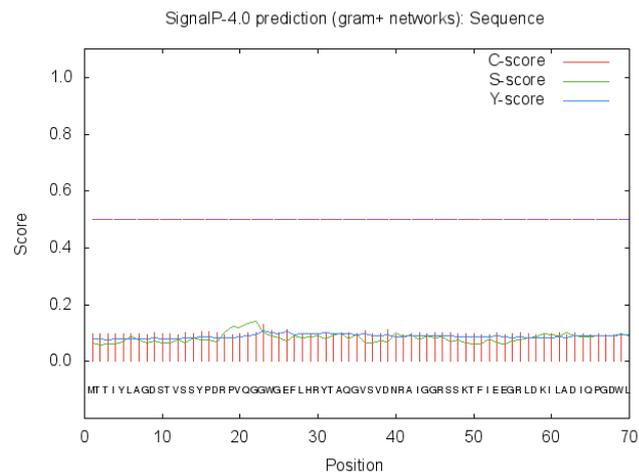
**Figura 43.** Modelo tridimensional de AE6L generado por I-TASSER y visualizado con PyMOL. las hojas plegadas beta ( $\beta$ ) se representan por flechas amarillas, las hélices alfa ( $\alpha$ ) están representadas de color rojo, y los bucles en verde.



**Figura 44.** Estructuras tridimensionales superpuestas de la proteína AE6L (azul) y de la proteína 1deo de *Aspergillus aculeatus* (rojo)

#### IV.8.4. Predicción de la localización celular de la enzima AE6L

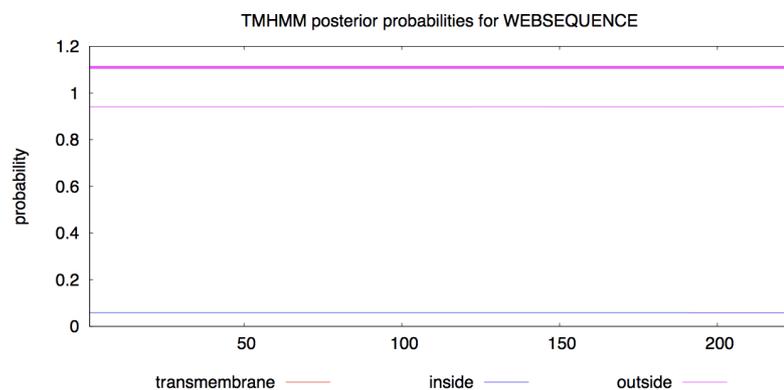
A pesar de haber encontrado a la proteína AE6L en el secretoma, el análisis informático de su secuencia mediante el programa informático SignalP 4.0 (Bendtsen et al. 2004), utilizando el modelo de Hidden Markov (HMM) predijo que la enzima AE6L carece de péptido señal (Figura 45).



**Figura 45.** Predicción de la presencia de péptido señal según el programa informático SignalP 4.0

#### IV.8.5. Predicción de la topología de AE6L

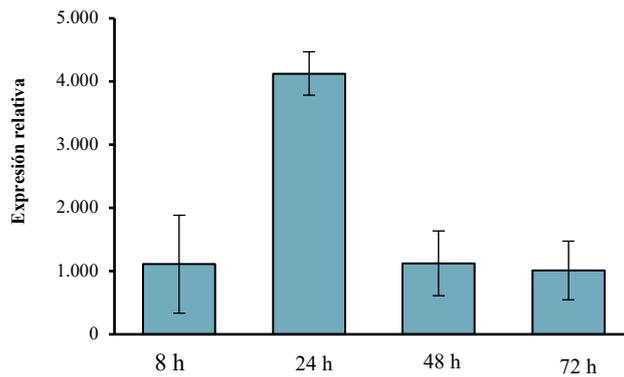
Mediante el programa TMHMM Server v.2.0 (Krogh et al. 2001) se llevó a cabo la predicción de la existencia de regiones transmembrana, basándose en la hidrofobicidad de las distintas regiones de la proteína AE6L. En este caso, el programa predijo que no existían posibles regiones transmembrana sugiriendo que no se encuentra anclada a la membrana bacteriana (Figura 46).



**Figura 46.** Predicción de hidrofobicidad de las distintas regiones de AE6L según el programa TMHMM Server

#### IV.9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN QUE CODIFICA LA PROTEÍNA AE6L MEDIANTE RT-qPCR

Con el propósito de estudiar la expresión del gen que codifica la proteína AE6L en *Bacillus* sp. HR21-6 se procedió a cuantificar los niveles de ARNm a diferentes tiempos de cultivo de la bacteria (8, 24, 48 y 72 h). Tal y como se muestra en la Figura 47 se observó una mayor expresión tras 24 h de cultivo de *Bacillus* sp. HR21-6 en el medio en PYB a 30°C. En este ensayo se empleó la expresión del gen *gyrA* para normalizar el cálculo.



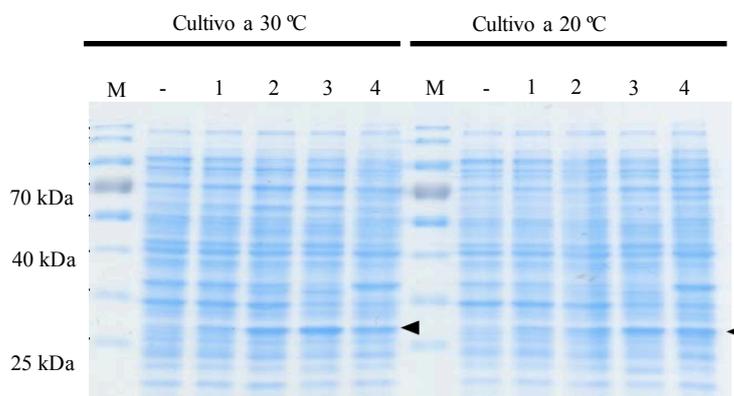
**Figura 47.** Expresión de AE6L a diferentes tiempos del cultivo de *Bacillus* sp. HR21-6. El cálculo de expresión se normaliza utilizando la expresión del gen *gyrA*. Las barras de error muestran el error estándar de  $n=3$ .

#### IV.10. EXPRESIÓN DE LA ENZIMA AE6L EN *Escherichia coli*

##### IV.10.1. Clonación y expresión del gen que codifica la proteína AE6L en *E. coli*

El primer paso para llevar a cabo la expresión de AE6L en *E. coli*, fue la síntesis de codones optimizados de la proteína etiquetada con un epítipo de 6 histidinas (6xHis tag) en su extremo C-terminal. Posteriormente se seleccionó el vector de expresión pMAB36, en el cual se insertó la secuencia del gen de AE6L (672 pbs) en los sitios de restricción *BseRI* y *KpnI* bajo el control del promotor dual T7/Cascade que permite la inducción tanto con IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) (T7), como con salicilato (Cascade).

El plásmido pMAB36-AE6L-6xHis (pMAB-AE6L) se introdujo mediante transformación química en células competentes de *E. coli* BL21 (DE3). Posteriormente, se procedió al crecimiento e inducción de la cepa recombinante como se indica en el apartado III.18 de Materiales y Métodos. Los extractos celulares de los cultivos inducidos se analizaron mediante electroforesis en un gel SDS-PAGE (Figura 48), donde se aprecia la expresión de una proteína de aproximadamente 26 kDa en cada condición ensayada.



**Figura 48.** Inducción de AE6L a partir de *E. coli* pMAB-AE6L durante 4 h a dos temperaturas diferentes (30°C y 20°C). Gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul de coomassie. **M**, marcador de pesos moleculares. **-**, BL21(DE3) pMAB-AE6L sin inducir. **1**, BL21(DE3) pMAB-AE6L con 0,2 mM de salicilato. **2**, BL21(DE3) pMAB-AE6L con 1 mM de salicilato. **3**, pMAB-AE6L con 1 mM de salicilato + 3-metilbenzoato. **4**, pMAB-AE6L con 1 mM de IPTG.

Al comparar todas las condiciones ensayadas se observó una óptima expresión de la proteína AE6L recombinante en *E. coli* (pMAB-AE6L) al inducir con 1 mM de salicilato (con o sin 3-metilbenzoato) a 30°C, por lo tanto, fue esta la condición seleccionada para llevar a cabo una expresión óptima.

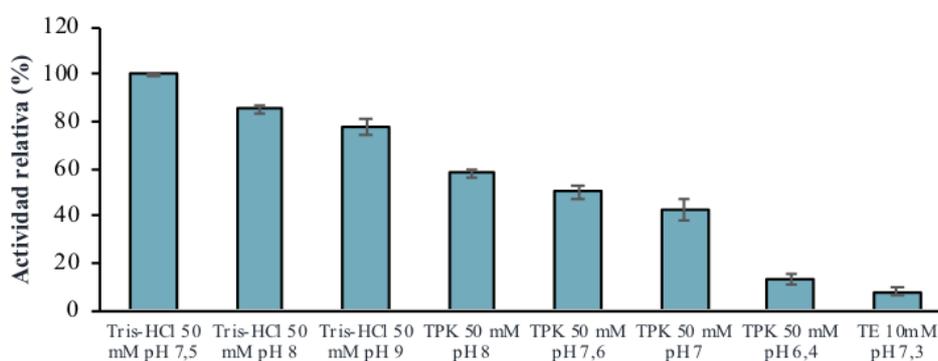
#### IV.10.2. Elección del tampón para la purificación de la enzima

Como último paso en la expresión de la proteína AE6L, se procedió a determinar el tampón de solubilización de la misma con el propósito de facilitar su purificación.

El factor determinante para la elección del tampón se centró en la búsqueda de un tampón que hidrolizase mínimamente el sustrato utilizado en cada reacción. Los distintos valores de pH establecidos por los diferentes tampones de reacción analizados se muestran en la Tabla 21. Finalmente, el tampón seleccionado en este apartado correspondió con el que presentó menor hidrólisis del sustrato sin la presencia de la enzima tras 1 hora de reacción utilizando *p*-NP acetato como sustrato. En la Figura 49 se observa como es el tampón TE 10 mM a pH 7,3 el que presenta menor actividad hidrolítica en ausencia de la enzima.

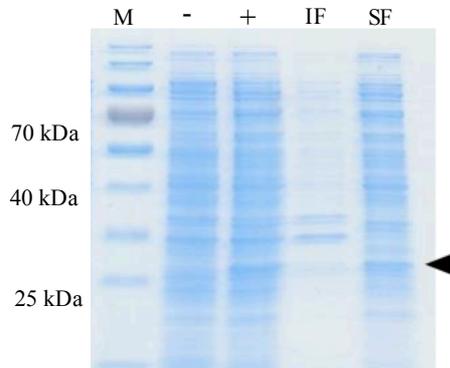
**Tabla 21.** Tampones y sus correspondientes pH

Tampón	pH
TE 10 mM	7,3
TPK 50 mM	6,4
TPK 50 mM	7,0
TPK 50 mM	7,6
TPK 50 mM	8,0
Tris-HCl 50 mM	7,5
Tris-HCl 50 mM	8,0
Tris-HCl 50 mM	9,0



**Figura 49.** Actividad lipolítica relativa de la enzima AE6L en presencia de los diferentes tampones. Las barras de error muestran el error estándar de n=3.

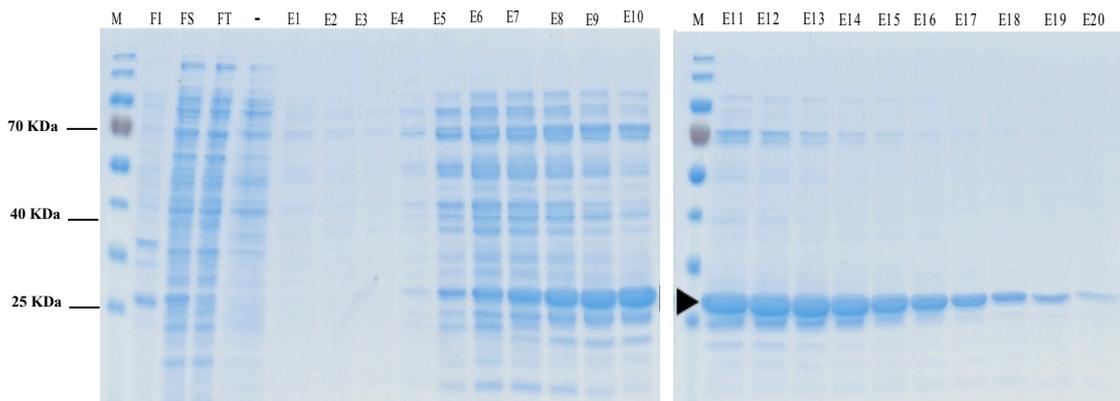
La determinación de la solubilidad de AE6L en el tampón TE pH 7,3 se llevó a cabo utilizando la proteína recombinante expresada en *E. coli*. Las condiciones de inducción utilizadas fueron 1 mM de salicilato a 30°C. Las células se lisaron generando muestras de fracción insoluble (IF) y de fracción soluble (SF). La comprobación de las diferentes muestras en un gel SDS-PAGE determinó que AE6L es una proteína soluble (Figura 50).



**Figura 50.** Gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul de coomassie que muestra la solubilidad de AE6L. *E. coli* BL21(DE3) pMAB-AE6L fue inducida con 1 mM de salicilato a 30°C. **M**, Marcador de pesos moleculares. **-**, Cultivo total sin inducir. **+**, cultivo total inducido. **IF**, fracción insoluble. **SF**, fracción soluble.

#### IV.11. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA AE6L

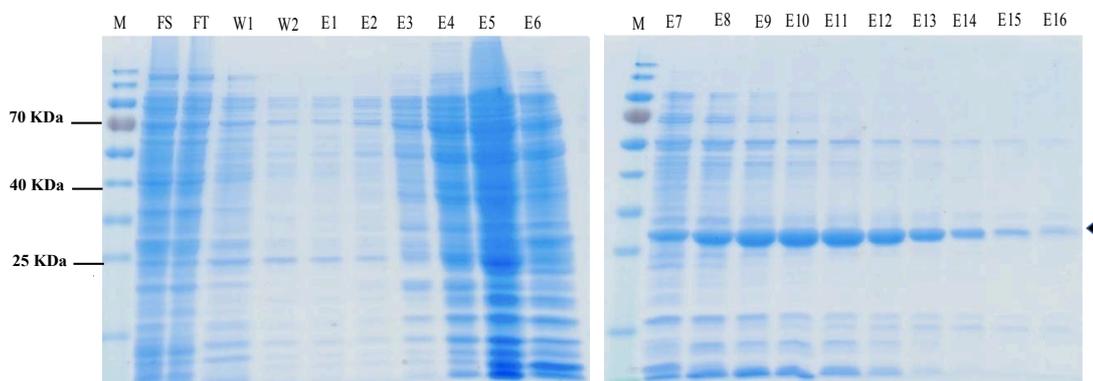
Después de la inducción de AE6L en *E. coli* con 1 mM de salicilato a 30°C, se procedió a su purificación con el objetivo de llevar a cabo su caracterización bioquímica. En un primer intento, se realizó una purificación usando una columna Ni-IMAC (Cromatografía de Afinidad con Metal Inmovilizado) a partir de la fracción soluble de la proteína AE6L eluyendo con imidazol (Figura 51). La cola de polihistidina en el extremo C-terminal de AE6L permitió su unión a la matriz empleada.



**Figura 51.** Gel SDS-PAGE al 12% donde se muestran las distintas fracciones del proceso de purificación empleando una columna Ni-IMAC y eluyendo la proteína AE6L con imidazol. **M**, marcador de pesos moleculares. **FI**, fracción insoluble. **FS**, fracción soluble. **FT**, fracción total inducida -, BL21(DE3) pMAB-AE6L sin inducir. **E1-E20**, eluciones obtenidas en el proceso de purificación.

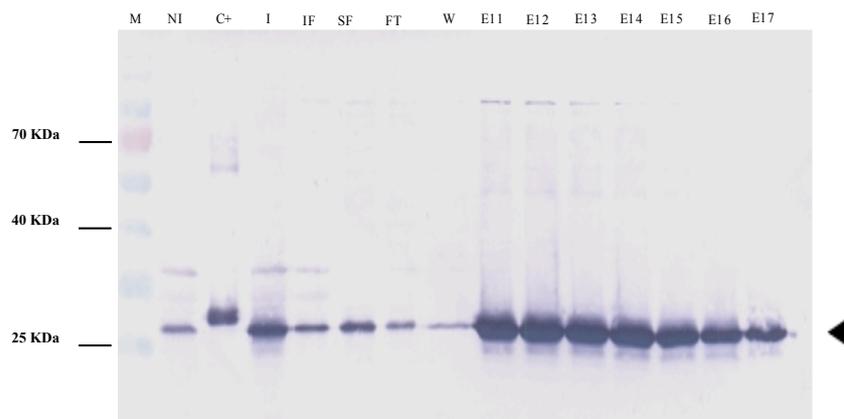
A pesar de conseguir fracciones de elevada pureza (E14-E20), fue necesario prescindir de esta purificación debido a que se observó que el imidazol, utilizado como disolvente en dicha purificación, producía la hidrólisis de *p*-NP acetato, sustrato empleado en las reacciones hidrolíticas para determinar la actividad enzimática. Se continuó observando hidrólisis del *p*-NP acetato incluso después de realizar 10 pasos de diálisis con el tampón TE pH 7,3 (10 mM Tris-ClH, pH 7,3, 1 mM EDTA).

Teniendo en cuenta estos resultados, se planteó un nuevo abordaje para llevar a cabo la purificación de AE6L probando una elución de la proteína mediante gradiente de pH (apartado III.20.2). El proceso de purificación se completó comprobando la estabilidad de la proteína AE6L en el tampón TE pH 7,3. Este tampón se ha utilizado en la determinación de distintas actividades como la hidrólisis de *para*-nitrofenoles y la acetilación y la desacetilación de compuestos fenólicos y carbohidratos. Por otra parte, también se aseguró la solubilidad de la proteína después de la purificación y posterior congelación/descongelación en N<sub>2</sub> líquido. Para comprobar el resultado del proceso de purificación, todas las alícuotas eluidas fueron cargadas en un gel de SDS-PAGE (Figura 52).



**Figura 52.** Gel SDS-PAGE al 12% donde se muestra la purificación Ni-IMAC eluyendo AE6L con gradiente de pH. **M**, Marcador de pesos moleculares. **FS**, Fracción soluble. **FT**, Fracción total. **W1**, Lavado de la columna. **W2**, Lavado de la columna. **E1-E16**, eluciones obtenidas en el proceso de purificación.

Se realizó un Western-blot de las diferentes fracciones eluidas de la purificación de AE6L con un anticuerpo anti-histidina con el objetivo de confirmar que la banda observada corresponde a la proteína de interés (Figura 53). En todos los casos se detecta la presencia de la enzima AE6L con el tamaño esperado.



**Figura 53.** Western blot con un anticuerpo anti-6xHis de las fracciones eluidas en gradiente de pH. **M**, Marcador de pesos moleculares. **NI**, Proteínas totales de cultivo no inducido. **C+**, BL21(DE3) pMAB-AE6L inducida y sin purificar. **I**, Proteína total de cultivo inducido con 1 mM salicilato a 30°C correspondiente a los ensayos de expresión. **IF**, muestra de fracción insoluble. **SF**, muestra de fracción soluble. **FT**, fracción que ha pasado por la resina y que no se ha unido a ella. **W**, Lavado de la columna. **E11-E17**, fracciones de elución.

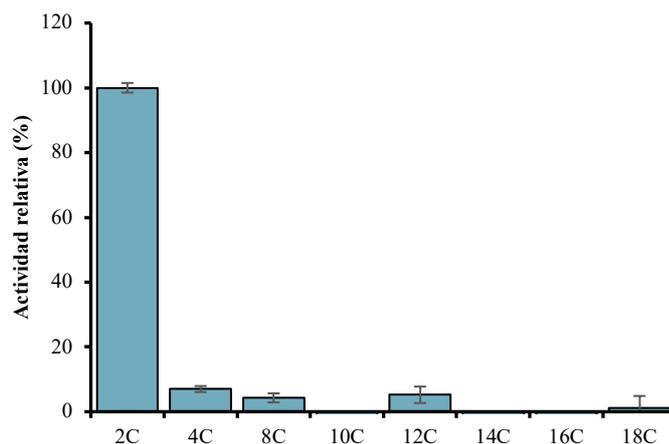
Finalmente, las fracciones E11-E14, coincidiendo con las fracciones con suficiente cantidad de proteína y suficiente pureza, se combinaron con el objetivo de conseguir mayor cantidad de proteína pura. La purificación de AE6L a partir de la fracción soluble de *E. coli* BL21(DE3) pMAB-AE6L permitió obtener 0,179 mg/ml de proteína, la cual presentó una actividad específica de 39,64 U/mg utilizando *p*-NP acetato como sustrato. El rendimiento del proceso de purificación fue del 60 %.

## IV.12. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA AE6L

Para determinar la influencia de diferentes parámetros sobre la actividad de AE6L, se llevaron a cabo estudios de especificidad de sustrato y de actividad de la enzima a diferentes temperaturas y solventes orgánicos.

### IV.12.1. Especificidad de sustrato de la enzima AE6L

Para determinar la especificidad de la enzima AE6L se utilizaron derivados del *p*-nitrofenol con diferente longitud de cadena. El estudio se llevó a cabo con la enzima AE6L purificada a partir de *E. coli* BL21 pMAB-AE6L. Los sustratos utilizados fueron *p*-NP acetato (C2), *p*-NP butirato (C4), *p*-NP hexanoato (C6), *p*-NP octanoato (C8), *p*-NP decanoato (C10), *p*-NP laurato (C12), *p*-NP miristato (C14), *p*-NP palmitato (C16) y *p*-NP estereato (C18).



**Figura 54.** Especificidad de AE6L frente a *p*-nitrofenoles de diferente longitud de cadena, *p*-NP acetato (C2), *p*-NP butirato (C4), *p*-NP hexanoato (C6), *p*-NP octanoato (C8), *p*-NP decanoato (C10), *p*-NP laurato (C12), *p*-NP miristato (C14), *p*-NP palmitato (C16) y *p*-NP estereato (C18). Los datos se muestran relativos a la mayor actividad AE6L (2C). Las barras de error muestran el error estándar de  $n=3$ .

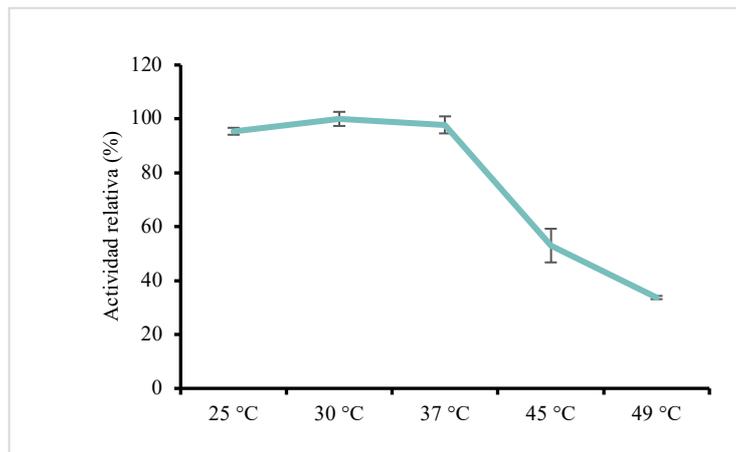
AE6L mostró una clara preferencia por los ácidos grasos de cadena corta, mostrando la actividad más alta con *p*-NP acetato (2C) (39,64 U/mg) (Figura 54). La actividad hidrolítica de la enzima se redujo abruptamente frente a los *p*-nitrofenol ésteres de longitud de cadena superiores a 2C. Sólo alrededor del 7% de la actividad relativa se detectó frente *p*-NP butirato (4C) y *p*-NP decanoato (C10) y un 5% para *p*-NP laurato (C12). Para cadenas superiores apenas se detectó actividad en las condiciones probadas. Teniendo en cuenta la actividad detectada en la hidrólisis del *p*-NP acetato, fue este el sustrato elegido para llevar a cabo la caracterización bioquímica de la enzima. Estos ensayos se realizaron también con extractos enzimáticos de *E. coli* BL21(DE3) pMAB-AE6L obteniendo resultados equivalentes.

#### IV.12.2. Influencia de la temperatura sobre la actividad de la enzima AE6L

##### IV.12.2.1. Actividad de la enzima AE6L a diferentes temperaturas

La temperatura a la cual AE6L presenta mayor actividad se determinó mediante la hidrólisis de *p*-NP acetato a diferentes temperaturas. Las temperaturas ensayadas fueron desde 25°C hasta 49°C (Figura 55). AE6L presenta su óptimo de temperatura entre 30 y 37°C.

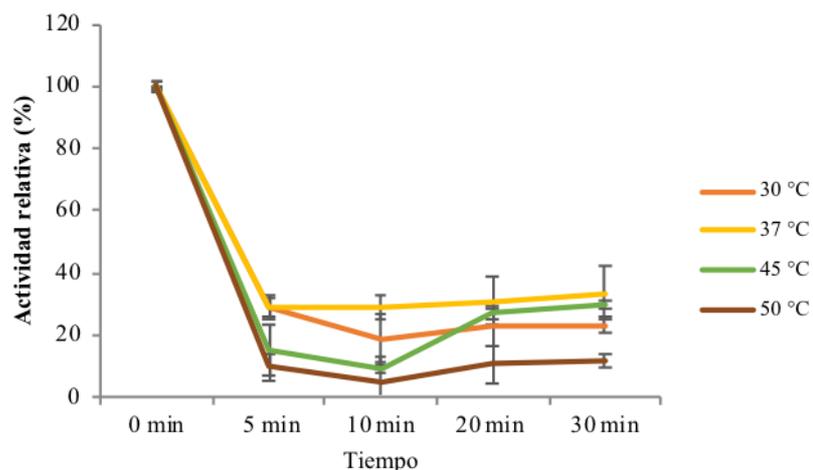
Finalmente se estableció 37°C como temperatura óptima de reacción debido a que coincidía con la temperatura fijada en las reacciones de determinación de actividad del sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6. A la temperatura de 49°C, la enzima aún seguía manteniendo el 60% de su actividad.



**Figura 55.** Actividad relativa de la enzima AE6L pura a diferentes temperaturas. La actividad se determinó usando el *p*-NP acetato como sustrato. Las barras de error muestran el error estándar de  $n=3$ .

#### IV.12.2.2. Termoestabilidad

Con el objetivo de determinar la termoestabilidad de AE6L, se incubó la enzima pura a diferentes temperaturas (30°C, 37°C, 45°C, 50°C) a diferentes tiempos (pre-incubación). Posteriormente, se midió su actividad frente a *p*-NP acetato en las condiciones óptimas de reacción descritas anteriormente (reacción). AE6L muestra mayor termoestabilidad después de haber sido pre-incubada a 37° C (Figura 56). Un dato curioso es la drástica pérdida de actividad observada tras haber sido pre-incubada 5 min a cada una de las temperaturas ensayadas, y como se recupera lentamente a medida que aumenta el tiempo de pre-incubación. Como se observa en la Figura 56, la máxima actividad se encuentra tras haber pre-incubado a 37°C durante 30 min conservando un 44% de su actividad frente al 27% establecido después de 5 min de pre-incubación.



**Figura 56.** Termoestabilidad de AE6L a diferentes temperaturas, expresadas como porcentaje de la actividad específica residual. Las barras de error muestran el error estándar de  $n=3$ .

Estos ensayos se realizaron también con extractos enzimáticos de *E. coli* BL21(DE3) pMAB-AE6L obteniendo resultados equivalentes.

### IV.12.3. Determinación de los parámetros cinéticos

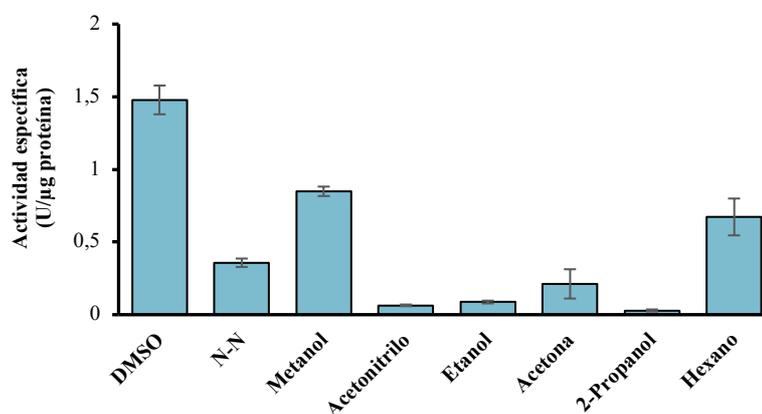
Los parámetros cinéticos fueron determinados usando la enzima AE6L pura a pH 7,3 y *p*-NP acetato como sustrato a 37°C, con el cual se había obtenido la máxima actividad ensayada (Tabla 22).

**Tabla 22.** Parámetros cinéticos de la enzima AE6L frente al sustrato *p*-NP acetato

Km (mM)	Vmax (mmol min <sup>-1</sup> )	Vmax/km	Kcat (s <sup>-1</sup> )	Kcat/km (s <sup>-1</sup> mm <sup>-1</sup> )
1,7	13,6	795	991	58,2

### IV.12.4. Influencia de distintos disolventes orgánicos sobre la actividad de la enzima AE6L

Debido a la poca variación entre los resultados obtenidos utilizando la proteína pura y los extractos de *E. coli* BL21(DE3) pMAB-AE6L en los parámetros estudiados anteriormente, los estudios que se detallan a continuación se llevaron a cabo solo con los extractos. El estudio de la actividad de la enzima AE6L se realizó en presencia de diferentes solventes orgánicos debido a que la mayoría de los procesos industriales llevados a cabo por lipasas se producen en presencia de alguno de ellos. Los solventes orgánicos utilizados en este estudio fueron los siguientes: dimetil sulfóxido (DMSO), N,N dimetilformamida (N-N), metanol, acetonitrilo, etanol, acetona, 2-propanol, todos ellos a una concentración del 30% y hexano al 5%. Como se observa en la Figura 57, AE6L presentó su mayor actividad en presencia de dimetil sulfóxido y su menor actividad utilizando 2-propanol.



**Figura 57.** Efecto de diferentes disolventes orgánicos en la actividad de la enzima AE6L. Las barras de error muestran el error estándar de n=3.

## IV.13. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES DE LA ENZIMA AE6L Y SU EXPRESIÓN EN *E. coli*

### IV.13.1. Selección de aminoácidos para la mutagénesis

Después de llevar a cabo un alineamiento de la enzima AE6L con diferentes proteínas homólogas pertenecientes a la subfamilia SGNH de la familia II de lipasas, se identificaron 5 aminoácidos conservados que podrían estar implicados en la actividad catalítica de la enzima,

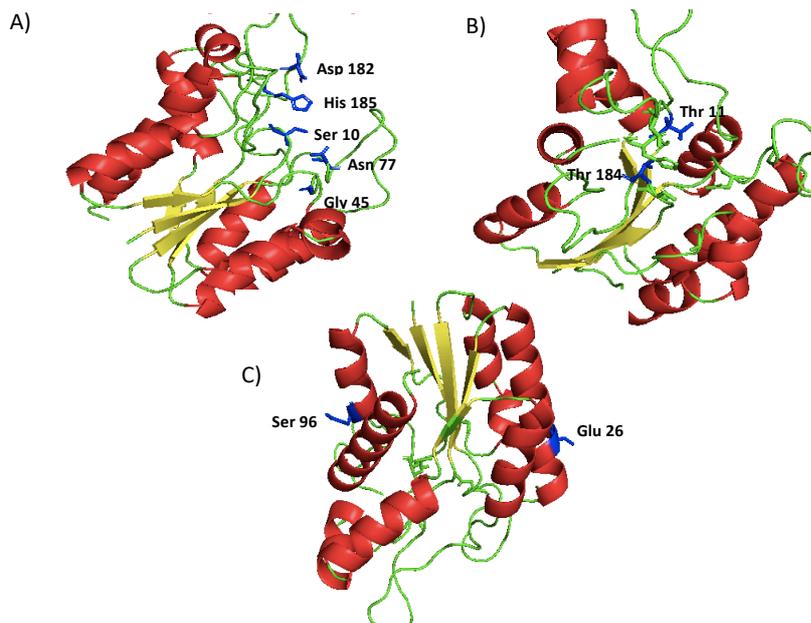
Ser10, Gly45, Asn77, Asp182 e His185 dispuestos en los bloques I, II, III y V, respectivamente y que forman parte de las secuencias conservadas en las esterasas GDSL subfamilia hidrolasas-SGNH (Akoh et al., 2004). Los primeros aminoácidos seleccionados para la mutagénesis fueron estos 5 residuos conservados. Además, se eligieron dos aminoácidos (Thr11 y Thr184) que podrían estar implicados en el reconocimiento de sustrato (Mølgaard et al., 2000). Por último, se seleccionaron también otros dos aminoácidos, Glu26 y Ser96: el Glu26 por estar presente sólo en 3 de las 8 proteínas analizadas además de coincidir con una sustitución de un residuo conservado, y el aminoácido Ser96 porque según el alineamiento estaba presente exclusivamente en AE6L (Tabla 23) (Figura 58). Todos los aminoácidos seleccionados fueron reemplazos por una alanina, debido al reducido componente estérico que presenta, excepto el aminoácido Glu26, que fue sustituido por el aminoácido presente en todas las proteínas al realizar el alineamiento.

**Tabla 23.** Aminoácidos de AE6L reemplazados

Aminoácido Original	Posición	Aminoácido nuevo
G	45	A
N	77	A
S	10	A
H	185	A
D	182	A
S	96	A
E	26	Q
T	184	A
T	11	A

En azul se muestran los residuos seleccionados por ser parte de los posibles centros activos, en verde se muestran los residuos conservados elegidos a partir del alineamiento y en amarillo se muestran los residuos relacionados con la especificidad de sustrato.





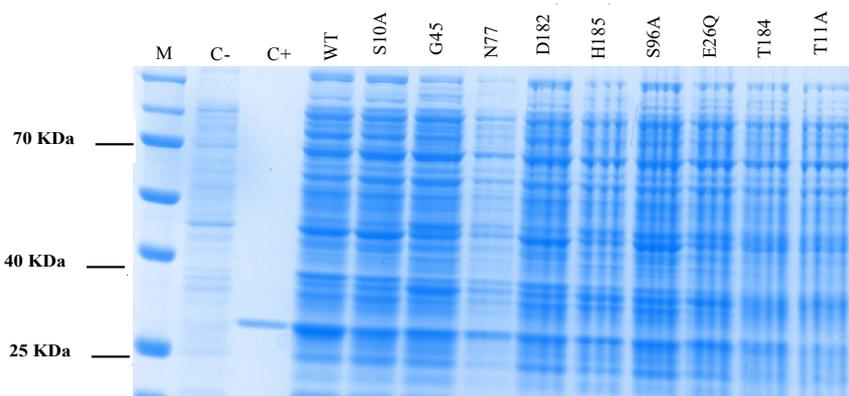
**Figura 59.** Predicción de la estructura tridimensional de la enzima AE6L. A) Localización de los aminoácidos que podrían estar implicados en la actividad catalítica de la enzima y que forman parte de las secuencias conservadas en las esterasas GDSL subfamilia hidrolasas-SGNH. B) Localización de los aminoácidos relacionados con el reconocimiento de sustrato. C) Localización de los aminoácidos Glu26 y Ser96 seleccionados por su especificidad en AE6L.

#### IV.13.3. Construcción de mutantes

Una vez identificados los residuos a reemplazar, se llevó a cabo el diseño de los oligonucleótidos (Tabla 15) para la construcción de los mutantes de la enzima AE6L. El plásmido parental utilizado para llevar a cabo la mutagénesis dirigida fue pMAB-AE6L.

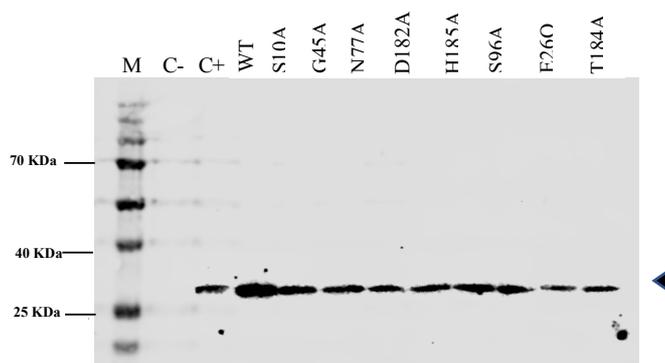
#### IV.13.4. Expresión y caracterización de los mutantes de AE6L en *E. coli*

Una vez obtenidas las diferentes mutaciones puntuales en el gen que codifica AE6L, los plásmidos se transformaron en *E. coli* BL21. La expresión de todos ellos fue llevada a cabo siguiendo el mismo procedimiento que para la proteína silvestre AE6L, tal y como se explica en el apartado III.18 de Materiales y Métodos. Seguidamente, los extractos proteicos de *E. coli* se analizaron en un gel SDS-PAGE para comprobar la correcta expresión de cada uno de los mutantes (Figura 60). En el caso del mutante T11A, no se consiguieron los mismos niveles de expresión que con el resto. En este caso además la estirpe presentaba defectos de crecimiento, sugiriendo que este alelo puede ser tóxico para la célula.



**Figura 60.** Gel SDS-PAGE donde se muestra la expresión de AE6L en *E. coli* BL21(DE3) (pMAB-AE6L) y de los diferentes mutantes. Todas las cepas fueron inducidas con 1 mM de salicilato durante 4 horas a 30°C. **M**, Marcador de pesos moleculares. **C-**, BL21(DE3) pMAB-AE6L sin inducir. **C+**, AE6L pura. **WT**, pMAB-AE6L. **S10A**, pMAB-AE6L<sup>S10A</sup>. **G45A**, pMAB-AE6L<sup>G45A</sup>. **N77A**, pMAB-AE6L<sup>N77A</sup>. **D182A**, pMAB36-AE6L<sup>D182A</sup>. **H185A**, pMAB-AE6L<sup>H185A</sup>. **S96A**, pMAB<sup>S96A</sup>. **E26Q**, pMAB36<sup>E26Q</sup>. **T184A**, pMAB<sup>T184A</sup>. **T11A**, pMAB<sup>T11A</sup>.

Para confirmar la correcta expresión de cada uno de los mutantes se realizó un *western-blot* con un anticuerpo anti-histidina. En todos los mutantes se detectó la presencia de la etiqueta 6xHis excepto en el mutante T11A, del que no se consiguieron extractos debido al poco crecimiento de la estirpe en las condiciones ensayadas (Figura 61). El ajuste de la cantidad de enzima en el extracto se llevó a cabo relativizando todos los mutantes a la proteína silvestre (AE6L) mediante una cuantificación densitométrica.



**Figura 61.** *Western blot* de la proteína AE6L expresada en *E. coli* BL21(DE3) (pMAB-AE6L) y de los diferentes mutantes detectados con el anticuerpo anti-histidina. **M**, Marcador de pesos moleculares. **C-**, BL21(DE3) pMAB-AE6L sin inducir. **C+**, AE6L pura. **WT**, pMAB-AE6L. **S10A**, pMAB-AE6L<sup>S10A</sup>. **G45A**, pMAB-AE6L<sup>G45A</sup>. **N77A**, pMAB-AE6L<sup>N77A</sup>. **D182A**, pMAB-AE6L<sup>D182A</sup>. **H185A**, pMAB-AE6L<sup>H185A</sup>. **S96A**, pMAB-AE6L<sup>S96A</sup>. **E26Q**, pMAB-AE6L<sup>E26Q</sup>. **T184A**, pMAB-AE6L<sup>T184A</sup>.

## IV.14. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS MUTANTES

### IV.14.1. Especificidad de sustrato de los mutantes

Para determinar si los mutantes experimentaron alguna variación en la especificidad de sustrato, comparados con la proteína silvestre, se llevaron a cabo reacciones de hidrólisis de ésteres de ácidos grasos con diferente longitud de cadena. Todos los datos están relativizados a la máxima actividad obtenida por AE6L utilizando *p*-NP acetato como sustrato. A los datos se les sometió a un análisis de varianza (ANOVA de un factor) determinando así si las diferencias entre cada mutante respecto a AE6L en la utilización de los diferentes sustratos fueron significativas desde el punto de vista estadístico con un nivel de significación del 5% (<0,05) (Figura 62).

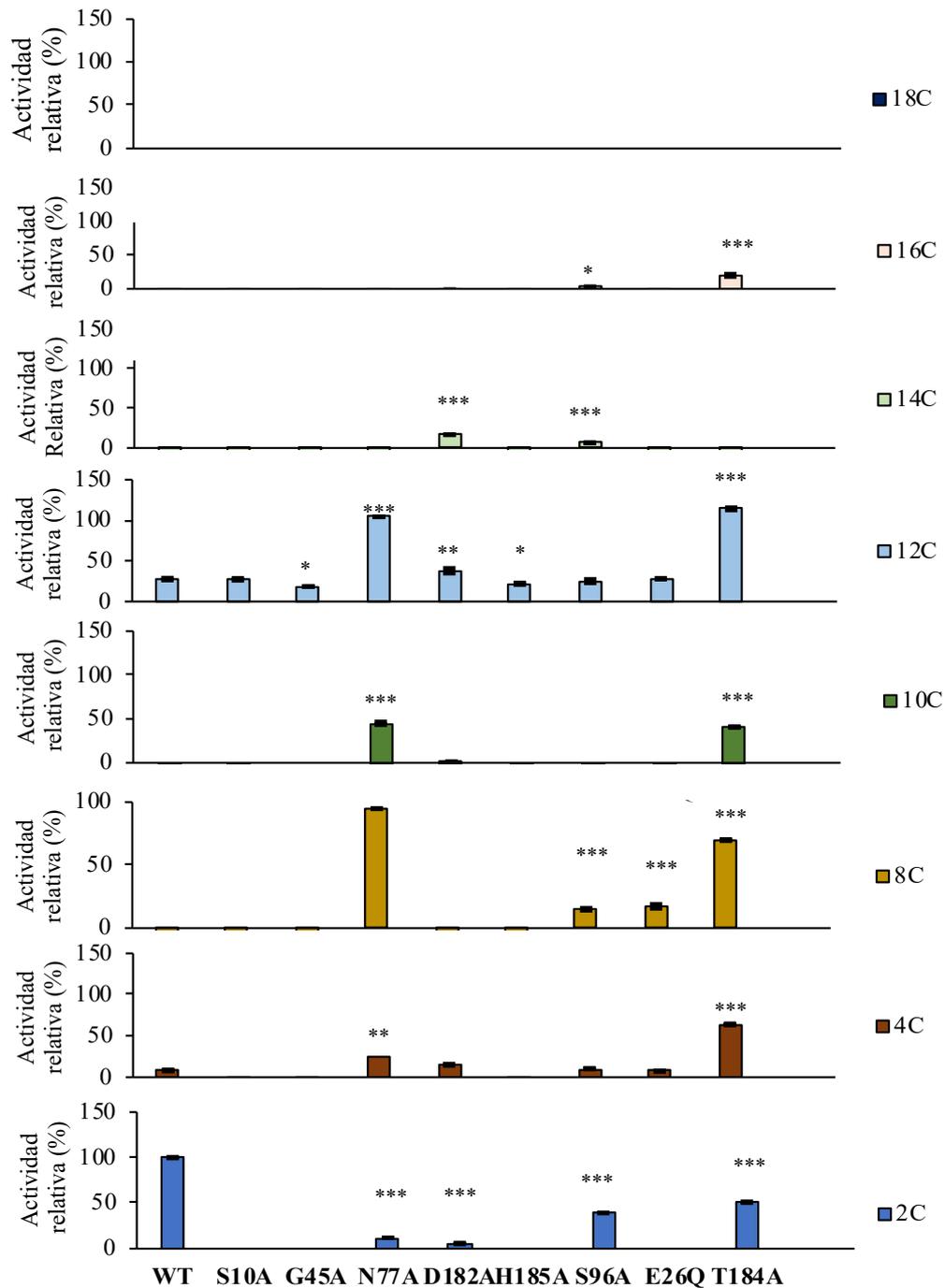
En general, la mutación de cualquiera de los residuos dio lugar a una pérdida de actividad enzimática frente a *p*-NP acetato. Cuando se utilizaron derivados del *p*-NP entre C4 y C12, se observó que los mutantes aumentaron o mantuvieron su actividad a diferencia de lo que ocurría con AE6L, que obtuvo su máxima actividad utilizando *p*-NP acetato como sustrato. Con sustratos de longitudes de cadena superiores a 12C, se observó una pérdida general o desaparición de la actividad en todos los mutantes ensayados.

Los residuos S10, G45 y H185 están descritos como aminoácidos que forman parte del centro activo mientras que y N77 y D182 son residuos que parecen estar implicados en la donación de protones durante la reacción catalítica (Akoh et al. 2004). La mutación de cualquiera de los tres primeros residuos originó una pérdida total de actividad, mientras que en el caso de la mutación de los otros dos residuos la pérdida de actividad no fue completa en *p*-NP acetato. El efecto de N77A en la actividad de AE6L en sustratos de mayor longitud de cadena se describe a continuación.

El residuo T184 parece estar involucrado en la especificidad de sustrato (Mølgaard et al. 2000a). Durante este trabajo se observó que las mutaciones N77A y T184A dieron lugar a una mayor actividad frente al sustrato de 8 átomos de carbono. Esto sugiere que estos residuos, N77 y T184, deben estar implicados en la especificidad de sustrato. El caso de N77 es particular porque se ha descrito que este residuo participa en la actividad catalítica de la enzima siendo donador de protones durante la reacción. Sin embargo, AE6L<sup>N77A</sup> presenta actividades en *p*-NP de 8 a 12C equiparables a los de AE6L en *p*-NP acetato. Por tanto, en este caso parece estar implicado en especificidad de sustrato frente a cadenas de carbonos entre 8 y 12C más que en la reacción catalítica *per se*.

Por último, los mutantes AE6L<sup>E26Q</sup> y AE6L<sup>S96A</sup> solo mostraron una ligera recuperación de la actividad en presencia de *p*-NP octanoato (8C), siendo prácticamente inapreciable en el resto de los sustratos.

En la Tabla 24 se detallan las actividades específicas de los diferentes mutantes. Todos los mutantes presentaron una disminución de la actividad frente a *p*-NP acetato comparado con la proteína silvestre.



**Figura 62.** Actividad relativa (%) de los mutantes con respecto a AE6L (WT) a 37°C y *p*-NP acetato (2C) frente a diferentes derivados del *p*-NP y una vez normalizada al restar la actividad del control negativo, *E. coli* BL21. Los sustratos utilizados fueron *p*-NP acetato (C2), *p*-NP butirato (C4), *p*-NP octanoato (C8), *p*-NP decanoato (C10), *p*-NP laurato (C12), *p*-NP miristato (C14), *p*-NP palmitato (C16) y *p*-NP estereato (C18). Las diferencias significativas con respecto al control de AE6L (WT) para cada sustrato se indican con asteriscos (\*=  $p > 0,05$ ; \*\*=  $p < 0,01$ ; \*\*\*=  $p < 0,001$ ). A los datos se les sometió a un análisis de varianza (ANOVA de un factor) utilizando el software PRISM 6.

**Tabla 24.** Actividad específica (U/mg) de la proteína AE6L y de los mutantes utilizando los diferentes derivados del *p*-NP.

Sustrato	AE6L	S10A	G45A	N77A	D182A	H185A	S96A	E26Q	T184A
2C	0,096	N.A.*	N.A.	0,017	0,008	N.A.	0,044	0,005	0,069
4C	0,007	N.A.	N.A.	0,029	0,013	N.A.	0,006	0,024	0,069
8C	0,005	N.A.	N.A.	0,087	0,017	N.A.	0,012	0,038	0,073
10C	N.A.	N.A.	N.A.	0,042	N.A.	N.A.	0,004	N.A.	0,046
12C	0,028	0,022	0,019	0,070	0,034	0,020	0,016	0,019	0,127
14C	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,016	N.A.	0,002	0,004	N.A.
16C	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,002	N.A.	0,016
18C	N.A.								

\* N.A.: no actividad

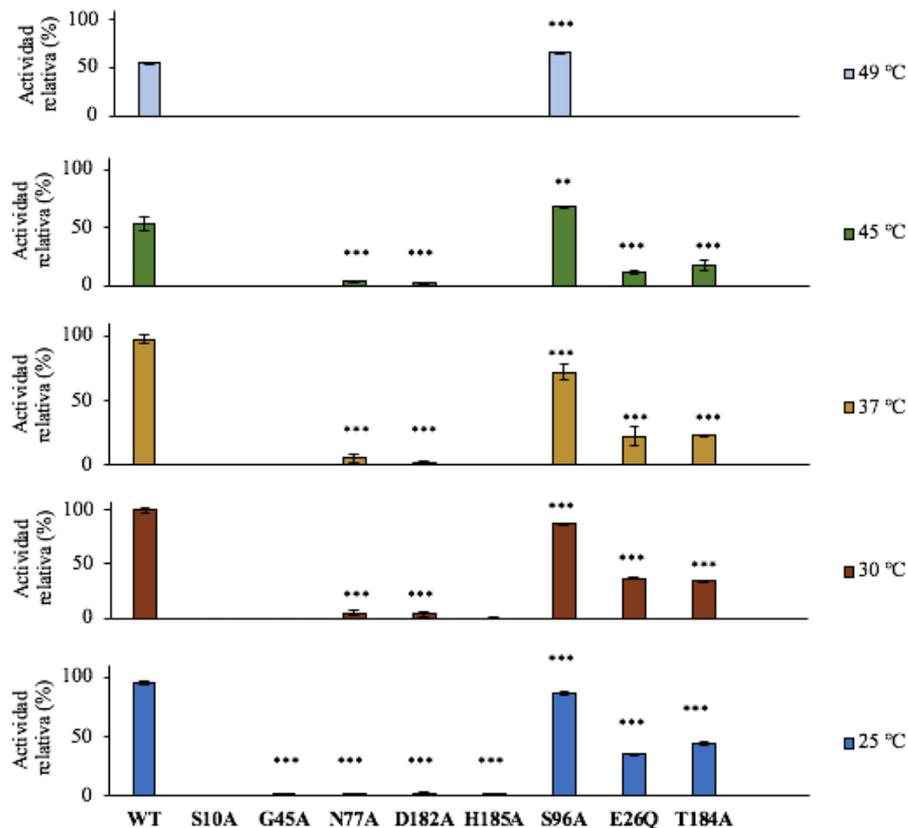
#### IV.14.2. Influencia de la temperatura

Para llevar a cabo un estudio sobre la influencia de la temperatura en estos mutantes, se realizaron 2 tipos de determinaciones: en el primer caso se estudió la temperatura óptima de reacción, y en el segundo caso, se analizó la termoestabilidad de los mutantes. En ambos casos se cuantificó la actividad lipolítica utilizando *p*-NP acetato como sustrato.

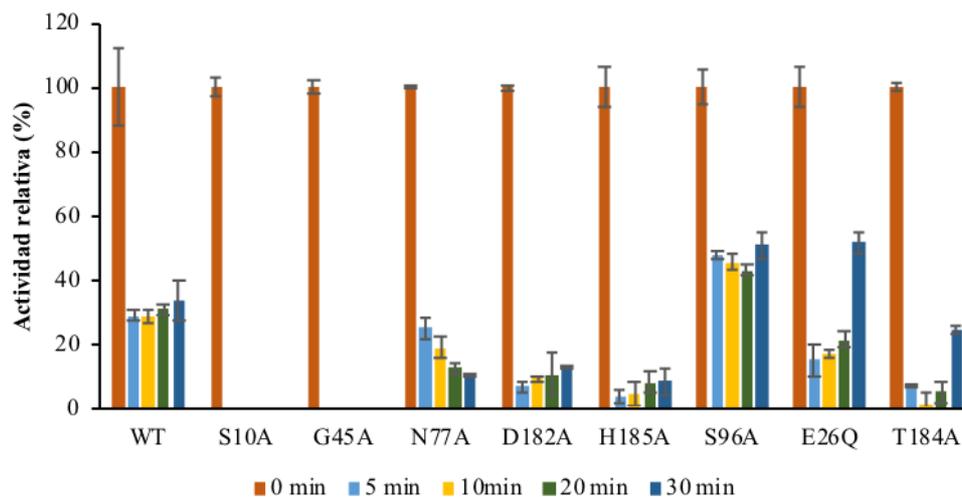
Tal como se había descrito anteriormente, la enzima AE6L presentó un máximo de actividad a 37°C. En todos los casos de los mutantes que presentaron actividad, la máxima actividad lipolítica se produce entre los 25 y los 37°C (Figura 63). A temperaturas más altas la actividad decae. Ninguno de los mutantes ensayados superó la actividad máxima registrada para AE6L en todo el rango de temperaturas. Los mutantes E26Q y T184A presentaron una disminución más acusada a temperaturas más altas.

Por otra parte, también se llevó cabo el estudio de la termoestabilidad de los distintos mutantes. Para ello, se incubaron a diferentes temperaturas (30, 37, 45 y 50°C) y a diferentes tiempos (5, 10, 20 y 30 min). Tras esta incubación, la actividad catalítica residual de cada mutante se determinó a 37°C y utilizando *p*-NP acetato como sustrato.

En la Figura 64, se representa el perfil de estabilidad de los distintos mutantes a 30°C. Ninguno de los mutantes analizados superó la estabilidad de AE6L, con la excepción del mutante AE6L<sup>S96A</sup> que presentó un 10% más de actividad que AE6L en todo el periodo de actividad ensayado. Hay que destacar que AE6L y todos los mutantes con actividad, experimentaron un brusco descenso de la actividad tras 5 min de incubación. Los mutantes AE6L<sup>E26Q</sup> y AE6L<sup>T184A</sup> experimentaron una ligera recuperación de la actividad a medida que aumentábamos los tiempos de incubación.



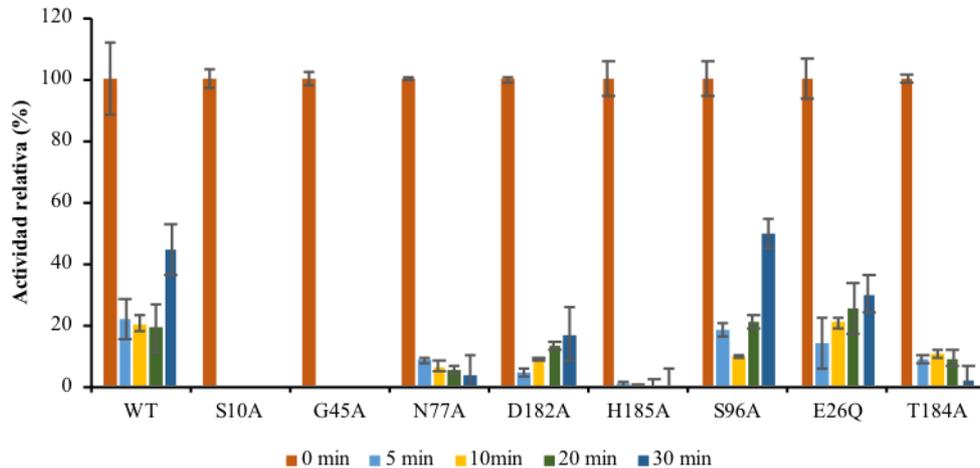
**Figura 63.** Actividad relativa (%) de los mutantes con respecto a AE6L (WT) a 37°C y *p*-NP acetato (2C) frente a diferentes derivados del *p*-NP y una vez normalizada al restar la actividad del control negativo, *E. coli* BL21. Las diferencias significativas con respecto al control para cada sustrato se indican con asteriscos (\*=  $p > 0,05$ ; \*\*=  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*=  $p \leq 0,001$ ). A los datos se les sometió a un análisis de varianza (ANOVA de un factor) utilizando el software PRISM 6. Las barras de error muestran el error estándar de  $n=3$ .



**Figura 64.** Termoestabilidad (porcentaje de actividad residual relativa) de los distintos mutantes incubados a 30°C y una vez normalizada la actividad al restar la actividad del control negativo, *E. coli* BL21. La reacción para determinar la actividad catalítica se realizó a 37°C utilizando *p*-NP acetato como sustrato. Las barras de error muestran el error estándar de  $n=3$ .

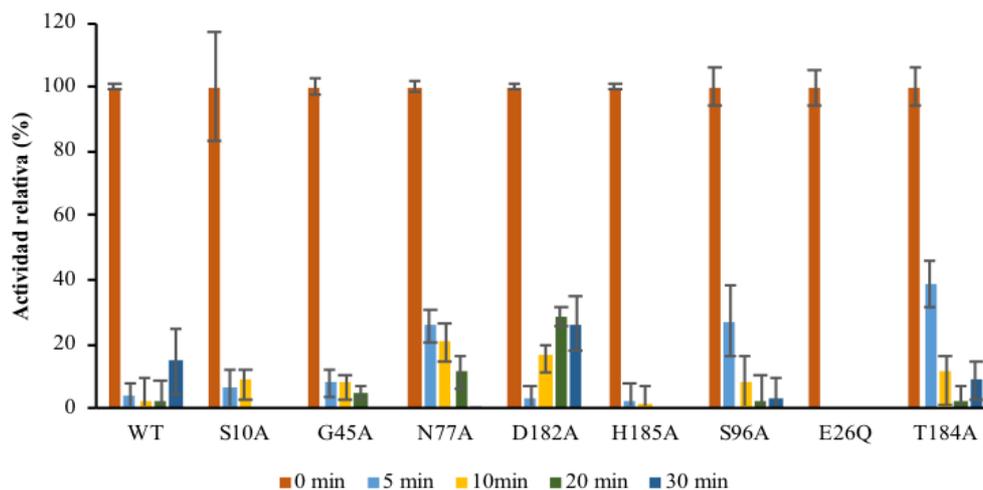
Como en el caso anterior también se observó un brusco descenso de la actividad tras 5 min de incubación tras 37°C (Figura 65), a 45°C (Figura 66) y a 50°C (Figura 67).

Particularmente, a 37°C se observó una recuperación de la actividad a medida que aumentaba el tiempo de incubación en los mutantes AE6L<sup>D182A</sup>, AE6L<sup>S96A</sup>, AE6L<sup>E26Q</sup> y la enzima silvestre.



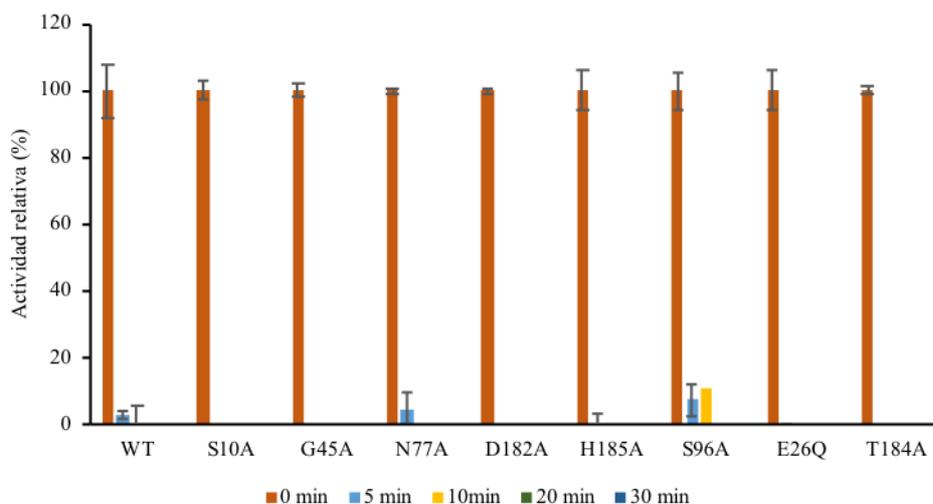
**Figura 65.** Termoestabilidad (porcentaje de actividad residual relativa) de los distintos mutantes incubados a 37°C y una vez normalizada la actividad al restar la actividad del control negativo, *E. coli* BL21. La reacción para determinar la actividad catalítica se realizó a 37°C utilizando *p*-NP acetato como sustrato. Las barras de error muestran el error estándar de n=3.

En la Figura 66, tal y como ocurría en el caso anterior, también se observó una recuperación de la actividad a medida que aumentaba el tiempo de incubación en el caso del mutante AE6L<sup>D182A</sup>.



**Figura 66.** Termoestabilidad (porcentaje de actividad residual relativa) de los distintos mutantes incubados a 45°C y una vez normalizada la actividad al restar la actividad del control negativo, *E. coli* BL21. La reacción para determinar la actividad catalítica se realizó a 37°C utilizando *p*-NP acetato como sustrato. Las barras de error muestran el error estándar de n=3.

En la Figura 67 se observa el perfil de estabilidad a 50°C, donde además de detectarse la pérdida generalizada de la actividad, no se observó ningún mutante destacable.



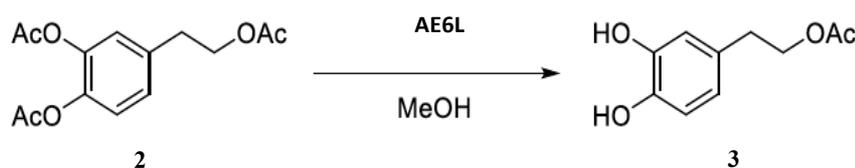
**Figura 67.** Termoestabilidad (porcentaje de actividad residual relativa) de los distintos mutantes incubados a 50°C y una vez normalizada al restar la actividad del control negativo, *E. coli* BL21. La reacción para determinar la actividad catalítica se realizó a 37°C utilizando *p*-NP acetato como sustrato. Las barras de error muestran el error estándar de  $n=3$ .

En términos generales se podría decir que la mutación del residuo S96 da lugar a una enzima ligeramente más estable que AE6L en todo el rango de temperaturas, conservando una mínima actividad incluso a 50°C tras cortos periodos de incubación. La mutación del residuo D182 da lugar a una enzima que experimenta una recuperación parcial de su actividad tras la prolongación del periodo de incubación en particular a las temperaturas intermedias (37 a 45°C) y la mutación del residuo E26 a temperaturas bajas (30 y 37°C).

#### IV.15. DESACETILACIÓN REGIOSELECTIVA DE COMPUESTOS FENÓLICOS USANDO LA ENZIMA AE6L PURA

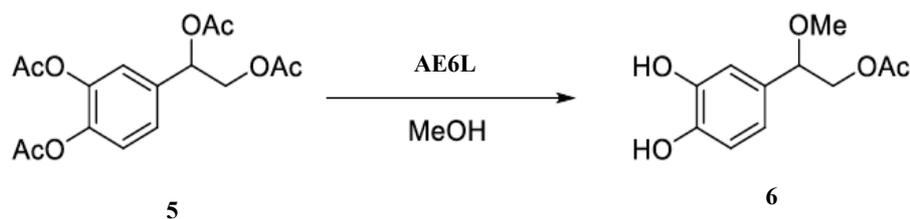
Las reacciones de desacetilación con la enzima pura se llevaron a cabo utilizando los mismos sustratos previamente ensayados con el sobrenadante bacteriano: hidroxitirosol **1**, DGHP **4** y oleuropeína **20**. Debido a la efectividad observada en la desacetilación de compuestos fenólicos peracetilados cuando se usó el sobrenadante de los diferentes organismos, solo se estudió la regioselectividad de AE6L pura en este tipo de reacciones.

Para ello, se partió de los tres compuestos fenólicos peracetilados: hidroxitirosol peracetilado **2**, DGHP peracetilado **5** y oleuropeína peracetilada **21**. Los resultados mostraron que la desacetilación del compuesto **2** en presencia de metanol fue completamente regioselectiva hacia los ésteres del anillo aromático dando como único producto, el derivado monoacetilado esperado **3** (Figura 68), tal y como ocurría cuando se usó el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6. Sin embargo, en vez de utilizar una relación sustrato/extracto enzimático 1:1 (p/p) se utilizó una relación 1500:1 (p/p) sustrato/enzima pura, confirmando que AE6L es la responsable de los procesos de desacetilación de estos compuestos (Tabla 25).



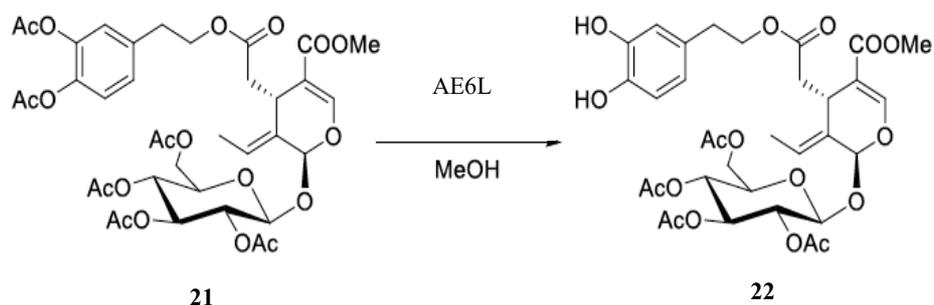
**Figura 68.** O-Desacetilación regioselectiva del compuesto **2** catalizada por AE6L

La reacción de desacetilación del DHPG peracetilado **5** en presencia de MeOH como disolvente también produjo el éter metílico esperado **6** (observado en la desacetilación con los sobrenadantes) con valores de conversión altos (Figura 69). Por otra parte, todos los intentos por reproducir la reacción utilizando EtOH y alcoholes de cadena más larga como disolventes fueron infructuosos, alcanzándose grados de conversión anormalmente bajos.



**Figura 69.** O-Desacetilación regioselectiva del compuesto **5** catalizada por AE6L

Sin embargo, la desacetilación de la oleuropeína peracetilada **21** mostró unos resultados muy diferentes a los previstos. En este caso, al contrario de lo que sucedía con el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6, la enzima pura daba lugar a una reacción regioselectiva, detectándose un único producto: la oleuropeína tetraacetilada **22** (Figura 70), indicando que esta enzima solo es responsable de la desacetilación de los acetilos fenólicos, dejando sin modificar la parte glucosídica.



**Figura 70.** O-Desacetilación regioselectiva del compuesto **21** catalizada por AE6L

**Tabla 25.** O-desacetilación regioselectiva de compuestos fenólicos utilizando AE6L

Compuesto	Sustrato/enzima (p/p)	Conversión %	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción (h)
Hidroxitirosol peracetilado 2	1500//1	82	60	20
		49	37	
DHPG peracetilado 5	2000/1	81	60	24
		19	37	
Oleuropeína 21	5000/1 2500/1	65	60	20
		36	37	

En la Tabla 25 se observa que la conversión obtenida depende de la temperatura de reacción ya que en todos los casos hubo una mejora notable al llevar a cabo la reacción a 60°C. La purificación de la enzima tras su sobreexpresión en *E. coli* permitió la utilización de cantidades mucho menores de enzima, en el rango de 1500-5000 veces menor comparado con el peso de sustrato, tal como era de esperar y conduciendo a una mayor efectividad en las reacciones de desacetilación con potencial biotecnológico. También se ha observado que la enzima AE6L pura parecía ser muy activa en las reacciones de transesterificación en medio metanólico, pero no en presencia de otros alcoholes de cadena más larga ya que, en el caso de la desacetilación del compuesto 5, las conversiones obtenidas utilizando EtOH como disolvente fueron muy reducidas incluso aumentando la cantidad de AE6L utilizada y empleando mayores tiempos de reacción.

#### IV.16. BIOACTIVIDADES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y SUS DERIVADOS

Este apartado de la Tesis Doctoral fue llevado a cabo durante una estancia en el laboratorio de la Dra. Doris Marko en el Instituto de Química de los Alimentos y Toxicología de la Facultad de Química de la Universidad de Viena, Austria.

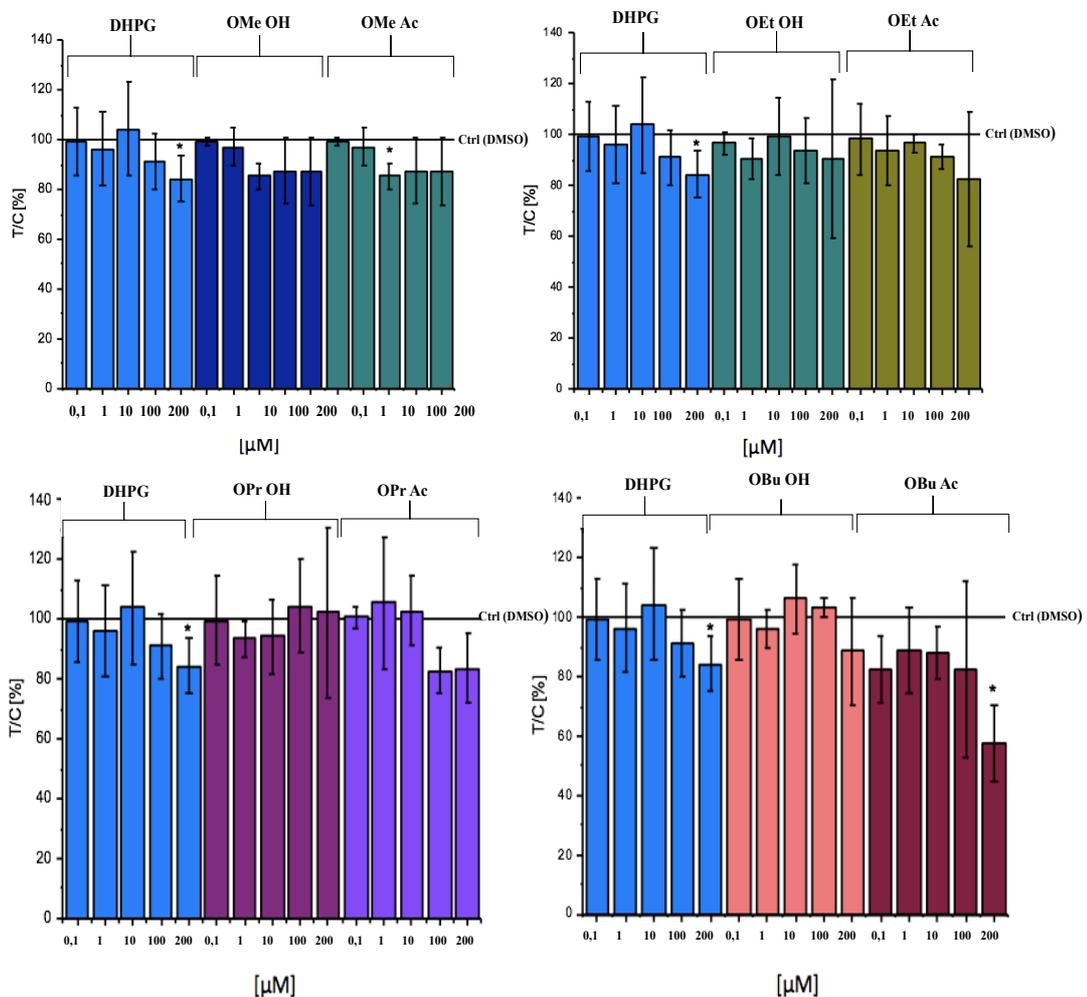
El objetivo de este proyecto consistió en evaluar la posible mejora de los derivados del DHPG obtenidos con respecto a diferentes bioactividades en comparación con el DHPG no modificado. La elección de este compuesto y sus derivados para este análisis estuvo motivada por su posible potencial en las bioactividades ensayadas y la falta de estudios sobre el mismo. El hidroxitirosol no modificado se incluyó como control por ser el compuesto del que más información se dispone en cuanto a su bioactividad. Estos compuestos fueron sometidos en primer lugar a un ensayo de evaluación de la citotoxicidad con el fin de comprobar la inocuidad de estos compuestos para las células humanas. Después de ello se realizó un estudio de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los mismos. Durante este trabajo los compuestos se han nombrado de forma abreviada como éter de metilo (OMe), etilo (OEt), propilo (OPr) o butilo (OBu) (Figura 23), y “Ac” indica si el DHPG está o no (OH) acetilado en la posición alifática.

##### IV.16.1. Evaluación de la citotoxicidad

Con la finalidad de evaluar los posibles efectos citotóxicos de los diferentes derivados obtenidos, se ensayaron en primer lugar sobre la línea celular HCEC (no tumoral). Esta actividad fue ensayada a partir de la combinación de dos ensayos diferentes: 1) *Water-soluble tetrazolium* (WST-1) y 2) sulforodamina B (SRB) cuya metodología se detalla en la sección III.25.3 de Materiales y métodos.

#### IV.16.1.1 Ensayo WST-1

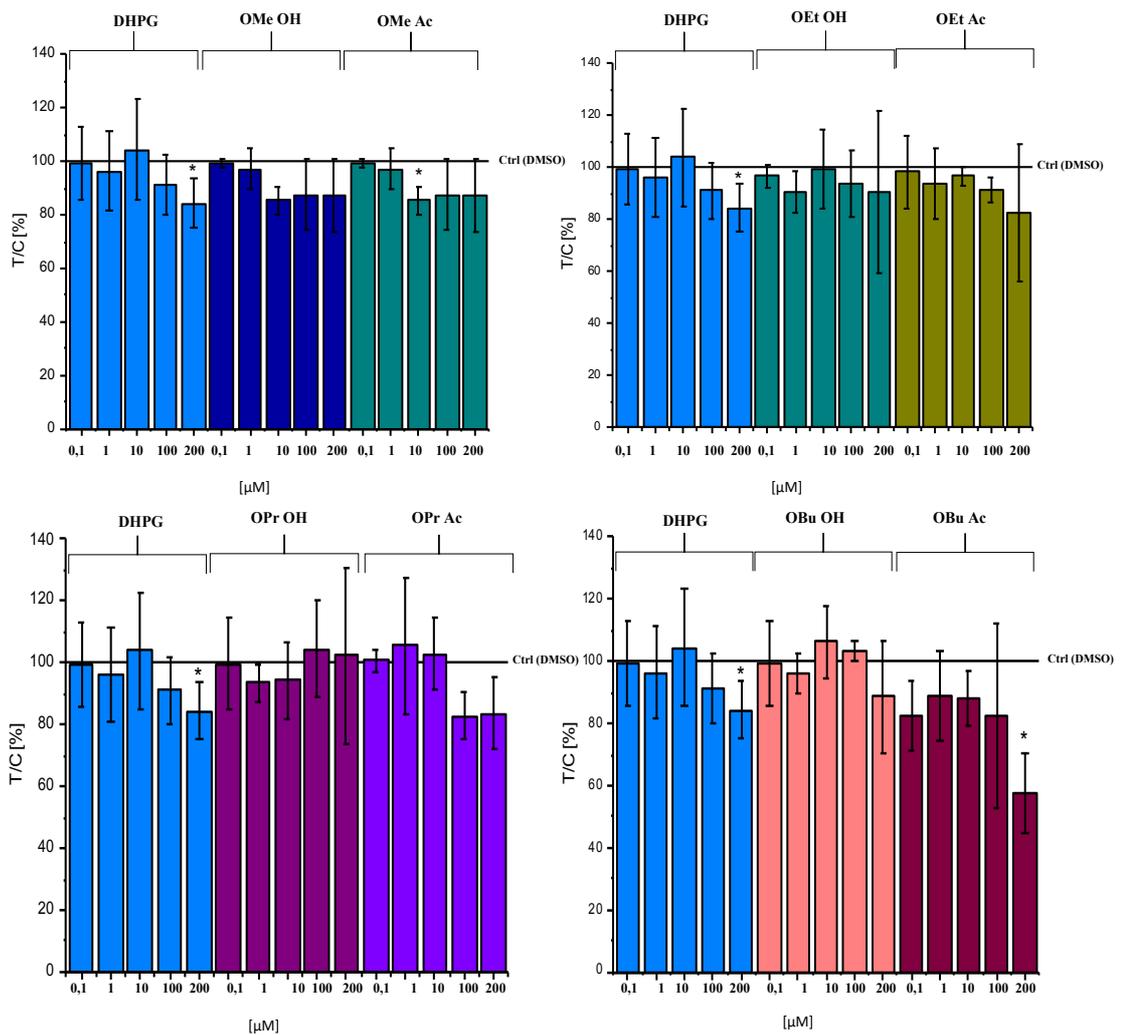
El ensayo cuantifica los efectos citotóxicos en la actividad mitocondrial a través de la producción glucolítica de NAD(P)H en células vivas. El DHPG provocó una mínima reducción en la viabilidad celular después de 24 h de incubación (Figura 71). Los diferentes derivados del DHPG tampoco mostraron efectos citotóxicos en células HCEC exceptuando el derivado OEt OH el cual presenta leves diferencias significativas a concentraciones de 0,1 y 1  $\mu\text{M}$ , disminuyendo la viabilidad celular aproximadamente entre un 20 y un 30%, respectivamente, frente al control negativo (2% DMSO, disolvente en el que están disueltos los compuestos estudiados).



**Figura 71.** Medidas de WST-1 sobre la viabilidad celular después de 24 horas de tratamiento con los diferentes compuestos fenólicos. Todas las gráficas muestran el DHPG sin modificar a diferentes concentraciones a efectos comparativos. Las diferencias significativas con respecto al control del disolvente (DMSO 2%) usado como control negativo (Ctrl) se indican con asteriscos (\* =  $p > 0.05$ ; \*\* =  $p > 0.01$ ; \*\*\* =  $p > 0.001$ ). Las mediciones en el ensayo WST-1 se realizaron en al menos tres réplicas biológicas, cada una por triplicado técnico (exceptuando el derivado OEt OH a 0,1  $\mu\text{M}$ ;  $n=1$ ). Las barras de error muestran el error estándar. T/C [%]: Total de células metabólicamente activas/Control.

#### IV.16.1.2. Ensayo SRB

La unión de la SRB a los amino ácidos básicos es estequiométrica, y por tanto la cuantificación de las células teñidas es directamente proporcional a la masa celular. Los efectos citotóxicos medidos con el ensayo SRB fueron muy similares a los extraídos por WST-1. Ningún derivado presentó ningún efecto en la viabilidad de la célula en las concentraciones ensayadas con tres excepciones: el DHPG a 200  $\mu\text{M}$  muestra una reducción del 20% de la masa celular; el OMe Ac a partir de 10  $\mu\text{M}$  muestra una reducción del 15% y el derivado OBU Ac a 200  $\mu\text{M}$  muestra la mayor reducción (45%) (Figura 72).



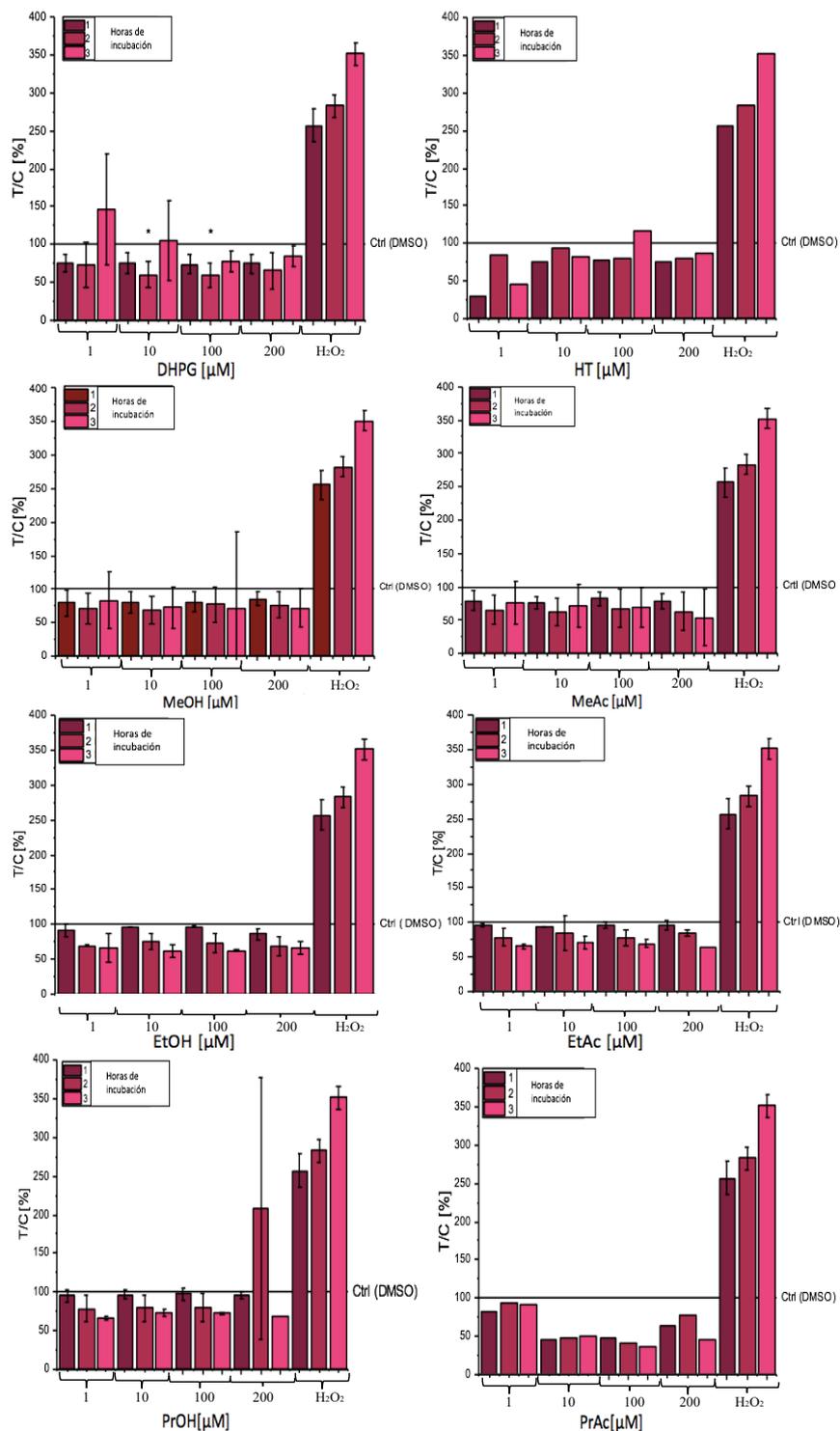
**Figura 72.** Medidas de SRB sobre la viabilidad celular de HCEC después de 24 horas de tratamiento con los diferentes compuestos fenólicos. Todas las gráficas muestran el DHPG sin modificar a efectos comparativos. Las diferencias significativas con respecto al control del disolvente (DMSO 2%) usado como control negativo (Ctrl) se indican con asteriscos. (\* =  $p > 0.05$ ; \*\* =  $p > 0.01$ ; \*\*\* =  $p > 0.001$ ). Las barras de error muestran el error estándar de  $n=3$ . T/C [%]: Total de masa celular/Control.

A rasgos generales, los ensayos de citotoxicidad en la línea celular HCEC concluyeron que el DHPG y sus derivados no son citotóxicos, y permitieron seleccionar concentraciones no letales de los diferentes compuestos (manteniendo una viabilidad celular cercana al 100% tras 24 horas de incubación) para los posteriores estudios de actividad antioxidante y de la producción de la citoquina TNF- $\alpha$ .

#### IV.16.2. Evaluación de la actividad antioxidante

El impacto del DHPG y sus derivados en los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés) intracelulares se estudió mediante el ensayo de diclorofluoresceína (DCF). Existen dos modalidades del ensayo. En el primero (ensayo pro-oxidante), la actividad antioxidante directa debida a su capacidad de eliminación de radicales, puede evaluarse mediante incubaciones de corta duración en presencia de los diferentes compuestos. En la segunda modalidad (DCF protector), se mide la capacidad de los compuestos de activar los sistemas celulares implicados en la defensa frente a estrés oxidativo, aplicando un período de pre-incubación de 24 h con el derivado fenólico respectivo. En este segundo caso, los niveles de ROS se cuantifican en ausencia de los compuestos fenólicos. Además del DHPG y sus derivados también se incluyó en el estudio el hidroxitirosol como referencia, por ser un fenol con una bioactividad antioxidante bien caracterizada.

El estudio pro-oxidante se llevó a cabo sobre la línea celular HCEC (no cancerosa). En estos ensayos, el DHPG mostró una reducción moderada de los niveles de ROS desde la primera hora de incubación. A las dos concentraciones más bajas (1 y 10  $\mu$ M), este efecto desapareció a las 3 h de incubación, posiblemente por agotamiento del compuesto (Figura 73). En el caso del hidroxitirosol, solo se pudo realizar una réplica y ésta sugiere también una reducción generalizada a todas las concentraciones de los niveles de ROS (Figura 73). Los dos derivados metil éteres del DHPG redujeron los niveles de ROS después de 1 hora de incubación. En el caso de los éteres de cadena más larga (OEt y OPr OH) apenas hubo reducción de los niveles de ROS en la primera hora de incubación y se observó un efecto más pronunciado progresivamente después de 2 horas de incubación en todas las concentraciones probadas. En ningún caso se detectó un incremento de los valores de ROS tras la adición del compuesto ensayado (Figura 73).



**Figura 73.** Ensayo DCF (pro-oxidativo). Influencia de los distintos compuestos fenólicos en la generación de ROS en células HCEC después de 1-3 h de co-incubación. Los datos se expresan a diferentes concentraciones como media  $\pm$  desviación estándar de al menos 4 experimentos independientes (exceptuando los compuestos; hidroxitirosol y PrAC n=1). Las diferencias significativas con respecto al control del disolvente (DMSO 2%) usado como control negativo (Ctrl) se calcularon mediante ANOVA de un factor, seguido por LSD de Fisher ( $p < 0.05$ ) y se indican con asteriscos (\*=  $p > 0.05$ ; \*\*=  $p > 0.01$ ; \*\*\*=  $p > 0.001$ ). T/C [%]: Total de fluorescencia de DCF/Control.

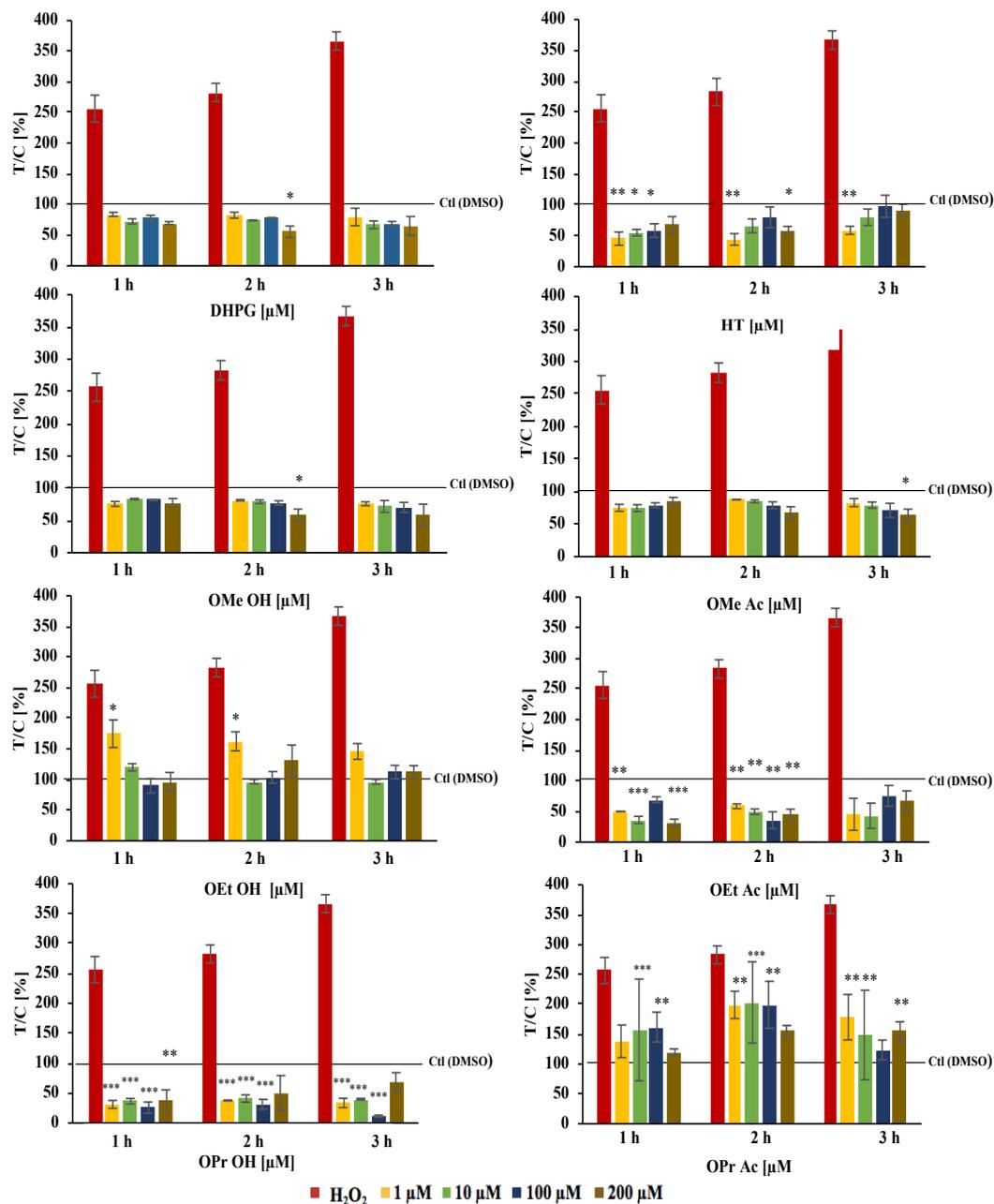
El estudio DCF protector se llevó a cabo con una línea celular no cancerosa (HCEC) y una línea celular cancerosa (HT-29). Las células se trataron con los compuestos fenólicos previamente durante 24 h, se lavaron para eliminar dichos compuestos y se les añadió 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A efectos comparativos, se utilizaron células no tratadas con los compuestos fenólicos a las que también se les añadió 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Si el compuesto proporciona capacidad antioxidante se desencadenarán una serie de mecanismos de defensa antioxidantes por medio de los cuales se elimina el exceso de ROS reduciendo de esta manera la formación de DCF fluorescente.

En el estudio con la línea celular HCEC, una pre-incubación de las células con el DHPG y el hidroxitirosol redujo los niveles de ROS generados por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. También se observó una ligera reducción de estos niveles de ROS por debajo incluso del control sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 74).

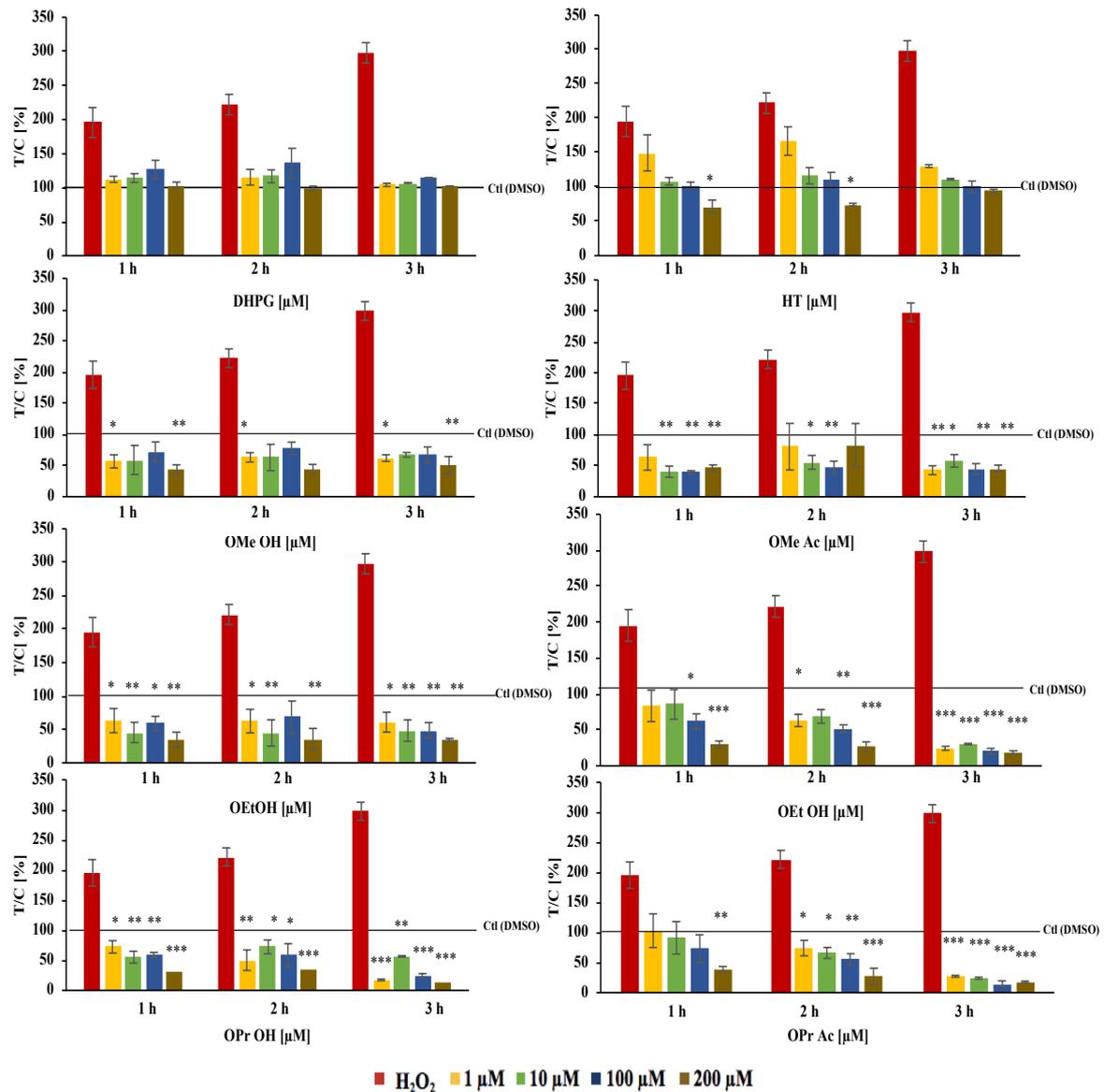
En general, todos los derivados del DHPG con la excepción del OPr Ac redujeron los niveles de ROS considerablemente hasta valores basales en el entorno de las células sin tratar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y por tanto, fueron capaces de neutralizar los radicales producidos por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 74). Además, en el caso particular de los derivados OEt Ac y OPr OH los niveles de ROS se redujeron considerablemente incluso por debajo de dichos niveles basales. Esta reducción llegó a ser de hasta 2-3 veces con respecto a las células sin tratar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de hasta 8 veces con respecto al control negativo (células sin pre-tratamiento con los compuestos fenólicos y tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La derivatización del DHPG en algunos de los casos (en particular OEt Ac y OPr OH) supuso una mejora de hasta dos veces de la inducción de los mecanismos de protección celular frente a estrés oxidativo.

En el estudio con la línea cancerosa HT-29, el DHPG y el hidroxitirosol redujeron los niveles de ROS hasta niveles basales, tal como se observó en células no cancerosas (Figura 75).

En este tipo de células, todos los derivados del DHPG mostraron una reducción de los niveles de ROS mucho más significativa que el DHPG natural. En el caso de los derivados metílicos se observa un descenso de los niveles de ROS de hasta un 60% con respecto a los niveles basales (Figura 75). En el caso de los derivados etílicos se apreció una reducción de hasta el 65% con respecto a los niveles basales cuando se incubaba con la concentración más baja de OEt OH y de hasta un 80% con la concentración más baja de OEt Ac (Figura 75). Se observó lo mismo con los derivados OPr OH y OPr Ac, los cuales mostraron reducciones de hasta el 70% y el 75%, respectivamente (Figura 75).



**Figura 74.** Efecto protector de los distintos compuestos fenólicos en la generación de ROS. El ensayo se realizó utilizando la línea celular HCEC e incubando los compuestos durante 1 h con 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos se expresan como media ± desviación estándar de al menos 4 experimentos independientes. Las diferencias significativas con respecto al control del disolvente (DMSO 2%) usado como control negativo (Ctrl) se calcularon mediante ANOVA de un factor, seguido por LSD de Fisher ( $p < 0.05$ ) y se indican con asteriscos (\*=  $p > 0.05$ ; \*\*=  $p > 0.01$ ; \*\*\*=  $p > 0.001$ ). T/C [%]: Total de fluorescencia de DCF/Control.



**Figura 75.** Efecto protector de los distintos compuestos fenólicos frente a estrés oxidativo. El ensayo se realizó incubando células HT-29 con 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos se expresan como media ± desviación estándar de al menos 4 experimentos independientes. Las diferencias significativas con respecto al control del disolvente (DMSO 2%) usado como control negativo (Ctrl) se calcularon mediante ANOVA de un factor, seguido por LSD de Fisher ( $p < 0.05$ ) y se indican con asteriscos (\* =  $p > 0.05$ ; \*\* =  $p > 0.01$ ; \*\*\* =  $p > 0.001$ ). T/C [%]: Total de fluorescencia de DCF/Control.

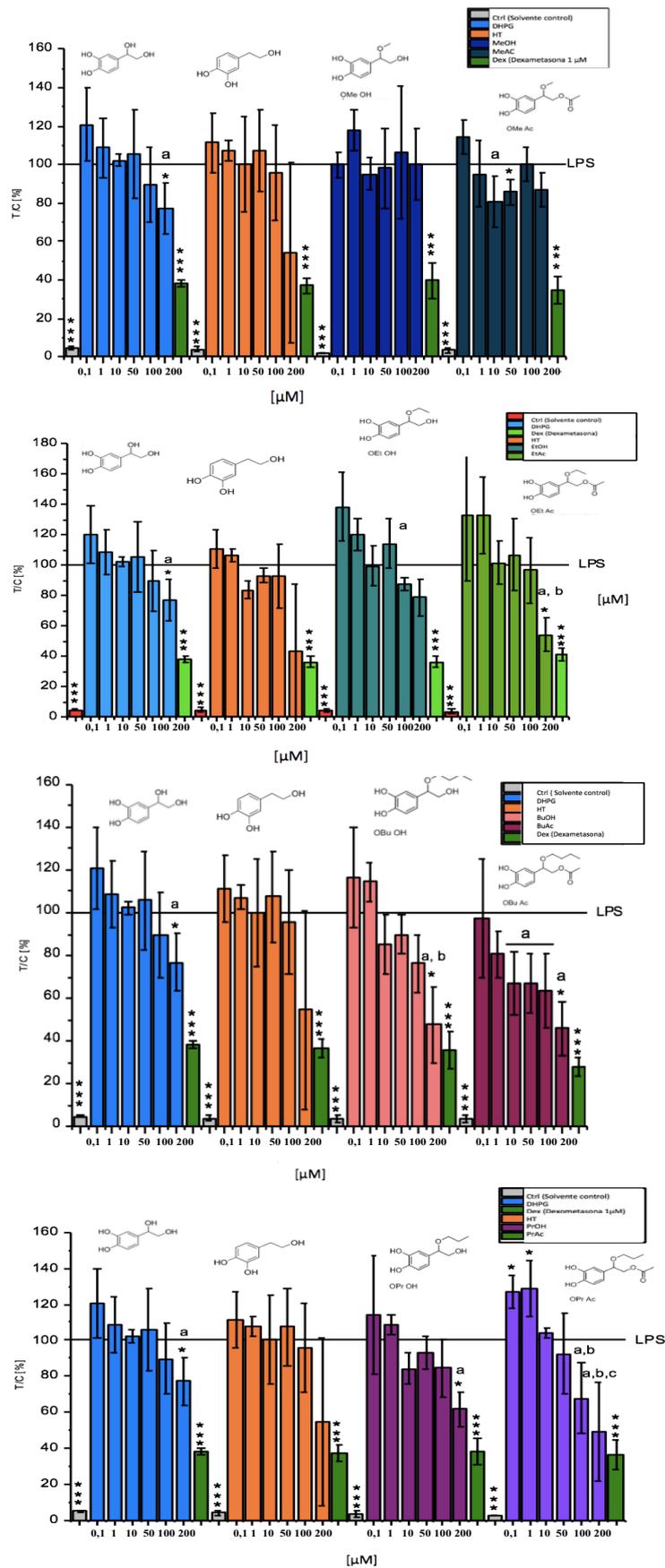
### IV.16.3. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria

El estudio de la actividad antiinflamatoria de los distintos compuestos fenólicos se llevó a cabo utilizando como biomarcador el factor transcripcional NF-kb, el cual se activa en caso de daño celular y traduce la señal provocando cambios a nivel celular y molecular, tales como el incremento de la citoquina TNF- $\alpha$  (Zhang et al. 2009). Para ello, se empleó la línea celular THP1-XBlue-CD14, derivada de monocitos humanos, en la que el gen de la fosfatasa alcalina se encuentra bajo el control del promotor de NF-kb. De esta manera, la cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina se correlaciona con una inducción de la expresión de NF-kb y un incremento de la actividad anti-inflamatoria.

El diseño experimental se realizó considerando el efecto preventivo de los compuestos, incubando con los extractos primero, e induciendo posteriormente la estimulación del biomarcador NF-kb con lipopolisacárido (LPS). Paralelamente a la evaluación del efecto sobre la actividad de NF-kb se analizó la viabilidad celular mediante un ensayo de Alamar Blue para comprobar el estado de las células después del tratamiento con los extractos, siendo en todos los casos las células viables (datos no mostrados).

Los resultados pusieron de manifiesto un incremento significativo de la actividad de la fosfatasa alcalina en las células estimuladas con LPS en comparación con las no estimuladas (Figura 76). La dexametasona, utilizada como fármaco antiinflamatorio, y en este estudio como control positivo, redujo significativamente la actividad de la fosfatasa alcalina ( $p < 0,001$ ), tal como era de esperar. En la mayoría de los derivados del DHPG a concentraciones bajas se observó un leve incremento respecto al control en la actividad de la fosfatasa alcalina. Aunque no era estadísticamente significativo, al observarse en todos los casos parece indicar una tendencia general. En el caso particular del derivado OPr Ac, este incremento es destacable, sugiriendo un papel pro-inflamatorio a concentraciones más bajas.

En líneas generales se apreció una correlación directa entre la longitud de la cadena alcoxi y la actividad antiinflamatoria, de manera que a medida que aumenta la longitud de la cadena se observan un efecto más pronunciado de la reducción de la actividad de la fosfatasa alcalina. Se observó también que, a concentraciones más elevadas, los valores de fosfatasa alcalina se redujeron significativamente en la mitad de los compuestos ensayados (DHPG, OEt Ac, OPr OH, OPr Ac, OBU OH, OBU Ac) y de acuerdo con esto, la reducción fue más significativa en presencia de la dosis más alta utilizada. Otra observación interesante fue que los derivados acetilados muestran una mayor capacidad antiinflamatoria que sus correspondientes derivados no acetilados, en particular para los derivados de alcoxi de cadena intermedia (OEt y OPr).



**Figura 76.** Actividad anti-inflamatoria de los distintos compuestos fenólicos después de 2 h de incubación en monocitos humanos sometidos a 1 μg/ml LPS de lipopolisacárido de *E. coli*

(inflamación inducida), Todos los derivados fenólicos figuran junto al DHPG y el hidroxitirosol a efectos comparativos. Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar de al menos 4 experimentos independientes. Las diferencias significativas con respecto al control del disolvente (DMSO 2%) usado como control negativo (Ctrl) se calcularon mediante ANOVA de un factor, seguido por LSD de Fisher ( $p < 0.05$ ), y se indican con asteriscos (\* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) y \*\*\* ( $p < 0,001$ )). Las diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas. se calcularon usando la prueba t de Student y se están indicados con "a", "b" o "c". T/C [%]: Total de fosfatasa alcalina/Control.

## DISCUSIÓN

---

## V. DISCUSIÓN

---

Durante siglos, los microorganismos han sido utilizados en beneficio del hombre sin tener consciencia de que los productos obtenidos se debían a la función de enzimas producidas por éstos. No fue hasta 1876 cuando Kühne (Kühne 1976) definió por primera vez el término enzima, aunque no ha sido hasta años recientes cuando el término de biocatalizador ha cobrado importancia en disciplinas como química, biofísica, biología molecular y en el ámbito biotecnológico. El término biocatálisis hace referencia a la utilización de enzimas capaces de catalizar reacciones que conducen a la obtención de compuestos de interés. Hoy en día, la utilización de estas enzimas en procesos biotecnológicos está muy extendida y ha demostrado su eficacia, por ejemplo, en la síntesis de fármacos, herbicidas, en la producción de biocombustibles, o en la industria textil y de detergentes. Otro abordaje importante de la biocatálisis, y particularmente el uso de enzimas hidrolíticas como lipasas y esterases, es constituir una alternativa a los métodos convencionales en síntesis química (Bouallagui et al. 2011; Adlercreutz 2013; Laszlo et al. 2013) ofreciendo la oportunidad de generar nuevos compuestos bioactivos mediante protecciones y desprotecciones estereo- y regioselectivas de manera más eficiente (H-Kitikun et al. 2012).

La obtención de derivados lipofílicos de compuestos fenólicos, como el hidroxitirosol, mediante el uso de enzimas, ha sido ampliamente descrito en los últimos años (Grasso et al. 2007; Torres de Pinedo et al. 2007; Buisman et al. 1998). Estos compuestos fenólicos tienen una gran aplicación farmacéutica debido a que son los principales antioxidantes de la dieta. En las últimas décadas, diversos estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto numerosos beneficios para la salud derivados del consumo de antioxidantes. Se ha observado que estos compuestos evitan daños producidos por estrés oxidativo en diferentes biomoléculas (ADN, lípidos, proteínas) previniendo, entre otros, el desarrollo de enfermedades degenerativas, cardiovasculares y cáncer (Cilla et al. 2009). En este contexto, está descrito que la protección y desprotección quimio-, regio- y estereoselectiva de grupos funcionales en compuestos fenólicos proporcionan a la molécula un aumento de la lipofilia, aumentando su resistencia a la degradación metabólica. La obtención de estos derivados también se puede llevar a cabo mediante el uso de síntesis química convencional, pero supone enormes dificultades técnicas (Wuts et al. 2007; Kocienski 2005). Estas dificultades están relacionadas por ejemplo con la existencia de una alta densidad de grupos funcionales muy similares en las moléculas de interés, requiriendo así extensas secuencias de protección y desprotección hasta alcanzar la modificación deseada. Otro problema derivado es la necesidad de emplear reactivos peligrosos o condiciones dañinas para el medio ambiente que finalmente solo pueden ofrecer opciones limitadas.

### V.1. SELECCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS CON CAPACIDAD TRANSESTERIFICADORA

Por los motivos expuestos anteriormente, en este trabajo se planteó como objetivo la búsqueda de microorganismos transesterificadores. La búsqueda se dirigió hacia la selección de cepas bacterianas capaces de llevar a cabo reacciones de protección y desprotección estereo- y

regioselectivas de compuestos polifuncionales favoreciendo y acentuando sus propiedades bioactivas.

Para el muestreo se seleccionaron dos industrias alimentarias. Tanto las industrias conserveras de pescado como las fábricas de curado de productos cárnicos son lugares donde existen muchos residuos lipídicos, y por tanto se consideró que podrían incluir microorganismos adaptados a la hidrólisis de sustratos lipídicos de diversos orígenes.

Con el objetivo de llevar a cabo la evaluación del potencial lipolítico de las muestras recogidas se desarrolló un procedimiento dividido en dos pasos que permitió la selección de cepas con capacidad transesterificadora de una forma rápida y sencilla. En primer lugar, se siguió el método tradicional para determinar la lipólisis de cultivos bacterianos en placas de agar-tributirina (Haider and Pakshirajan 2007; Lanka and Latha 2015). En total se obtuvieron más de 459 colonias de hongos y bacterias, aunque el estudio solo se continuó con las 66 cepas bacterianas. Los candidatos fúngicos fueron descartados debido a la similitud morfológica entre ellos. En un segundo paso se empleó un método basado en la transesterificación del *p*-nitrofenol palmitato (*p*-NPP) (sustrato de cadena larga de átomos de C) en el que se utilizaron los sobrenadantes de los cultivos de las bacterias seleccionadas. El criterio para la selección de los sobrenadantes se basa en antecedentes que describen que a nivel industrial las lipasas extracelulares son mucho más eficientes que las células completas (S. Li et al. 2012). Esto es debido por ejemplo a una mayor facilidad para llevar a cabo la modificación de las condiciones de reacción, a una menor sensibilidad a la toxicidad del producto y a un mayor rendimiento debido a la posibilidad de utilizar volúmenes de reacción menores y tiempos reducidos. De todas las bacterias obtenidas aproximadamente el 10% fueron bacterias lipolíticas lo que resulta dentro del rango determinado en otros estudios (Mudryk and Skórczewski 2000).

En este segundo paso se seleccionaron 19 cepas transesterificadoras mediante el proceso establecido, lo cual supone un 28% de las estirpes que mostraban actividad hidrolítica. Según los análisis de ARN 16S llevados a cabo, estas cepas resultaron muy cercanas filogenéticamente al género *Bacillus* (Figura 25). Este resultado no es sorprendente puesto que este género se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza debido a su habilidad para formar endosporas, característica que les confiere resistencia y potencia su aislamiento en diversos hábitats como ecosistemas acuáticos, terrestres e incluso en ambientes extremos. A pesar de la amplia distribución de este género, el suelo es considerado el principal reservorio de la mayor parte de las especies de *Bacillus* debido a que la gran mayoría de ellas son especies saprófitas, característica que le permite utilizar la gran diversidad de sustratos orgánicos presentes en esta compleja matriz (McSpadden Gardener 2004).

Hoy en día, muchas especies pertenecientes a este género son utilizadas activamente en la producción de enzimas industriales debido entre otros, a su gran versatilidad metabólica y a la secreción de productos de interés como enzimas y antibióticos (Harwood 1989). En este contexto, las enzimas lipolíticas son unos de los productos de interés mejor caracterizados.

Las primeras lipasas bacterianas se describieron a principios del Siglo XX a partir de las cepas de *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeuriginosa* y *Pseudomonas fluorescens* (Arpigny and Jaeger 1999; Jaeger et al. 1999b), aunque los primeros estudios de caracterización de lipasas se realizaron en una lipasa pancreática (Sarda and Desnuelle 1958). Actualmente existen numerosos estudios sobre la producción de lipasas bacterianas, particularmente en los géneros *Pseudomonas* (Madan and Mishra 2010; Yang et al. 2009) y *Bacillus* (Sangeetha et al. 2010; Quyen et al. 2003; Ahmed et

al. 2010; Dutta and Ray 2009). Otros géneros como *Acinetobacter* (Li et al. 2004), *Staphylococcus* (Talon et al. 1996), *Streptococcus* (Tripathi et al. 2004), *Burkholderia* (Wang et al. 2013) *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes* y *Chromobacterium* (Riaz et al. 2010) también han sido ampliamente analizados.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con las cepas seleccionadas, se probó la capacidad de diferentes cepas transesterificadoras obtenidas en el screening para modificar compuestos bioactivos (polifenoles y carbohidratos). Al obtener resultados muy similares con las distintas cepas se decidió centrar el estudio únicamente en el análisis de una de las cepas seleccionadas en etapas anteriores, *Bacillus* sp. HR21-6. Esta cepa mostró los resultados más alentadores en los estudios de regioselectividad ya que obtuvo los mejores datos de conversión de los productos naturales de partida hacia los derivados deseados. La producción de lipasas bacterianas se puede llevar a cabo tanto en cultivo en medio líquido (Chakraborty and Raj 2008) como en medio sólido (Alkan et al. 2007). La optimización de la producción de lipasas en *Bacillus* sp. HR21-6 se desarrolló por completo mediante su cultivo en medio líquido debido a que su velocidad de crecimiento en este sistema era mucho más elevada que en medio sólido. La mayoría de los estudios de producción de lipasas no utilizan azúcares simples como fuentes de carbono sino sustratos lipídicos (Yang et al. 2009) y normalmente, cuando se utiliza la glucosa como fuente de carbono, los sustratos lipídicos se consideran inductores de la producción de lipasa (Hun et al. 2003). Se ha descrito que la producción de lipasa rara vez es constitutiva y la cantidad de enzima extracelular que produce suele ser escasa (Lee et al. 1999b). Por este motivo, en muchos casos es necesario el uso de compuestos lipídicos para inducir la producción de lipasas tales como aceites vegetales (Kumar et al. 2005), Tween 20/80 (Li et al. 2004), hexadecano (Boekema et al. 2007) y triglicéridos sintéticos como tributirina y tripalmitina (Rahman et al. 2006). Para optimizar la producción de lipasas/esterasas en *Bacillus* sp. HR21-6, se utilizaron diferentes medios de cultivo, y tributirina como inductor. Finalmente, se concluyó que la utilización de peptona en el medio de cultivo favorecía en esta cepa la producción de lipasas con respecto a la triptona y que la presencia de tributirina no mejoraba la actividad lipolítica, quizás por ser un sustrato con longitud de cadena demasiado corta (Figura 27).

En algunos casos, la presencia de surfactantes es un requisito previo importante para la producción de lipasas. La actividad catalítica de las lipasas se rige por la activación interfacial, una propiedad observada cuando el sustrato lipídico comienza a formar una emulsión, presentando así una interfaz para que la enzima actúe. La adición de un tensioactivo disminuye la tensión superficial entre la fase orgánica y acuosa presente en la mezcla de reacción y aumenta la velocidad de emulsificación (Wu and Tsai 2004). En la optimización de la producción de lipasas en *Bacillus* sp. HR21-6 no se estudió el efecto de surfactantes debido a que su adición podría contaminar los compuestos antioxidantes que se estudiarían posteriormente.

## **V.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE *Bacillus* sp. HR21-6. CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDADES DE LA ENZIMA AE6L**

Debido a que la secuencia genómica de *Bacillus* sp. HR21-6 no estaba disponible en la base de datos, el primer paso fue secuenciar su genoma para utilizarlo con dos objetivos: 1) identificar posibles lipasas y esterases en su genoma y 2) usarlo como referencia para la identificación de las proteínas en el secretoma.

El análisis por espectrometría de masas de la fracción extracelular soluble libre (FSEP) y de la fracción unida a las vesículas de membrana (OMV) indicó que aproximadamente un 2% de los genes codifican proteínas secretadas.

De todas las proteínas identificadas en el secretoma, únicamente la enzima AE6L presentaba un dominio esterasa. Tras el análisis de las dos fracciones del secretoma, FSEP y OMV, AE6L sólo se detectó en la fracción FSEP. Esta enzima se identificó como una esterasa (ramnogalacturonano acetilestera, RGAE; EC 3.1.1.6) perteneciente a la familia CE-12 de las carbohidrato esterases (Cantarel et al. 2009). Se ha descrito que la enzima ramnogalacturonano acetilestera cataliza la desacetilación del ramnogalacturonano I, uno de los complejos polisacáridos de la pectina presente en la pared de las plantas superiores, el cual está compuesto de residuos de ácido galacturónico y ramnosa (Ishii 1997). Considerando esta actividad de la proteína en el medio natural se pensó que fácilmente podía ser la responsable de las desacetilaciones de los compuestos fenólicos estudiados. Un hecho sorprendente fue que no se detectó ninguna lipasa en el secretoma de *Bacillus* sp. HR21-6. Se debe tener en cuenta que durante el primer paso de selección se utilizó un éster del ácido butírico (4C), pero que la selección de microorganismos transesterificadores se llevó a cabo utilizando *p*-NP palmitato (16C), con lo que se esperaría seleccionar bacterias que secretaran lipasas. La enzima AE6L es una esterasa y tal como se demostró posteriormente, su actividad enzimática solo se observó cuando se utilizó *p*-NP acetato (2C), decayendo bruscamente a partir de *p*-NP butirato (4C). De hecho, durante el segundo paso de selección, esta cepa presentó unos valores de transesterificación moderados y lejos de los más altos. Tal como se ha mencionado anteriormente, esta cepa se seleccionó por ser la que mejores conversiones presentaba en las reacciones de desacetilación, lo cual implica compuestos 2C.

Sólo unas pocas enzimas se han caracterizado dentro de la familia CE-12 (Cantarel et al. 2009). La importancia de esta familia radica en la aplicación industrial de algunos de sus miembros para la producción de antibióticos o el blanqueo de papel. Además, AE6L pertenece a la familia de las hidrolasas GDSL subfamilia SGNH, que tiene características estructurales únicas (Akoh et al. 2004), entre las que se encuentran las siguientes: (1) posee cuatro bloques de residuos conservados, (2) una hoja  $\beta$  central de cinco cadenas, (3) ausencia de un codo nucleofílico, (4) la Ser nucleofílica se encuadran en la hoja  $\beta$  del extremo carboxilo terminal, y (5) el Asp y la His de la tríada catalítica se encuentran en el bloque V (Mølgaard et al. 2000a). Dentro de este grupo se encuentran enzimas como la cefalosporina C deacetilasa de *Bacillus* sp. KCCM1014 que ha sido utilizada previamente para la transformación industrial del 2-ácido metoxiimino-2-furilacetil-cefalosporánico y del ácido 7-aminocefalosporánico, ambos intermedios avanzados en la producción de antibióticos semisintéticos (Choi et al. 2000).

A través de las diferentes herramientas bioinformáticas usadas en el presente estudio, se determinó que la proteína AE6L de *Bacillus* sp. HR21-6 comparte algunas de las características más significativas de este tipo de proteínas, como la presencia de cuatro bloques de residuos, la existencia del Asp y la His de la tríada catalítica situadas en el mismo bloque o la presencia de la Ser catalítica en el bloque I, próxima al extremo C terminal de la proteína.

La ramnogalacturonano acetilestera de *Aspergillus aculeatus* (AaRGAE) ha sido ampliamente estudiada para determinar la cinética de las acetilesterasas (Kauppinen et al. 1995) y su estructura cristalográfica (Mølgaard et al. 2000b). En este trabajo se utilizó la enzima AaRGAE, para modelizar la estructura tridimensional de AE6L utilizando el servidor I-TASSER. Mediante la evaluación geométrica utilizando el gráfico de Ramachandran se evaluó su estructura suponió un buen acercamiento a la posible estructura real de AE6L.

A pesar de tratarse de una proteína extracelular, la predicción establecida por el Modelo de Hidden Markov (HMM) sugiere que la proteína AE6L carece de péptido señal. Puesto que AE6L se localizó en la fracción soluble extracelular, esto sugiere que podría utilizar un sistema alternativo, como por ejemplo una ruta de secreción de tipo ABC. Esta ruta es un sistema de varios componentes, en el que existen proteínas periplásmicas que captan el sustrato con gran afinidad, y lo transfieren a unas proteínas de membrana, las cuales acoplan el paso de dicho sustrato hasta el citoplasma (sin alterarlo químicamente) mediante la hidrólisis de ATP. La denominación de "transportadores ABC" se debe a que en todos ellos existe una o dos proteínas periféricas de membrana citoplásmica que poseen un dominio (de unos 200 aminoácidos) conservado evolutivamente, denominado "cassette de unión a ATP" (las iniciales de *ATP-binding cassette* generan la sigla "ABC"). Los sistemas ABC de bacterias Gram-positivas están menos estudiados, pero en general muestran semejanzas con bacterias Gram-negativas, salvo que carecen del transportador libre periplásmico. En su lugar existe una proteína con funciones equivalentes (captar el nutriente del exterior), pero que está anclada al lado externo de la membrana citoplásmica, cerca del heterodímero integral de membrana (la unión se realiza mediante su cisteína N-terminal, que se une a un fosfolípido).

El análisis de la expresión del gen que codifica la proteína AE6L determinó una mayor expresión tras 24 h de cultivo de *Bacillus* sp. HR21-6, dato que contrasta con el momento de máxima actividad detectada durante la optimización del crecimiento de la cepa (48 h). Este hecho puede deberse a que la optimización de la producción de lipasas de *Bacillus* sp. HR21-6 se realizó con *p*-NP palmitato como sustrato y no con *p*-NP acetato, cuantificándose por tanto otra actividad enzimática diferente. Otra explicación posible puede ser que esta dilación entre la máxima expresión del gen y la máxima actividad de la proteína venga motivada por el tiempo requerido para la traducción del ARNm y la secreción de la proteína al medio.

Para analizar la especificidad de sustrato, el gen que codifica la enzima AE6L, responsable de la actividad enzimática deseada, se clonó en un vector de expresión y se optimizaron las condiciones de producción de la proteína. Posteriormente, se purificó la proteína recombinante y se llevó a cabo su caracterización bioquímica. La actividad de la enzima fue ensayada frente a una batería de *p*-NP con un rango de longitud de cadena de entre 2 y 18 átomos de carbono. La especificidad de la enzima AE6L para *p*-NP acetato y *p*-NP butirato es similar a otras esterases estudiadas, como por ejemplo la esterasa EstC de *Lactobacillus casei* LILA (Fenster et al. 2003) o la esterasa EstB28 de *Oenococcus oeni* (Sumbly et al. 2009). La distinción entre lipasa y esterasa se centra, entre otros aspectos, en la especificidad de la longitud de la cadena alifática (Wang et al. 2013). En general, las esterases muestran una actividad preferencial hacia sustratos o cadenas de ácidos grasos solubles en agua con longitudes de cadena corta (<10 átomos de carbono), mientras que las lipasas catalizan hidrólisis y síntesis de ácidos grasos de cadena larga (>10 átomos de carbono) generalmente insolubles en agua (Jaeger et al. 1999a). Por tanto, debido a que AE6L mostró una especificidad evidente hacia sustratos de cadena corta y en concreto mayoritariamente de 2C, puede ser clasificada como una esterasa.

La mayoría de las esterases muestran actividad óptima a valores de pH superiores a 7,0 y son estables en un rango estrecho de pH alcalino (Cieśliński et al. 2007; Kang et al. 2011). Otros estudios también demuestran que un número importante de lipasas/esterasas tienen mayor actividad a pH cercanos al fisiológico como por ejemplo las lipasas de *Pseudoalteromonas arctica* (pH 7,5) (Al Khudary et al. 2010), *Bacillus licheniformis* (pH 8,0) (Torres et al. 2009) ó *Pseudoalteromonas* sp. (pH 8,0) (Cieśliński et al. 2007). En este estudio seleccionamos un pH de reacción de 7,3, debido a que en estas condiciones la hidrólisis química en el tampón de reacción era mínima.

En cuanto al óptimo de temperatura, AE6L mostró una actividad máxima a 37°C. Existen algunos casos de enzimas que exhiben mayor actividad a temperatura ambiente o en el rango de 25–37°C (Fang et al. 2015). Sin embargo, estas temperaturas son claramente inferiores a la de algunas esterasas bacterianas estudiadas, como las enzimas de *Bacillus pseudofirmus* y *Pseudomonas sapidus* (50°C) (Rao et al. 2013), *Bacillus licheniformis* (60-65°C) (Torres et al. 2009) ó *Thermoanaerobacter tengcongensis* (70°C) (Rao et al. 2011). AE6L posee una termoestabilidad moderada después de incubarla a 37°C, conservando hasta un 30% de actividad residual después de 30 min.

Los disolventes orgánicos son compuestos basados en el elemento químico carbono, ampliamente utilizados en la industria por sus propiedades disolventes. El logaritmo del coeficiente de partición (logP) es una medida cuantitativa de la polaridad de los disolventes; así, los disolventes menos hidrofóbicos presentan un valor bajo de logP y suelen causar una mayor inactivación de la enzima que los disolventes más hidrofóbicos que presentan un alto valor de logP tal y como se muestra en la Tabla 26 (Laane y et al. 1987).

**Tabla 26.** Valores de Log P

Disolvente orgánico	Log P
Dimetilsulfóxido (DMSO) (30%)	-1,3
N,N-dimetilformamida (30 %)	-1
Metanol (30%)	-0,76
Acetonitrilo (30 %)	-0,33
Etanol (30%)	-0,24
Acetona (30%)	-0,23
2-Propanol (30 %)	0,0074
Hexano (5%)	3,5

En general, el rendimiento de la biocatálisis es bajo cuando se lleva a cabo en disolventes polares que presentan un valor de logP <2, es moderado en disolventes que presentan un logP entre 2 y 4 y es alto en disolventes que poseen un logP >4 (Laane et al. 1987). Este estudio reveló que la enzima AE6L presenta su mayor actividad en presencia de DMSO, mostrando el valor logP más bajo y mantiene la misma actividad tanto en solventes orgánicos menos hidrofóbicos (metanol) como más hidrofóbicos (hexano).

Los parámetros cinéticos de la enzima AE6L se determinaron a pH 7,3 utilizando la enzima AE6L frente al sustrato *p*-NP acetato. El valor de Km fue 1,7 mM, el cual resultó dentro del rango de valores de esterasas estudiadas anteriormente, como es el caso de la ramnogalacturonona acetilesterasa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Martínez-Martínez et al. 2008) o la acetil esterasa de *Termitomyces clypeatus* (Mukhopadhyay et al. 1997). La velocidad máxima determinada para

AE6L resultó ligeramente superior a la de otras esterasas descritas (Martínez-Martínez et al. 2008; Navarro-Fernández et al. 2008).

### V.3. ANÁLISIS DE MUTANTES DE LA ENZIMA AE6L

En la bibliografía existen numerosos estudios de mutagénesis de proteínas con el fin de determinar los aminoácidos responsables de la actividad enzimática o bien modificar ciertas propiedades de la mismas. Los estudios de mutagénesis llevados a cabo en enzimas lipolíticas son numerosos, como por ejemplo los de la lipasa Bp1A de *Bacillus pumillus* (Bustos-Jaimes et al. 2010), o los de la esterasa EstB de *Burkholderia gladioli* (Ivancic et al. 2007; Valinger et al. 2007).

Como ya se mencionó con anterioridad, se determinó que la enzima AE6L pertenecía a la familia GDSL y dentro de esta extensa familia a la subfamilia de hidrolasas SGNH debido a la presencia de cinco residuos conservados (Ser10, Gly45, Asn77, Asp182 y His185) distribuidos en cuatro bloques I, II, III y V, respectivamente (Mølgaard et al. 2000). Se ha descrito que cada uno de estos cinco residuos juega un papel clave en la función catalítica de la enzima (Ho et al. 1997).

Para determinar el centro activo de la enzima AE6L, se seleccionaron estos cinco residuos conservados supuestamente implicados en la catálisis de la enzima y se sustituyeron mediante mutagénesis dirigida por Ala. La Ala no es un aminoácido muy reactivo debido a la limitada reactividad del grupo metilo. Este hecho facilita que su sustitución pueda revelar la función del aminoácido que sustituye, debido a que permite la existencia de un aminoácido en la cadena polipeptídica sin proporcionar una función de reacción. Este hecho nos permite predecir que verdaderamente estos cinco residuos están implicados en la actividad catalítica de la enzima. Se observó una pérdida total de actividad sobre los sustratos de cadena de dos átomos carbonos (2C) en los mutantes AE6L<sup>S10A</sup>, AE6L<sup>G45A</sup> y AE6L<sup>H185A</sup>, verificando la importancia de éstos en el papel catalítico de la enzima. Estos datos concuerdan con los residuos que se describen en una thioesterasa de *E. coli* como responsables de la actividad catalítica (Lee et al. 2006). Por otra parte, los mutantes AE6L<sup>N77A</sup> y AE6L<sup>D182A</sup> presentaron actividad residual sobre este sustrato. Esto podría indicar que estos aminoácidos parecen no ser tan determinantes en la actividad catalítica. Tanto el residuo N77 como el D182 están descritos como donadores de protones en el proceso de catálisis, por lo que la carencia de uno de ellos podría ser sustituida por el otro de forma parcial, permitiendo así que se aprecie actividad residual.

El cambio de aminoácidos en una proteína puede desencadenar no sólo la pérdida de funcionalidad de la misma sino la modificación de sus propiedades (Ivancic et al. 2007; Valinger et al. 2007). Este parece ser el caso de las mutaciones N77A y T184A. Es destacable señalar un aumento de actividad en estos dos mutantes (AE6L<sup>N77A</sup> y AE6L<sup>T184A</sup>) a medida que aumenta la longitud de cadena de los ácidos grasos del sustrato utilizado. Esto podría explicarse debido a que la sustitución del aminoácido original por alanina (un aminoácido con un componente estérico pequeño) cambie el plegamiento de la proteína favoreciendo que pueda acomplejarse a sustratos de mayor envergadura, y por tanto cambie la especificidad de la misma. Aunque en un principio pareció sorprendente el cambio de especificidad de sustrato en el mutante N77A, por ser un residuo involucrado en la donación de protones en el centro activo, este tipo de cambio de especificidad también se ha descrito en otro estudio en la TAP (tioesterasa I, EC 3.1.2.2) de *E. coli* (Lee et al. 2006). Cambios similares de especificidad de sustrato tras la mutación del residuo T184 también han sido descritos en otras esterasas (Mølgaard et al. 2000). Una variación en la especificidad de sustrato se observó también en las lipasas SXL de *Staphylococcus xylosus* y SSL de *Staphylococcus simulans* al sustituir el residuo de ácido aspártico de la posición 290 por alanina

(Mosbah et al. 2006; Sayari et al. 2007) y al sustituir en la lipasa SXL el residuo de glicina 311 por Leu, Trp, Asp o Lys (Mosbah et al. 2007).

Otras dos sustituciones llevadas a cabo fueron en el aminoácido E26 por estar presente solo en 3 de las 8 secuencias de esterasas analizadas durante el alineamiento con proteínas de la familia GDSL, y el residuo S96, por estar solo presente en la proteína AE6L en la posición mencionada (Figura 58). En ambas sustituciones se produjo una pérdida de actividad, siendo menos acusada en el caso del residuo S96. A pesar de estar poco conservado, el residuo E26 parece ser esencial para la función de la enzima.

El siguiente paso fue la caracterización bioquímica de estos mutantes usando *p*-NP acetato (2C) como sustrato con el objetivo de determinar si se había producido alguna mejora en sus actividades a diferentes temperaturas. Se observó que las mutaciones S10A, G45A, N77A, D182A, y H185A conllevaba a una pérdida de actividad de actividad en todas las temperaturas ensayadas, fortaleciendo así la hipótesis de la implicación de todos ellos en el proceso catalítico. Las mutaciones E26Q y T184A proporcionaron a la enzima una cierta disminución de la termosensibilidad y presentaron la máxima actividad a 30 y 25°C, respectivamente. La mutación S96A, confiere a AE6L valores de actividad 1,2 veces superiores a la temperatura más alta ensayada, y por tanto confiere una cierta termorresistencia a la enzima. Además, dicha mutación también resultó ser la más termoestable en todas las temperaturas probadas (Figura 63).

Un dato destacable es como en AE6L y en todos los mutantes analizados, exceptuando N77A, las actividades más altas se dan después de haber incubado las enzimas durante 30 min (Figuras 64-67). Estos datos ratifican estudios donde se pone de manifiesto que el periodo de pre-incubación de una enzima puede influir en la termoestabilidad (Han et al. 2011; Kumar and Mehta 2013).

#### **V.4. MODIFICACIÓN REGIOSELECTIVA DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CARBOHIDRATOS A PARTIR DE EXTRACTOS BACTERIANOS**

En este trabajo para realizar las modificaciones de sustratos han utilizado extractos bacterianos parcialmente purificados, y en consecuencia muy baratos de obtener, que muestran niveles de rendimiento similares o incluso superiores al de lipasas comerciales purificadas, y por tanto podrían ser de uso generalizado en la industria biotecnológica. Sirva como ejemplo que el uso de estos extractos lipolíticos permitió obtener análogos a los sustratos ensayados en un solo paso. El estudio se realizó sobre diferentes compuestos fenólicos procedentes del olivo como el hidroxitirosol **1**, el DHPG **4** y el alcohol protocatecuico **8** (Brenes et al. 1999). El DHPG es un fenol simple estructuralmente similar a hidroxitirosol, pero con un grupo hidroxilo adicional en la posición benecílica. La razón de analizar este polifenol poco estudiado hasta el momento se basa en su eficacia antioxidante en agua, mayor que la del ácido ascórbico o el hidroxitirosol, mientras que en el medio lipídico es comparable a la de la vitamina E (Rodríguez et al. 2009). Además, el DHPG muestra excelentes posibilidades para ser modificado debido al alto contenido en su estructura de grupos OH libres para ser acilados, obteniendo de esta forma una batería de nuevos derivados bioactivos lipófilos con una actividad y biodisponibilidad mejoradas, tal como se ha descrito en nuestros resultados. A pesar de estas ventajas, este compuesto nunca ha sido propuesto como un antioxidante en formulaciones de alimentos funcionales, así como tampoco se han descrito sus derivados previamente.

En colaboración con el grupo del Prof. José María Fernández-Bolaños del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla y como parte también de

la Tesis doctoral del Dr. Alejandro González Benjumea se realizó el estudio de regioselectividad sobre diferentes sustratos utilizando los extractos enzimáticos de *Bacillus* sp. HR21-6.

En una fase inicial, se observó que las reacciones de desacetilación eran mucho más eficientes que las de acetilación, y por tanto, el estudio se centró fundamentalmente en la desacetilación de compuestos fenólicos y carbohidratos previamente peracetilados. Es destacable como la desacetilación del DHPG totalmente acetilado (**5**), usando diferentes alcoholes alifáticos, proporcionó sólo la desacetilación quimioselectiva de los acetilos aromáticos respetando las posiciones alifáticas. Además, se observó una sustitución inesperada del grupo acetil en la posición bencílica por un grupo alcoxi, permitiendo con ello el acceso en un único paso a una nueva familia de polifenoles lipofílicos **6a-6d**, que combinan enlaces de tipo éster y éter en la misma molécula. Estas moléculas se adoptan más fácilmente a un determinado perfil farmacológico. A partir del hidroxitirosol peracetilado (**2**), se obtuvo un derivado monoacetilado en la posición alifática. Algunos de los derivados obtenidos durante el proceso de desacetilación de los diferentes compuestos fenólicos ya han sido detectados anteriormente. En particular, el compuesto **7a** (Figura 32) se localizó en hojas de olivo (*Olea europaea*) (Di Donna et al. 2010) y el compuesto **10** (Figura 33) en el caldo de fermentación del hongo marino Y26-02 (Wu et al. 2009).

Respecto a la modificación de carbohidratos, es especialmente notable la preferencia del extracto enzimático de *Bacillus* sp. HR21-6 por realizar la desacetilación de carbohidratos peracetilados en un único anillo de glucopiranososa. Esta reacción originó una pérdida de asimetría sin precedentes de estos carbohidratos en solo dos pasos, dando lugar a derivados hasta ahora desconocidos (Figura 34). Esta pérdida de asimetría de la trehalosa es un gran avance en el campo de la Química medicinal (Wu and Wang 2014). Este hecho supone un punto de partida para acceder a análogos de metabolitos naturales que se encuentran en la pared de *Mycobacterium tuberculosis*, estos análogos son conocidos como sulfolípidos *O*-acilados, (Baer 1993). Los sulfolípidos de trehalosa (*SL*), llamados también sulfátidos, son ácidos micólicos unidos al disacárido trehalosa, pero sustituidos por grupos sulfatos. Se localizan en la periferia de la pared celular y son considerados factores de virulencia de esta bacteria. Estas moléculas naturales son esenciales para la patogenicidad ya que permiten la adhesión y penetración de la bacteria en el interior de los macrófagos favoreciendo su supervivencia al inhibir o interferir en la respuesta inmune (Schorey et al. 1997). Por esta razón se postula que los nuevos derivados *O*-acilados de la trehalosa pueden modular la infección (Gilleron et al. 2004), siendo por tanto compuestos potencialmente útiles para el desarrollo de vacunas. Esta es la razón por la que se ha dedicado tanto esfuerzo en la síntesis regioselectiva de sulfolípidos basados en trehalosa, aunque solo se ha conseguido acceder a ellos a partir de largas rutas sintéticas de protección-desprotección de la molécula (Sarpe and Kulkarni 2014). Por lo tanto, los derivados **14** y **15** (Figura 34), obtenidos en este trabajo, podrían usarse fácilmente como módulos para la construcción de nuevos análogos de sulfolípidos de trehalosa que funcionen como metabolitos naturales de *Mycobacterium*.

Es conocido que los ésteres derivados de la sacarosa peracetilada **17**, un disacárido no simétrico que consta de dos anillos de azúcar diferentes, son valiosos tensioactivos biodegradables con especial interés en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica (Shi et al. 2011). En este caso, todos los extractos tuvieron preferencia por desacetilar el anillo de fructofuranosa, dejando la glucopiranososa intacta; esto permitió la identificación de los compuestos **18** y **19** (Figura 35). Estos resultados complementarían los publicados por Ong et al (Ong et al. 1993) sobre la desacetilación del compuesto **17** mediante catálisis enzimática con la lipasa de *Candida cylindracea*, obteniendo derivados parcialmente acetilados, en los que la desacetilación solo ocurre en la unidad de glucosa, es decir con una regioselectividad totalmente distinta a la observada con los extractos utilizados en este trabajo.

En la bibliografía se encuentran numerosos ejemplos de acilaciones de glicósidos con lipasas comerciales, fundamentalmente glucosa y galactosa. Las lipasas más usadas en estos procesos son las procedentes de *C. antarctica* (Davis et al. 2014), *Candida rugosa* y la acetil esterasa de *Trichoderma reesei*. La regioselectividad de la reacción con este tipo de moléculas tiene una tendencia general a la acilación en el hidroxilo en C-6 cuando se emplean lipasas (Davis et al. 2014; Kim et al. 2003) y en el hidroxilo en C-3 cuando se emplean esterasas (Biely et al. 2015).

En un contexto farmacológico, la finalidad de este trabajo es aumentar la biodisponibilidad de compuestos bioactivos a través de un aumento en su lipofilia. Si también tenemos en cuenta la farmacocinética, sería conveniente acilar en la posición 6 del azúcar. Este evento puede suponer la ralentización de los procesos de metabolización y excreción de la molécula favoreciendo así su acumulación en el organismo (Pérez et al. 2005).

Otro hecho destacable fue el resultado obtenido en la desacetilación de la oleuropeína utilizando la enzima AE6L como biocatalizador. Se observó una regioselectividad total hacia la fracción fenólica de la molécula, dejando intacta la parte glucosídica de la misma (Figura 36). Esto contrasta con los resultados obtenidos cuando se utilizaba el extracto de *Bacillus* sp. HR21-6 donde la regioselectividad no distinguía entre la zona fenólica y glucosídica. Esto podría ser motivado por la presencia de otras enzimas extracelulares en el extracto, dejando abierto así un campo de estudio para la búsqueda en el extracto de nuevas enzimas que dirigen una regioselectividad diferente.

Debemos indicar que las reacciones regioselectivas de esta Tesis han sido realizadas tanto con extractos enzimáticos obtenidos a partir del sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6 como con enzima pura. Los extractos se procesaron mediante diálisis y posterior liofilización con el fin de utilizarlos como biocatalizador de las reacciones estudiadas, ofreciendo un método simple y barato de producción, que permitió sintetizar nuevas familias de compuestos fenólicos antioxidantes con un potencial bioactivo explorado parcialmente en este trabajo. Es importante indicar que los resultados obtenidos en los ensayos de desacetilación regioselectiva usando la proteína recombinante AE6L como biocatalizador fueron similares al extracto de *Bacillus* sp. HR21-6 sobre todos los compuestos fenólicos analizados, con la única excepción de la oleuropeína, mencionado anteriormente. Es importante remarcar que la purificación de la proteína AE6L supuso emplear ratios muy reducidas de enzima pura/sustrato, en comparación con la relación extracto enzimático/sustrato (entre 1500-5000 veces menor), confirmando de esta manera que AE6L es la enzima responsable de llevar a cabo los procesos de desacetilación estudiados. También se observó que después del proceso de purificación, AE6L es más activa cuando la reacción ocurre en presencia de un disolvente metanólico y va decayendo el grado de conversión del sustrato a medida que aumenta la longitud del alcohol, lo que confirma su entidad como esterasa. Este hecho puede deberse a que a medida que aumenta el número de carbonos del alcohol aumenta también su componente estérico, dificultando así el acceso de la enzima al sustrato.

Por otra parte, se observó que el éxito de la desacetilación de los compuestos fenólicos peracetilados depende enormemente de la temperatura de reacción, ya que en todos los casos hubo una mejora notable al calentar a 60°C (Tabla 25), posiblemente debido a una mayor disolución del sustrato, y por tanto a una mayor disponibilidad del mismo. Este dato contrasta con la temperatura óptima de actividad observada en los estudios de caracterización de AE6L con los derivados de los *p*-NP, la cual se fijó a 37°C y disminuía a medida que aumentaba la temperatura, quedando de manifiesto que un incremento de ésta inducía la pérdida de su actividad. Para explicar esta discordancia podemos remitirnos a estudios previos donde se confirma que los compuestos fenólicos pueden acomplejarse con las proteínas para estabilizarlas (Majid 2011), reduciendo así el efecto perjudicial de la alta temperatura sobre la enzima y permitiendo un mejor acceso al sustrato.

## V.5. BIOACTIVIDADES DE LOS DERIVADOS DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Estudios previos han demostrado que los derivados lipófilos y análogos de uno de los compuestos fenólicos del aceite de oliva, el hidroxitirosol, muestran un mejor equilibrio hidrofílico/lipofílico (Lorentz et al. 2010), una mayor biodisponibilidad en comparación con sus análogos desprotegidos (Fragopoulou et al. 2007) y una mayor estabilidad frente a especies reactivas de oxígeno, haciendo a estas moléculas mucho más atractivas para la industria alimentaria y farmacéutica (Pereira-Caro et al. 2012). Estos hallazgos nos llevaron a analizar los derivados de otro compuesto fenólico procedente del aceite de oliva, el DHPG, menos estudiado hasta el momento y con las mismas características bioactivas (Brenes et al. 1999). Además, estudios de producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos THP-1 mostraron una importante reducción en los niveles de esta citoquina con algunos polifenoles como el galato de epigallocatequina (EGCG), la catequina más abundante en el té verde (Leong et al. 2014) o los bioflavonoides presentes en el jugo de bergamota (BJe) (Navarra et al. 2015; Risitano et al. 2014). Estudios utilizando líneas celulares han permitido demostrar la bioactividad de algunos polifenoles como la quercetina (Sak 2014). Por este motivo, en este trabajo se procedió a evaluar la actividad citotóxica, antioxidante y anti-inflamatoria de estos derivados mediante estudios *in vitro* en diferentes líneas celulares como una línea celular de adenocarcinoma de colon humano (HT-29), una línea de células endoteliales corneales humanas (HCEC) y una línea monocitaria de leucemia aguda humana (THP-1). Estos estudios se desarrollaron durante una estancia realizada en el laboratorio de la Dra. Doris Marko en la Universidad de Viena.

En primer lugar, se procedió a determinar el potencial efecto citotóxico de los éteres de metilo, etilo, propilo y butilo del DHPG y del propio compuesto fenólico sin modificar. Estos compuestos en general no produjeron efectos citotóxicos en células HCEC (Figuras 71 y 72). Estos resultados están en concordancia con otras publicaciones que demuestran que las células HT-29 son bastante insensibles a los posibles efectos citotóxicos del resveratrol (González-Sarriás et al. 2012; Saunier et al. 2017). En este trabajo solo se observó la excepción del DHPG a 100  $\mu$ M y su derivado OEt OH a 0,1-1  $\mu$ M, donde el ensayo WST-1 en células HCEC indicó una ligera disminución en la actividad mitocondrial.

Estudios previos han demostrado una mayor actividad antioxidante de diferentes éteres de hidroxitirosol en comparación con el hidroxitirosol cuando se analizaba mediante el ensayo fluorométrico de diclorodihidrofluoresceína (DCF) en células musculares de rata. Este efecto parece ser debido a una mejor absorción de los compuestos en las células (Tofani et al. 2010). También han sido ampliamente estudiados los efectos protectores contra el estrés oxidativo. Algunos resultados obtenidos hasta el momento para evaluar la actividad de los éteres de hidroxitirosol en células HepG2, revelan un gran potencial para evitar el daño celular inducido por peróxido de hidrogeno y gran capacidad para mantener el estado redox celular inalterado después de un tratamiento previo de incubación (Pereira-Caro et al. 2011). Estos resultados también están en concordancia con los obtenidos con hidroxitirosol por Martin et al.,(2010). Todos los compuestos ensayados en este estudio mostraron una ligera disminución de la fluorescencia de DCF en el ensayo pro-oxidante, indicando que pueden realizar tareas antioxidantes solo moderadas. Sin embargo, en este trabajo se pone de manifiesto la relevancia del hidroxitirosol y el DHPG como inductores de los sistemas celulares de protección frente a estrés oxidativo. Se determinó que los derivados del DHPG son también efectivos en células HCEC, en particular los derivados OEt OH y OPr Ac redujeron de forma sustancial los niveles de ROS, muy por debajo incluso de los niveles basales. A su vez, es también importante tener en cuenta que la actividad antioxidante de los derivados fenólicos fue mucho más acusada en una línea celular cancerosa HT-

29. En este caso, todos los derivados del DPHG ensayados fueron notablemente más efectivos que el compuesto natural sin modificar.

La iniciación y el mantenimiento de diversas respuestas inflamatorias están reguladas por moléculas pro-inflamatorias tales como las interleuquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8) y citoquinas antiinflamatorias (IL-10) (Gao et al. 2014) de forma que una desregulación de estos mediadores puede dar lugar a diversas enfermedades, entre las que se incluye el cáncer (Kaiser 2010).

En el presente estudio, se investigó la capacidad de los diferentes derivados fenólicos, incluyendo el propio DHPG y el hidroxitirosol, para reducir la respuesta inflamatoria celular. Las células cancerosas generalmente tienen un nivel más alto de ROS y una mayor sobreexpresión de enzimas antioxidantes en comparación con las células normales. Por este motivo, este estudio se realizó con una línea monocitaria de leucemia aguda humana (THP-1). Es conocido que la inflamación promueve la tumorigénesis mediante la activación de factores de transcripción NF- $\kappa$ B (Conejo et al. 2001). En este estudio, los derivados propílicos y butílicos del DHPG inhibieron significativamente la activación de las respuestas inflamatorias mediadas por NF- $\kappa$ B, mediante la supresión de la expresión de NF- $\kappa$ B en monocitos THP-1 estimulados por LPS. Estos resultados destacan que estos derivados son potenciales agentes antioxidantes con actividad anti-inflamatoria.

En base a todo lo expuesto, los derivados fenólicos estudiados parecen que poseen un gran potencial para el tratamiento o prevención de diferentes enfermedades entre las que destaca la neurodegeneración o el cáncer.

Por tanto, se propone que la modificación regioselectiva de los compuestos fenólicos naturales mediante el uso de enzimas lipolíticas de origen bacteriano, abre la posibilidad de mejorar la actividad y/o la capacidad de dichos compuestos para atravesar la membrana, aumentando así su lipofilia sin modificar sus posibilidades bioactivas. Esta determinación nos deja campos abiertos al estudio, como por ejemplo determinar si esta mejora está motivada por una actividad intrínseca del derivado obtenido o es producto de una mejora en la lipofilia del mismo, haciéndolo por tanto más disponible.

## CONCLUSIONES

---

## VI. CONCLUSIONES

---

1. Se ha desarrollado un método de selección de microorganismos capaces de llevar a cabo reacciones regioselectivas en compuestos fenólicos naturales y azúcares, pudiendo ser utilizados como biocatalizadores en este tipo de reacciones. Su utilización sustituye largas rutas de síntesis químicas y el empleo de reactivos, abaratando el proceso.
2. Se ha obtenido la secuencia completa del genoma de *Bacillus* sp. HR21-6. Tras el análisis de su secretoma se identificó una enzima en la fracción extracelular soluble libre con actividad esterasa. Esta enzima fue designada como AE6L, mostrando homología con proteínas pertenecientes a la familia II o GDSL, subfamilia hidrolasas-SGNH.
3. AE6L se purificó tras expresarse heterológamente en *E. coli*. La enzima presentó una actividad máxima a 37°C y pH 7,3 con *p*-NP acetato como sustrato, mostrando unas condiciones óptimas dentro del rango de procedimientos industriales.
4. La purificación de la proteína permitió confirmar que AE6L es la enzima responsable de la desacetilación de compuestos fenólicos peracetilados que se llevaba a cabo en el sobrenadante de *Bacillus* sp. HR21-6.
5. Tras un estudio de mutagénesis dirigida se han identificado los aminoácidos Ser10, Glu26, Gly45, Asn77, Asp182 e His185 como implicados en la actividad enzimática de la proteína AE6L. Además, los aminoácidos Asn77 y Thr194 parecen estar implicados en la especificidad de sustrato de la enzima.
6. El DHPG y sus derivados no produjeron efectos citotóxicos en células HCEC.
7. Los compuestos fenólicos naturales y los derivados del DHPG mostraron una actividad antioxidante directa moderada en células HCEC. Estos compuestos también demostraron ser capaces de activar los mecanismos celulares de protección frente a estrés oxidativo en estas células. En la línea celular cancerosa HT-29 los compuestos fenólicos naturales redujeron los niveles de ROS hasta niveles basales, mientras que todos los derivados del DHPG dieron lugar a una reducción aún más pronunciada.
8. El DHPG y sus derivados propoxi- y butoxi- desacetilados, y etoxi-, propoxi- y butoxi-acetilados presentaron una actividad anti-inflamatoria moderada.

## BIBLIOGRAFÍA

---

## I. BIBLIOGRAFÍA

---

- Abdelmonaem, M., Hatem, B., Imen, G. & Jeannette, B. H. (2010). Classification of EC 3.1.1.3 bacterial true lipases using phylogenetic analysis. *African Journal of Biotechnology*, 9(48), 8243–8247. doi:10.5897/AJB10.721
- Adlercreutz, P. (2013). Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chemical Society Reviews*, 42 (15), 6406. doi:10.1039/c3cs35446f
- Adom, K. K. & Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (21), 6182–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12358499>.
- Ahmed, E. H., Raghavendra, T. & Madamwar, D. (2010). An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: Application for ethyl caprylate synthesis. *Bioresource Technology*, 101 (10), 3628–3634. doi:10.1016/J.BIORTECH.2009.12.107
- Akoh, C. C., Lee, G.-C., Liaw, Y.-C., Huang, T.-H. & Shaw, J.-F. (2004). GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research*, 43(6), 534–552. doi:10.1016/j.plipres.2004.09.002
- Al Khudary, R., Venkatachalam, R., Katzer, M., Elleuche, S. & Antranikian, G. (2010). A cold-adapted esterase of a novel marine isolate, *Pseudoalteromonas arctica*: gene cloning, enzyme purification and characterization. *Extremophiles*, 14 (3), 273–285. doi:10.1007/s00792-010-0306-7
- Alalouf, O., Balazs, Y., Volkinshtein, M., Grimpel, Y., Shoham, G. & Shoham, Y. (2011). A New family of carbohydrate esterases is represented by a GDSL hydrolase/acetylxyloxyesterase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (49), 41993–42001. doi:10.1074/jbc.M111.301051
- Albuquerque, J. A., González, J., García, D. & Cegarra, J. (2006). Composting of a solid olive-mill by-product (“alperujo”) and the potential of the resulting compost for cultivating pepper under commercial conditions. *Waste Management*, 26(6), 620–626. doi:10.1016/J.WASMAN.2005.04.008
- Alkan, H., Baysal, Z., Uyar, F. & Dogru, M. (2007). Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136 (2), 183–92.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–402.
- Altschul, S. F., Stephen F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215 (3), 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Andreadou, I., Iliodromitis, E. K., Mikros, E., Constantinou, M., Agalias, A., Magiatis, P., et al. (2006). The Olive Constituent Oleuropein Exhibits Anti-Ischemic, Antioxidative, and Hypolipidemic Effects in Anesthetized Rabbits. *The Journal of Nutrition*, 136(8), 2213–2219. doi:10.1093/jn/136.8.2213
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2), 195–201. doi:10.1093/bioinformatics/bti770
- Arpigny, J. L. & Jaeger, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *The Biochemical Journal*, 343 Pt 1, 177–83.

- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., et al. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, 9(1), 75. doi:10.1186/1471-2164-9-75
- Baer, H. H. (1993). The structure of an antigenic glycolipid (SL-IV) from *Mycobacterium Tuberculosis*. *Carbohydrate Research*, 240, 1–22.
- Baird, L. & Dinkova-Kostova, A. T. (2011). The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Archives of Toxicology*, 85(4), 241–72. doi:10.1007/s00204-011-0674-5
- Banat, I. M., Makkar, R. S. & Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 495–508. doi:10.1007/s002530051648
- Barbaro, B., Toietta, G., Maggio, R., Arciello, M., Tarocchi, M., Galli, A. & Balsano, C. (2014). Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 18508–24. doi:10.3390/ijms151018508
- Barderas, M. G., Vivanco, F. & Alvarez-Llamas, G. (2013). Vascular proteomics. Methods in Molecular Biology . Vol. 1000, pp. 1–20. Totowa, NJ. Humana Press. doi:10.1007/978-1-62703-405-0\_1
- Bassegoda, A., Pastor, F. I. J. & Diaz, P. (2012). *Rhodococcus* sp. Strain CR-53 LipR, the first member of a new bacterial lipase family (Family X) displaying an unusual Y-type oxyanion hole, similar to the *Candida antarctica* lipase clan. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1724–1732. doi:10.1128/AEM.06332-11
- Bastian, A. A., Marcozzi, A. & Herrmann, A. (2012). Selective transformations of complex molecules are enabled by aptameric protective groups. *Nature Chemistry*, 4(10), 789–793. doi:10.1038/nchem.1402
- Bayer, S., Kunert, A., Ballschmiter, M. & Greiner-Stoeffele, T. (2010). Indication for a new lipolytic enzyme family: isolation and characterization of two esterases from a metagenomic library. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 18(3), 181–187. doi:10.1159/000315459
- Bernini, R., Mincione, E., Barontini, M. & Crisante, F. (2008). Convenient synthesis of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives from tyrosol or homovanillyl alcohol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 8897–8904. doi:10.1021/jf801558z
- Bertone, S., Giacomini, M., Ruggiero, C., Piccarolo, C. & Calegari, L. (1996). Automated systems for identification of heterotrophic marine bacteria on the basis of their Fatty Acid composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(6), 2122–32.
- Biely, P., Malovíková, A., Uhliaríková, I., Li, X.-L. & Wong, D. W. S. (2015). Glucuronoyl esterases are active on the polymeric substrate methyl esterified glucuronoxylan. *FEBS Letters*, 589(18), 2334–2339. doi:10.1016/J.FEBSLET.2015.07.019
- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N. & Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(8), 971–4.
- Biswanath, B. & Dey, A. (2012). A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus* spp. *Journal of Biochemical Technology* 3(4): 448-457
- Blázquez, M. A., Santos, E., Flores, C., Martínez-Zapater, J. M., Salinas, J. & Gancedo, C. (1998). Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *The Plant Journal*, 13(5), 685–689. doi:10.1046/j.1365-313X.1998.00063.x
- Boekema, B. K. H. L., Beselin, A., Breuer, M., Hauer, B., Koster, M., Rosenau, F., et al. (2007). Hexadecane and tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 3838–3844.

doi:10.1128/AEM.00097-07

- Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(1), 73–81. doi:10.1016/S0168-6445(01)00075-4
- Bornscheuer, U. T. (2006). *Hydrolases in organic synthesis : regio- and stereoselective biotransformations*. Biotechnology Institute.
- Bouallagui, Z., Han, J., Isoda, H. & Sayadi, S. (2011). Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1), 179–184. doi:10.1016/j.fct.2010.10.014
- Bouaziz, M., Grayer, R. J., Simmonds, M. S. J., Damak, M. & Sayadi, S. (2005). Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar chemlali growing in tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 236–241. doi:10.1021/jf048859d
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>.
- Braun, P., Tommassen, J. & Filloux, A. (1996). Role of the propeptide in folding and secretion of elastase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 19(2), 297–306. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8825775>.
- Brenes, M., García, A., García, P., Rios, J. J. & Garrido, A. (1999). Phenolic compounds in apanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3535–3540. doi:10.1021/jf990009o
- Brockerhoff, H. & Jensen, R. G. (Robert G. (1974). *Lipolytic enzymes*. Academic Press.
- Buisman, G. J. H., van Helteren, C. T. W., Kramer, G. F. H., Veldsink, J. W., Derksen, J. T. & Cuperus, F. P. (1998). Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants. *Biotechnology Letters*, 20(2), 131–136. doi:10.1023/A:1005368222340
- Bulotta, S., Corradino, R., Celano, M., Maiuolo, J., D'Agostino, M. & Oliverio, M. (2013). Antioxidant and antigrowth action of peracetylated oleuropein in thyroid cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, 51(1), 181–189. doi:10.1530/JME-12-0241
- Bustos-Jaimes, I., Mora-Lugo, R., Calcagno, M. L. & Farrés, A. (2010). Kinetic studies of Gly28:Ser mutant form of *Bacillus pumilus* lipase: Changes in kcat and thermal dependence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(12), 2222–2227. doi:10.1016/J.BBAPAP.2010.09.001
- Cabrerizo, S., De La Cruz, J. P., López-Villodres, J. A., Muñoz-Marín, J., Guerrero, A., Reyes, J. J., et al. (2013). Role of the inhibition of oxidative stress and inflammatory mediators in the neuroprotective effects of hydroxytyrosol in rat brain slices subjected to hypoxia reoxygenation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(12), 2152–2157. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.08.007
- Caffall, K. H. & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879–1900. doi:10.1016/j.carres.2009.05.021
- Calderón-Montaña, J. M., Madrona, A., Burgos-Morón, E., Orta, M. L., Mateos, S., Espartero, J. L. & López-Lázaro, M. (2013). Selective cytotoxic activity of new lipophilic Hydroxytyrosol alkyl ether derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(21), 5046–5053. doi:10.1021/jf400796p
- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycomics.

*Nucleic Acids Research*, 37, D233–D238. doi:10.1093/nar/gkn663

- Castilla, A., Panizza, P., Rodríguez, D., Bonino, L., Díaz, P., Irazoqui, G. & Rodríguez Giordano, S. (2017). A novel thermophilic and halophilic esterase from *Janibacter* sp. R02, the first member of a new lipase family (Family XVII). *Enzyme and Microbial Technology*, 98, 86–95. doi:10.1016/j.enzmictec.2016.12.010
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C. & Mahillon, J. (2019). Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Frontiers in Microbiology*, 10, 302. doi:10.3389/fmicb.2019.00302
- Chahinian, H., Ali, Y., Abousalham, A., Petry, S., Mandrich, L., Manco, G. (2005). Substrate specificity and kinetic properties of enzymes belonging to the hormone-sensitive lipase family: Comparison with non-lipolytic and lipolytic carboxylesterases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1738(1–3), 29–36. doi:10.1016/j.bbalip.2005.11.003
- Chakraborty, K. & Raj, R. P. (2008). An extra-cellular alkaline metalloproteinase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization. *Food Chemistry*, 109(4), 727–736. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2008.01.026
- Chebil, L., Anthoni, J., Humeau, C., Gerardin, C., Engasser, J.-M. & Ghoul, M. (2007). Enzymatic Acylation of Flavonoids: Effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9496–9502. doi:10.1021/jf071943j
- Choi, S. K., Olsen, D. S., Roll-Mecak, A., Martung, A., Remo, K. L., Burley, S. K., et al. (2000). Physical and functional interaction between the eukaryotic orthologs of prokaryotic translation initiation factors IF1 and IF2. *Molecular and cellular biology*, 20(19), 7183–91. doi:10.1128/mcb.20.19.7183-7191.2000
- Cieśliński, H., Białkowska, A. M., Długolecka, A., Daroch, M., Tkaczuk, K. L., Kalinowska, H., et al. (2007). A cold-adapted esterase from psychrotrophic *Pseudoalteromonas* sp. strain 643A. *Archives of Microbiology*, 188(1), 27–36. doi:10.1007/s00203-007-0220-2
- Cilla, A., De Palma, G., Lagarda, M. J., Barberá, R., Farré, R., Clemente, G. & Romero, F. (2009). Impact of fruit beverage consumption on the antioxidant status in healthy women. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 54(1), 35–42. doi:10.1159/000205318
- Claus, & Berkeley. (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2, 529–550. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10019929565/>.
- Cohn. (n.d.). Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174AL |
- Compain, P. (2018). Glycomimetics: Design, synthesis, and therapeutic applications. *Molecules*, 23(7), 1658. doi:10.3390/molecules23071658
- Concepción Romero, , Eduardo Medina, , Julio Vargas, , Manuel Brenes, & Castro, A. De. (2007). In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. doi:10.1021/JF0630217
- Conejo, R., Valverde, A. M., Benito, M. & Lorenzo, M. (2001). Insulin produces myogenesis in C2C12 myoblasts by induction of NF- $\kappa$ B and downregulation of AP-1 activities. *Journal of Cellular Physiology*, 186(1), 82–94. doi:10.1002/1097-4652(200101)186:1.
- Coni, E., Di Benedetto, R., Di Pasquale, M., Masella, R., Modesti, D., Mattei, R. & Carlini, E. A. (2000). Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids*, 35(1), 45–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10695923>.
- Contesini, F. J., Melo, R. R. & Sato, H. H. (2018). An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(3), 321–334. doi:10.1080/07388551.2017.1354354

- Craig-Barnes, H. A., Doumouras, B. S., & Palaniyar, N. (2010). Surfactant protein D interacts with alpha2-macroglobulin and increases its innate immune potential. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(18), 13461–70. doi:10.1074/jbc.M110.108837
- Crowe, J. H., Hoekstra, F. A. & Crowe, L. M. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 54(1), 579–599. doi:10.1146/annurev.ph.54.030192.003051
- Cruz, H., Pérez, C., Wellington, E., Castro, C. & Servín-González, L. (1994). Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family. *Gene*, 144(1), 141–2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8026751>.
- D'Angelo, S, Manna, C., Migliardi, V., Mazzoni, O., Morrica, P., Capasso, G., et al. (2001). Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 29(11), 1492–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11602527>.
- D'Angelo, Stefania, Ingrosso, D., Migliardi, V., Sorrentino, A., Donnarumma, G., Baroni, A., et al. (2005). Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(7), 908–919. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.12.015
- Davis, C. B., Markey, C. E., Busch, M. A. & Busch, K. W. (2007). Determination of capsaicinoids in habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 5925–5933. doi:10.1021/jf070413k
- Davis, R. A., Fettingner, J. C. & Gervay-Hague, J. (2014). Tandem glycosyl iodide glycosylation and regioselective enzymatic acylation affords 6-O-tetradecanoyl- $\alpha$ -d-cholesteryl glycosides. *The Journal of Organic Chemistry*, 79(17), 8447–52. doi:10.1021/jo501371h
- de Pascale, D., Cusano, A. M., Autore, F., Parrilli, E., di Prisco, G., Marino, G. & Tutino, M. L. (2008). The cold-active Lip1 lipase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 is a member of a new bacterial lipolytic enzyme family. *Extremophiles*, 12(3), 311–323. doi:10.1007/s00792-008-0163-9
- De Simone, G., Galdiero, S., Manco, G., Lang, D., Rossi, M. & Pedone, C. (2000). A snapshot of a transition state analogue of a novel thermophilic esterase belonging to the subfamily of mammalian hormone-sensitive lipase 1 1Edited by D. Rees. *Journal of Molecular Biology*, 303(5), 761–771. doi:10.1006/jmbi.2000.4195
- De Simone, G., Menchise, V., Manco, G., Mandrich, L., Sorrentino, N., Lang, D., et al. (2001). The crystal structure of a hyper-thermophilic carboxylesterase from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus* 1 1Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology*, 314(3), 507–518. doi:10.1006/jmbi.2001.5152
- De Virgilio, C., Hottiger, T., Dominguez, J., Boller, T. & Wiemken, A. (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *European Journal of Biochemistry*, 219(1–2), 179–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8306984>.
- DeLano, W.L. (2002) *The PyMOL Molecular Graphics System*. Delano Scientific, San Carlos.
- Denmark, S. E. & Ambrosi, A. (2015). Why you really should consider using palladium-catalyzed cross-coupling of silanols and silanolates. *Organic Process Research & Development*, 19(8), 982–994. doi:10.1021/acs.oprd.5b00201
- Derewenda, Z. S., Wei, Y., Contreras, J. A., Sheffield, P., Osterlund, T., Derewenda, U., et al. (1999). Crystal structure of brefeldin A esterase, a bacterial homolog of the mammalian hormone-sensitive lipase. *Nature Structural Biology*, 6(4), 340–345. doi:10.1038/7576
- Di Donna, L., Mazzotti, F., Naccarato, A., Salerno, R., Tagarelli, A., Taverna, D. & Sindona, G. (2010). Secondary metabolites of *Olea europaea* leaves as markers for the discrimination of cultivars and cultivation zones by multivariate analysis. *Food Chemistry*, 121(2), 492–496.

- doi:10.1016/j.foodchem.2009.12.070
- Dong, H. & Zhang, D. (2014). Current development in genetic engineering strategies of *Bacillus* species. *Microbial Cell Factories*, 13, 63. doi:10.1186/1475-2859-13-63
- Duthie, G. G. & Brown, K. M. (1994). Reducing the risk of cardiovascular disease. In *Functional Foods* (pp. 19–38). Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/978-1-4615-2073-3\_2
- Dutta, S. & Ray, L. (2009). Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C7. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159(1), 142–154. doi:10.1007/s12010-009-8543-x
- Dyrløv Bendtsen, J., Nielsen, H., von Heijne, G. & Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 340(4), 783–795. doi:10.1016/j.jmb.2004.05.028
- Ebrahimi, A. & Schluesener, H. (2012). Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls. *Ageing Research Reviews*, 11(2), 329–345. doi:10.1016/j.arr.2012.01.006
- Elbein, A. D. (1974). The Metabolism of  $\alpha,\alpha$ -Trehalose. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 30, 227–256. doi:10.1016/S0065-2318(08)60266-8
- Elend, C., Schmeisser, C., Leggewie, C., Babiak, P., Carballeira, J. D. & Steele, H. L. (2006). Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3637–45. doi:10.1128/AEM.72.5.3637-3645.2006
- Elshaghabee, F. M. F., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C. & Panwar, H. (2017). *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/FMICB.2017.01490
- Embuscado, M. E. Functionalizing carbohydrates for food applications: texturizing and bioactive/flavor delivery systems. pp. 486, DEStech Publications, Inc. <https://www.destechpub.com/product/functionalizing-carbohydrates-for-food-applications/>.
- Escobar-Niño, A., Luna, C., Luna, D., Marcos, A. T., Cánovas, D. & Mellado, E. (2014). Selection and characterization of biofuel-producing environmental bacteria isolated from vegetable oil-rich wastes. *PloS One*, 9(8), e104063. doi:10.1371/journal.pone.0104063
- Ewis, H. E., Abdelal, A. T. & Lu, C.-D. (2004). Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxyl esterases from *Geobacillus stearothermophilus*. *Gene*, 329, 187–195. doi:10.1016/j.gene.2003.12.029
- Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Montedoro, G. F. & Morozzi, G. (2002). Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 11(4), 351–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12195161>.
- Fang, Y., Singh, B. & Singh, B. P. (2015). Effect of temperature on biochar priming effects and its stability in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 80, 136–145. doi:10.1016/J.SOILBIO.2014.10.006
- Favaro, L., Cagnin, L., Basaglia, M., Pizzocchero, V., van Zyl, W. H. & Casella, S. (2017). Production of bioethanol from multiple waste streams of rice milling. *Bioresource Technology*, 244, 151–159. doi:10.1016/j.biortech.2017.07.108
- Felizón, B., Fernández-Bolaños, J., Heredia, A. & Guillén, R. (2000). Steam-explosion pretreatment of olive cake. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(1), 15–22. doi:10.1007/s11746-000-0003-y
- Feller, G., Thiry, M. & Gerday, C. (1990). Sequence of a lipase gene from the antarctic

- psychrotroph *Moraxella* TA144. *Nucleic Acids Research*, 18(21), 6431. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2243791>.
- Fenster, K. M., Parkin, K. L. & Steels, J. L. (2003). Intracellular esterase from *Lactobacillus casei* LILA: nucleotide sequencing, purification, and characterization. *Journal of Dairy Science*, 86(4), 1118–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12741535>.
- Fernández-Bolaños Guzmán, J., Guillén Bejarano, R., Jiménez Araujo, A., Rodríguez-Arcos, R., Rodríguez-Gutiérrez, G. & Lama Muñoz, A. (2008). Method for purifying 3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG) from plant products. <http://digital.csic.es/handle/10261/28350>.
- Fernandez-Bolanos, J., Lopez, O., Fernandez-Bolanos, J. & Rodriguez-Gutierrez, G. (2008). Hydroxytyrosol and derivatives: isolation, synthesis, and biological properties. *Current Organic Chemistry*, 12(6), 442–463. doi:10.2174/138527208784083888
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillén, R. & Jiménez, A. (2002). Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "Alperujo": *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6804–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12405779>.
- Fitó, M., de la Torre, R., Farré-Albaladejo, M., Khymenetz, O., Marrugat, J. & Covas, M.-I. (2007). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 43(4), 375–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18209271>.
- Fragopoulou, E., Nomikos, T., Karantonis, H. C., Apostolakis, C., Pliakis, E., Samiotaki, M., et al. (2007). Biological activity of acetylated phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(1), 80–89. doi:10.1021/jf0627221
- Fu, Y., Tsui, H.-C. T., Bruce, K. E., Sham, L.-T., Higgins, K. A., Lisher, J. P., et al. (2013). A new structural paradigm in copper resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature Chemical Biology*, 9(3), 177–183. doi:10.1038/nchembio.1168
- Furneri, P. M., Piperno, A., Sajia, A. & Bisignano, G. (2004). Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12), 4892–4. doi:10.1128/AAC.48.12.4892-4894.2004
- Galperin, M. Y. (2013). Genome diversity of spore-forming firmicutes. *Microbiology Spectrum*, 1(2). doi:10.1128/microbiolspectrum.TBS-0015-2012
- Gao, L., Li, Z., Chang, S. & Wang, J. (2014). Association of interleukin-10 polymorphisms with schizophrenia: A meta-analysis. *PLoS ONE*, 9(3), e90407. doi:10.1371/journal.pone.0090407
- Ghazarian, H., Itoni, B., & Oppenheimer, S. B. (2011). A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica*, 113(3), 236–247. doi:10.1016/j.acthis.2010.02.004
- Giamarellos-Bourboulis, E. J., Geladopoulos, T., Chrisofos, M., Koutoukas, P., Vassiliadis, J., Alexandrou, I., et al. (2006). Oleuropein. *Shock*, 26(4), 410–416. doi:10.1097/01.shk.0000226342.70904.06
- Gilleron, M., Stenger, S., Mazon, Z., Wittke, F., Mariotti, S., Böhmer, G., et al. (2004). Diacylated sulfoglycolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Experimental Medicine*, 199(5), 649–59. doi:10.1084/jem.20031097
- Goldemberg, J. (2008). The Brazilian biofuels industry. *Biotechnology for Biofuels*, 1(1), 6. doi:10.1186/1754-6834-1-6
- Goldsmith, C. D., Bond, D. R., Jankowski, H., Weidenhofer, J., Stathopoulos, C. E., Roach, P. D. & Scarlett, C. J. (2018). The olive biophenols oleuropein and hydroxytyrosol selectively reduce proliferation, influence the cell cycle, and induce apoptosis in pancreatic cancer cells.

*International Journal of Molecular Sciences*, 19(7). doi:10.3390/ijms19071937

- Gómez-Rico, A., Salvador, M. D., Moriana, A., Pérez, D., Olmedilla, N., Ribas, F. & Fregapane, G. (2007). Influence of different irrigation strategies in a traditional Cornicabra cv. olive orchard on virgin olive oil composition and quality. *Food Chemistry*, 100(2), 568–578. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2005.09.075
- Gong, D., Geng, C., Jiang, L., Cao, J., Yoshimura, H. & Zhong, L. (2009). Effects of hydroxytyrosol-20 on carrageenan-induced acute inflammation and hyperalgesia in rats. *Phytotherapy Research*, 23(5), 646–650. doi:10.1002/ptr.2686
- González-Correa, J. A., Navas, M. D., Lopez-Villodres, J. A., Trujillo, M., Espartero, J. L. & De La Cruz, J. P. (2008). Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia–reoxygenation. *Neuroscience Letters*, 446(2–3), 143–146. doi:10.1016/j.neulet.2008.09.022
- González-Sarrías, A., Li, L. & Seeram, N. P. (2012). Anticancer effects of maple syrup phenolics and extracts on proliferation, apoptosis, and cell cycle arrest of human colon cells. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 185–196. doi:10.1016/J.JFF.2011.10.004
- Gordon, M. H., Paiva-Martins, F. & Almeida, M. (2001). Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2480–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11368623>. Accessed 23 March 2019
- Götz, F., Verheij, H. M. & Rosenstein, R. (1998). Staphylococcal lipases: molecular characterisation, secretion, and processing. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93(1–2), 15–25. doi:10.1016/S0009-3084(98)00025-5
- Grasso, S., Siracusa, L., Spatafora, C., Renis, M. & Tringali, C. (2007). Hydroxytyrosol lipophilic analogues: enzymatic synthesis, radical scavenging activity and DNA oxidative damage protection. *Bioorganic Chemistry*, 35(2), 137–52. doi:10.1016/j.bioorg.2006.09.003
- Green, M. R. Michael R., Sambrook, J. & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Guichard, C., Pedruzzi, E., Fay, M., Marie, J.-C., Braut-Boucher, F., Daniel, F., et al. (2006). Dihydroxyphenylethanol induces apoptosis by activating serine/threonine protein phosphatase PP2A and promotes the endoplasmic reticulum stress response in human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 27(9), 1812–1827. doi:10.1093/carcin/bgl009
- Gupta, Q., B., & P., L. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), 15–32. doi:10.1007/s00253-002-0975-y
- H-Kittikun, A., Prasertsan, P., Zimmermann, W., Seesuriyachan, P., & Chaiyaso, T. (2012). Sugar ester synthesis by thermostable lipase from *Streptomyces thermocarboxydus* ME168. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(8), 1969–82. doi:10.1007/s12010-012-9624-9
- Hagiwara, K., Goto, T., Araki, M., Miyazaki, H., & Hagiwara, H. (2011). Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *European Journal of Pharmacology*, 662(1–3), 78–84. doi:10.1016/j.ejphar.2011.04.023
- Haider, M. A., & Pakshirajan, K. (n.d.). Screening and optimization of media constituents for enhancing lipolytic activity by a soil microorganism using statistically designed experiments. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 141(2–3), 377–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025563>.
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2023–2044. doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x
- Han, J., Talorete, T. P. N., Yamada, P., & Isoda, H. (2009). Anti-proliferative and apoptotic effects

- of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*, 59(1), 45–53. doi:10.1007/s10616-009-9191-2
- Han, M., Jun, S.-H., Song, S. H., Park, K. U., Kim, J. Q., & Song, J. (2011). Use of tandem mass spectrometry for newborn screening of 6 lysosomal storage Disorders in a Korean population. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 31(4), 250. doi:10.3343/kjlm.2011.31.4.250
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345791>.
- Handrick, R., Reinhardt, S., Focarete, M. L., Scandola, M., Adamus, G., Kowalczyk, M., & Jendrossek, D. (2001). A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short chain-length hydroxyalkanoic acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36215–24. doi:10.1074/jbc.M101106200
- Hanes, C. S. (1932). Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *The Biochemical Journal*, 26(5), 1406–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16744959>.
- Harwood, C. R. (1989). Introduction to the Biotechnology of *Bacillus*. *Bacillus* (pp. 1–4). Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/978-1-4899-3502-1\_1
- Hasan, F., Shah, A. A. & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235–251. doi:10.1016/J.ENZMICTEC.2005.10.016
- Hausmann, S. & Jaeger, K.-E. (2010). Lipolytic enzymes from bacteria. In Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology (pp. 1099–1126). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-77587-4\_77
- Hemilä, H., Koivula, T. T. & Palva, I. (1994). Hormone-sensitive lipase is closely related to several bacterial proteins, and distantly related to acetylcholinesterase and lipoprotein lipase: Identification of a superfamily of esterases and lipases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1210(2), 249–253. doi:10.1016/0005-2760(94)90129-5
- Heryani, H. & Putra, M. D. (2017). Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, 27, 49–54. doi:10.1016/J.EJBT.2017.03.005
- Ho, Y. S., Swenson, L., Derewenda, U., Serre, L., Wei, Y., Dauter, Z., et al. (1997). Brain acetylhydrolase that inactivates platelet-activating factor is a G-protein-like trimer. *Nature*, 385(6611), 89–93. doi:10.1038/385089a0
- Hun, C. J., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B. & Basri, M. (2003). A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. *Biochemical Engineering Journal*, 15(2), 147–151. doi:10.1016/S1369-703X(02)00185-7
- Ilinkaya, O. N., Ulyanova, V. V., Yarullina, D. R. & Gataullin, I. G. (2017). Secretome of intestinal bacilli: A natural guard against pathologies. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1666. doi:10.3389/fmicb.2017.01666
- Ishii, T. (1997). O-acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls. *Plant Physiology*, 113(4), 1265–72. doi:10.1104/PP.113.4.1265
- Isticato, R., Cangiano, G., Tran, H. T., Ciabattini, A., Medaglini, D., Oggioni, M. R., et al. (2001). Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*, 183(21), 6294–6301. doi:10.1128/JB.183.21.6294-6301.2001
- Ivancic, M., Valinger, G., Gruber, K. & Schwab, H. (2007). Inverting enantioselectivity of *Burkholderia gladioli* esterase EstB by directed and designed evolution. *Journal of Biotechnology*, 129(1), 109–22. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.10.007
- Jaeger, K.-E., Dijkstra, B. W. & Reetz, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of*

- Microbiology*, 53(1), 315–351. doi:10.1146/annurev.micro.53.1.315
- Jaeger, Karl-Erich, & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 390–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12323363>.
- Jain, N. K. & Roy, I. (2009). Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 18(1), 24–36. doi:10.1002/pro.3
- Jones, L. H. (2015). Recent advances in the molecular design of synthetic vaccines. *Nature Chemistry*, 7(12), 952–960. doi:10.1038/nchem.2396
- Joung, K.-B. & Côté, J.-C. (2002). A single phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* strains and bacilli species inferred from 16S rRNA gene restriction fragment length polymorphism is congruent with two independent phylogenetic analyses. *Journal of Applied Microbiology*, 93(6), 1075–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12452965>. Accessed 7 June 2019
- Kaiser, J. (2010). Cancer's Circulation Problem. *Science*, 327(5969), 1072–1074. doi:10.1126/science.327.5969.1072
- Kaneda, T. (1977). Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriological reviews*, 41(2), 391–418. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/329832>.
- Kang, C.-H., Oh, K.-H., Lee, M.-H., Oh, T.-K., Kim, B. & Yoon, J.-. (2011). A novel family VII esterase with industrial potential from compost metagenomic library. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 41. doi:10.1186/1475-2859-10-41
- Kapoor, M. & Gupta, M. N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47(4), 555–569. doi:10.1016/J.PROCBIO.2012.01.011
- Katarina, B., Kerstin, S., Susanne, B., Amelie, F., Lars, E., Rolf, E., Andersson, & Lena H. Dimberg. (2003). Avenanthramides in Oats (*Avena sativa* L.) and Structure–Antioxidant Activity Relationships. doi:10.1021/JF020544F
- Kauppinen, S., Christgau, S., Kofod, L. V, Halkier, T., Dörreich, K. & Dalbøge, H. (1995). Molecular cloning and characterization of a rhamnogalacturonan acetyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. Synergism between rhamnogalacturonan degrading enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 27172–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592973>.
- Kenji, M., Takimoto, A., Yagi, S. & Takayasu, S. (1991). Cephalosporin acetylhydrolase gene from *Bacillus subtilis*. <https://patents.google.com/patent/US5281525>.
- Keston, A. S. & Brandt, R. (1965). The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Analytical Biochemistry*, 11(1), 1–5. doi:10.1016/0003-2697(65)90034-5
- Kim, E.-Y., Oh, K.-H., Lee, M.-H., Kang, C.-H., Oh, T.-K. & Yoon, J.-H. (2009). Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 257–60. doi:10.1128/AEM.01400-08
- Kim, H. K., Park, S. Y., Lee, J. K. & Oh, T. K. (1998). Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(1), 66–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9501519>.
- Kim, K.-H., Tsao, R., Yang, R. & Cui, S. W. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95(3), 466–473. doi:10.1016/J.Foodchem.2005.01.032
- Kim, M.-J., Choi, M. Y., Lee, J. K. & Ahn, Y. (2003). Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: significantly enhanced reactivity and regioselectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26(3–6), 115–118. doi:10.1016/J.MOLCATB.2003.04.001
- Kim, Y.-J., Choi, G.-S., Kim, S.-B., Yoon, G.-S., Kim, Y.-S. & Ryu, Y.-W. (2006). Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein Expression and*

- Purification*, 45(2), 315–323. doi:10.1016/j.pep.2005.06.008
- Knauseder, F., Schiestel, M. & Schörgendorfer, K. (1999). Nucleic acid molecule encoding a cephalosporin acylesterase. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO1999038982>.
- Kocienski, P., Christopher J., Bell, R., Otto, B. (2005) Nucleophilic addition of  $\alpha$ -metallated carbamates to planar chiral cationic  $\eta^3$ -allylmolybdenum complexes: a stereochemical study. *Synthesis* 2005(1): 75-84. doi: 10.1055/s-2004-834917
- Komes, D., Lovric, T., Kovacevic Ganic, K., Gajdos Kljusuric, J. & Banovic, M. (2005). Trehalose improves flavour retention in dehydrated apricot puree. *International Journal of Food Science and Technology*, 40(4), 425–435. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.00967.
- Koster, M., Bitter, W. & Tommassen, J. (2000). Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 290(4–5), 325–331. doi:10.1016/S1438-4221(00)80033-8
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567–580. doi:10.1006/jmbi.2000.4315
- Kühne, W. (1976). Ueber das Verhalten Verschiedener organisirter und sog. ungeformter Fermente. *FEBS Letters*, 62, E4–E7. doi:10.1016/0014-5793(76)80847-2
- Kumar, R. & Mehta, A. (2013). Isolation , Optimization and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus alcalophilus*. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, India Online ISSN: 2319-7064
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S. S. & Gupta, R. (2005). Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 38–44. doi:10.1016/J.PEP.2004.12.010
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., et al. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249–256. doi:10.1038/36786
- Lama-Muñoz, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rubio-Senent, F., Palacios-Díaz, R. & Fernández-Bolaños, J. (2013). A study of the precursors of the natural antioxidant phenol 3,4-dihydroxyphenylglycol in olive oil waste. *Food Chemistry*, 140(1–2), 154–160. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2013.02.063
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*, John Wiley and Sons, New York, 115-175.
- Lanka, S. & Latha, J. N. L. (2015). A short review on various screening methods to isolate potential lipase producers: lipases-the present and future enzymes of biotech industry. *International Journal of Biological Chemistry*, 9(5), 207–219. doi:10.3923/ijbc.2015.207.219
- Laszlo, J. A., Cermak, S. C., Evans, K. O., Compton, D. L., Evangelista, R. & Berhow, M. A. (2013). Medium-chain alkyl esters of tyrosol and hydroxytyrosol antioxidants by cuphea oil transesterification. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(3), 363–371. doi:10.1002/ejlt.201200296
- Latorre, J. D., Hernandez-Velasco, X., Wolfenden, R. E., Vicente, J. L., Wolfenden, A. D., Menconi, A., et al. (2016). Evaluation and selection of *Bacillus* Species based on Eenzyme production, antimicrobial activity, and biofilm synthesis as direct-fed microbial candidates for poultry. *Frontiers in Veterinary Science*, 3, 95. doi:10.3389/fvets.2016.00095
- Lee, D., Koh, Y., Kim, K., Kim, B., Choi, H., Kim, D., et al. (1999b). Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*, 179(2), 393–400. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10518742>.

- Lee, L.-C., Lee, Y.-L., Leu, R.-J. & Shaw, J.-F. (2006). Functional role of catalytic triad and oxyanion hole-forming residues on enzyme activity of *Escherichia coli* thioesterase I/protease I/phospholipase L1. *The Biochemical Journal*, 397(1), 69–76. doi:10.1042/BJ20051645
- Lee, M.-H., Lee, C.-H., Oh, T.-K., Song, J. K. & Yoon, J.-H. (2006). Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7406–9. doi:10.1128/AEM.01157-06
- Lee, M. H., Hong, K. S., Malhotra, S., Park, J.-H., Hwang, E. C., Choi, H. K., et al. (2010). A new esterase EstD2 isolated from plant rhizosphere soil metagenome. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(5), 1125–1134. doi:10.1007/s00253-010-2729-6
- Lenfant, N., Hotelier, T., Velluet, E., Bourne, Y., Marchot, P. & Chatonnet, A. (2013). ESTHER, the database of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. *Nucleic Acids Research*, 41, D423-9. doi:10.1093/nar/gks1154
- Leong, D. J., Choudhury, M., Hanstein, R., Hirsh, D. M., Kim, S. J., Majeska, R. J., et al. (2014). Green tea polyphenol treatment is chondroprotective, anti-inflammatory and palliative in a mouse posttraumatic osteoarthritis model. *Arthritis Research & Therapy*, 16(6), 508. doi:10.1186/s13075-014-0508-y
- Levisson, M., van der Oost, J. & Kengen, S. W. M. (2007). Characterization and structural modeling of a new type of thermostable esterase from *Thermotoga maritima*. *FEBS Journal*, 274(11), 2832–2842. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05817.x
- Li, C.-Y., Cheng, C.-Y. & Chen, T.-L. (2004). Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. *Biochemical Engineering Journal*, 19(1), 25–31. doi:10.1016/J.BEJ.2003.09.006
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M. & Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3). doi:10.5936/CSBJ.201209017
- Liang, W., Lee, A. H., Binns, C. W., Huang, R., Hu, D. & Zhou, Q. (2009). Tea consumption and ischemic stroke risk. *Stroke*, 40(7), 2480–2485. doi:10.1161/STROKEAHA.109.548586
- Lineweaver, H. & Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658–666. doi:10.1021/ja01318a036
- Liu, L., Jin, C., & Zhang, Y. (2014). Lipophilic phenolic compounds (Lipo-PCs): emerging antioxidants applied in lipid systems. *RSC Adv.*, 4(6), 2879–2891. doi:10.1039/C3RA44792H
- Logan, Berge, O., Bishop, A. H., Busse, H.-J., De Vos, P., Fritze, D., et al. (2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(8), 2114–2121. doi:10.1099/ijs.0.013649-0
- Logan, N. A. & Halket, G. (2011). Developments in the taxonomy of aerobic, endospore-forming bacteria (pp. 1–29). *Endospore-forming Soil Bacteria*. Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-19577-8\_1
- López-Beceiro, J., Pascual-Cosp, J., Artiaga, R., Tarrío-Saavedra, J. & Naya, S. (2011). Thermal characterization of ammonium alum. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 104(1), 127–130. doi:10.1007/s10973-010-1189-7
- Lorentz, C., Dulac, A., Pencreac'h, G., Ergan, F., Richomme, P. & Saultani-Vigneron, S. (2010). Lipase-catalyzed synthesis of two new antioxidants: 4-O- and 3-O-palmitoyl chlorogenic acids. *Biotechnology Letters*, 32(12), 1955–1960. doi:10.1007/s10529-010-0386-6
- Luo, C., Li, Y., Wang, H., Cui, Y., Feng, Z., Li, H., et al. (2013). Hydroxytyrosol promotes superoxide production and defects in autophagy leading to anti-proliferation and apoptosis on human prostate cancer cells. *Current Cancer Drug Targets*, 13(6), 625–39.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23597197>. Accessed 8 November 2018

- Madan, B. & Mishra, P. (2010). Co-expression of the lipase and foldase of *Pseudomonas aeruginosa* to a functional lipase in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*(3), 597–604. doi:10.1007/s00253-009-2131-4
- Majid, A. (2011). Thermal stability of free bromelain and bromelain-polyphenol complex in pineapple juice. *International Food Research Journal* *18*(3):1051-1060
- Mamat, U., Wilke, K., Bramhill, D., Schromm, A. B., Lindner, B., Kohl, T. A., et al. (2015). Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. *Microbial Cell Factories*, *14*(1), 57. doi:10.1186/s12934-015-0241-5
- Manco, L., Ribeiro, M. L., Almeida, H., Freitas, O., Abade, A. & Tamagnini, G. (1999). PK-LR gene mutations in pyruvate kinase deficient Portuguese patients. *British Journal of Haematology*, *105*(3), 591–595. doi:10.1046/j.1365-2141.1999.01387.x
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Cherukuri, P. F., DeWeese-Scott, C., Geer, L. Y., Gwadz, M., et al. (2004). CDD: a conserved domain database for protein classification. *Nucleic Acids Research*, *33*(Database issue), D192–D196. doi:10.1093/nar/gki069
- Martín-Peláez, S., Covas, M. I., Fitó, M., Kušar, A. & Pravst, I. (2013). Health effects of olive oil polyphenols: Recent advances and possibilities for the use of health claims. *Molecular Nutrition and Food Research*. doi:10.1002/mnfr.201200421
- Martín, M. A., Ramos, S., Granado-Serrano, A. B., Rodríguez-Ramiro, I., Trujillo, M., Bravo, L. & Goya, L. (2010). Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxificant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, *54*(7), 956–966. doi:10.1002/mnfr.200900159
- Martínez-Martínez, I., Navarro-Fernández, J., Daniel Lozada-Ramírez, J., García-Carmona, F. & Sánchez-Ferrer, Á. (2008). YesT: A new rhamnogalacturonan acetyl esterase from *Bacillus subtilis*. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, *71*(1), 379–388. doi:10.1002/prot.21705
- Mateos, R., Domínguez, M. M., Espartero, J. L. & Cert, A. (2003). Antioxidant effect of phenolic compounds,  $\alpha$ -tocopherol, and other minor Ccomponents in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(24), 7170–7175. doi:10.1021/jf034415q
- Matsudaira, P. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, *262*(21), 10035–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3611052>. Accessed 12 November 2018
- McGuffin, L. J., Bryson, K. & Jones, D. T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, *16*(4), 404–405. doi:10.1093/bioinformatics/16.4.404
- McSpadden Gardener, B. B. (2004). Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. *Phytopathology*, *94*(11), 1252–1258. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.11.1252
- Meier, R., Drepper, T., Svensson, V., Jaeger, K.-E. & Baumann, U. (2007). A calcium-gated lid and a large  $\beta$ -roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(43), 31477–31483. doi:10.1074/jbc.M704942200
- Mesnage, S., Dellarole, M., Baxter, N. J., Rouget, J.-B., Dimitrov, J. D., Wang, N., et al. (2014). Molecular basis for bacterial peptidoglycan recognition by *LysM* domains. *Nature Communications*, *5*(1), 4269. doi:10.1038/ncomms5269
- Milner, J. A. (1994). Reducing the Risk of Cancer. Functional Foods (pp. 39–70). Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/978-1-4615-2073-3\_3
- Mima, K., Ogino, S., Nakagawa, S., Sawayama, H., Kinoshita, K., Krashima, R., et al. (2017). The

- role of intestinal bacteria in the development and progression of gastrointestinal tract neoplasms. *Surgical Oncology*, 26(4), 368–376. doi:10.1016/j.suronc.2017.07.011
- Miro-Casas, E., Covas, M.-I., Farre, M., Fito, M., Ortuño, J., Weinbrenner, T., et al. (2003). Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clinical Chemistry*, 49, 945–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12765992>. Accessed 8 November 2018
- Miskin, J. E., Farrell, A. M., Cunliffe, W. J. & Holland, K. T. (1997). *Propionibacterium acnes*, a resident of lipid-rich human skin, produces a 33 kDa extracellular lipase encoded by *gehA*. *Microbiology*, 143(5), 1745–1755. doi:10.1099/00221287-143-5-1745
- Mølgaard, A., Kauppinen, S. & Larsen, S. (2000a). Rhamnogalacturonan acetyl esterase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases. *Structure*, 8(4), 373–383. doi:10.1016/S0969-2126(00)00118-0
- Mosbah, H., Sayari, A., Bezzine, S. & Gargouri, Y. (2006). Expression, purification, and characterization of His-tagged *Staphylococcus xylosus* lipase wild-type and its mutant Asp 290 Ala. *Protein Expression and Purification*, 47(2), 516–523. doi:10.1016/J.PEP.2005.11.013
- Mosbah, H., Sayari, A., Verger, R. & Gargouri, Y. (2007). Gly311 residue triggers the enantioselectivity of *Staphylococcus xylosus* lipase: A monolayer study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 310(1), 196–204. doi:10.1016/j.jcis.2007.01.073
- Mudryk, Z. J. & Skórczewski, P. (2000). Occurrence and activity of lipolytic *Bacterioneuston* and *Bacterioplankton* in the estuarine lake gardno. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 51(6), 763–772. doi:10.1006/ECSS.2000.0719
- Mukhopadhyay, A., Hazra, P. P., Sengupta, T., Ghosh, A. K. & Sengupta, S. (1997). Acetyl esterase production by *Termitomyces clypeatus*. *Biotechnology Letters*, 19(2), 159–162. doi:10.1023/A:1018316531658
- Murphy, H. N., Stewart, G. R., Mischenko, V. V., Apt, A. S., Harris, R., McAlister, M. S. B., et al. (2005). The OtsAB pathway is essential for trehalose biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15), 14524–14529. doi:10.1074/jbc.M414232200
- Nagarajan, M., Benjakul, S., Prodpran, T. & Songtipya, P. (2012). Properties of film from splendid squid (*Loligo formosana*) skin gelatin with various extraction temperatures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(4), 489–496. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2012.06.017
- Navarra, M., Mannucci, C., Delbò, M. & Calapai, G. (2015). *Citrus bergamia* essential oil: from basic research to clinical application. *Frontiers in pharmacology*, 6, 36. doi:10.3389/fphar.2015.00036
- Navarro-Fernández, J., Martínez-Martínez, I., Montoro-García, S., García-Carmona, F., Takami, H. & Sánchez-Ferrer, A. (2008). Characterization of a new rhamnogalacturonan acetyl esterase from *Bacillus halodurans* C-125 with a new putative carbohydrate binding domain. *Journal of Bacteriology*, 190(4), 1375–82. doi:10.1128/JB.01104-07
- Nawawi, M. H., Mohamad, R., Tahir, P. M. & Saad, W. Z. (2017). Extracellular Xylanopectinolytic Enzymes by *Bacillus subtilis* ADI1 from EFB's Compost. *International Scholarly Research Notices*, 2017, 7831954. doi:10.1155/2017/7831954
- Nishibe, S. (2002). The plant origins of herbal medicines and their quality evaluation. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 122(6), 363–79.
- Nishizawa, M., Shimizu, M., Ohkawa, H. & Kanaoka, M. (1995). Stereoselective production of (+)-trans-chrysanthemic acid by a microbial esterase: cloning, nucleotide sequence, and overexpression of the esterase gene of *Arthrobacter globiformis* in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9), 3208–15.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7574629>.

- Niyonzima, F. N. & More, S. S. (2015). Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus*. *Biotech*, 5(1), 61–70. doi:10.1007/s13205-014-0200-6
- Noventa-Jordão, M. A., de Lourdes, M., Polizeli, T. M., Bonini, B. M., Jorge, J. A. & Terenzi, H. F. (1996). Effects of temperature shifts on the activities of *Neurospora crassa* glycogen synthase, glycogen phosphorylase and trehalose-6-phosphate synthase. *FEBS letters*, 378(1), 32–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8549797>.
- Nthangeni, M B., Patterson, H.-G., van Tonder, A., Vergeer, W. P. & Litthauer, D. (2001). Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(7–8), 705–712. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11339956>.
- Nthangeni, Mulalo B., Ramagoma, F., Tlou, M. G. & Litthauer, D. (2005). Development of a versatile cassette for directional genome walking using cassette ligation-mediated PCR and its application in the cloning of complete lipolytic genes from *Bacillus* species. *Journal of Microbiological Methods*, 61(2), 225–234. doi:10.1016/j.mimet.2004.11.021
- Ohtake, S. & Wang, Y. J. (2011). Trehalose: Current Use and Future Applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(6), 2020–2053. doi:10.1002/jps.22458
- Olempska-Beer, Z. S., Merker, R. I., Ditto, M. D. & DiNovi, M. J. (2006). Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45(2), 144–158. doi:10.1016/j.yrtph.2006.05.001
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., et al. (1992). The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Engineering, Design and Selection*, 5(3), 197–211. doi:10.1093/protein/5.3.197
- Omar, S. H. (2010). Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 18(3), 111–21. doi:10.1016/j.jsps.2010.05.005
- Ong, G. T., Chang, K. Y., Wu, S. H. & Wang, K. T. (1993). Selective deacylation on the glucosyl moiety of octa-O-acetylsucrose by enzymic hydrolysis: formation of 2,1',3',4',6'-penta-O-acetylsucrose. *Carbohydrate Research* 241:327-33. doi: 10.1016/0008-6215(93)80124-W
- Parapouli, M., Foukis, A., Stergiou, P.-Y., Koukouritaki, M., Magklaras, P., Gkini, O. A., et al. (2018). Molecular, biochemical and kinetic analysis of a novel, thermostable lipase (LipSm) from *Stenotrophomonas maltophilia* Psi-1, the first member of a new bacterial lipase family (XVIII). *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 25(1), 4. doi:10.1186/s40709-018-0074-6
- Park, H.-S., Nam, S.-H., Lee, J. K., Yoon, C. N., Mannervik, B., Benkovic, S. J. & Kim, H.-S. (2006). Design and evolution of new catalytic activity with an existing protein scaffold. *Science*, 311(5760), 535–538. doi:10.1126/science.1118953
- Pastuch-Gawolek, G., Malarz, K., Mrozek-Wilczkiewicz, A., Musioł, M., Serda, M., Czaplińska, B. & Musiol, R. (2016). Small molecule glycoconjugates with anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112, 130–144. doi:10.1016/j.ejmech.2016.01.061
- Pathak, D. & Ollis, D. (1990). Refined structure of diene lactone hydrolase at 1.8 Å. *Journal of Molecular Biology*, 214(2), 497–525. doi:10.1016/0022-2836(90)90196-S
- Patrick, G. L. 2018. An introduction to medicinal chemistry. 2018. Oxford University Press. <https://global.oup.com/ushe/product/an-introduction-to-medicinal-chemistry9780198749691?cc=us&lang=en&>.
- Pereira-Caro, G., Sarriá, B., Madrona, A., Espartero, J. L., Escuderos, M. E., Bravo, L. & Mateos, R. (2012). Digestive stability of hydroxytyrosol, hydroxytyrosyl acetate and alkyl hydroxytyrosyl ethers. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(6), 703–707.

doi:10.3109/09637486.2011.652943

- Pereira-Caro, G., Sarriá, B., Madrona, A., Espartero, J. L., Goya, L., Bravo, L. & Mateos, R. (2011). Alkyl hydroxytyrosyl ethers show protective effects against oxidative stress in HepG2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 5964–5976. doi:10.1021/jf2002415
- Pérez, C., Juárez, K., García-Castells, E., Soberón, G. & Servín-González, L. (1993). Cloning, characterization, and expression in *Streptomyces lividans* 66 of an extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp. M11. *Gene*, 123(1), 109–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8422993>.
- Pérez, J. A., Hernández, J. M., Trujillo, J. M. & López, H. (2005). Iridoids and secoiridoids from *Oleaceae*. *Studies in Natural Products Chemistry*, 32, 303–363. doi:10.1016/S1572-5995(05)80059-6
- Petersen, E. I., Valinger, G., Sölkner, B., Stubenrauch, G. & Schwab, H. (2001). A novel esterase from *Burkholderia gladioli* which shows high deacetylation activity on cephalosporins is related to beta-lactamases and DD-peptidases. *Journal of Biotechnology*, 89(1), 11–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11472796>.
- Pieretti, S., Di Giannuario, A., Capasso, A. & Nicoletti, M. (1992). Pharmacological effects of phenylpropanoid glycosides from *Orobancha hederæ*. *Phytotherapy Research*, 6(2), 89–93. doi:10.1002/ptr.2650060208
- Pocklington, W. D. & Dieffenbacher, A. (1988). Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by high performance liquid chromatography: results of a collaborative study and the standardised method. *Pure and Applied Chemistry*, 60(6), 877–892. doi:10.1351/pac198860060877
- Porter, N. T. & Martens, E. C. (2017). The Critical Roles of Polysaccharides in Gut Microbial Ecology and Physiology. *Annual Review of Microbiology*, 71(1), 349–369. doi:10.1146/annurev-micro-102215-095316
- Pounis, G., Bonaccio, M., Di Castelnuovo, A., Costanzo, S., de Curtis, A., Persichillo, M., et al. (2016). Polyphenol intake is associated with low-grade inflammation, using a novel data analysis from the Moli-sani study. *Thrombosis and Haemostasis*, 115(2), 344–52. doi:10.1160/TH15-06-0487
- Pugsley, A. P. (1992). Translocation of a folded protein across the outer membrane in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(24), 12058–12062. doi:10.1073/pnas.89.24.12058
- Queneau, Y., Jarosz, S., Lewandowski, B. & Fitremann, J. (2007). Sucrose Chemistry and Applications of Sucrochemicals. pp. 217–292. doi:10.1016/S0065-2318(07)61005-1
- Quyên, D. T., Schmidt-Dannert, C. & Schmid, R. D. (2003). High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase. *Protein Expression and Purification*, 28(1), 102–110. doi:10.1016/S1046-5928(02)00679-4
- Rafehi, H., Smith, A. J., Balcerzyk, A., Ziemann, M., Ooi, J., Loveridge, S. J., et al. (2012). Investigation into the biological properties of the olive polyphenol, hydroxytyrosol: mechanistic insights by genome-wide mRNA-Seq analysis. *Genes & Nutrition*, 7(2), 343. doi:10.1007/S12263-011-0249-3
- Rahman, R. N. Z. A., Baharum, S. N., Salleh, A. B. & Basri, M. (2006). S5 Lipase: an organic solvent tolerant enzyme. *Journal of Microbiology*, 44(6), 583–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17205035>.
- Rao, L., Xue, Y., Zheng, Y., Lu, J. R. & Ma, Y. (2013). A Novel Alkaliphilic *Bacillus* Esterase Belongs to the 13th Bacterial Lipolytic Enzyme Family. *PLoS One*, 8(4), e60645.

doi:10.1371/journal.pone.0060645

- Rao, L., Xue, Y., Zhou, C., Tao, J., Li, G., Lu, J. R. & Ma, Y. (2011). A thermostable esterase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* opening up a new family of bacterial lipolytic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1814(12), 1695–1702. doi:10.1016/j.bbapap.2011.08.013
- Reetz, M. T. (2004). Controlling the enantioselectivity of enzymes by directed evolution: practical and theoretical ramifications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), 5716–22. doi:10.1073/pnas.0306866101
- Reyes, J. J., De La Cruz, J. P., Muñoz-Marin, J., Guerrero, A., Lopez-Villodres, J. A., Madrona, A., et al. (2013). Antiplatelet effect of new lipophilic hydroxytyrosol alkyl ether derivatives in human blood. *European Journal of Nutrition*, 52(2), 591–599. doi:10.1007/s00394-012-0361-1
- Riaz, M., Shah, A. A., Hameed, A. & Hasan, F. (2010). Characterization of lipase produced by *Bacillus* sp. FH5 in immobilized and free state. *Annals of Microbiology*, 60(1), 169–175. doi:10.1007/s13213-009-0012-9
- Risitano, R., Currò, M., Cirmi, S., Ferlazzo, N., Campiglia, P., Caccamo, D., et al. (2014). Flavonoid Fraction of Bergamot Juice Reduces LPS-Induced Inflammatory Response through SIRT1-Mediated NF- $\kappa$ B Inhibition in THP-1 Monocytes. *PLoS ONE*, 9(9), e107431. doi:10.1371/journal.pone.0107431
- Ro, H.-S., Hong, H. P., Kho, B. H., Kim, S. & Chung, B. H. (2004). Genome-wide cloning and characterization of microbial esterases. *FEMS Microbiology Letters*, 233(1), 97–105. doi:10.1016/j.femsle.2004.01.046
- Rodríguez-Gutiérrez, G., Duthie, G. G., Wood, S., Morrice, P., Nicol, F., Reid, M., et al. (2012). Alperujo extract, hydroxytyrosol, and 3,4-dihydroxyphenylglycol are bioavailable and have antioxidant properties in vitamin E-deficient rats—a proteomics and network analysis approach. *Molecular nutrition & food research*, 56(7), 1137–47. doi:10.1002/mnfr.201100808
- Rodríguez-Mateos, A., Vauzour, D., Krueger, C. G., Shanmuganayagam, D., Reed, J., Calani, L., et al. (2014). Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Archives of Toxicology*, 88(10), 1803–1853. doi:10.1007/s00204-014-1330-7
- Rodríguez, G., Lama, A., Jaramillo, S., Fuentes-Alventosa, J. M., Guillén, R., Jiménez-Araujo, A., et al. (2009). 3,4-Dihydroxyphenylglycol (DHPG): an important phenolic compound present in natural table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6298–304. doi:10.1021/jf803512r
- Rodríguez, G., Lama, A., Jaramillo, S., Fuentes-Alventosa, J. M., Guillén, R., Jiménez-Araujo, A., et al. (2009). 3,4-Dihydroxyphenylglycol (DHPG): an important phenolic compound present in natural table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6298–6304. doi:10.1021/jf803512r
- Rodríguez, G., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R. & Fernández-Bolaños, J. (2007). Effect of steam treatment of alperujo on the composition, enzymatic Saccharification, and in vitro digestibility of alperujo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(1), 136–142. doi:10.1021/jf0616513
- Roig, A., Cayuela, M. L. & Sánchez-Monedero, M. A. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, 26(9), 960–969. doi:10.1016/J.WASMAN.2005.07.024
- Romani, A., Mulas, S. & Heimler, D. (2017). Polyphenols and secoiridoids in raw material (*Olea europaea* L. leaves) and commercial food supplements. *European Food Research and Technology*, 243(3), 429–435. doi:10.1007/s00217-016-2756-3

- Rosenstein, R. & Götz, F. (2000). *Staphylococcal lipases*: Biochemical and molecular characterization. *Biochimie*, 82(11), 1005–1014. doi:10.1016/S0300-9084(00)01180-9
- Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4), 725–38. doi:10.1038/nprot.2010.5
- Rúa, M. L., Schmidt-Dannert, C., Wahl, S., Sprauer, A. & Schmid, R. D. (1997). Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus* large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *Journal of Biotechnology*, 56(2), 89–102. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9304872>.
- Rueda, F., Cano-Garrido, O., Mamat, U., Wilke, K., Seras-Franzoso, J., García-Fruitós, E. & Villaverde, A. (2014). Production of functional inclusion bodies in endotoxin-free *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(22), 9229–9238. doi:10.1007/s00253-014-6008-9
- Ruiz, C., Blanco, A., Pastor, F. I. J. & Diaz, P. (2002). Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. *FEMS Microbiology Letters*, 217(2), 263–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12480114>.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–25. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Sak, K. (2014). Site-Specific Anticancer Effects of Dietary Flavonoid Quercetin. *Nutrition and Cancer*, 66(2), 177–193. doi:10.1080/01635581.2014.864418
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (David W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samoylova, Y. V., Sorokina, K. N., Romanenko, M. V. & Parmon, V. N. (2018). Cloning, expression and characterization of the esterase estUT1 from *Ureibacillus thermosphaericus* which belongs to a new lipase family XVIII. *Extremophiles*, 22(2), 271–285. doi:10.1007/s00792-018-0996-9
- Sánchez-Maldonado, A. F., Schieber, A. & Gänzle, M. G. (2011). Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 111(5), 1176–1184. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05141.x
- Sangeetha, R., Geetha, A. & Arulpani, I. Concomitant production, partial purification and characterization of a serine protease and a proteolysis-resistant metallolipase from *Bacillus pumilus* SG2. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 65(1–2), 61–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20355323>.
- Sarbishegi, M., Mehraein, F. & Soleimani, M. (2014). Antioxidant role of oleuropein on midbrain and dopaminergic neurons of substantia nigra in aged rats. *Iranian Biomedical Journal*, 18(1), 16–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24375158>. Accessed 8 November 2018
- Sarda, L. & Desnuelle, P. (1958). Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 30(3), 513–521. doi:10.1016/0006-3002(58)90097-0
- Sarpe, V. A. & Kulkarni, S. S. (2014). Expeditious Synthesis of *Mycobacterium tuberculosis* Sulfolipids SL-1 and Ac<sub>2</sub> SGL Analogues. *Organic Letters*, 16(21), 5732–5735. doi:10.1021/ol5027987
- Sarwar, A., Brader, G., Corretto, E., Aleti, G., Abaidullah, M., Sessitsch, A. & Hafeez, F. Y. (2018). Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. *PLoS ONE*, 13(6), e0198107. doi:10.1371/journal.pone.0198107
- Saunier, E., Antonio, S., Regazzetti, A., Auzeil, N., Laprévotte, O., Shay, J. W., et al. (2017). Resveratrol reverses the Warburg effect by targeting the pyruvate dehydrogenase complex in colon cancer cells. *Scientific Reports*, 7(1), 6945. doi:10.1038/s41598-017-07006-0

- Sayari, A., Agrebi, N., Jaoua, S. & Gargouri, Y. (2001). Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus simulans* lipase. *Biochimie*, 83(9), 863–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698108>.
- Sayari, Adel, Mosbah, H., & Gargouri, Y. (2007). Importance of the residue Asp 290 on chain length selectivity and catalytic efficiency of recombinant *Staphylococcus simulans* lipase expressed in *E. coli*. *Molecular Biotechnology*, 36(1), 14–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17827533>.
- Schaffer, S., Podstawa, M., Visioli, F., Bogani, P., Müller, W. E. & Eckert, G. P. (2007). Hydroxytyrosol-Rich olive mill wastewater extract protects brain cells in vitro and ex vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5043–5049. doi:10.1021/jf0703710
- Schallmeyer, M., Singh, A. & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1–17. doi:10.1139/w03-076
- Schoemaker, M., Feldbrügge, R., Gründig, B. & Friedrich Spener. (1997). The lipoyxygenase sensor, a new approach in essential fatty acid determination in foods. *Biosensors and Bioelectronics*, 12(11), 1089–1099. doi:10.1016/S0956-5663(97)00073-0
- Schorey, J. S., Carroll, M. C. & Brown, E. J. (1997). A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science*, 277(5329), 1091–3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9262476>.
- Schütte, M. & Fetzner, S. (2007). EstA from *Arthrobacter nitroguajacolicus* Rü61a, a Thermo- and Solvent-Tolerant Carboxylesterase Related to Class C  $\beta$ -Lactamases. *Current Microbiology*, 54(3), 230–236. doi:10.1007/s00284-006-0438-2
- Scoditti, E., Calabriso, N., Massaro, M., Pellegrino, M., Storelli, C., Martines, G., et al. (2012). Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: A potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 527(2), 81–89. doi:10.1016/j.abb.2012.05.003
- Servili, M., & Montedoro, G. (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9–10), 602–613. doi:10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<602::AID-EJLT602>3.0.CO;2-X
- Sharma, S. C. V. (2012). Bioremediation: Features, Strategies and applications. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science*. Vol. 2 (2),
- Sharma, S., & Kanwar, S. S. (2014). Organic solvent tolerant lipases and applications. *The Scientific World Journal*, 2014, 625258. doi:10.1155/2014/625258
- Shasha, & Leibowitz, J. (1961). On the oleuropein, the bitter principle of olives 1. *The Journal of Organic Chemistry*, 26(6), 1948–1954. doi:10.1021/jo01065a063
- Shi, Y., Li, J. & Chu, Y.-H. (2011). Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of sucrose-based esters. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86(12), 1457–1468. doi:10.1002/jctb.2711
- Silverman, M. P. & Lundgren, D. (1959). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. II. Manometric studies. *Journal of Bacteriology*, 78(3), 326–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14446765>.
- Singh, A., Van Hamme, J. D. & Ward, O. P. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, 25(1), 99–121. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2006.10.004
- Singh, I., Mok, M., Christensen, A.-M., Turner, A. H. & Hawley, J. A. (2008). The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(2), 127–132. doi:10.1016/j.numecd.2006.09.001

- Sirianni, R. W., Olausson, P., Chiu, A. S., Taylor, J. R. & Saltzman, W. M. (2010). The behavioral and biochemical effects of BDNF containing polymers implanted in the hippocampus of rats. *Brain Research*, 1321, 40–50. doi:10.1016/j.brainres.2010.01.041
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., et al. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2359136>.
- Skupin, R., Cooper, T. G., Fröhlich, R., Prigge, J. & Haufe, G. (1997). Lipase-catalyzed resolution of both enantiomers of Ornidazole and some analogues. *Tetrahedron: Asymmetry*, 8(14), 2453–2464. doi:10.1016/S0957-4166(97)00260-7
- Smith, & Gordon. Aerobic sporeforming bacteria. (1952). *US Government Printing Office*. [https://archive.org/stream/aerobicsporeform16smit/aerobicsporeform16smit\\_djvu.txt](https://archive.org/stream/aerobicsporeform16smit/aerobicsporeform16smit_djvu.txt).
- Sommer, P., Bormann, C. & Götz, F. (1997). Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3553–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9293006>.
- Soto-Vaca, A., Gutierrez, A., Losso, J. N., Xu, Z. & Finley, J. W. (2012). Evolution of Phenolic Compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(27), 6658–6677. doi:10.1021/jf300861c
- Spizizen, J. (1958). Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(10), 1072–8. doi:10.1073/pnas.44.10.1072
- Stuer, W., Jaeger, K. E. & Winkler, U. K. (1986). Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 168(3), 1070–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3096967>.
- Sumbly, K. M., Matthews, A. H., Grbin, P. R. & Jiranek, V. (2009). Cloning and Characterization of an Intracellular Esterase from the Wine-Associated Lactic Acid Bacterium *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6729–6735. doi:10.1128/AEM.01563-09
- Sun, H., Lin, Z., Zhao, L., Chen, T., Shang, M., Jiang, H., et al. (2018). *Bacillus subtilis* spore with surface display of paramyosin from *Clonorchis sinensis* potentializes a promising oral vaccine candidate. *Parasites & Vectors*, 11(1), 156. doi:10.1186/s13071-018-2757-0
- Talon, R., Montel, M.-C. & Berdague, J.-L. (1996). Production of flavor esters by lipases of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus xylosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(8), 620–622. doi:10.1016/S0141-0229(96)00075-0
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596–1599. doi:10.1093/molbev/msm092
- Tamura, K., Nei, M. & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(30), 11030–11035. doi:10.1073/pnas.0404206101
- Teng, Y. & Xu, Y. (2007). A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. *Analytical Biochemistry*, 363(2), 297–299. doi:10.1016/j.ab.2007.01.026
- Thompson, D. J. & Stout, D. G. (1997). Mixtures of Persian clover with Italian ryegrass or barley-Italian ryegrass for annual forage. *Canadian Journal of Plant Science*, 77(4), 579–585. doi:10.4141/P96-138
- Tofani, D., Balducci, V., Gasperi, T., Incerpi, S. & Gambacorta, A. (2010). Fatty Acid Hydroxytyrosyl Esters: Structure/Antioxidant Activity Relationship by ABTS and in Cell-Culture DCF Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5292–5299.

doi:10.1021/jf1000716

- Tomás-Barberan, F. A., Ferreres, F. & Gil, M. I. (2000). Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. *Studies in Natural Products Chemistry*, 23, 739–795. doi:10.1016/S1572-5995(00)80141-6
- Tommassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M. & Lazdunski, A. (1992). Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology reviews*, 9(1), 73–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1389315>.
- Torres de Pinedo, A., Peñalver, P. & Morales, J. C. (2007). Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure–activity relationship. *Food Chemistry*, 103(1), 55–61. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2006.07.026
- Torres, S., Baigorí, M. D., Swathy, S. L., Pandey, A., & Castro, G. R. (2009). Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase. *Food Research International*, 42(4), 454–460. doi:10.1016/j.foodres.2008.12.005
- Tripathi, M. K., Roy, U., Jinwal, U. K., Jain, S. K. & Roy, P. . (2004). Cloning, sequencing and structural features of a novel *Streptococcus* lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(5), 437–445. doi:10.1016/J.ENZMICTEC.2003.11.020
- Tyndall, J. D. A., Sinchaikul, S., Fothergill-Gilmore, L. A., Taylor, P. & Walkinshaw, M. D. (2002). Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *Journal of Molecular Biology*, 323(5), 859–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12417199>.
- Urdaci, M. i, & Pinchuk, I. (2004). Antimicrobial activity of *Bacillus probiotics*. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 38 (6), S86-90.
- Valinger, G., Hermann, M., Wagner, U. G. & Schwab, H. (2007). Stability and activity improvement of cephalosporin esterase EstB from *Burkholderia gladioli* by directed evolution and structural interpretation of muteins. *Journal of Biotechnology*, 129(1), 98–108. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.10.008
- Van Slambrouck, S., Groux-Degroote, S., Krzewinski-Recchi, M., Cazet, A., Delannoy, P. & Steelant, W. F. A. (2014). Carbohydrate-to-carbohydrate interactions between  $\alpha$ 2,3-linked sialic acids on  $\alpha$ 2 integrin subunits and asialo-GM1 underlie the bone metastatic behaviour of LNCAP-derivative C4-2B prostate cancer cells. *Bioscience Reports*, 34(5), 546–557. doi:10.1042/BSR20140096
- Vanella, L., Di Giacomo, C., Sorrenti, V., Galvano, F., Santangelo, R., Cardile, V., et al. (2012a). Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *International Journal of Oncology*, 41(1), 31–8. doi:10.3892/ijo.2012.1428
- Vanella, L., Di Giacomo, C., Sorrenti, V., Galvano, F., Santangelo, R., Cardile, V., et al. (2012b). Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *International Journal of Oncology*, 41(1), 31–8. doi:10.3892/ijo.2012.1428
- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J. & Spencer, J. P. E. (2010). Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2(11), 1106–31. doi:10.3390/nu2111106
- Vejdovszky, K., Warth, B., Sulyok, M. & Marko, D. (2016). Non-synergistic cytotoxic effects of *Fusarium* and *Alternaria* toxin combinations in Caco-2 cells. *Toxicology Letters*, 241, 1–8. doi:10.1016/J.TOXLET.2015.10.024
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I. & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). doi:10.18781/R.MEX.FIT.1706-5
- Visioli, F. & Galli, C. (1994). Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life*

- Sciences*, 55(24), 1965–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7990657>. Accessed 8 November 2018
- Visioli, Francesco, Bellomo, G. & Galli, C. (1998). Free Radical-Scavenging Properties of Olive Oil Polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247(1), 60–64. doi:10.1006/bbrc.1998.8735
- Visioli, Francesco, Poli, A. & Galli, C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, 22(1), 65–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11746176>.
- Vita, J. A. (2005). Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 292S–297S. doi:10.1093/ajcn/81.1.292S
- Wang, B., Yao, M., Lv, L., Ling, Z., & Li, L. (2017). The human microbiota in health and disease. *Engineering*, 3(1), 71–82. doi:10.1016/J.ENG.2017.01.008
- Wang, H., Huang, W., Orwenyo, J., Banerjee, A., Vasta, G. R., & Wang, L.-X. (2013). Design and synthesis of glycoprotein-based multivalent glyco-ligands for influenza hemagglutinin and human galectin-3. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(7), 2037–44. doi:10.1016/j.bmc.2013.01.028
- Wang, J., Shen, W.-J., Patel, S., Harada, K., & Kraemer, F. B. (2005). Mutational analysis of the “regulatory module” of hormone-sensitive lipase. *Biochemistry*, 44(6), 1953–1959. doi:10.1021/bi049206t
- Warneck, & Wisdom. Arylalkanoic acid resolution. GB. Patent No. WO1993004189A1. 1994-09-15
- Waterman, E., & Lockwood, B. (2007). Active components and clinical applications of olive oil. *Alternative medicine review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 12(4), 331–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18069902>.
- Wei, Y., Schottel, J. L., Derewenda, U., Swenson, L., Patkar, S. & Derewenda, Z. S. (1995). A novel variant of the catalytic triad in the *Streptomyces scabies* esterase. *Nature structural biology*, 2(3), 218–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7773790>.
- Westbrook, A. W., Ren, X., Oh, J., Moo-Young, M. & Chou, C. P. (2018). Metabolic engineering to enhance heterologous production of hyaluronic acid in *Bacillus subtilis*. *Metabolic Engineering*, 47, 401–413. doi:10.1016/j.ymben.2018.04.016
- Wilhelm, M., Boutabout, M., Heyman, T. & Wilhelm, F. X. (1999). Reverse transcription of the yeast Ty1 retrotransposon: the mode of first strand transfer is either intermolecular or intramolecular. *Journal of Molecular Biology*, 288 (4), 505–10. doi:10.1006/jmbi.1999.2723
- Winkler, F. K., D’Arcy, A. & Hunziker, W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, 343(6260), 771–774. doi:10.1038/343771a0
- Winslow, C. E. (1920). The untilled fields of public health. *Science*, 51(1306), 23–33. doi:10.1126/science.51.1306.23
- Wong, C.-H., & Zimmerman, S. C. (2013). Orthogonality in organic, polymer, and supramolecular chemistry: from Merrifield to click chemistry. *Chemical Communications*, 49 (17), 1679. doi:10.1039/c2cc37316e
- Wu, C.-H. & Wang, C.-C. (2014). Strategies for desymmetrising trehalose to synthesise trehalose glycolipids. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12(30), 5558–62. doi:10.1039/c4ob00587b
- Wu, H.-H., Tian, L., Chen, G., Xu, N., Wang, Y.-N., Sun, S. & Pei, Y.-H. (2009). Six compounds from marine fungus Y26-02. *Journal of Asian Natural Products Research*, 11 (8), 748–751. doi:10.1080/10286020903025783
- Wu, H.-S. & Tsai, M.-J. (2004). Kinetics of tributyrin hydrolysis by lipase. *Enzyme and Microbial*

- Technology*, 35(6–7), 488–493. doi:10.1016/J.ENZMICTEC.2004.08.002
- Wu, X., & Schauss, A. G. (2012, July 11). Mitigation of inflammation with foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi:10.1021/jf3007008
- Wuts, P. G. M., Greene, T. W. (2007). Greene's protective groups in organic synthesis. John Wiley & Sons, New York.
- Xiao, J. B., & Högger, P. (2015). Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1), 23–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25005188>.
- Xu, S., Lin, Y., Zeng, D., Zhou, M., Zeng, Y., Wang, H., et al. (2018). *Bacillus licheniformis* normalize the ileum microbiota of chickens infected with necrotic enteritis. *Scientific Reports*, 8(1), 1744. doi:10.1038/s41598-018-20059-z
- Yamada, K., Ogawa, H., Hara, A., Yoshida, Y., Yonezawa, Y., Karibe, K., et al. (2009). Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antiviral Research*, 83(1), 35–44. doi:10.1016/j.antiviral.2009.03.002
- Yang, J., Zhang, B. & Yan, Y. (2009). Cloning and Expression of *Pseudomonas fluorescens* 26-2 Lipase Gene in *Pichia pastoris* and Characterizing for Transesterification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159(2), 355–365. doi:10.1007/s12010-008-8419-5
- Yoshida, H. (2016). Borylation of Alkynes under Base/Coinage Metal Catalysis: Some Recent Developments. *ACS Catalysis*, 6(3), 1799–1811. doi:10.1021/acscatal.5b02973
- Zhang, K., Su, L., Duan, X., Liu, L. & Wu, J. (2017). High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 32. doi:10.1186/s12934-017-0649-1
- Zhang, X., Cao, J. & Zhong, L. (2009). Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 379(6), 581–586. doi:10.1007/s00210-009-0399-7
- Zhu, K., Hölzel, C. S., Cui, Y., Mayer, R., Wang, Y., Dietrich, R., et al. (2016). Probiotic *Bacillus cereus* Strains, a Potential Risk for Public Health in China. *Frontiers in Microbiology*, 7, 718. doi:10.3389/fmicb.2016.00718
- Zhu, X., Larsen, N. A., Basran, A., Bruce, N. C. & Wilson, I. A. (2003). Observation of an arsenic adduct in an acetyl esterase crystal structure. *Journal of Biological Chemistry*, 278(3), 2008–2014. doi:10.1074/jbc.M210103200



