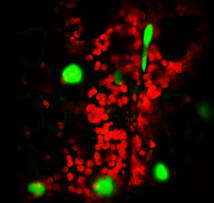
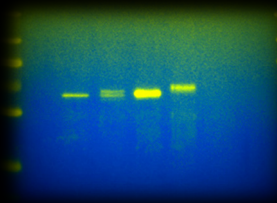


CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, MOLECULAR Y CELULAR DE LA β -GLUCOSIDASA DE OLIVO Y SU RELACIÓN CON LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN



TESIS DOCTORAL

David Velázquez Palmero
Sevilla, 2014



INSTITUTO DE LA GRASA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Productos Vegetales



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, MOLECULAR Y CELULAR DE LA β -GLUCOSIDASA DE OLIVO Y SU RELACIÓN CON LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

Memoria presentada por David Velázquez Palmero, Ldo. en Biología, para
optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide

Fdo. David Velázquez Palmero

Autorizamos la presentación de la Tesis Doctoral titulada **“Caracterización bioquímica, molecular y celular de la β -glucosidasa de olivo y su relación con la composición fenólica del aceite de oliva virgen”**, realizada por D. David Velázquez Palmero en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Productos Vegetales del Instituto de la Grasa (CSIC) bajo nuestra dirección.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos la presente en Sevilla, a 12 de Junio de 2014.

V.º B.º
Los Directores

José Manuel Martínez Rivas
Científico titular del CSIC

Ana Gracia Pérez Rubio
Científico titular del CSIC

Conforme la tutora

Mónica Venegas Calerón

A Dña. María Ordóñez Morales
In memoriam

AGRADECIMIENTOS

Concluida la redacción de la presente Tesis Doctoral, quiero que estas últimas palabras que escribo sirvan para expresar el profundo agradecimiento que siento hacia todas aquellas personas que, de alguna forma, han contribuido al desarrollo de este trabajo de investigación.

A mis directores de tesis, el Dr. José Manuel Martínez Rivas y la Dra. Ana Gracia Pérez Rubio, por su dedicación, paciencia y esfuerzo durante todos estos años. Gracias por la confianza que habéis depositado en mí, por haberme brindado la oportunidad de pertenecer a vuestros grupos de investigación y por todos los conocimientos que me habéis transmitido tanto en el plano científico como en el personal.

A la Dra. Mónica Venegas Calerón, por acceder a mi tutoría.

Al Dr. Luis Carlos Sanz Martínez, por sus consejos y su disposición en todo momento para resolver cualquier duda que me surgiera.

Al Dr. Francisco Millán Rodríguez, por su fantástica acogida cuando estaba en la dirección del instituto y su constante interés en conocer cómo se estaba desarrollando mi Tesis Doctoral.

A la Dra. M^a Luisa Hernández, por haber sido mi mentora. Gracias por las risas, tu sinceridad, tus consejos y por todo lo que he aprendido de ti. Siempre serás mi directora de tesis *honoris causa*. A mis otras compañeras de grupo de la segunda planta, M^a Dolores Sicardo, Isabel Narváez y a la recientemente incorporada Lourdes García. Lola, gracias por tu ayuda, por todos los buenos momentos vividos y por haberme enseñado tanto sobre el funcionamiento del laboratorio. Lourdes, mi sucesora, gracias por haberme acompañado en esta última etapa mitigando el estrés de la escritura. Isa, gracias por todas esas charlas y por tu interés en saber cómo iba mi tesis.

Al Profesor Ian A Graham, al Dr. Fabián Vaistij, por la fantástica acogida durante la estancia predoctoral que realicé en 2012 en el CNAP de la Universidad de York (Inglaterra). Gracias por todo lo que he aprendido con vosotros y por poner a mi disposición todo lo necesario para la realización de buena parte de este trabajo de investigación.

A la Dra. Ángela Román, mi *alter ego*. Para mí has sido uno de mis grandes descubrimientos de los últimos años. Gracias por tu complicidad, por esas conversaciones trascendentales interminables y por todas las vivencias compartidas tanto dentro como fuera del laboratorio.

A mis compañeras del laboratorio de la primera planta, la Dra. Carmen Romero, la Dra. Araceli Sánchez, Mar Pascual y muy especialmente a la Dra. Rosa M^a García. Rosa, gracias por tu comprensión y empatía, por la ayuda y el apoyo que me has prestado en y por todas esas conversaciones que ayudaban a que nos situásemos por encima de los problemas. Que no se apague nunca nuestra música interior.

A mis compañeros de desayuno, tanto los que seguís en el instituto como los que ya habéis tomado un rumbo distinto, por todas las conversaciones y todos los debates en los que tratábamos de arreglar el mundo. Gracias también por las discrepancias, de las que se aprende bastante más que de las coincidencias, y os pido disculpas por mi vehemencia en la defensa de mis más férreos ideales. Ha sido un honor compartir tantos momentos con todos vosotros.

Al Dr. Justo Javier Pedroche, por sus muestras de ánimo y sus directos y precisos consejos en momentos decisivos para mí.

A M^a Carmen Millán, por confiar siempre en mí, por tus constantes muestras de cariño, por tus consejos y por estar siempre dispuesta a brindarme una sonrisa cuando lo necesitaba.

Al Dr. Enrique Martínez Force, por tener siempre abierta la puerta de su despacho para resolver cualquier cuestión que me surgiera.

A José Julián Ríos, por su inestimable ayuda y asesoramiento técnico e informático.

A mis padres, sin los cuales no habría sido posible llegar hasta aquí. Mamá, gracias por mostrarme siempre tu cara más amable independientemente de la versión de mí que tenías delante. Si la incondicionalidad tuviera un nombre, seguramente sería el tuyo. El orgullo hacia mí que siempre me profesas es el hálito que me alienta a seguir hacia adelante.

A Paula y Elena, mis sobrinas, con quienes disfruto tanto. Gracias por recordarme que sigue habiendo un niño dentro de mí.

A mi abuela María, a quien dedico esta Tesis. Sin tu amor, atención, comprensión, cariño, bondad y afecto no sería lo que soy hoy. Porque sigues y seguirás siempre viva dentro de mí.

A todos mis amigos, muy especialmente a Rocío Aguilera y Vanesa Carrasco, por proporcionarme siempre un cálido y confortable refugio para evadirme de la realidad cuando el mundo se derrumbaba a mis pies y por tener la capacidad de llenarme el espíritu

de savia regeneradora. Vuestro orgullo y abnegada confianza en mí han sido cruciales para mantener el impulso que me ha llevado hasta aquí. Perdonad mis períodos de ausencia y gracias por comprender mi casi exclusiva dedicación al laboratorio.

A Lucas, mi perro, por todo el cariño desinteresado que me diste y por tus efusivos recibimientos siempre que cruzaba la puerta de casa.

Y en general, a todas las personas con las que he tenido el placer de trabajar en el Instituto de la Grasa. Siempre os tendré en mi recuerdo.

Este trabajo de investigación ha sido financiado mediante ayudas a la investigación concedidas por el Ministerio de Ciencia e Innovación para el período 2009-2011 (AGL2008-00258) y por el Ministerio de Economía y competitividad para el período 2011-2014 (AGL2011-24442). Durante el período 2009-2013 he sido beneficiario de una ayuda predoctoral JAE-Pre concedida por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas que ha hecho posible la realización de esta tesis.

“El azar afortunado suele ser casi siempre
el premio del esfuerzo perseverante”

Santiago Ramón y Cajal

“Los olivos grises,
los caminos blancos.
El sol ha sorbido
la calor del campo;
y hasta tu recuerdo
me lo va secando
este alma de polvo
de los días malos”

Antonio Machado

“Si para recobrar lo recobrado
debí perder primero lo perdido,
si para conseguir lo conseguido
tuve que soportar lo soportado,

si para estar ahora enamorado
fue menester haber estado herido,
tengo por bien sufrido lo sufrido,
tengo por bien llorado lo llorado.

Porque después de todo he comprobado
que no se goza bien de lo gozado
sino después de haberlo padecido.

Porque después de todo he comprendido
que lo que el árbol tiene de florido
vive de lo que tiene sepultado”

Francisco Luis Bernárdez

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, MOLECULAR Y
CELULAR DE LA β -GLUCOSIDASA DE OLIVO Y SU
RELACIÓN CON LA COMPOSICIÓN FENÓLICA
DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN**

David Velázquez Palmero
Sevilla, 2014

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. EL OLIVO: CARACTERÍSTICAS DEL ARBOL Y DEL CULTIVO	3
I.1.1. Origen histórico e importancia del cultivo	3
I.1.2. Descripción del árbol y su fruto	4
I.1.3. Variedades de olivo y aplicaciones	6
I.2. EL ACEITE DE OLIVA: OBTENCIÓN Y COMPOSICIÓN	8
I.2.1. Definición, clasificación y consumo	8
I.2.2. Proceso de obtención	10
I.2.3. Composición química	13
I.3. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	16
I.3.1. Definición y origen metabólico	16
I.3.2. Compuestos fenólicos presentes en la aceituna y en el aceite de oliva virgen	19
I.3.3. Procesos de transformación enzimática de los compuestos fenólicos del fruto durante el proceso de obtención del aceite de oliva virgen	22
I.3.4. Factores determinantes de la composición fenólica del aceite de oliva virgen	25
I.3.5. Contribución de los compuestos fenólicos a la calidad del aceite de oliva virgen	26
I.4. LAS β-GLUCOSIDASAS DE PLANTAS	28
I.4.1. Clasificación, distribución y localización	28
I.4.2. Estructura y mecanismo de reacción	30
I.4.3. Regulación y papel fisiológico	33
I.4.4. Interés biotecnológico de la β -glucosidasa de aceituna	36
II. OBJETIVOS	37
III. MATERIALES Y MÉTODOS	41
III.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	43
III.1.1. Olivo	43
III.1.1.1. Variedades utilizadas y condiciones de cultivo	43

III.1.1.2. Tejidos de olivo utilizados	44
III.1.2. <i>Nicotiana benthamiana</i>	47
III.1.3. Bacterias	47
III.1.2.1. <i>Escherichia coli</i>	47
III.1.2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	47
III.1.2.3. Condiciones de cultivo	48
III.2. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA	49
III.2.1. Plásmidos y genoteca utilizados	49
III.2.2. Transformación genética de <i>E. coli</i>	50
III.2.3. Transformación genética de <i>A. tumefaciens</i>	51
III.2.4. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>	51
III.2.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	52
III.2.6. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	53
III.2.7. Digestión de DNA con enzimas de restricción	53
III.2.8. Desfosforilación de plásmidos con fosfatasa alcalina	53
III.2.9. Ligación de fragmentos de DNA	54
III.2.10. Clonación por recombinación específica de sitio	54
III.2.11. Determinación y análisis de las secuencias de DNA	54
III.2.12. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR	55
III.2.13. Purificación de productos de PCR	56
III.2.14. Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría	57
III.3. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA	57
III.3.1. Aislamiento de RNA de tejidos de olivo	57
III.3.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa	58
III.3.3. Síntesis de cDNA	58
III.3.4. Análisis de RNA mediante PCR cuantitativa en tiempo real	59
III.4. AISLAMIENTO DE CLONES DE cDNA CORRESPONDIENTES A β- GLUCOSIDASAS DE OLIVO	62
III.4.1. Identificación de nuevas secuencias	62
III.4.2. Amplificación por PCR del extremo 5' del gen <i>OepBGLC4</i>	62
III.4.3. Aislamiento de clones completos de cDNA de <i>BGLC</i> de olivo	63
III.5. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS GENES <i>BGLC</i> DE OLIVO EN <i>E. coli</i>	64
III.6. EXPRESIÓN HETERÓLOGA TRANSITORIA DE LOS GENES <i>BGLC</i> DE OLIVO EN HOJAS DE <i>N. benthamiana</i>	66
III.6.1. Expresión heteróloga de isoenzimas recombinantes <i>BGLC</i> de olivo fusionadas a un motivo 6xHis	66

III.6.2. Expresión heteróloga de isoenzimas recombinantes BGLC de olivo fusionadas a eGFP	68
III.7. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ISOENZIMAS RECOMBINANTES BGLC DE OLIVO	70
III.7.1. Obtención de extractos crudos de <i>E. coli</i>	70
III.7.2. Purificación de isoenzimas recombinantes BGLC de olivo expresadas en hojas de <i>N. benthamiana</i>	70
III.7.2.1. Obtención del extracto crudo	70
III.7.2.2. Purificación de isoenzimas recombinantes BGLC de olivo	71
III.8. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS DE MESOCARPO DE ACEITUNA	71
III.9. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	72
III.9.1. β -glucosidasa	72
III.9.1.1. Ensayo <i>in vitro</i> espectrofotométrico	72
III.9.1.2. Ensayo <i>in vitro</i> mediante cromatografía líquida de alta resolución	72
III.10. OTROS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	73
III.10.1. Determinación de la concentración de proteínas	73
III.10.2. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	73
III.10.3. Western blot y detección inmunológica de proteínas	75
III.11. CARACTERIZACIÓN DE ISOENZIMAS RECOMBINANTES PURIFICADAS BGLC DE OLIVO EXPRESADAS EN HOJAS DE <i>N. benthamiana</i>	77
III.11.1. Especificidad y selectividad de sustrato	77
III.11.2. Determinación de parámetros cinéticos	77
III.11.3. Efecto del pH	77
III.11.4. Efecto de la temperatura	77
III.12. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS	78
III.12.1. Extracción de aceite de oliva virgen	78
III.12.2. Extracción de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen	78
III.12.3. Extracción de compuestos fenólicos de mesocarpo de aceituna	79
III.12.4. Extracción de compuestos fenólicos de semilla de aceituna	79
III.12.5. Análisis de compuestos fenólicos mediante cromatografía líquida de alta resolución	80
III.13. REACTIVOS Y APARATOS	85
III.13.1. Reactivos	85
III.13.2. Aparatos	86

IV. RESULTADOS	89
IV.1. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE cDNAs CORRESPONDIENTES A β-GLUCOSIDASAS DE OLIVO	91
IV.1.1. Aislamiento de clones de cDNA	91
IV.1.2. Análisis de las secuencias	92
IV.2. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS GENES <i>BGLC</i> DE OLIVO Y PURIFICACIÓN DE LAS ISOENZIMAS RECOMBINANTES	99
IV.2.1. Sobreexpresión de los genes <i>BGLC</i> de olivo en <i>E. coli</i>	99
IV.2.2. Sobreexpresión de los genes <i>BGLC</i> de olivo en <i>N. benthamiana</i>	102
IV.3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ISOENZIMA OepBGLC1 RECOMBINANTE	107
IV.3.1. Efecto del pH	109
IV.3.2. Efecto de la temperatura	109
IV.3.3. Selectividad de sustrato	110
IV.3.4. Cinéticas de reacción	115
IV.3.5. Inactivación térmica	116
IV.4. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LOS GENES <i>BGLC</i> DE OLIVO	118
IV.5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>BGLC</i> DE OLIVO	120
IV.5.1. Regulación espacial y temporal	120
IV.5.2. Efecto de la variedad	125
IV.5.3. Efecto del régimen hídrico	127
IV.5.4. Efecto de distintos estreses abióticos	130
IV.5.4.1. Efecto de la temperatura	130
IV.5.4.2. Efecto de la oscuridad	133
IV.5.4.3. Efecto de la herida	135
IV.6. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DE LAS β-GLUCOSIDASAS DE OLIVO EN LAS VARIETADES MENYA Y SHENGEH DURANTE LA MADURACIÓN DEL FRUTO	137
IV.6.1. Evolución de los niveles de expresión de los genes <i>BGLC</i> de olivo en mesocarpo durante la maduración del fruto	137
IV.6.2. Evolución de la actividad BGLC durante la maduración del fruto	139
IV.6.3. Análisis de la composición fenólica de mesocarpo del fruto y de los correspondientes aceites	140
V. DISCUSIÓN	147

VI. CONCLUSIONES	171
VII. BIBLIOGRAFÍA	177
VIII. ANEXO	199

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Rama joven de olivo con inflorescencias.	5
Fig. 2. Corte transversal de una aceituna.	6
Fig. 3. Biosíntesis de compuestos fenólicos a partir de la ruta del ácido shikímico, del metabolismo de los fenilpropanoides y de la ruta del ácido mevalónico.	18
Fig. 4. Principales compuestos fenólicos de la aceituna.	20
Fig. 5. Principales compuestos fenólicos del AOV.	21
Fig. 6. Mecanismo propuesto para explicar el proceso de transformación de los glucósidos fenólicos de la aceituna durante el proceso de obtención del AOV.	24
Fig. 7. Reacción catalizada por las enzimas β -glucosidasas.	29
Fig. 8. Estructura tridimensional de la β -glucosidasa de <i>Rauvolfia serpentina</i> que presenta los dominios tipo barril (β/α) ₈ .	30
Fig. 9. Mecanismo de reacción de característico de β -glucosidasas del clan GH-A.	32
Fig. 10. Aspecto y estadios de desarrollo y maduración de las aceitunas de la variedad Picual utilizadas en este trabajo.	45
Fig. 11. Aspecto y estadios de desarrollo y maduración de las aceitunas de la variedad Arbequina utilizadas en este trabajo.	46
Fig. 12. Curva de amplificación de la qRT-PCR.	61
Fig. 13. Representación esquemática de las reacciones de recombinación para la obtención de las construcciones del vector pH2GW7.	67
Fig. 14. Proceso de infiltración de las hojas de <i>N. benthamiana</i> .	68
Fig. 15. Representación esquemática de las construcciones del vector de expresión pK7FGW2.0.	69
Fig. 16. Recta de calibrado del movimiento relativo de las proteínas patrón en función de su masa molecular en SDS-PAGE.	75
Fig. 17. Perfiles fenólicos típicos de aceites de la variedad Picual (A) y Arbequina (B) registrados a 280 y 335 nm.	82

Fig. 18. Perfiles fenólicos típicos de frutos de la variedad Picual (A) y Arbequina (B) registrados a 280 y 335 nm.	83
Fig. 19. Perfiles fenólicos obtenidos a partir de extractos etanólicos de cotiledón (A) y membrana seminal (B) registrados a 280 y 335 nm.	84
Fig. 20. Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes <i>BGLC</i> de olivo.	95
Fig. 21. Modelado de la estructura tridimensional de las BGLC de olivo.	96
Fig. 22. Análisis filogenético de las enzimas BGLC de plantas.	98
Fig. 23. SDS-PAGE de fracciones totales (A) y extractos crudos (B) de células de <i>E. coli</i> que sobreexpresan los genes <i>BGLC</i> de olivo.	100
Fig. 24. Análisis de western blot de fracciones totales de células de <i>E. coli</i> que sobreexpresan los genes <i>BGLC</i> de olivo usando como anticuerpo primario anti 6xHis (A) o anti BGLC de olivo (B).	102
Fig. 25. SDS-PAGE de extractos crudos (A) y preparaciones purificadas (B) obtenidos a partir de hojas de <i>N. benthamiana</i> que expresan transitoriamente los genes <i>BGLC</i> de olivo.	104
Fig. 26. Análisis de western blot de preparaciones purificadas obtenidas a partir de hojas de <i>N. benthamiana</i> que expresan transitoriamente los genes <i>BGLC</i> de olivo usando como anticuerpo primario anti 6xHis (A) o anti BGLC de olivo (B).	106
Fig. 27. Hidrólisis de la oleuropeína por la acción de la isoforma OepBGLC1 a distintos tiempos de reacción.	108
Fig. 28. Determinación del pH óptimo de la actividad BGLC de la isoenzima recombinante OepBGLC1.	109
Fig. 29. Determinación de la temperatura óptima de la actividad BGLC de la isoenzima recombinante OepBGLC1.	110
Fig. 30. Reacción de la isoenzima recombinante OepBGLC1 con una mezcla de glucósidos fenólicos obtenida a partir de extractos fenólicos de pulpa y tegumento.	112
Fig. 31. Reacción de la isoenzima recombinante OepBGLC1 con compuestos fenólicos de un extracto de cotiledón de semilla de aceituna.	114

Fig. 32. Efecto de la concentración de oleuropeína sobre la velocidad de la isoenzima recombinante OepBGLC1 (A) y su correspondiente representación de Lineweaver-Burk (B).	115
Fig. 33. Cinéticas de inactivación térmica de la isoenzima recombinante OepBGLC1.	117
Fig. 34. Localización subcelular de las β -glucosidasas de olivo.	119
Fig. 35. Niveles de expresión relativa de los genes <i>OeBGLC2</i> , <i>OeBGLC3</i> y <i>OeBGLC4</i> en diferentes tejidos de las variedades Picual y Arbequina.	121
Fig. 36. Evolución de los niveles de expresión relativa de los genes <i>OeBGLC2</i> , <i>OeBGLC3</i> y <i>OeBGLC4</i> en mesocarpo de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina a lo largo del desarrollo y maduración del fruto.	123
Fig. 37. Evolución de los niveles de expresión relativa de los genes <i>OeBGLC2</i> , <i>OeBGLC3</i> y <i>OeBGLC4</i> en semilla de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina a lo largo del desarrollo y maduración del fruto.	124
Fig. 38. Efecto de la variedad sobre los niveles de expresión relativa de los genes <i>OeBGLC2</i> , <i>OeBGLC3</i> y <i>OeBGLC4</i> en mesocarpo de aceitunas de diferentes variedades.	126
Fig. 39. Efecto del régimen hídrico sobre los niveles de expresión relativa de los genes <i>OeBGLC2</i> , <i>OeBGLC3</i> y <i>OeBGLC4</i> en mesocarpo de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina.	128
Fig. 40. Efecto del riego deficitario sobre los niveles de expresión relativa de los genes <i>OeBGLC1</i> , <i>OeBGLC2</i> , <i>OeBGLC3</i> y <i>OeBGLC4</i> en mesocarpo de aceitunas de la variedad Arbequina.	129
Fig. 41. Efecto de la temperatura baja sobre los niveles de expresión relativa de los genes <i>OeBGLC2</i> , <i>OeBGLC3</i> y <i>OeBGLC4</i> en mesocarpo de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina.	131
Fig. 42. Efecto de la temperatura alta sobre los niveles de expresión relativa de los genes <i>OeBGLC2</i> , <i>OeBGLC3</i> y <i>OeBGLC4</i> en mesocarpo de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina.	132
Fig. 43. Efecto de la oscuridad sobre los niveles de expresión relativa de los genes <i>OeBGLC2</i> , <i>OeBGLC3</i> y <i>OeBGLC4</i> en mesocarpo de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina.	134

- Fig. 44. Efecto de la herida sobre los niveles de expresión relativa de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en mesocarpo de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina. 136
- Fig. 45. Evolución de los niveles de expresión relativa de los genes *OeBGLC1*, *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en mesocarpo de aceitunas de las variedades Menya y Shengeh durante la maduración del fruto. 138
- Fig. 46. Evolución de la actividad β -glucosidasa en pulpa de aceitunas de las variedades Menya y Shengeh durante la maduración. 139
- Fig. 47. Evolución del contenido de glucósidos fenólicos en pulpa de frutos de las variedades Menya y Shengeh a lo largo de la maduración del fruto. 145
- Fig. 48. Evolución del contenido fenólico de aceites procedentes de aceitunas de las variedades Menya y Shengeh a lo largo de la maduración. 146
- Fig. 49. Esquema que ilustra la generación de derivados secoiridoideos por la actividad de la isoenzima nuclear *OepBGLC1* tras producirse la lisis de las células del mesocarpo. 169

ÍNDICE DE TABLAS

Tab. 1. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.	47
Tab. 2. Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo.	49
Tab. 3. DNA polimerasas empleadas en este trabajo.	56
Tab. 4. Oligonucleótidos utilizados en la qRT-PCR.	59
Tab. 5. Oligonucleótidos utilizados para la obtención de clones de cDNA correspondientes a <i>BGLCs</i> de olivo.	64
Tab. 6. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones codificantes de los genes <i>BGLC</i> de olivo para la expresión heteróloga en <i>E. coli</i> .	65
Tab. 7. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones codificantes de los genes <i>BGLC</i> de olivo con el objeto de obtener isoenzimas recombinantes fusionadas a un motivo 6xHis en su extremo C-terminal.	66
Tab. 8. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones codificantes de los genes <i>BGLC</i> de olivo con el objeto de obtener isoenzimas recombinantes fusionadas a eGFP en su extremo C-terminal.	69
Tab. 9. Gradiente de elución aplicado en el análisis de los compuestos fenólicos por HPLC.	80
Tab. 10. Actividad de la isoenzima recombinante OepBGLC1 frente a distintos glucósidos fenólicos contenidos en una mezcla de extractos fenólicos de pulpa y membrana seminal de aceituna.	113
Tab. 11. Parámetros cinéticos de la isoenzima recombinante OepBGLC1 calculados a partir de la representación de Lineweaver-Burk.	116
Tab. 12. Contenido de compuestos fenólicos de pulpa de aceitunas de la variedad Menya durante la maduración.	141
Tab. 13. Contenido de compuestos fenólicos de pulpa de aceitunas de la variedad Shengeh durante la maduración.	142
Tab. 14. Composición fenólica de aceites obtenidos a partir de aceitunas de la variedad Menya durante la maduración.	143
Tab. 15. Composición fenólica de aceites obtenidos a partir de aceitunas de la variedad Shengeh durante la maduración.	144

Tab. 16. Cuadro anexo en el que quedan recogidos los números de acceso y las referencias bibliográficas de las secuencias de proteínas utilizadas para el análisis filogenético. 201

ABREVIATURAS

AAL	Forma aldehídica de la aglucona del ligustrósido
AAO	Forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína
ABA	Ácido abscísico
ABA-GE	Glucosil éster del ácido abscísico
AOV	Aceite de oliva virgen
APS	Persulfato amónico
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BGFA	Factor de agregación de β -glucosidasas
BGLC	β -glucosidasa
BSA	Seroalbúmina bovina
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor
CE	Comisión Europea
COI	Consejo oleícola internacional
Ct	Ciclo umbral
CV	Coefficiente de variación
DAOD	Forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína descarboximetilada
DAOL	Forma dialdehídica de la aglucona del ligustrósido descarboximetilado
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
dR	Incremento de fluorescencia
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EFS	Extracción en fase sólida
eGFP	Proteína fluorescente verde mejorada
ESTs	<i>Expressed sequence tags</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GH	Glicosil hidrolasas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución

HSP	<i>Heat shock protein</i>
IM	Índice de maduración
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
LOX	Lipoxigenasa
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico
MOPS	Ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico
Na₂EDTA	Etilendiamin tetraacetato sódico
NBT	Nitroazul de tetrazolio
PAGE	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIPES	Ácido 1,4-piperazíndietanesulfónico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
pNPG	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glucopiranosido
POX	Peroxidasa
PPO	Polifenol oxidasa
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
PVPP	Polivinil polipirrolidona
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SD	Desviación estándar
SDF	Semanas después de la floración
SDS	Dodecilsulfato sódico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-1,2-diaminometano
U	Unidad enzimática
UBQ	Ubiquitina
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

I. INTRODUCCIÓN

I.1. EL OLIVO: CARACTERÍSTICAS DEL ARBOL Y DEL CULTIVO

I.1.1. Origen histórico e importancia del cultivo

El cultivo del olivo, uno de los árboles más emblemáticos del mundo, se ha venido desarrollando desde tiempos inmemorables hasta la actualidad, situándose a día de hoy entre los más importantes del área mediterránea. Debido a que el olivo y sus frutos han ocupado un lugar relevante en las antiguas civilizaciones, la larga historia del olivar y la cultura oleícola pueden confundirse fácilmente con la propia historia de la humanidad. Tanto en rituales litúrgicos como en aspectos más cotidianos (gastronómicos, iluminación, cosméticos y médicos), el olivo y sus derivados han estado al servicio del hombre durante siglos, representando además símbolos de paz, armonía y sabiduría.

Aunque el lugar de origen del cultivo del olivo continúa suscitando controversia, los avances en datación por radiocarbono, paleobotánica, genética e historia arqueológica parecen circunscribirlo a las regiones geográficas de Oriente Medio (Kaniewski *et al.*, 2012), zona a partir de la cual se difunde de este a oeste hasta poblar todos los países ribereños del Mediterráneo (Breton *et al.*, 2009). La incesante actividad comercial de los fenicios los convirtió en importantes agentes propagadores del olivo y de las técnicas de extracción del aceite, siendo los primeros en implantar la cultura oleícola en la Península Ibérica a mediados del siglo XI a. C., concretamente en las regiones situadas en los valles de los ríos Guadalquivir y Genil. A pesar de que existen pruebas que apuntan a que los griegos ya difundieron en los países más occidentales del Mediterráneo su tradición olivarera entre los siglos VI y VII a. C., fueron realmente los romanos los que consolidaron el cultivo en Hispania y lo expandieron desde la provincia Bética hacia el norte, intensificando la actividad comercial y contribuyendo al desarrollo tecnológico. El cultivo del olivar continuó incrementándose notablemente en la región Bética durante los ocho siglos de al-Ándalus. Los árabes, además de aportar importantes mejoras tanto en las técnicas de cultivo como en el proceso de obtención del aceite y su almacenamiento, introdujeron sus propias variedades en la península y sentaron definitivamente los vocablos castellanos de aceituna, aceite y almazara. A partir del siglo XV, con los viajes transoceánicos de Colón, Magallanes y Juan Sebastián Elcano, el cultivo se extendió por el Nuevo Mundo. En la actualidad, el olivo también se cultiva en Sudáfrica, China, y Australia.

El hábitat del olivo se concentra, tanto en el hemisferio norte como en el sur, en regiones climáticas del tipo mediterráneo caracterizadas por veranos secos y calurosos. El patrimonio oleícola existente se estima en aproximadamente 1.000 millones de olivos, ocupando una superficie de aproximadamente 10 millones de ha. El 98 % del total se sitúa en los países de la cuenca mediterránea, 1,2 % en el continente americano, 0,4 % en Asia oriental y otro 0,4 % en Oceanía. La producción del olivar alcanza una media anual de cerca de 16 millones de Tm de aceitunas, de las que el 90 % se destinan a la obtención de aceite y el 10 % restante se consumen elaboradas como aceitunas de mesa.

En España existen olivares repartidos por casi todo el territorio nacional, lo que sitúa al país a la cabeza de la producción de aceitunas en el mundo, con una producción media anual de 4.673.000 Tm de aceitunas, de las cuales 328.000 se destinan a aderezo y 4.345.000 a la obtención de aceite. Las últimas estadísticas del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente correspondientes al año 2013 sitúan la superficie del olivar en España en 2.584.067 ha. Dentro de España, Andalucía con el 60 % de la superficie y el 80 % de la producción, es la principal Comunidad Autónoma productora de aceite y aceituna de mesa.

I.1.2. Descripción del árbol y su fruto

El olivo (*Olea europaea* L.) pertenece a la familia botánica Oleaceae, en la que se engloban unos 29 géneros de plantas arbóreas y arbustivas distribuidas por las regiones tropicales y templadas del mundo (Rapoport, 2008). Posee la interesante peculiaridad de ser el único miembro de la familia Oleaceae cuyo fruto es comestible. El olivo cultivado es un árbol de tamaño mediano, de unos 4 a 8 m de altura, según la variedad, que puede permanecer vivo y productivo durante cientos de años. Con un tronco grueso y una corteza de color gris a verde grisáceo, su copa es redondeada, más o menos lobulada; la ramificación natural tiende a producir una copa bastante densa, aunque las diversas prácticas de poda la aclaran para permitir mejor la penetración de la luz. El olivo es un árbol polimórfico, con fases juvenil y adulta. Las diferencias entre estas fases se manifiestan en la capacidad reproductora (sólo en la fase adulta), en el potencial de enraizamiento (mayor en la fase juvenil) y en las diferencias morfológicas de hojas y ramas.

Las hojas del olivo son persistentes y generalmente tienen una vida media de dos a tres años, aunque también permanecen en el árbol hojas de mayor edad. Son de disposición decusada, simples, de forma lanceolada y con bordes enteros, con un limbo de longitud de 3-9 cm y anchura de 1-1,8 cm. Poseen una nervadura central muy marcada y las secundarias poco aparentes. A partir de las axilas foliares de los nudos del crecimiento vegetativo se desarrollan las inflorescencias (Fig. 1), de forma paniculada, las cuales albergan de 10-40 flores según la variedad. Las flores son pequeñas y actinomorfas, con simetría regular. Desde que aparece la primera flor hasta que se produce la floración completa pueden transcurrir de 2-3 semanas, lo que dificulta la determinación de la fecha exacta de floración de un cultivar o incluso de un solo árbol.



Fig. 1. Rama joven de olivo con inflorescencias.

La polinización y la fecundación son requisitos esenciales para la formación y el cuajado de los frutos, aunque también en el olivo pueden formarse frutos partenocárpicos (zofairones) sin el beneficio de la fecundación, que son más pequeños y de escaso valor económico. El fruto del olivo, la aceituna, posee una forma que oscila entre elipsoidal y globosa, con una longitud de 1-4 cm y un diámetro de 0,6-2,0 cm, y una capacidad fotosintética que va decayendo a medida que el fruto madura. Tanto la forma como el tamaño pueden variar mucho en función de la variedad. La aceituna es una drupa que contiene una sola semilla y está compuesta por tres tejidos principales: endocarpo o hueso, mesocarpo o pulpa, y exocarpo o piel (Fig. 2). El conjunto de estos dos últimos tejidos se denomina pericarpo. El pericarpo tiene su origen en la pared del ovario, mientras que la

semilla que se encuentra en el interior del endocarpo es de origen embrionario. El mesocarpo carnoso compuesto por células parenquimáticas es el tejido donde tiene lugar principalmente la acumulación de aceite. El desarrollo del fruto desde la floración hasta la completa maduración de la aceituna es un proceso muy largo, que dura entre 35 y 40 semanas. La lignificación del endocarpo, que transcurre entre las 10 y las 12 semanas después de la floración (SDF), coincide con el inicio de la biosíntesis y acumulación de aceite tanto en la semilla como en el mesocarpo. El proceso de maduración comienza aproximadamente a las 28 SDF, y se caracteriza por un cambio del color del fruto, que pasa de verde a morado, y por último a negro (Sánchez, 1994).

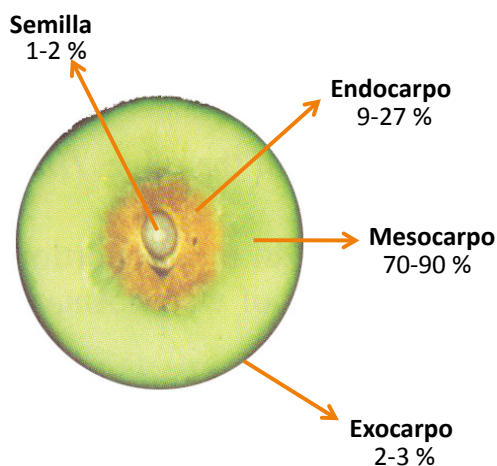


Fig. 2. Corte transversal de una aceituna. Los porcentajes indican el volumen que ocupa cada tejido en el fruto.

I.1.3. Variedades de olivo y aplicaciones

Durante el proceso de difusión del cultivo del olivo en la zona mediterránea, los primeros olivicultores de cada región seleccionaron en sus bosques de acebuche (olivo silvestre) los individuos más sobresalientes en función de determinados atributos tales como la productividad, el tamaño del fruto y su contenido de aceite, el grado de adaptación al medio, etc. (Barranco, 2008). La perpetuación de estos individuos seleccionados mediante reproducción asexual dio lugar a las primeras variedades del olivo. Posteriormente, se sucedieron eventos de propagación vegetativa de las variedades

iniciales interrumpidos puntual y localmente por sucesos de hibridación mediante reproducción sexual (Zeder *et al.*, 2006). La selección fenotípica de los nuevos individuos que presentaban determinadas características deseadas y su posterior propagación mediante reproducción vegetativa, dieron lugar al gran número de variedades diferentes de olivo que conocemos hoy día.

El material vegetal del olivo cultivado en España está constituido por un gran número de variedades. Hasta la fecha, se han encontrado 262 variedades cultivadas en España. Esta diversidad es debida probablemente al origen autóctono de las variedades, que ocasionó que en cada zona se eligieran cultivares diferentes, y a determinados factores que han mantenido la situación inicial. Entre ellos hay que destacar la escasa presión de selección aplicada por el hombre a esta especie. Asimismo, la longevidad de las plantaciones limita la renovación varietal restringiendo la sustitución de los cultivares. Otra característica del material vegetal del olivo es la localización de las variedades. Normalmente, incluso las variedades más importantes presentan una zona de mayor concentración, pero posteriormente su influencia decae rápidamente, desapareciendo su cultivo en comarcas relativamente próximas. Por último, todas las variedades del olivo se caracterizan por la existencia de una enorme homogeneidad genética debido a los procedimientos de propagación vegetativa empleados y a la muy baja ocurrencia y dificultad de detección de mutaciones en esta especie.

De las variedades de olivo cultivadas en España, únicamente 24 alcanzan la categoría de variedad principal. Dos de ellas, Manzanilla de Sevilla y Gordal Sevillana, se destinan fundamentalmente para aceituna de mesa. Otras tres (Hojiblanca, Manzanilla Cacereña y Aloreña), se consideran de doble aptitud y dedican parte de su producción para aderezo y parte a la obtención de aceite. El resto de las variedades se dedican casi exclusivamente a la obtención de aceite de oliva, siendo Picual y Arbequina las de mayor repercusión económica en España, obteniéndose aceites con propiedades tecnológicas, nutricionales y organolépticas muy diferentes. Aunque el principal producto del cultivo del olivo es el aceite de oliva, seguido a distancia de la aceituna de mesa, también son de gran relevancia económica los subproductos del olivo, como son el orujo, madera y hojas del olivo, etc.

I.2. EL ACEITE DE OLIVA: OBTENCIÓN Y COMPOSICIÓN

I.2.1. Definición, clasificación y consumo

El aceite de oliva virgen (AOV) se define como el zumo oleoso obtenido del fruto del olivo exclusivamente por medios mecánicos u otros procedimientos físicos aplicados en condiciones que excluyan toda alteración del producto, y que no se ha sometido a ningún otro tratamiento que no sea su lavado, decantación, centrifugado o filtración, excluidos expresamente los aceites obtenidos con el uso de disolventes o de coadyuvantes de acción química o bioquímica, por un procedimiento de reesterificación o como resultado de cualquier mezcla con aceites de otros tipos. Cuando se obtiene mediante sistemas de extracción adecuados y procede de frutos frescos y sanos de buena calidad, sin defectos ni alteraciones y con la adecuada madurez, el AOV posee excepcionales características nutricionales y organolépticas. Las propiedades organolépticas del AOV son, de hecho, el criterio más utilizado para evaluar su calidad. El Reglamento de la Comisión Europea (CE) n.º 2568/91, con las correspondientes modificaciones posteriores, define las características químicas y organolépticas de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva, así como los métodos de análisis de tales características. La modificación del reglamento CE n.º 640/2008, recoge el método revisado por el Consejo Oleícola Internacional (COI) para la valoración organoléptica de los aceites de oliva vírgenes, en el que se incluye además una actualización de las descripciones de los atributos positivos y negativos de éstos. La última modificación UE n.º 1348/2013, que ha entrado en vigor el 1 de marzo de 2014, sustituye el artículo 2 sobre los métodos de análisis de las características de los aceites y establece que la comprobación de las características organolépticas del AOV correrá a cargo de paneles de catadores autorizados por los estados miembros.

Según la normativa europea, los aceites de oliva se clasifican en aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva virgen y aceite de oliva lampante en función de una serie de parámetros fisicoquímicos y características organolépticas descritas en los reglamentos mencionados. A diferencia de las dos primeras categorías que pueden destinarse directamente al consumo, el aceite de oliva lampante no es apto para ser consumido, por lo que debe someterse a un proceso químico de refinado (neutralización, decoloración y desodorización) para rectificar sus defectos. El aceite así obtenido es el aceite de oliva

refinado, cuyas características sensoriales son prácticamente neutras al carecer de olor y sabor, y no es apto para el consumo hasta que no se mezcle con aceite de oliva virgen o aceite de oliva virgen extra, dando lugar a lo que se conoce como aceite de oliva. Además de los aceites de oliva vírgenes, en las almazaras se obtiene también un subproducto, el orujo, que posee un contenido significativo de aceite que puede ser extraído mediante procesos físicos o químicos, obteniéndose el aceite de orujo crudo que no es apto para el consumo directo y debe someterse al proceso de refinado. Se obtiene así el aceite de orujo refinado que, tras mezclarse con aceite de oliva virgen o aceite de oliva virgen extra, da lugar al aceite de orujo de oliva.

Según las estadísticas del COI, tanto la producción como el consumo mundial de aceite de oliva han experimentado un aumento progresivo durante la última década del siglo XX y la primera del siglo XXI con respecto a periodos anteriores, una tendencia que parece haberse consolidado durante los primeros años de la segunda década del presente siglo. Según este organismo la producción mundial de aceite de oliva en la campaña 2013/2014 podría ascender a 3,2 millones de Tm, lo que supera sus previsiones iniciales realizadas en septiembre, que estaban en torno a los tres millones de Tm. Este fenómeno bien podría atribuirse a una concienciación generalizada de la población mundial sobre las bondades del AOV como componente esencial de la dieta mediterránea. En los países de la cuenca mediterránea, donde la fuente principal de grasa de su alimentación es el aceite de oliva, la incidencia de determinadas enfermedades crónicas es una de las más bajas del mundo, mientras que la esperanza de vida es una de las más altas (Trichopoulou *et al.*, 2000; Pérez-Jiménez *et al.*, 2005; Gardener *et al.*, 2011). De acuerdo con numerosos estudios epidemiológicos (Pauwels, 2011; Moreno-Luna *et al.*, 2012; López *et al.*, 2013), el consumo continuado de aceite de oliva tiene importantes beneficios para la salud reduciendo la incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y obesidad, debido fundamentalmente a su composición de ácidos grasos, mayoritariamente monoinsaturados, y a la actividad antioxidante de algunos de sus componentes menores como los polifenoles o tocoferoles. Estos efectos beneficiosos para la salud han sido determinantes para que, en 2004, la Food and Drug Administration (FDA) norteamericana autorizara que el aceite de oliva incluyera en su etiquetado la leyenda “puede reducir el riesgo de desarrollar enfermedad coronaria”, hecho que ha contribuido de manera extraordinaria a divulgar y fomentar el consumo de AOV. Sin embargo, la creciente

demanda de AOV durante las últimas décadas no se puede atribuir sólo a sus efectos beneficiosos para la salud, sino también a sus excelentes propiedades organolépticas y a su enorme versatilidad culinaria.

I.2.2. Proceso de obtención

Las condiciones de extracción tienen un gran impacto en la cualidades sensoriales y nutricionales del AOV (Morales y Aparicio, 1999). La experiencia demuestra que el deterioro del AOV se produce casi exclusivamente como consecuencia de una manipulación incorrecta de los frutos y de un procesado incorrecto, ya que, si bien es verdad que las diversas variedades de aceitunas que se cultivan dan lugar a aceites con perfiles organolépticos diferentes, ninguna de ellas origina un aceite defectuoso *per se*. Por lo tanto, la tecnología de extracción oleícola, o elaiotecnia, resulta fundamental para poder obtener un aceite de oliva virgen de máxima calidad (virgen extra).

El proceso de obtención comienza con la recolección de las aceitunas, que aun siendo una operación independiente del proceso propiamente dicho, influye sensiblemente en las características del aceite. Las aceitunas deben ser cuidadosamente recolectadas del árbol en su punto óptimo de maduración (Anastasopoulos *et al.*, 2011). Una vez en la almazara se clasifican en función de la variedad, procedencia del árbol o del suelo, estado sanitario, etc. Es importante que el proceso de extracción del aceite se lleve a cabo a la mayor brevedad posible para evitar posibles defectos debido a un almacenamiento excesivo y/o inadecuado de los frutos, tales como atrojado, mohohumedad o avinado (Morales *et al.*, 2005). Antes de ser procesadas, las aceitunas deben someterse a un proceso de limpieza que elimine cualquier resto vegetal, o no vegetal, que pueda interferir con la maquinaria o afectar negativamente a la calidad del producto. En frutos maduros, la mayor parte del aceite de las células parenquimáticas del mesocarpo se encuentra en el citoplasma formando una única gota (Rangel *et al.*, 1997), aunque también existe una pequeña proporción de aceite en la semilla.

El proceso de obtención del AOV consta de las siguientes fases: molienda, batido, extracción y separación (Alba, 2008). Durante la molturación, el molino actúa como una cizalla que desgarras las paredes y las membranas celulares provocando la liberación de las gotas de aceite y favoreciendo al mismo tiempo que entren en contacto enzimas y sustratos

antes separados en distintos compartimentos celulares y se formen algunos de los compuestos responsables de la calidad del AOV. Los molinos utilizados pueden ser de rulos o empiedros (sistema tradicional), troncocónicos o cilíndricos, si posteriormente se utiliza el sistema de prensas; o molinos como el de martillo, de discos dentados o de rodillos metálicos, utilizados cuando posteriormente se emplea un decánter o centrífuga horizontal. La composición del AOV varía dependiendo del sistema de molturación empleado. Estudios comparativos entre los dos sistemas muestran que los aceites cuyas aceitunas fueron molturadas con molinos metálicos poseen un mayor contenido en compuestos fenólicos con respecto al sistema de empiedros tradicional (Inarejos-García *et al.*, 2011). Los molinos metálicos son más eficientes a nivel industrial porque no son excesivamente caros y trabajan en continuo a alta velocidad, razón por la cual suelen utilizarse en almazaras con altas tasas de producción. Sin embargo, este tipo de molinos pueden producir emulsiones que dificulten la separación agua-aceite.

Para maximizar la producción de aceite, la pasta resultante después de la molturación debe ser batida para completar el efecto de cizallamiento de la molienda y facilitando la coalescencia de las gotas de aceite en gotas de mayor tamaño. Las termobatidoras empleadas más frecuentemente son las de eje horizontal, aunque también se emplean de eje vertical. La temperatura y el tiempo de batido son factores que condicionan las características del aceite obtenido (Morales y Aparicio, 1999). Cuando la molienda se lleva a cabo con molinos de empiedro, es recomendable que el batido de la pasta se realice a tiempos cortos de 20-30 min y a temperaturas de 22-25 °C. No obstante, si la molienda se realiza en molinos metálicos, el uso de temperaturas más altas de (25-30 °C) normalmente implica utilizar tiempos de batido más prolongados (30-75 min) para evitar la formación de emulsiones. Aunque el incremento del tiempo y de la temperatura de batido proporcione rendimientos de aceite más elevados, suele ir en detrimento de la calidad del mismo. Generalmente, para evitar cambios en el color del aceite, un incremento de la acidez y la pérdida de compuestos volátiles, se recomienda que la temperatura de batido no exceda de 30 °C. De igual modo, un incremento en el tiempo de batido favorece la degradación oxidativa de compuestos fenólicos. Para facilitar la separación del aceite de los demás componentes de la pasta, pueden utilizarse coadyuvantes tecnológicos que se añaden en la fase de batido. Según la legislación europea, el único compuesto permitido

para facilitar la extracción del aceite es el silicato de magnesio hidratado (talco), por tratarse de un compuesto que no tiene acción química ni bioquímica sobre el proceso.

La siguiente etapa consiste en la separación de los líquidos contenidos en la pasta de aceituna. Se puede realizar mediante diferentes sistemas: filtración selectiva, extracción por presión y extracción por centrifugación. La filtración selectiva se basa en la distinta tensión superficial existente entre el aceite y el alpechín, que provoca que durante el batido se separe una cierta cantidad de aceite en fase continua. La separación espontánea del aceite de la pasta no proporciona grandes rendimientos y por lo general se combina con métodos de presión o centrifugación. La extracción por métodos de prensas es el procedimiento más antiguo de extracción de acetite, que se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo hasta llegar a las prensas hidráulicas actuales. El método consiste en distribuir la pasta en discos filtrantes (capachos) y apilarlos, de forma que la presión aplicada sobre el conjunto provoque la separación del aceite de la pasta. Sin embargo, la extracción por centrifugación es el método más usado actualmente al tratarse de procesos continuos que permiten obtener aceites de alta calidad con menores costes de producción. La centrifugación tiene lugar en una centrífuga horizontal o decánter que puede ser de tres fases (orujo, alpechín y aceite) o de dos fases (orujo húmedo o alperujo y aceite). En el sistema de centrifugación de tres fases se adiciona a la pasta batida agua templada (25-30 °C) para incrementar la fluidez y favorecer la separación de las fases sólidas y líquidas por la fuerza centrífuga. Esta adición presenta importantes inconvenientes como el consumo de energía térmica y agua, el aumento de la cantidad de residuos acuosos (alpechín) y el menor contenido en compuestos fenólicos del aceite obtenido (Salvador *et al.*, 2003). El sistema de dos fases reduce drásticamente las desventajas de los decánteres de tres fases (Di Giovacchino *et al.*, 2002) y tiene la ventaja de recuperar una mayor cantidad de compuestos fenólicos, lo que permite obtener aceites con mayor estabilidad oxidativa. El principal inconveniente de este método de extracción es la producción del subproducto alperujo, que presenta humedades muy altas y es de difícil manejo. Finalmente, para separar los restos de agua y las partículas sólidas es necesaria una centrifugación vertical final que suele hacerse a velocidades de 6000-7000 rpm.

Un paso posterior para obtener un aceite limpio y brillante sería el de la filtración. Aunque en algunas almazaras se soslaya este procedimiento, la eliminación de restos

acuosos que provocan turbidez en el aceite reduce los posteriores procesos degradativos e incrementa la vida útil del producto (Frankel *et al.*, 2013).

Una vez envasado el AOV, la fecha de consumo preferente no debe exceder de un año ya que está demostrado que el tiempo de almacenamiento y las condiciones del mismo, tales como temperatura, la disponibilidad de oxígeno y el material de los depósitos, repercuten sobre la calidad del aceite (Stefanouadaki *et al.*, 2010). En este sentido, aunque todos los aceites experimentan pérdidas de calidad a lo largo de la conservación, es recomendable utilizar envases que minimicen el paso del oxígeno y de la luz (Samaniego-Sánchez *et al.*, 2012).

I.2.3. Composición química

El AOV está constituido principalmente por triglicéridos (94-96 %) y mezclas complejas de componentes menores (aproximadamente 2 %) de naturaleza química muy diversa. Respecto a la composición de ácidos grasos, la principal diferencia entre el AOV y otros aceites vegetales es su alto contenido en ácido oleico, un ácido graso monoinsaturado que supone entre el 56 y 84 % del contenido total de ácidos grasos, y la presencia de los ácidos linoleico (3-21 %) y linolénico (0,1-1,0 %). Otros ácidos grasos presentes en el AOV son el ácido palmítico (6-21 %), el ácido palmitoleico (0,3-3,5 %) y el ácido esteárico (0,3-5,3 %). Los triglicéridos del AOV, como en la mayoría de aceites vegetales, poseen una estructura específica en la que los ácidos grasos saturados se localizan en las posiciones *sn-1* y *sn-3* y están prácticamente ausentes en la posición *sn-2*, que generalmente está ocupada por ácidos grasos insaturados. Además de triglicéridos, en el AOV también existen ácidos grasos libres, monoglicéridos y diglicéridos, pero en una proporción menor.

Los componentes menores del AOV engloban a un grupo muy heterogéneo de compuestos tales como esteroides, alcoholes alifáticos grasos, ésteres no glicéricos, hidrocarburos, tocoferoles, compuestos fenólicos, pigmentos (clorofilas y carotenoides), compuestos volátiles, ceras y fosfolípidos, que son determinantes para la calidad del aceite, influyendo en sus propiedades nutricionales y organolépticas, afectando a su estabilidad oxidativa y permitiendo la autenticación del mismo así como conocer su trazabilidad (Aparicio *et al.*, 2007; García-González *et al.*, 2008).

Los esteroides se agrupan en tres clases: fitoesteroides, alcoholes triterpénicos y metilesteroides. Están presentes en el rango de 1800-5000 mg/kg de aceite y su contenido está relacionado con la variedad y el estadio de maduración de los frutos empleados en su obtención (Lukic *et al.*, 2013), de forma que este parámetro puede ser utilizado para la detección de adulteraciones (García-González *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que estos compuestos pueden tener propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias e hipocolesterolémicas (Sakouhi *et al.*, 2009).

Los alcoholes alifáticos grasos constituyen una clase importante de compuestos dentro de los componentes menores, ya que se usan como criterio para la clasificación del aceite de oliva en las distintas categorías. Los principales alcoholes lineales presentes en el aceite de oliva son docosanol, tetracosanol, hexacosanol y octacosanol, mientras que los alcoholes con un número impar de átomos de carbono se encuentran como trazas. El contenido total de alcoholes alifáticos no suele exceder de 350 mg/kg de aceite.

Los ésteres no-glicéridos son compuestos minoritarios formados por ácidos grasos esterificados con alcoholes distintos del glicerol como metanol, etanol y otros alcoholes de cadena larga, y también con esteroides como β -sitosterol, campesterol, estigmasterol y con alcoholes triterpénicos. La concentración total de este grupo de compuestos se encuentra en el rango de 100-250 mg/kg de aceite.

Con respecto a los hidrocarburos, el principal compuesto presente en el AOV es el escualeno (1250-7500 mg/kg de aceite), y constituye alrededor del 50 % de la fracción insaponificable. Otros hidrocarburos distintos al escualeno (pentacosano, hexacosano, heptacosano, octacosano) se usan para la detección de contaminaciones (Mafrá *et al.*, 2010). El contenido total de hidrocarburos es de 1500-8000 mg/kg de aceite.

En relación a los tocoferoles, el AOV contiene α -, β - y γ -tocoferol, siendo el α -tocoferol o vitamina E el más abundante con un contenido de 12-400 mg/kg de aceite. Los tocoferoles contribuyen a las propiedades antioxidantes del AOV y su perfil se usa con frecuencia como criterio de pureza (Escuderos *et al.*, 2009).

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo de especial interés dentro de los componentes menores del AOV, ya que son fundamentales tanto para las propiedades nutricionales y organolépticas del AOV como para su estabilidad oxidativa. Las características de estos compuestos se describen más ampliamente en el apartado I.3.

Los pigmentos, tanto las clorofilas como los carotenoides, son responsables del color del AOV. Los pigmentos clorofílicos son responsables del color verdoso del aceite, siendo las feofitinas, productos de oxidación de las clorofilas, los compuestos mayoritarios, mientras que los carotenoides son los que proporcionan el color amarillento al aceite. La luteína es el carotenoide más abundante, seguido del β -caroteno y xantofilas. La cantidad de pigmentos en un aceite depende en gran medida de la variedad, de los factores agronómicos, del grado de maduración de la aceituna, del sistema de obtención del aceite y del sistema de almacenamiento (Gallardo-Guerrero *et al.*, 2005; Criado *et al.*, 2007). Los pigmentos clorofílicos se cuantifican en el AOV en concentraciones de 10-30 mg/kg de aceite, mientras que la concentración de los carotenoides no excede de 10 mg/kg de aceite. Estos compuestos juegan un papel importante en la salud, en la trazabilidad del alimento, en la autenticación (Gandul-Rojas *et al.*, 2000) y en la estabilidad oxidativa actuando como antioxidantes en condiciones de oscuridad y como prooxidantes en condiciones de luz.

Los compuestos volátiles responsables del aroma del AOV son de naturaleza química muy diversa, aldehídos, cetonas, alcoholes y ésteres entre otros, y están presentes en el aceite en concentraciones muy bajas. Algunos de los compuestos identificados en la fracción volátil del AOV están ya presentes en el tejido intacto de la aceituna, mientras que otros no aparecen, o se detectan sólo como trazas, dentro de las células del fruto (Montedoro *et al.*, 1993), formándose rápidamente cuando se produce la rotura de la estructura celular (como ocurre durante el proceso de obtención de AOV), como resultado de reacciones enzimáticas en presencia de oxígeno. Dentro de este grupo de compuestos destacan los aldehídos y alcoholes de seis átomos de carbono así como sus correspondientes ésteres volátiles, que son los principales responsables de las notas aromáticas verdes características del AOV y cuyos precursores son los ácidos grasos linoleico y linolénico, que son procesados a través de la ruta de la lipoxigenasa (LOX) (Olías *et al.*, 1993; Padilla *et al.*, 2009; Padilla *et al.*, 2010). El perfil de compuestos volátiles de un aceite está fuertemente condicionado por la variedad de aceituna y por su grado de maduración (Aparicio y Morales, 1998; Sánchez-Ortiz *et al.*, 2012a; Sánchez-Ortiz *et al.*, 2012b; Sánchez-Ortiz *et al.*, 2013). Además de estos compuestos volátiles que podríamos clasificar como deseables, existen una serie de compuestos que también se forman durante el procesado de la aceituna o durante la conservación del aceite que se identifican como

notas aromáticas no deseadas y que son responsables de algunos defectos organolépticos de los aceites (Morales *et al.*, 2005).

Las ceras son ésteres de los ácidos grasos con alcoholes alifáticos de cadena larga y cuyo interés radica en que son indicadores tanto de la calidad como de la pureza de un AOV. El AOV se distingue del refinado y del aceite de orujo porque contiene alto contenido de ceras de 36 y 38 átomos de carbono y bajo contenido de ceras de 40, 42, 44 y 46 átomos de carbono, mientras que los otros aceites se caracterizan por una relación inversa.

Por último, los fosfolípidos presentan un contenido total que está en el rango de 40-135 mg/kg de aceite. Estos compuestos pueden afectar al estado fisicoquímico de aceites no filtrados y se consideran antioxidantes secundarios (Koidis y Boskou, 2006).

I.3. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

I.3.1. Definición y origen metabólico

Los compuestos fenólicos son moléculas que provienen del metabolismo secundario de las plantas y se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (Amiot *et al.*, 1986). Las más de 8000 estructuras fenólicas conocidas en la actualidad constituyen un extenso, ubicuo y heterogéneo grupo de compuestos que abarca desde moléculas de bajo peso molecular con un único anillo aromático hasta complejos polímeros de alto peso molecular como las ligninas y los taninos (Balasundram *et al.*, 2006). Los compuestos fenólicos suelen encontrarse conjugados con azúcares o ácidos orgánicos. Aunque pueden ser clasificados en función del número y la disposición de sus átomos de carbono, resulta más conveniente, dada la enorme heterogeneidad de estructuras que presentan, definirlos en función de su origen metabólico como aquellas sustancias que proceden de la ruta del ácido shikímico y del metabolismo de los fenilpropanoides (Ryan *et al.*, 2002). De esta forma, algunos compuestos se identifican como polifenoles sin que incorporen en sus estructuras un grupo fenólico ni posean siquiera un anillo aromático. La ruta del ácido shikímico conecta el metabolismo central del carbono con la ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos mediante la conversión del fosfoenolpiruvato y la eritrosa-4-fosfato, intermediarios de la

glucolisis y del ciclo de las pentosas fosfato, respectivamente, en corismato, que es el precursor de todos los aminoácidos aromáticos entre los cuales se encuentra la L-fenilalanina (Maeda y Dudareva, 2012) (Fig. 3). La fenilalanina amonio liasa (PAL) es la enzima que regula la biosíntesis de los fenilpropanoides en plantas y cataliza la desaminación no oxidativa de la L-fenilalanina para formar el ácido *trans*-cinámico y amonio libre. Esta reacción es el primer paso de la biosíntesis de un gran grupo de metabolitos secundarios derivados del metabolismo de los fenilpropanoides como son los compuestos fenólicos (Tomás-Barberan y Espin, 2001). La biosíntesis de los compuestos secoiridoideos, que son característicos de la familia oleaceae a la que pertenece el olivo, resulta de la combinación de dos grandes rutas metabólicas, la ruta del ácido mevalónico dentro del metabolismo de los terpenos y la ruta metabólica de los fenilpropanoides. Aunque ésta última está bien documentada (Dixon *et al.*, 2002), la ruta metabólica responsable de la formación de compuestos secoiridoideos no está todavía bien establecida (Obied *et al.*, 2008).

En términos fisiológicos, los compuestos fenólicos desempeñan un importante papel en el crecimiento y la reproducción de las plantas, participando también en los mecanismos de defensa frente a depredadores y agentes patógenos (Bravo, 1998). Desde un punto de vista alimentario, los compuestos fenólicos contribuyen a las características organolépticas y nutricionales de los alimentos de origen vegetal, tanto frescos como procesados (Crozier *et al.*, 2009).

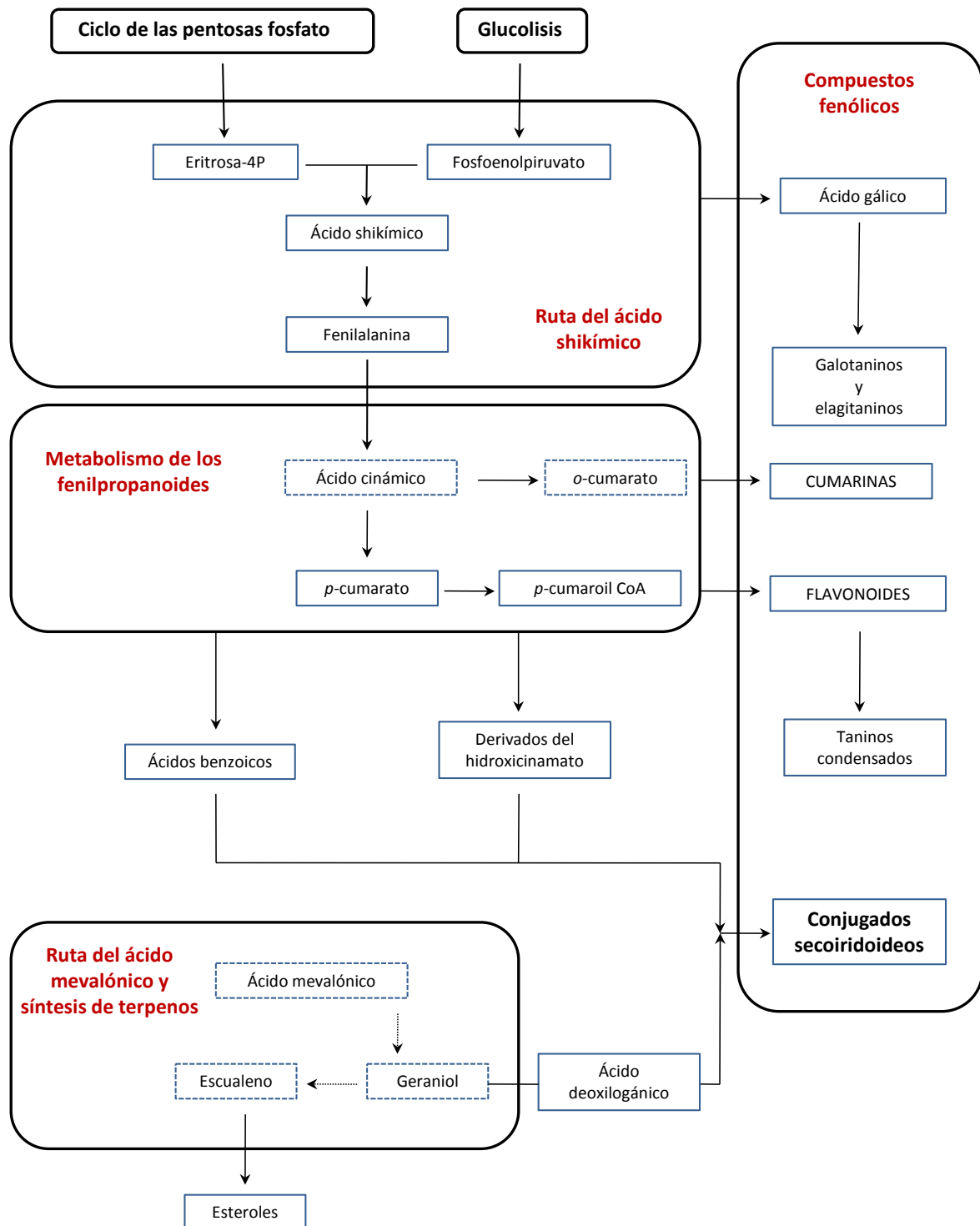


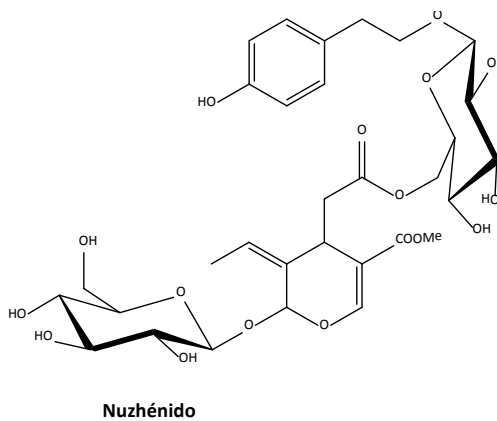
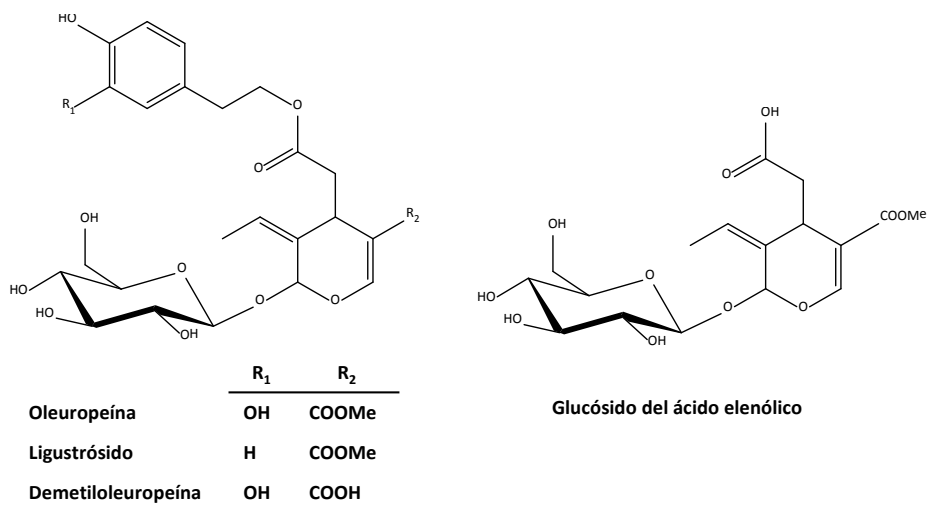
Fig. 3. Biosíntesis de compuestos fenólicos a partir de la ruta del ácido shikímico, del metabolismo de los fenilpropanoides y de la ruta del ácido mevalónico.

I.3.2. Compuestos fenólicos presentes en la aceituna y en el aceite de oliva virgen

El fruto del olivo presenta un elevado contenido fenólico que puede llegar a constituir hasta el 3% del peso fresco de la pulpa (Raina, 1995), siendo los ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, flavonoides y muy especialmente los compuestos secoiridoideos, los componentes fenólicos más importantes en la aceituna (Fig. 4). La mayoría de los compuestos fenólicos presentes en la aceituna están almacenados en la vacuola (Bayliss *et al.*, 1997; Hutzler *et al.*, 1998) y se encuentran conjugados con una molécula de glucosa mediante un enlace β -glucosídico. Los principales glucósidos secoiridoideos de la aceituna son la oleuropeína y el ligustrósido, cuyas agluconas son ésteres del ácido elenólico con hidroxitirosol y tirosol, respectivamente (Soler-Rivas *et al.*, 2000). Otros derivados secoiridoideos son la demetilooleuropeína, de fuerte componente varietal, el nuzhénido, que es mayoritario en la semilla (Servili *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2010), el glucósido del ácido elenólico y el 11-metil oleósido (Kalua *et al.*, 2005). Entre los compuestos no secoiridoideos el más abundante es el verbascósido, que es un éster heterosídico del ácido cafeico, y el hidroxitirosol conjugado con dos azúcares, glucosa y ramnosa. Otros compuestos minoritarios de carácter fenólico identificados en la aceituna son los alcoholes tirosol e hidroxitirosol, glucósidos de flavonas tales como luteolín-7-glucósido, apigenín-7-glucósido, luteolín-5-glucósido, y flavonoles como quercetín-3-rutinósido.

La mayor parte de los compuestos fenólicos presentes en el AOV derivan de los glucósidos fenólicos presentes en el fruto, si bien algunos de ellos ya se encontraban como tales en la aceituna intacta (Fig. 5). Los componentes mayoritarios de la fracción fenólica del AOV son los derivados secoiridoideos del ácido elenólico con hidroxitirosol y tirosol: la forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína (AAO), la forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína descarboximetilada (DAOD), la forma aldehídica de la aglucona del ligustrósido (AAL) y la forma dialdehídica de la aglucona del ligustrósido descarboximetilado (DAOD) (Artajo *et al.*, 2007). Además, aparecen los fenoles simples hidroxitirosol y tirosol (Montedoro *et al.*, 1992b) y, en menor cantidad, los ácidos ferúlico, *p*-cumárico, vanílico y cinámico, y los acetatos de hidroxitirosol y tirosol. También se han identificado en la fracción fenólica del AOV dos compuestos pertenecientes a la familia de los lignanos, el pinorresinol y 1-acetoxipinorresinol (Brenes *et al.*, 2000; Owen *et al.*, 2000), y flavonas como la luteolina y apigenina (Rovellini *et al.*, 1997).

COMPUESTOS SECOIRIDOIDEOS



COMPUESTOS NO SECOIRIDOIDEOS

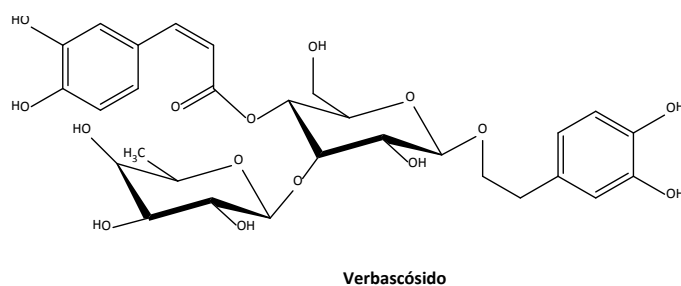
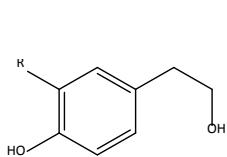
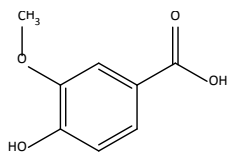


Fig. 4. Principales compuestos fenólicos de la aceituna.

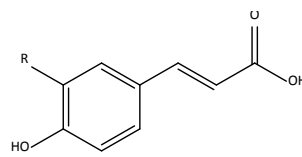
FENOLES SIMPLES



(R = OH) Hidroxitirosol
(R = H) Tirosol

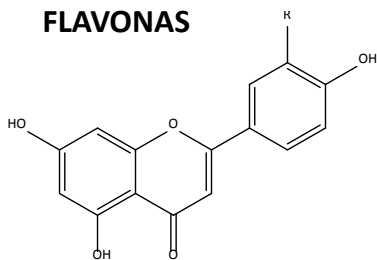


Ácido vanílico



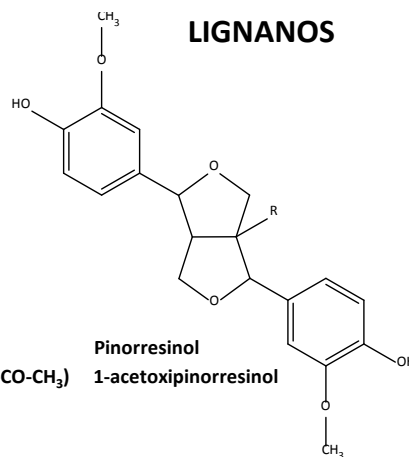
(R = H) Ácido *p*-cumárico
(R = O-CH₃) Ácido ferúlico

FLAVONAS



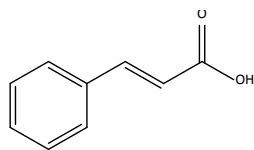
(R = OH) Luteolina
(R = H) Apigenina

LIGNANOS



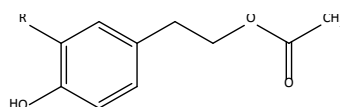
(R = H) Pinorresinol
(R = O-CO-CH₃) 1-acetoxipinorresinol

DE ESTRUCTURA NO FENÓLICA



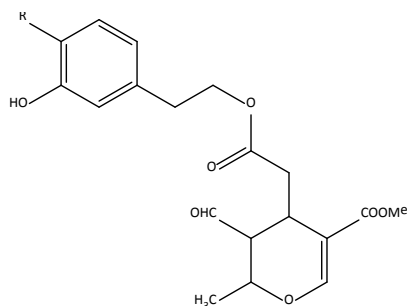
Ácido cinámico

ACETATOS

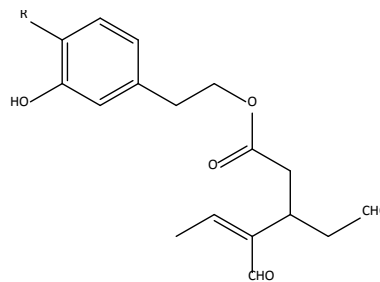


(R = H) Acetato de hidroxitirosol
(R = O-CO-CH₃) Acetato de tirosol

DERIVADOS SECOIRIDOIDEOS



(R = OH) AAO
(R = H) AAL



(R = OH) DAOD
(R = H) DALD

Fig. 5. Principales compuestos fenólicos del AOV.

I.3.3. Procesos de transformación enzimática de los compuestos fenólicos del fruto durante el proceso de obtención del aceite de oliva virgen

Igual que ocurre en el caso de otros componentes menores como los compuestos volátiles y los pigmentos, los compuestos fenólicos más significativos del AOV son generados durante el proceso de obtención del aceite por reacciones enzimáticas y/o químicas a partir de sustratos presentes en la aceituna (Herrera, 2007).

Tal y como se ha mencionado, la mayoría de los compuestos fenólicos del fruto son glucósidos secoiridoideos que se encuentran almacenados en la vacuola y cuyo carácter hidrofílico impide su transferencia al aceite. Durante la molturación se produce la rotura de los tejidos y de los orgánulos celulares, poniéndose en contacto los glucósidos fenólicos con las enzimas encargadas de su transformación. El mecanismo propuesto para explicar las transformaciones que sufren estos compuestos queda recogido en la Fig. 6. La enzima β -glucosidasa (BGLC) actúa en primer lugar hidrolizando rápidamente los glucósidos fenólicos para dar lugar a sus correspondientes agluconas, las cuales adquieren un nuevo carácter anfipático que permite que se distribuyan en el sistema bifásico constituido por el aceite y el agua de vegetación según el coeficiente de reparto de cada especie química (Artajo *et al.*, 2007; Herrera, 2007). La actividad de la enzima BGLC sobre la oleuropeína, demetiloleuropeína y ligustrósido produce la formación de una serie de isómeros que se van estabilizando con el tiempo hasta formar los derivados secoiridoideos mayoritarios en el aceite: AAO, AAL, DAOD y DAOL. A partir de éstos se liberan pequeñas cantidades de hidroxitirosol y tirosol, posiblemente por hidrólisis química aunque no se pueda descartar la intervención de otras enzimas como isomerasas, esterasas y descarboxilasas. Dos enzimas oxidorreductasas, la peroxidasa (POX) y la polifenoloxidasas (PPO), constituyen los principales agentes de oxidación de los compuestos fenólicos (Montedoro *et al.*, 2002; García-Rodríguez *et al.*, 2011), ya que tienen la capacidad de oxidar tanto los glucósidos fenólicos como los derivados secoiridoideos, actuando desde el principio del proceso de obtención del aceite pero sobre todo durante la etapa de batido. La PPO es la principal enzima implicada en la oxidación de fenoles, catalizando la reacción de hidroxilación de los monofenoles a *o*-difenoles, y posteriormente la oxidación de los *o*-difenoles a quinonas, siendo esta última actividad difenolasa la que predomina en aceituna y la que determina la mayor tasa de oxidación durante la etapa de molturación. La oxidación de fenoles por la

POX, aunque está en cierta manera limitada por la disponibilidad de peróxidos es, sin embargo, muy relevante durante la etapa de batido debido a la gran termoestabilidad de estas enzimas (García-Rodríguez, 2014). Por lo tanto, el contenido final de compuestos fenólicos del aceite está determinado por el balance de las actividades enzimáticas implicadas en la transformación de los compuestos fenólicos durante el proceso de obtención del AOV (Romero-Segura *et al.*, 2012). Del conjunto de todas las actividades enzimáticas que pueden incidir sobre la composición fenólica del AOV, y más concretamente que pueden determinar la formación de derivados secoiridoideos, la BGLC juega un papel crucial por ser la enzima que actúa directamente sobre los glucósidos fenólicos del fruto controlando la etapa inicial (El Riachy *et al.*, 2011).

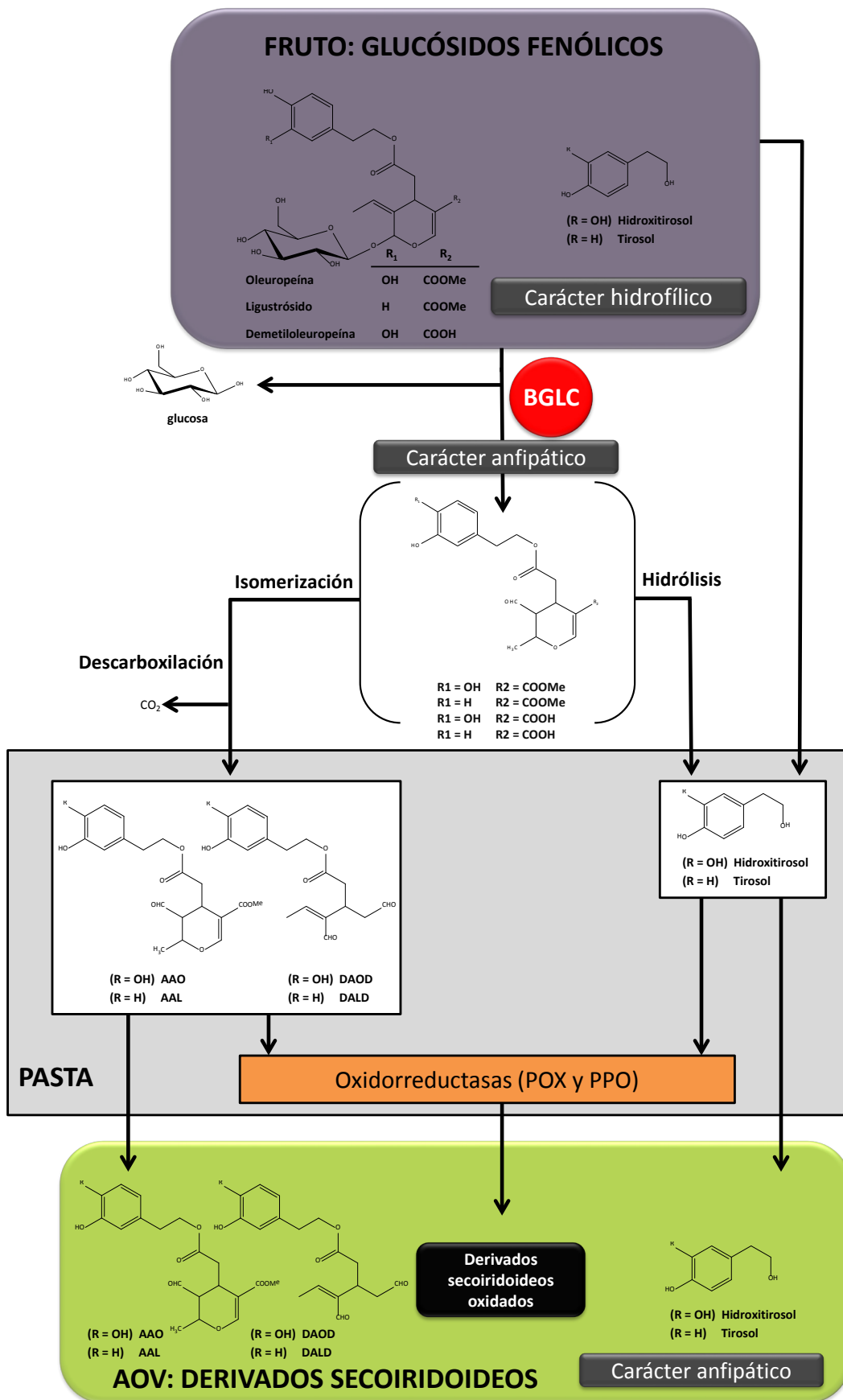


Fig. 6. Mecanismo propuesto para explicar el proceso de transformación de los glucósidos fenólicos de la aceituna durante el proceso de obtención del AOV.

I.3.4. Factores determinantes de la composición fenólica del aceite de oliva virgen

La composición fenólica final del AOV, como la de otros componentes menores que son determinantes de la calidad, está condicionada por diversos factores que pueden clasificarse en endógenos y exógenos. Los factores endógenos son aquellos que dependen de las características genéticas de la variedad de fruto considerada y sobre los cuales resulta imposible incidir para modificar las características del aceite. El resto de factores no dependientes del genotipo de la variedad son factores exógenos, los cuales pueden clasificarse en factores agronómicos e industriales (Servili *et al.*, 2004).

El contenido total y el perfil de los compuestos fenólicos inicialmente presentes en el fruto, así como el nivel de actividad de las enzimas endógenas que actúan durante la obtención del aceite, están determinados genéticamente y modulados por los factores agronómicos. Debido a que cada variedad está genéticamente predeterminada para dar aceites con un determinado perfil fenólico, se puede establecer una clasificación de AOVs monovarietales en función de sus componentes fenólicos (Kalua *et al.*, 2005), e incluso realizar cruzamientos entre variedades que generen nuevos individuos con genotipos diferentes y que den lugar a aceites de diferente composición fenólica en comparación con los obtenidos a partir de sus progenitores (El Riachy *et al.*, 2012). Existe una correlación negativa entre el contenido fenólico de los aceites y el estadio de maduración de las aceitunas utilizadas en su obtención. A medida que el fruto madura, el contenido de los glucósidos fenólicos mayoritarios oleuropeína y ligustrósido va siendo progresivamente inferior (Amiot *et al.*, 1986; Ryan *et al.*, 1999; Morelló *et al.*, 2004) y los aceites obtenidos tienen consecuentemente una menor cantidad total de derivados secoirioideos del hidroxitirosol y tirosol (Brenes-Balbuena *et al.*, 1992; Uceda *et al.*, 1999; Benito *et al.*, 2013).

El régimen hídrico del cultivo se ha descrito como uno de los factores agronómicos más importantes en la composición fenólica del AOV. Los aceites obtenidos de frutos cuyos árboles no han sufrido estrés hídrico debido a un riego regular muestran un contenido fenólico inferior que los aceites extraídos de frutos procedentes de árboles cultivados en régimen de secano, existiendo una correlación negativa entre las dosis de agua aplicadas al olivar y el contenido fenólico del AOV (Artajo *et al.*, 2006; Servili *et al.*, 2007). También juega un papel relevante sobre el contenido de derivados fenólicos del aceite la selección

del momento y la intensidad del riego practicado durante los meses de verano (Gómez Del Campo y García, 2013). Dado que cada región geográfica posee unas características climáticas y edafológicas específicas, el contenido fenólico de los aceites se ve afectado por la localización del cultivo (Baiano *et al.*, 2013; Issaoui *et al.*, 2013), si bien es cierto que cada variedad posee una plasticidad genética diferente y por lo tanto una capacidad diferencial de adaptación al medio.

Más allá de la influencia de los factores agronómicos, la composición fenólica también se ve afectada por factores industriales como las condiciones del proceso de obtención y de almacenamiento del AOV (De Stefano *et al.*, 1999; Issaoui *et al.*, 2009). Los diferentes parámetros tecnológicos del proceso de obtención del aceite tales como la temperatura, tiempo de batido y exposición al aire, pueden incidir sobre la actividad de las enzimas endógenas mencionadas anteriormente y, por tanto, afectar a la composición fenólica del aceite (Servili y Montedoro, 2002; Gómez-Rico *et al.*, 2009; Catania *et al.*, 2013).

I.3.5. Contribución de los compuestos fenólicos a la calidad del aceite de oliva virgen

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo de especial interés dentro de los componentes menores del AOV. Diversos estudios han puesto de manifiesto la triple implicación que los compuestos fenólicos tienen sobre la calidad del AOV, resultando fundamentales en sus propiedades organolépticas, tecnológicas y nutricionales. Desde un punto de vista organoléptico son responsables de las notas amargas y picantes del AOV (Yousfi *et al.*, 2010), desde un punto de vista tecnológico condicionan la estabilidad oxidativa del aceite (Del Carlo *et al.*, 2004; Martínez Nieto *et al.*, 2010) y desde un punto de vista nutricional actúan como antioxidantes bioactivos que tienen efectos beneficiosos para la salud (Bendini *et al.*, 2007; Cicerale *et al.*, 2009; López *et al.*, 2013).

Aunque el aroma y el sabor son los dos atributos de calidad más importantes del AOV, probablemente sea el sabor, y más concretamente el atributo amargo, asociado al contenido fenólico, el factor determinante para la aceptación definitiva de un aceite por parte del consumidor (Monteleone *et al.*, 1997). La evaluación del sabor amargo se realiza mediante análisis sensorial con un panel de catadores especialmente entrenado según el Anexo XXII del Reglamento CE nº 2568/91 y sus posteriores modificaciones CE n.º 640/2008

y UE n.º 1348/2013. Aunque parece claro que son los cuatro derivados secoiridoideos mayoritarios del aceite antes descritos (DAOD, DALD, AAO, AAL) los más estrechamente relacionados con el atributo amargo, no existe aún acuerdo definitivo acerca del grado de contribución de cada uno de ellos (Gutiérrez-Rosales *et al.*, 2003; Artajo *et al.*, 2006). Algunos resultados apuntan al derivado secoiridoideo AAO como el principal compuesto responsable del sabor amargo, ya que su contenido presenta una alta correlación con los datos de evaluación sensorial del amargor realizada por un panel de catadores (Mateos *et al.*, 2004).

La influencia de los compuestos fenólicos sobre la estabilidad oxidativa del AOV ha sido estudiada por numerosos autores, pudiéndose establecer una correlación positiva entre el contenido fenólico del aceite y la vida útil del producto (Montedoro *et al.*, 1992a; Ninfali *et al.*, 2002). El mecanismo a través del cual los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes en el AOV se basa en su capacidad para secuestrar radicales libres. Durante el proceso de oxidación lipídica, los compuestos fenólicos intervienen estabilizando los radicales libres lipídicos mediante una rápida donación de átomos de hidrógeno transformándose al hacerlo en radicales fenóxido, los cuales son relativamente estables y actúan como terminadores de las reacciones de propagación de la oxidación lipídica. La efectividad como antioxidante de cada compuesto fenólico se basa en la mayor o menor estabilidad de su radical fenóxido, que evidentemente guarda relación directa con su estructura química (Robards *et al.*, 1999; Medina *et al.*, 2007). Parece estar confirmado que el hidroxitirosol y los derivados secoiridoideos AAO y DAOD son los que muestran una mayor capacidad antioxidante en comparación con el tirosol y los derivados AAL y DALD, ya que los primeros generan radicales fenóxido más estables (Baldioli *et al.*, 1996; Mateos *et al.*, 2003).

Por otro lado, una parte importante de las propiedades nutricionales del AOV se deben a su contenido en compuestos fenólicos, los cuales reciben la denominación de compuestos bioactivos por su capacidad antioxidante dentro del organismo e intervienen en la consideración de este producto como alimento funcional. El metabolismo energético oxidativo provoca la formación natural de especies reactivas del oxígeno (ROS) tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y los radicales libres superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo (OH^{\cdot}), hidroperóxido (HO_2^{\cdot}) y peroxinitrilo ($ONOO^{\cdot}$) (Gutteridge, 1995). A concentraciones moderadas, dada su corta existencia, los radicales libres desempeñan un importante papel

en las rutas de señalización celular. Sin embargo, su producción se incrementa frente a diferentes agresiones como infecciones, ejercicio físico extremo, dietas desequilibradas, tóxicos alimentarios y contaminantes ambientales, entre otros. La concentración anormalmente alta de este tipo de especies reactivas incrementan el estrés oxidativo del organismo, pudiéndose dañar, reversible o irreversiblemente, todo tipo de moléculas orgánicas, incluyendo los ácidos nucleicos, proteínas y aminoácidos libres, lípidos, carbohidratos y macromoléculas del tejido conectivo, siendo especialmente sensibles dentro del grupo de los lípidos los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Los daños producidos por las ROS se han asociado con el desarrollo de numerosas enfermedades, tales como aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer y la enfermedad de Alzheimer (Cicerale *et al.*, 2009). Los efectos estabilizadores de los compuestos fenólicos del AOV sobre las ROS, en especial los del hidroxitirosol, han sido relacionados durante los últimos años con la capacidad protectora del AOV frente a este tipo de enfermedades (Tripoli *et al.*, 2005; Perona *et al.*, 2006), tal y como se desprende de estudios epidemiológicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Raederstorff, 2009; Estruch *et al.*, 2013). En este sentido, es necesario señalar que para evaluar la capacidad antioxidante de los fenoles, además de cuantificar de modo preciso su contenido en el AOV, es esencial conocer la absorción y el metabolismo de estos compuestos en el organismo humano mediante estudios de biodisponibilidad, ya que sólo podrán ser verdaderamente efectivos aquellos compuestos que alcancen concentraciones suficientes en los tejidos donde han de ejercer su acción como para tener efecto biológico (Crozier *et al.*, 2009). Dentro de los derivados secoiridoideos del AOV, cabe destacar el redescubrimiento del compuesto DALD, también conocido como oleocantal, como un agente antiinflamatorio no esteroideo similar al ibuprofeno (Impellizzeri y Lin, 2006).

I.4. LAS β -GLUCOSIDASAS DE PLANTAS

I.4.1. Clasificación, distribución y localización

Los hidratos de carbono constituyen el grupo de moléculas orgánicas más abundantes en los tejidos vegetales al desempeñar un conjunto de funciones fisiológicas

extremadamente diversas, tales como energéticas, de reserva, estructurales, como precursores metabólicos, de señalización celular, etc. A pesar de que tienen una composición química bastante similar, los carbohidratos pueden formar un enorme número de combinaciones distintas debido a la variedad estereoquímica de los grupos hidroxilo que poseen y a las múltiples posibilidades de ensamblaje de unos monosacáridos con otros. Si además se tiene en cuenta el hecho de que en la naturaleza muchas moléculas azucaradas presentan sustituyentes que no son carbohidratos, la diversidad es extraordinaria. Esta diversidad estructural y funcional de los carbohidratos requiere de la existencia de muchas enzimas implicadas en su biosíntesis (glicosiltransferasas) y su degradación (glicosilhidrolasas, polisacárido liasas y carbohidrato esterasas). Las glicosilhidrolasas han sido clasificadas en más de 100 familias en base a las similitudes en sus secuencias de aminoácidos y a sus conformaciones tridimensionales (Henrissat, 1991) y, salvo contadas excepciones, el mecanismo de acción de los miembros de la familia está bastante conservado (Gloster *et al.*, 2008).

Las enzimas β -glucosidasas (β -D-glucopiranosido glicosilhidrolasas) hidrolizan los enlaces glucosídicos para liberar los residuos terminales no reductores a partir de glucósidos y oligosacáridos (Fig. 7).

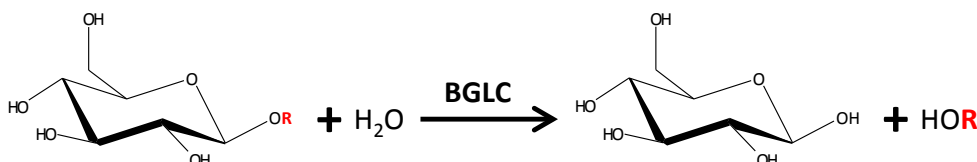


Fig. 7. Reacción catalizada por las enzimas β -glucosidasas.

Estas enzimas se encuentran en todos los organismos vivos desempeñando una amplia gama de funciones fisiológicas. Las BGLCs que han sido descritas en la literatura pertenecen a las familias de las glicosilhidrolasas GH1, GH3, GH5, GH9 y GH30 (Ketudat Cairns y Esen, 2010). Estas familias, que comparten dominios estructurales, tienen aminoácidos catalíticos conservados y un mismo mecanismo de reacción, y muy posiblemente provengan de un mismo ancestro común, se agrupan en clanes. De éstos, GH-A es el que engloba a un mayor número de familias incluyendo a GH1, GH5 y GH30. La

mayor parte de las BGLCs de plantas caracterizadas hasta el momento pertenecen a la familia GH1.

Las BGLCs de plantas presentan una localización subcelular muy diversa: citoplasma, pared celular, membrana plasmática, vacuola, peroxisoma, núcleo o retículo endoplásmico (Minic, 2008). En monocotiledóneas suelen contener un péptido de tránsito en el extremo N-terminal característico de localización plastidial (Gusmayer *et al.*, 1994). Sin embargo, en dicotiledóneas suelen presentar un péptido señal N-terminal característico de la ruta de secreción vía retículo endoplásmico con glicosilación cotraduccional. La localización final puede ser apoplástica o intracelular en cuerpos proteicos (Morant *et al.*, 2008b).

I.4.2. Estructura y mecanismo de reacción

Las BGLCs poseen varias estructuras terciarias, pero el plegamiento del dominio catalítico es similar en cada una de las familias de las glicosilhidrolasas. Las familias del clan GH-A poseen una estructura común del tipo barril (β/α)₈ que contiene sus sitios activos (Fig. 8).

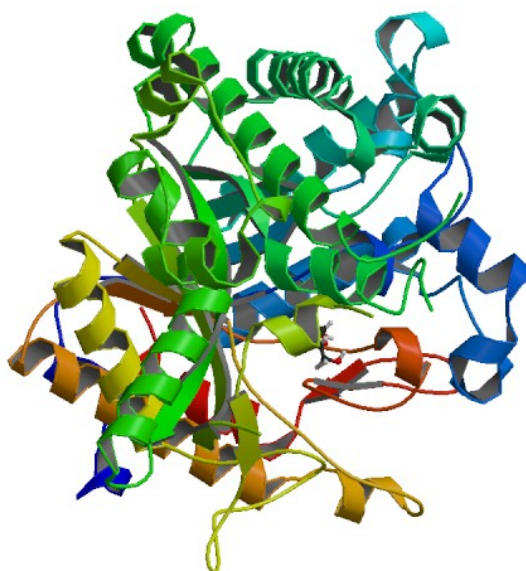


Fig. 8. Estructura tridimensional de la β -glucosidasa de *Rauwolfia serpentina* que presenta los dominios tipo barril (β/α)₈ (Xia *et al.*, 2012).

Las secuencias de aminoácidos de las BGLCs de la familia GH1 contienen motivos altamente conservados tales como YRFSI, TFNEP, LGLNYY, YITENG y DNFEW, los cuales sirven para identificar a los miembros de la familia. De estos, TFNEP e YITENG son los más conservados al formar parte del centro activo y contener los dos ácidos glutámicos directamente implicados en la catálisis (Barrett *et al.*, 1995; Burmeister *et al.*, 1997).

Los monómeros de las BGLCs de la familia GH1 tienen pesos moleculares que oscilan entre los 55 y 65 kDa según los análisis mediante SDS-PAGE, lo cual concuerda con el tamaño teórico de los polipéptidos determinados hasta el momento, que oscilan entre los 447 y 527 aminoácidos. Las BGLCs de eucariotas suelen tener tamaños mayores que las de procariontes. Además, todas las BGLCs aisladas de animales y dicotiledóneas con la excepción de la enzima de *Polygonum tinctorum* (Minami *et al.*, 1999) suelen desviarse 3-5 kDa de sus pesos moleculares calculados a partir de la secuencia debido a que presentan glicosilación (Esen, 2003), una modificación postraduccional que podría ser esencial para la estabilidad de las proteínas con actividad BGLC, pero no está claro que sea crucial para la actividad catalítica de la enzima (Cicek y Esen, 1999). La forma catalíticamente activa suele ser un homodímero de aproximadamente 120 kDa o múltiplos de dichos dímeros, como las proteínas hexaméricas de trigo o centeno (Sue *et al.*, 2006). En maíz, la BGLC forma agregados insolubles como resultado de la interacción específica entre la enzima y una pequeña proteína denominada HSP (*heat shock protein*) de 32 kDa que se expresa fuertemente en las líneas endogámicas (Esen y Blanchard, 2000). Esta proteína, denominada BGFA (factor de agregación de BGLCs) junto con su lectina homóloga en sorgo (SL), parecen ser las responsables del reconocimiento específico de determinados azúcares (Kittur *et al.*, 2010). De manera similar, se han descrito agregados enzimáticos de alto peso molecular en plantas como la avena (Nisius, 1988) y el lino (Fieldes y Gerhardt, 1994). La disociación de la estructura cuaternaria puede conducir a la pérdida de la actividad, aunque en ocasiones los monómeros puedan retenerla (Hsieh y Graham, 2001).

Las BGLCs son enzimas ubicuas y, dada la enorme diversidad de sustratos fisiológicos posibles, no resulta sorprendente que en la mayoría de los organismos existan diferentes isoenzimas (Conn, 1993). Los análisis bioquímicos suelen determinar la presencia en un organismo determinado de dos o tres isoenzimas. Sin embargo, las técnicas bioquímicas suelen subestimar el número real de formas moleculares existentes en un organismo, siendo común que el número de isoenzimas detectadas en los estudios

genómicos o transcriptómicos sea bastante superior al número de isoenzimas detectadas bioquímicamente. Sólo en el genoma de *Arabidopsis thaliana* y de arroz se han detectado, respectivamente, 48 y 38 genes tentativamente identificados como BGLCs (Xu *et al.*, 2004; Opassiri *et al.*, 2006).

Las BGLCs pueden presentar dos mecanismos catalíticos diferentes (Rye y Withers, 2000), uno con inversión (típico de la familia GH9) y otro con retención (típico del clan GH-A y de la familia GH3) de la quiralidad del carbono anomérico. No obstante, la mayoría de las BGLCs que están bien caracterizadas tienen un mecanismo catalítico retentivo que consta de dos etapas (Fig. 9), glicosilación y deglicosilación. Los aminoácidos catalíticos, que suelen ser dos ácidos glutámicos conservados, se encuentran separados entre sí a una distancia de 5 Å. En la fase de glicosilación, un residuo desempeña el papel de nucleófilo atacando al centro anomérico para desplazar a la aglicona y formar un intermediario glucosilado con la enzima. Al mismo tiempo, el otro residuo desempeña el papel de ácido y protona al oxígeno glicosídico. En el segundo paso, el residuo catalítico libre actúa como base y desprotona una molécula de agua, la cual ataca al enlace entre la enzima y el resto glicosílico produciéndose la separación, y liberándose una molécula de glucosa que retiene la configuración del carbono anomérico.

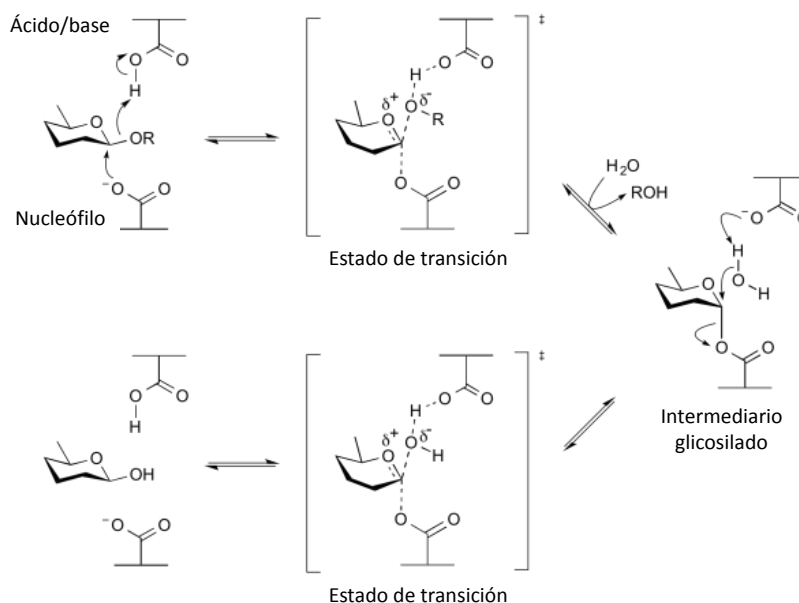


Fig. 9. Mecanismo de reacción de característico de β-glucosidasas del clan GH-A.

Aunque el mecanismo catalítico de estas enzimas está bastante bien estudiado, no se conoce exactamente cómo las BGLCs reconocen al sustrato e interactúan con él. Algunas enzimas de la familia GH1 tienen un amplio rango de especificidad hidrolizando β -D-fucósidos, β -D-manósidos, β -D-galactósidos y α -D-arabinósidos, y otras sólo son activas frente a un número reducido de glicósidos. El sitio de unión de las enzimas de la familia GH1 a la parte azucarada de la molécula de sustrato está compuesto por una serie de aminoácidos altamente conservados: Gln, His, Asn, Trp, Glu y Trp (Chuenchor *et al.*, 2008). Sin embargo, la base de la amplia diversidad de funciones de las BGLCs, especialmente en plantas, es la diferente especificidad que muestran estas enzimas por las agluconas del sustrato. Diversos estudios estructurales y de mutagénesis dirigida apuntan a que los aminoácidos responsables de la especificidad por la aglucona se encuentran situados en regiones diferentes al centro activo (Cicek *et al.*, 2000). Por lo tanto, las enzimas de la familia GH1 constan de dos bolsillos de unión a la molécula de sustrato, uno responsable del enlace de la parte azucarada muy similar en todos los miembros de la familia, y otro responsable de la unión con la aglucona del sustrato cuyos aminoácidos varían en cada enzima y es responsable de su especificidad.

I.4.3. Regulación y papel fisiológico

Las BGLCs de plantas cubren un amplio rango de funciones fisiológicas, tales como defensa, simbiosis, catabolismo de la pared celular y lignificación, señalización celular, respuesta a estreses y metabolismo secundario (Ketudat Cairns y Esen, 2010). El papel fisiológico de estas enzimas queda determinado por su especificidad de sustrato, el tejido donde están presentes, su localización subcelular, su nivel de respuesta ante un estrés determinado y las condiciones en las cuales entran en contacto con sus sustratos fisiológicos. Las plantas son conocidas por contener glucósidos de defensa que liberan sustancias tóxicas y usan a las BGLCs como “detonadores” de estas “bombas” (Morant *et al.*, 2008b). En general, estos glucósidos suelen almacenarse en compartimentos subcelulares diferentes (generalmente en las vacuolas) a los de las BGLCs, de forma que cuando se produce cualquier daño en el tejido se ponen en contacto las enzimas con sus sustratos y se produce la liberación de los compuestos de defensa tóxicos.

Se conoce desde hace bastante tiempo que las plantas poseen glicósidos que liberan compuestos tóxicos cuando son hidrolizados por las BGLCs, tales como el cianuro y los ácidos hidroxámicos. Como ya se ha mencionado, en general los glicósidos asociados a funciones de defensa son almacenados en diferentes compartimentos que las BGLCs encargadas de su hidrólisis. Mientras que los compuestos de defensa suelen almacenarse en la vacuola, las BGLCs suelen localizarse en el apoplasto o en los plastidios aunque también se han encontrado en compartimentos diferentes, como por ejemplo en los cuerpos del retículo endoplasmático. De esta forma, cuando se producen daños en los tejidos derivados de la depredación, infestación o ataque por cualquier agente patógeno se ponen en contacto las enzimas con sus sustratos liberándose los compuestos de defensa. Las plantas han desarrollado multitud de compuestos defensivos, tales como glucósidos cianogénicos que liberan α -hidroxinitrilos cuya hidrólisis enzimática o espontánea libera cianuro (Poulton, 1990; Morant *et al.*, 2008b) y glucósidos no cianogénicos como γ y β -hidroxinitrilos, isoflavonas, flavonoides, cumarinas, ácidos hidroxicinámicos y saponinas (Morant *et al.*, 2008a; Ahn *et al.*, 2010). Tras la ruptura celular, las BGLCs defensivas a menudo se unen a factores de agregación, los cuales se piensa que ayudan a localizar a las BGLCs próximas al lugar donde se ha producido el daño asegurando la máxima liberación de los compuestos de defensa (Nisius, 1988; Falk *et al.*, 1995; Blanchard *et al.*, 2001; Nagano *et al.*, 2008).

La pared celular de la plantas es el mayor repositorio de carbohidratos de la naturaleza, muchos de los cuales están enlazados por enlaces β -glicosídicos, por lo que no resulta sorprendente el papel de las BGLCs en el desarrollo de la pared celular. De hecho, las BGLCs parecen intervenir tanto en la degradación de los oligosacáridos generados durante el recambio de la pared celular (*turnover*) como en la liberación de los monolignoles a partir de sus glicósidos para permitir la lignificación estabilizadora de las paredes celulares secundarias.

Las plantas poseen muchos glucósidos de fitohormonas y ha sido motivo de debate saber si son productos de la inactivación de las hormonas activas o constituyen un reservorio de las mismas. Existen BGLCs con la capacidad de hidrolizar glucósidos de fitohormonas, tales como la BGLC de arroz que hidroliza el glucósido de la giberelina (Schliemann, 1984) y la BGLC de maíz ZmBGLC1, que además de hidrolizar su compuesto de defensa tiene la capacidad de hidrolizar glucósidos de citoquininas (Brzobohaty *et al.*,

1993). El ácido abscísico (ABA) en su forma glucosil éster (ABA-GE) se transporta desde las raíces a las hojas y allí es hidrolizado por BGLCs, aunque también se transportan grandes cantidades de ABA libre (Dietz *et al.*, 2000). Recientemente se ha descubierto una BGLC de *Arabidopsis thaliana* localizada en el retículo endoplasmático que se activa para hidrolizar ABA-GE en respuesta al estrés por sequía (Lee *et al.*, 2006). La mutación de este gen causa germinación temprana y cierre estomático deficiente, fenotipo que al restablecerse tras la expresión transgénica del gen demuestra el papel que pueden tener las BGLCs en la regulación de los niveles de ABA a partir del reservorio en forma de ABA-GE.

Las BGLCs son también importantes porque liberan compuestos que son sustratos de rutas metabólicas secundarias de las plantas que estaban almacenados en forma de glicósidos. La strictosidina, que es un intermediario de la ruta de los alcaloides monoterpenos, se hidroliza por la acción de las BGLCs permitiendo el metabolismo de muchos otros alcaloides monoterpenos (Stockigt y Zenk, 1977).

Además, existen otras funciones asociadas a las BGLCs, como por ejemplo la liberación de compuestos volátiles a partir de los glicósidos almacenados en la rosa (Sakai *et al.*, 2008). Con la gran variedad de glucósidos encontrados en las plantas, no es de extrañar que todavía existan funciones fisiológicas de las BGLCs que aún no hayan sido descubiertas.

La naturaleza química de las agluconas de los glucósidos que son sustratos de las BGLCs es tan diversa como las funciones fisiológicas que les han sido asignadas. En este sentido e independientemente del papel fisiológico que desempeñen, cabe destacar que muchos de estos glucósidos, como es el caso de los compuestos secoiridoideos de olivo, presentan en su región no glucídica estructuras de tipo fenólico distribuidas por todas las partes de la planta.

Existe muy poca información sobre la función fisiológica de las proteínas con actividad BGLC en frutos. Entre los estudios existentes se han descrito algunas enzimas como la de cereza y naranja cuya actividad principal parece estar asociada a la degradación de la pared celular durante el proceso de reblandecimiento del fruto (Cameron *et al.*, 2001; Gerardi *et al.*, 2001), o las de la naranja sanguina implicadas en la regulación de los cambios de color del fruto mediante la hidrólisis de antocianinas (Barbagallo *et al.*, 2007).

I.4.4. Interés biotecnológico de la β -glucosidasa de aceituna

Más allá del interés puramente fisiológico, las BGLCs tienen un papel relevante en el ámbito de la alimentación porque muchos de los metabolitos derivados de su actividad tienen una enorme repercusión en las propiedades sensoriales de alimentos de origen vegetal, como los zumos, el vino y el propio aceite de oliva (Günata, 2003). En la aceituna se describió inicialmente la existencia de dos fracciones proteicas con actividad BGLC, una asociada a la pared celular vinculada a la firmeza o ablandamiento del fruto, y otra soluble que parece ser más abundante en frutos maduros y sin papel fisiológico claramente asignado (Fernández-Bolaños *et al.*, 1995). La localización subcelular *in situ* de proteínas con actividad BGLC en aceituna, mostró la presencia de isoenzimas activas usando un sustrato artificial en el núcleo, en los cloroplastos y en las gotas de aceite de las células del mesocarpo, siendo estos dos últimos orgánulos los que presentaban actividad con oleuropeína (Mazzuca *et al.*, 2006).

Más recientemente, se ha purificado a aparente homogeneidad una isoenzima BGLC activa frente al glucósido fenólico mayoritario del fruto, la oleuropeína (Romero-Segura *et al.*, 2009; Kara *et al.*, 2011). Esta enzima resulta de gran importancia porque su actividad durante el proceso de obtención del AOV es clave para determinar el contenido fenólico final del aceite (Romero-Segura *et al.*, 2012).

En trabajos previos de nuestro grupo (Romero-Segura, 2010) se ha clonado un gen *BGLC* de olivo (*OepBGLC1*) y se han analizado sus niveles de expresión en distintos tejidos durante el desarrollo y maduración del fruto en las variedades Picual y Arbequina, así como en aceitunas sometidas a distintos estreses abióticos tales como temperaturas alta y baja, oscuridad, herida y sequía. Sin embargo, todavía no se ha conseguido establecer la identidad funcional del gen ni su capacidad para hidrolizar los principales glucósidos fenólicos del fruto.

II. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo de investigación es la identificación y caracterización bioquímica, molecular y celular de los genes e isoenzimas β -glucosidasa que intervienen en la transformación de los glucósidos fenólicos tras la molturación de las aceitunas y que determinan la composición fenólica del AOV, así como estudiar su regulación y función fisiológica. Para ello, se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- Aislamiento y secuenciación de clones de cDNA correspondientes a *BGLCs* de olivo que presentan una alta expresión en mesocarpo.
- Expresión funcional de los genes *BGLC* de olivo en hospedador heterólogo.
- Caracterización bioquímica de las isoenzimas recombinantes *BGLC* de olivo.
- Estudio de la localización subcelular de las isoformas *BGLC* de olivo.
- Estudio de la regulación de la expresión de los genes *BGLC* de olivo.
- Caracterización molecular y bioquímica de las *BGLCs* de olivo durante la maduración del fruto de las variedades Menya y Shengeh, las cuales dan lugar a aceites con contenidos fenólicos altos o bajos, respectivamente.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

III.1.1. Olivo

III.1.1.1. Variedades utilizadas y condiciones de cultivo

Para el desarrollo de los experimentos presentados en este trabajo se han utilizado olivos (*Olea europaea* L.) de las variedades Picual, Arbequina, Picudo, Hojiblanca, Manzanilla, Menya y Shengeh. Las muestras de las variedades Picual y Arbequina se recogieron en el olivar experimental del Instituto de la Grasa, situado en Bellavista (Sevilla), regado y fertilizado por goteo desde el momento de la floración hasta la maduración completa del fruto (de Abril a Diciembre), excepto aquellos árboles destinados a los experimentos de secano. Las aceitunas de las variedades Picudo, Hojiblanca y Manzanilla se recogieron en un olivar experimental situado en el CIFA de Cabra (Córdoba), cultivado en régimen de regadío. Las aceitunas de las variedades Menya y Shengeh se recolectaron de olivos pertenecientes al Banco Mundial de Germoplasma situado en el CIFA Alameda del Obispo (Córdoba). Por último, las aceitunas de la variedad Arbequina utilizadas en el experimento de riego deficitario se obtuvieron de un olivar comercial en seto situado cerca de Sevilla y cultivado según el método descrito por Fernández *et al.* (2013).

Para los experimentos de estreses abióticos, se recogieron ramas de olivo de las variedades Picual y Arbequina que contenían aproximadamente 100 frutos en enero con 28 SDF (semanas después de la floración), y se incubaron durante 24 h en una cámara de cultivo a 25 °C con una intensidad de luz de 11,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un ciclo de 12 h luz/12 h de oscuridad, de tal manera que el inicio del experimento se producía a las 2 h del ciclo de luz, manteniéndose el fotoperiodo natural día/noche de las aceitunas. De esta forma, las condiciones fisiológicas se mantenían lo más parecidas posibles a las del árbol, no detectándose cambios en la expresión de los genes *BGLC*. Los tratamientos de estrés se basaron en la modificación de las condiciones estándar según el efecto estudiado.

III.1.1.2. Tejidos de olivo utilizados

Se han empleado cuatro tipos de tejidos diferentes: tejido foliar procedente de hojas jóvenes, tejido indiferenciado de frutos completos en los que no se había formado aún el endocarpo (drupa joven) y tejidos de mesocarpo y semilla obtenidos a partir de frutos con distintos estadios de desarrollo y maduración. Los tejidos destinados a la extracción de RNA total se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta su uso. Los frutos destinados a la extracción de aceite o a la obtención de polvo acetónico se utilizaron inmediatamente después de su recolección, conservándose a 4 °C durante el tiempo transcurrido entre recogida y procesado.

Para el seguimiento del desarrollo y la maduración de los frutos de las distintas variedades se recogieron muestras cada tres o cuatro semanas, tomando sólo el estadio mayoritario de los árboles a los tiempos indicados (Fig. 10 y Fig. 11). La edad de las aceitunas se determinó en SDF y ésta se relacionó con el índice de maduración (IM), determinado en función de los colores que presentan la piel y el mesocarpo del fruto (Hermoso *et al.*, 1991). De este modo se establecieron las siguientes categorías:

- 0, aceitunas con epidermis verde intenso.
- 1, aceitunas con epidermis amarilla o verde amarillento.
- 2, aceitunas con epidermis amarillenta, con puntos o áreas rojizas.
- 3, aceitunas con epidermis rojiza o violeta claro.
- 4, aceitunas con epidermis negra y mesocarpo completamente blanco.
- 5, aceitunas con epidermis negra y aproximadamente la mitad del mesocarpo violeta.
- 6, aceitunas con epidermis negra y mesocarpo violeta casi en su totalidad.
- 7, aceitunas con epidermis negra y mesocarpo completamente negro.

A las 9 SDF (IM 0) todavía no ha tenido lugar la lignificación del endocarpo, fenómeno que suele producirse entre las 10 y las 12 SDF, y que coincide con el inicio de la síntesis y la acumulación del aceite tanto en el mesocarpo como en la semilla. Tras un largo proceso de desarrollo, el color verde intenso cambia a verde amarillento a las 23 SDF (IM

1). A las 28 SDF comienza el proceso de maduración del fruto (IM 2), cambiando el color a morado a las 31 SDF (IM 3) y finalmente a negro a las 35 SDF (IM 4 y 5).

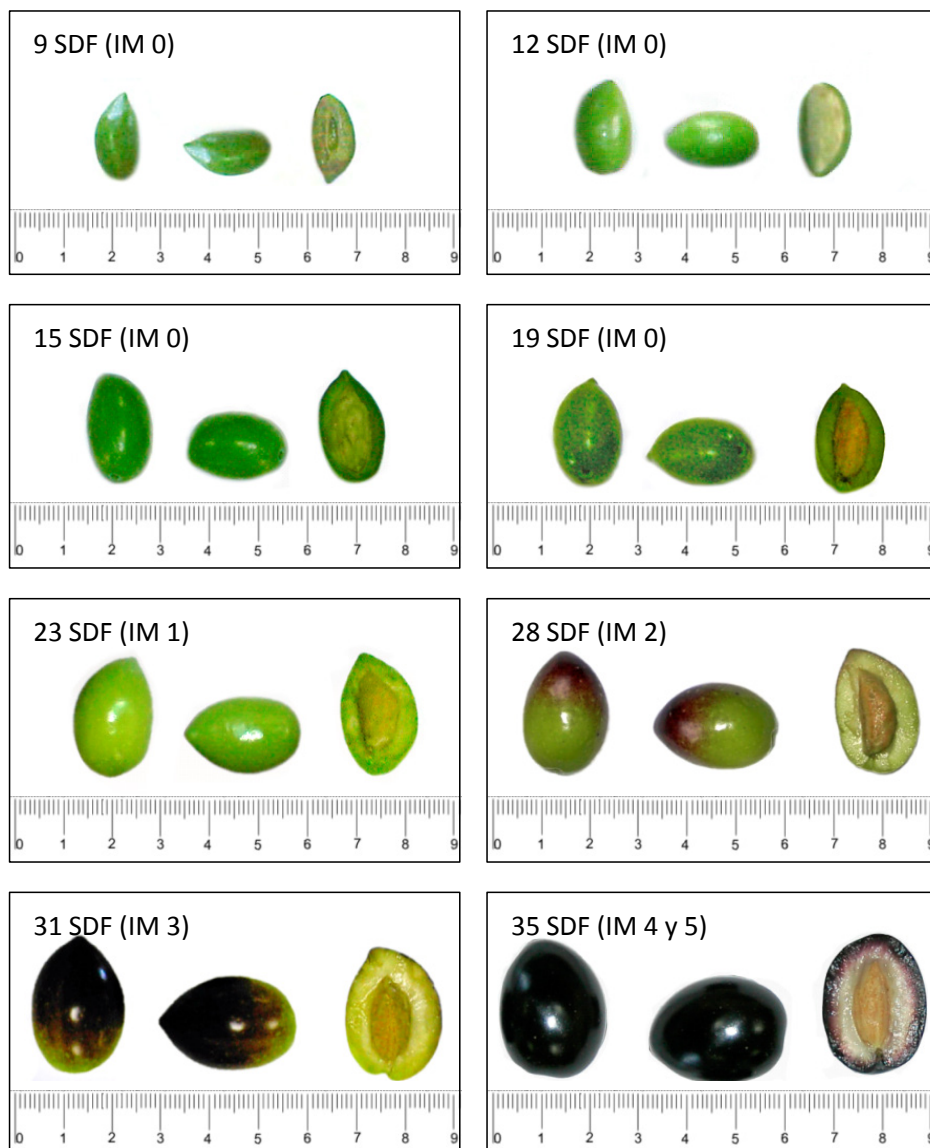


Fig. 10. Aspecto y estadios de desarrollo y maduración de las aceitunas de la variedad Picual utilizadas en este trabajo. La regla mostrada mide el tamaño de los frutos en cm.

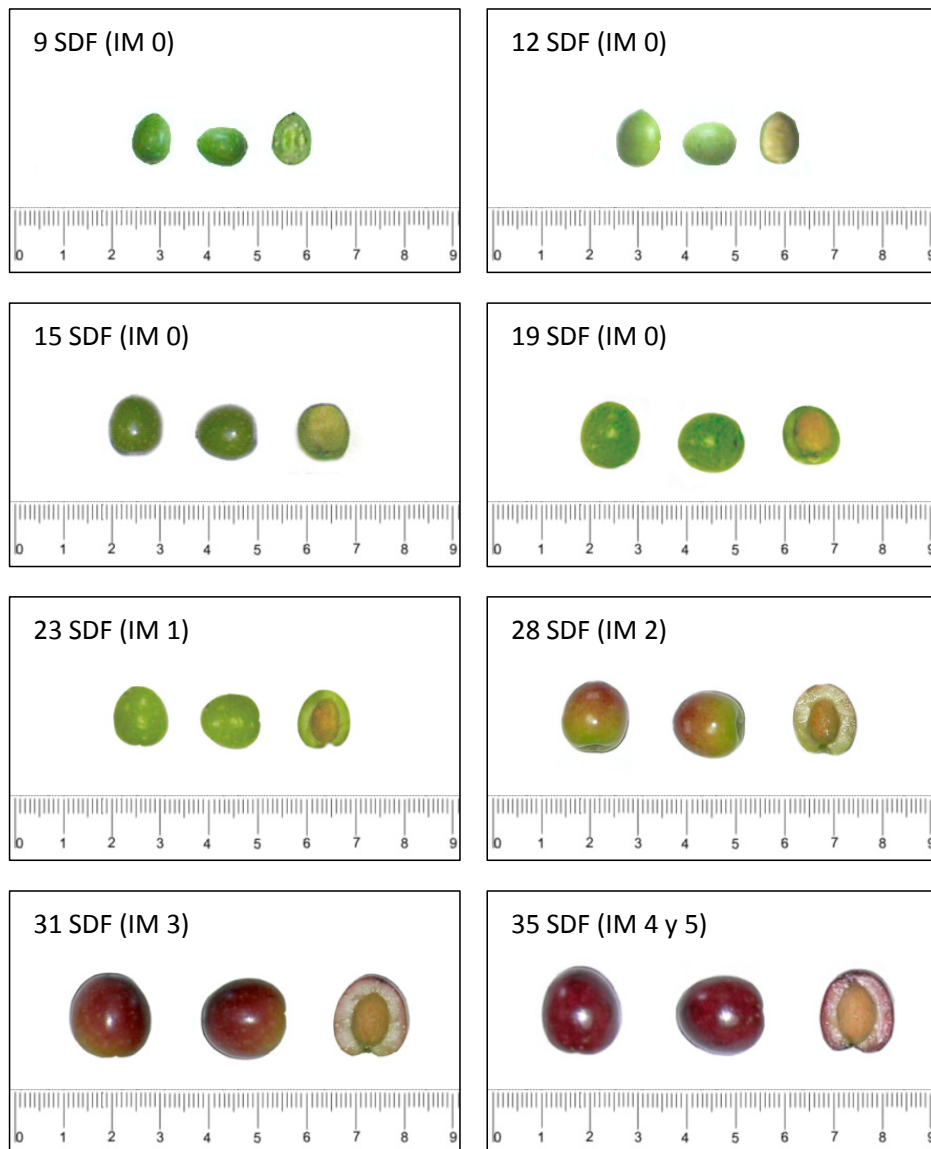


Fig. 11. Aspecto y estadios de desarrollo y maduración de las aceitunas de la variedad Arbequina utilizadas en este trabajo. La regla mostrada mide el tamaño de los frutos en cm.

III.1.2. *Nicotiana benthamiana*

Las plantas de *N. benthamiana* utilizadas en este trabajo, regadas y fertilizadas regularmente, se cultivaron durante 4-6 semanas en cámaras de crecimiento con fotoperiodo de día largo de 16 h luz ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) / 8 h oscuridad, y una temperatura constante de 25 °C.

III.1.3. Bacterias

III.1.2.1. *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo junto con sus correspondientes genotipos quedan recogidas en la Tab. 1.

Tab. 1. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo
XL1-Blue	<i>recA1 endA1gyr96 thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]
XL10-Gold Kan	Tet ^r Δ(<i>mrcA</i>)183 Δ(<i>mrcCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r) Tn5 (Kan ^r) amy]
BL21 (DE3)	F' <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)
One Shot® TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>

III.1.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*

En este trabajo se ha empleado la cepa GV3101 (Rif^R) de *A. tumefaciens* transformada con el plásmido pMP90RK (Gen^R).

III.1.2.3. Condiciones de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de bacterias, tras ser esterilizados mediante autoclavado, fueron los siguientes:

- Medio Luria-Bernati (LB): triptona al 1 % (p/v), extracto de levadura al 0,5 % (p/v) y NaCl al 1 % (p/v).
- Medio SOB: triptona al 2 % (p/v), extracto de levadura al 0,5 % (p/v), NaCl al 0,05 % (p/v), KCl 2,5 mM y MgCl₂ 10 mM.
- Medio SOC: triptona al 2 % (p/v), extracto de levadura al 0,5 % (p/v), NaCl al 0,05 % (p/v), KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM y glucosa al 0,36 % (p/v).
- Medio NZY⁺: hidrolizado de caseína al 1 % (p/v), extracto de levadura al 0,5 % (p/v), NaCl al 0,5 % (p/v), MgCl₂ 12,5 mM, MgSO₄ 12,5 mM y glucosa al 0,4 % (p/v).

Para preparar medios de cultivos sólidos se añadió agar bacteriológico al 1,5 % (p/v) previamente al autoclavado.

Las disoluciones concentradas de antibióticos para la selección de cepas resistentes se esterilizaron por filtración y se añadieron a los medios de cultivo después del autoclavado a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (100 µg ml⁻¹), tetraciclina (50 µg ml⁻¹), kanamicina (50 µg ml⁻¹), gentamicina (50 µg ml⁻¹) y espectinomicina (50 µg ml⁻¹).

Cuando el vector empleado estaba diseñado para la selección azul/blanco de las colonias mediante la interrupción del gen *lacZ* debida a la inserción del fragmento clonado, el medio de cultivo se suplementó con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,5 mM esterilizado por filtración y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal) 80 µg ml⁻¹ disuelto en N,N-dimetilformamida (DMF).

La temperatura de incubación de los cultivos de *A. tumefaciens* fue de 28 °C. En cambio, los cultivos de *E. coli* se incubaron a 37 °C. Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas de Petri, mientras que los cultivos de medio líquido se incubaron aplicando una agitación orbital de 200 rpm.

III.2. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA

III.2.1. Plásmidos y genoteca utilizados

Los plásmidos empleados que no han sido construidos en este trabajo se muestran en la Tab. 2.

Tab. 2. Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo.

Plásmido	Organismo propagador	Descripción	Origen
pGEM-T Easy	<i>E. coli</i>	Vector para la clonación de productos de PCR que contienen desoxiadenosina en sus extremos.	Promega, Estados Unidos
pSPARK® I	<i>E. coli</i>	Vector para la clonación de productos de PCR con los extremos romos.	Canvax, España
pET-45b(+)	<i>E. coli</i>	Vector para la expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> .	Novagen, Estados Unidos
pENTR™/D-TOPO®	<i>E. coli</i>	Vector que permite la clonación direccional de productos de PCR para su expresión después de la recombinación con vectores de destino compatibles con el sistema Gateway®.	Invitrogen, Estados Unidos
pH2GW7	<i>E. coli</i> / <i>A. tumefaciens</i>	Vector de destino del sistema Gateway® para la expresión de proteínas recombinantes en plantas.	Karimi <i>et al.</i> (2002)
pK7FGW2.0	<i>E. coli</i> / <i>A. tumefaciens</i>	Vector de destino del sistema Gateway® para la expresión en plantas de proteínas recombinantes fusionadas a eGFP en su extremo C-terminal.	Karimi <i>et al.</i> (2002)

La genoteca de cDNA Uni-ZAP XR de olivo utilizada en este trabajo fue construida a partir de mRNA aislado de aceitunas de 13 SDF de la variedad Picual (Haralampidis *et al.*, 1998).

III.2.2. Transformación genética de *E. coli*

Para la preparación de células competentes de la cepa de *E. coli* XL1-Blue, se inoculó a partir de una colonia aislada un precultivo de 2 ml de medio LB con tetraciclina y se cultivó durante toda la noche. Con 1 ml del precultivo anterior se inocularon 100 ml de medio SOB y se cultivó hasta alcanzar aproximadamente una A_{600} de 0,5. A continuación, el cultivo se incubó en hielo durante 10 min y se recogieron las células por centrifugación a 2.500 *g* durante 10 min a 4 °C. Tras descartar el sobrenadante, el precipitado celular se resuspendió en 40 ml de tampón TB (ácido 1,4-piperazíndietanesulfónico (PIPES)-KOH 10 mM pH 6,7, MnCl₂ 55 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM) estéril y preenfriado a 4 °C. Posteriormente, se incubó en hielo durante 10 min, se centrifugó a 2.500 *g* durante 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado de células en 8 ml de tampón TB preenfriado a 4 °C y 0,56 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Tras incubar 10 min en hielo, las células competentes se dividieron en alícuotas de 200 µl, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta su uso. Las células así preparadas presentaron una eficiencia de transformación de 10⁶-10⁷ transformantes por µg de DNA.

Para la transformación de las células competentes XL1-Blue, se añadió el DNA plasmídico transformante (<100 ng en un máximo de 20 µl) a una alícuota de células de 200 µl recién descongelada en hielo y se incubó, también en hielo, durante 20 min. Tras someter las células a choque térmico durante 90 s a 42 °C e incubar de nuevo en hielo durante 2 min, se añadieron 800 µl de medio LB y se incubaron durante 45 min con agitación orbital a 150 rpm. Para recoger las células transformadas, la suspensión se centrifugó a 1.100 *g* durante 5 min y el precipitado se resuspendió en 100 µl de medio LB para sembrar las células en medio LB con el antibiótico adecuado. Cuando se utilizaron plásmidos que permiten identificar a los transformantes recombinantes debido a la interrupción por inserción del gen *lacZ*, el medio se suplementó con IPTG 0,5 mM y X-Gal 0,02 mM en DMF.

Para las construcciones preparadas con el plásmido pSPARK® I se emplearon células competentes XL10-Gold *Kan* (Stratagene) de eficiencia de transformación superior a 5x10⁹ transformantes por µg de DNA. Las células competentes BL21 (DE3) (Novagen) se emplearon para las construcciones preparadas con el plásmido pET-45b(+). En el caso de las transformaciones necesarias para la obtención de las construcciones preparadas con los

plásmidos pENTR™/D-TOPO®, pK7FGW2.0 y pH2GW7, se utilizaron las células competentes One Shot TOP10 (Invitrogen). En todos estos casos en los que se usaron células competentes comerciales, se siguieron las instrucciones indicadas por cada fabricante.

III.2.3. Transformación genética de *A. tumefaciens*

Para la preparación de células competentes de la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*, se inoculó a partir de una colonia aislada un precultivo de 5 ml de medio LB con gentamicina y se cultivó durante toda la noche. Con 1 ml del precultivo anterior se inocularon 50 ml de medio LB con gentamicina. El cultivo se incubó hasta alcanzar una A_{600} de 0,5-1,0. Tras enfriar en hielo durante 10 min, la suspensión celular se centrifugó a 2.500 g durante 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de CaCl_2 20 mM con glicerol al 10 % (v/v) previamente enfriado en hielo. Las células competentes se dividieron en alícuotas de 100 μl , se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Para la transformación de las células competentes de *A. tumefaciens* se añadió el DNA plasmídico (0,1-1 μg en un máximo de 10 μl) a una alícuota de células de 100 μl recién descongelada en hielo y se congeló en nitrógeno líquido. Inmediatamente después se sometió a choque térmico a 37 °C durante 5 min. A continuación, se añadieron 400 μl de medio LB y se incubó a 28 °C durante 1 h con agitación orbital a 200 rpm. Posteriormente, se sembraron dos placas de medio LB con gentamicina y otro antibiótico apropiado con 250 μl de células transformadas cada una.

III.2.4. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* y *A. tumefaciens*

Según el grado de pureza del DNA plasmídico necesario para su uso posterior, se emplearon dos métodos de aislamiento diferentes.

Cuando la finalidad del DNA plasmídico obtenido fue el análisis de transformantes de *E. coli* mediante digestión con endonucleasas de restricción, se inocularon 3 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se cultivó durante toda la noche. Después de recoger las células por centrifugación a 16.000 g durante 30 s y descartar el

sobrenadante, se resuspendieron en una solución que contenía 180 μ l de tampón BF (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, sacarosa al 8 % (p/v), etilendiamin tetraacetato sódico (Na_2EDTA) 50 mM pH 8,0, y Tritón X-100 al 0,5 % (v/v)) y 20 μ l de lisozima 10 mg/ml. Tras hervir durante 1 min a 100 °C, se incubó 5 min en hielo y se centrifugó a 16.000 g durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez transferido el sobrenadante a un tubo nuevo y descartado el precipitado de restos celulares, se añadieron 480 μ l de solución IS recién preparada (400 μ l de isopropanol y 80 μ l NH_4Ac 5 M), se mezcló por inversión y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 16.000 g durante 20 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 μ l de etanol al 70 % (v/v). Después de secar el precipitado, se resuspendió en 97 μ l de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y Na_2EDTA 1 mM) y 3 μ l de RNasa A (10 mg/ml) y se incubó durante 30 min a 37 °C.

Para el resto de aplicaciones donde se requiere una mayor pureza del DNA plasmídico, el aislamiento se realizó utilizando indistintamente dos tipos de kits comerciales: “GFX™ Micro Plasmid Prep Kit” (GE Healthcare, Reino Unido) y “QIAprep Spin Miniprep Kit” (Qiagen, Alemania). En el caso de *E. coli*, se inocularon 3 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente y se cultivó durante toda la noche. Después, se recogieron las células por centrifugación a 16.000 g durante 30 s. Para el aislamiento del DNA plasmídico de *A. tumefaciens* se inocularon 20 ml de medio LB con los antibióticos apropiados y cultivó durante 24 h. Posteriormente, se centrifugó a 3.000 g durante 10 min a 4 °C. En ambos casos se continuó siguiendo las instrucciones de cada fabricante.

III.2.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis de DNA se llevó a cabo según Sambrook *et al.* (1989). Los geles se prepararon en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM y Na_2EDTA 1 mM) con concentraciones de agarosa que oscilaban entre 0,7-1,7 % (p/v).

Las muestras se suplementaron con tampón de carga que contenía azul de bromofenol al 0,09 % (p/v), xilen cianol FF al 0,09 % (p/v), glicerol al 60 % (v/v) y EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) 60 mM, y la electroforesis se desarrolló en cubetas horizontales, usando TAE como tampón de electroforesis.

Para la detección del DNA, tanto los geles como el tampón de electroforesis incluían bromuro de etidio al 0,1 % (p/v), visualizándose las bandas en un transiluminador de luz ultravioleta.

Para determinar el tamaño de los fragmentos separados se usaron dos tipos de marcadores de peso molecular suministrados por dos casas comerciales diferentes: "1 Kb Gene Ruler™" (Thermo Scientific, Estados Unidos) y "1 kb DNA Ladder" (New England Biolabs, Reino Unido). Para la cuantificación de los fragmentos de cDNA se utilizó el marcador "Mass Ruler™" (Thermo Scientific).

III.2.6. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Después de su identificación mediante visualización con luz ultravioleta, se cortó el fragmento del gel que contenía la banda deseada con una cuchilla estéril. La extracción del DNA se llevó a cabo usando el kit "QIAEX II Gel Extraction kit" (Qiagen) siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante.

III.2.7. Digestión de DNA con enzimas de restricción

La digestión de fragmentos de DNA se realizó con endonucleasas de restricción de tipo II. Las condiciones de la digestión, tanto doble como simple, así como las de parada de la reacción, fueron las indicadas por la casa comercial según las enzimas empleadas.

III.2.8. Desfosforilación de plásmidos con fosfatasa alcalina

Para la ligación de insertos al plásmido pET-45b(+), el vector previamente digerido fue desprovisto de los grupos 5'-fosfato con el objeto de impedir su recircularización. En la reacción de desfosforilación se añadieron 20 U de fosfatasa alcalina (Roche, Suiza) a 5 µg de plásmido en presencia del tampón suministrado por el fabricante. Transcurrida la incubación de 1 h a 37 °C, se realizó una electroforesis en gel de agarosa y se cortó y purificó la banda correspondiente tal y como se indica en el apartado III.2.6.

III.2.9. Ligación de fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA amplificados mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuyos extremos poseían desoxiadenosina se ligaron al plásmido pGEM-T Easy (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los fragmentos de DNA amplificados mediante PCR con extremos romos se ligaron al plásmido pSPARK® I (Canvax) siguiendo las instrucciones proporcionadas por la casa comercial.

La ligación de insertos de DNA al vector pET-45b(+), previamente digerido y desfosforilado, se llevó a cabo con la DNA ligasa del bacteriófago T4 (New England Biolabs, Reino Unido) con una relación molar inserto:vector 3:1. La reacción se desarrolló en un volumen final de 10 µl utilizando el tampón proporcionado por la casa comercial, incubando a 16 °C durante toda la noche. La reacción se paró mediante incubación a 65 °C durante 10 min y, tras enfriar en hielo, se conservó a -20 °C hasta su utilización.

III.2.10. Clonación por recombinación específica de sitio

Las construcciones plasmídicas para la expresión heteróloga en *N. benthamiana* con los vectores pH2GW7 y pK7FGW2.0 se hicieron mediante el uso de la tecnología Gateway® (Invitrogen), la cual permite el intercambio de insertos entre dos plásmidos por recombinación específica de sitio.

Las construcciones donadoras fueron realizadas con el vector pENTR™/D-TOPO® siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Las reacciones de recombinación entre las construcciones donadoras y los vectores de destino se realizaron utilizando la mezcla enzimática “Gateway® LR Clonase™ II enzyme mix” (Invitrogen), siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante.

III.2.11. Determinación y análisis de las secuencias de DNA

La secuenciación del DNA se realizó por SECUGEN (Madrid), salvo las realizadas para las construcciones de expresión en *N. benthamiana* que se hicieron en el servicio de secuenciación de la Universidad de York (Reino Unido). El análisis de las secuencias se llevó

a cabo con el grupo de programas LASERGENE (DNASStar, Estados Unidos). Para los alineamientos se usaron los programas ClustalX y GeneDoc. Para la construcción de los árboles filogenéticos se empleó el método del vecino más cercano (Neighbor-Joining) con la corrección de Kimura para múltiples sustituciones y un muestreo “bootstrap” de 1000 replicados. Para la visualización y manipulación del dendrograma se usó el programa Mega 5.2. Las predicciones sobre los posibles sitios de N-glicosilación se realizaron con el programa NetNGlyc 1.0. Las predicciones bioinformáticas sobre la localización subcelular de cada isoenzima se obtuvieron utilizando tres programas diferentes: Target P 1.1, WoLF, PSORT y ProtComp 9.0. Los dominios conservados en las secuencias de aminoácidos deducidas se analizaron con el programa del NCBI y el programa Pfam. El modelado tridimensional de cada isoenzima se realizó con el programa SWISS-MODEL a partir de modelos cristalográficos existentes.

III.2.12. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR

Todas las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 50 μ l conteniendo DNA molde, $MgCl_2$ 1,5-3 mM, dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato) 0,2-1 mM, oligonucleótidos directo y reverso 0,5 μ M, DNA polimerasa 1-2,5 U y tampón 1x suministrado por las casas comerciales. Los distintos tipos de DNA polimerasas empleados en este trabajo se recogen en la Tab. 3.

Tab. 3. DNA polimerasas empleadas en este trabajo.

Enzima	Casa comercial	Descripción
MyTaq™ DNA Polymerase <i>Taq</i> DNA Polymerase	Bioline, España New England Biolabs	Enzimas cuyos productos de PCR poseen desoxiadenosina en sus extremos.
MyTaq™ HS DNA Polymerase	Bioline	Enzima unida a un anticuerpo que requiere alcanzar 95 °C para ser activada, incrementándose así la especificidad de hibridación de los oligonucleótidos. Generan productos de PCR con desoxiadenosina en los extremos.
ACCUZYME™ DNA Polymerase	Bioline	Enzimas de alta fidelidad de copia que poseen actividad DNA polimerasa 5'-3' y exonucleasa "proofreading" 3'-5'. Generan productos de PCR romos.
VELOCITY DNA Polymerase	Bioline	
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs	

Todas las reacciones de PCR realizadas constaron de una fase inicial de desnaturalización a 95 °C, seguida de 30-35 ciclos que consistían en una primera etapa de desnaturalización de 95 °C, una segunda de hibridación de los oligonucleótidos con el DNA molde a la temperatura adecuada y una tercera etapa de extensión a 72 °C. La duración de las etapas de cada ciclo fue la especificada por las casas comerciales teniendo en cuenta el tamaño del fragmento de DNA a amplificar. Cuando se empleó como DNA molde una alícuota de la genoteca indicada en el apartado III.2.1., fue necesaria una fase de calentamiento inicial más duradera (10 min a 95 °C) que desnaturalizase las proteínas de la cápsida viral permitiendo la liberación del material genético a la mezcla de reacción.

III.2.13. Purificación de productos de PCR

Cuando los productos amplificados mediante PCR se usaron como molde en otra reacción de PCR, se sometieron a un procedimiento de purificación mediante el kit "QIAquick PCR Purification Kit" (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.2.14. Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría

La determinación de la concentración y pureza de las muestras de ácidos nucleicos se realizó mediante la medida espectrofotométrica de la A_{260} y A_{280} según el método descrito por Sambrook *et al.* (1989).

Para la cuantificación se consideró que un valor de A_{260} de 1,0 equivalía a 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de doble cadena o 40 $\mu\text{g/ml}$ de RNA. La relación A_{260}/A_{280} permitió estimar la pureza de la muestra, considerando que valores inferiores a 1,8 para DNA y a 2,0 para RNA indicaban la presencia de proteínas.

III.3. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA

III.3.1. Aislamiento de RNA de tejidos de olivo

El aislamiento de RNA total se realizó utilizando disoluciones previamente tratadas con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0,1 % (v/v) durante 16 h y autoclavadas para inhibir las RNasas, material de plástico libre de RNasas, y material de vidrio esterilizado por calentamiento durante 8 h a 180 °C. Muestras de 1-2 g de tejidos de olivo, congeladas y conservadas a -80 °C, se trituraron en un mortero que contenía nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que posteriormente se transfirió a un tubo de polipropileno de 15 ml. A continuación, se añadieron 5 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 9,0, NaCl 100 mM, Na_2EDTA 10 mM y SDS al 2 % (p/v)), 50 μl de β -mercaptoetanol y 2,5 ml de fenol. Si el tejido procesado era mesocarpo u hoja, se añadió también polivinil polipirrolidona (PVPP) al 2 % (p/v) que retira los compuestos fenólicos presentes al formar con estos un complejo, facilitándose la extracción de los ácidos nucleicos. Tras agitar suavemente durante 5 min, se añadieron 2,5 ml de cloroformo y se agitó nuevamente durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 2.500 g durante 10 min, se recogió la fase superior y se repitió la extracción de esta fase con fenol y cloroformo dos veces más. Los ácidos nucleicos se precipitaron añadiendo 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 3 volúmenes de etanol absoluto e incubando durante 30 min a -80 °C. Tras centrifugar a 2.500 g durante 30 min a 4 °C, se resuspendió el precipitado en 2,5 ml de agua destilada

estéril tratada con DEPC y se añadieron 2,5 ml de LiCl 5 M, incubándose durante 16 h a 4 °C para precipitar el RNA. Después de la incubación, se centrifugó a 2.500 g durante 30 min a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril tratada con DEPC. El RNA se precipitó de la misma forma descrita anteriormente para los ácidos nucleicos. El precipitado de RNA se lavó dos veces con etanol al 70 % (v/v), se resuspendió en 25 µl de agua destilada estéril tratada con DEPC y se conservó a -80 °C.

III.3.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa

Para comprobar la integridad del RNA obtenido, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1,4 % (p/v) en tampón MEN (MOPS (ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico) 20 mM pH 7,0, NaAc 5 mM y Na₂EDTA 1 mM) con bromuro de etidio 4 µg/ml. El tratamiento desnaturante previo de las muestras se realizó incubando a 65 °C durante 15 min una mezcla de volumen final 20 µl que contenía 4 µg de RNA total, tampón MEN, formaldehído 2,2 M y formamida al 50 % (v/v). Tras enfriar en hielo durante 2 min, se añadieron 2 µl de solución de carga (azul de bromofenol al 0,25 % (p/v), glicerol al 50 % (v/v) y Na₂EDTA 1 mM) y se aplicó la muestra al gel. La electroforesis se llevó a cabo en tampón MEN, a 50 V durante 2h.

III.3.3. Síntesis de cDNA

Como paso previo a la síntesis de cDNA, el RNA obtenido se trató con DNasa para la eliminación de restos del DNA genómico. Para ello, muestras de 10 µg de RNA total se procesaron con el “TURBO DNA-free kit” (Ambion, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, para la síntesis de cDNA se empleó el kit “SuperScript™ III First-Strand Synthesis System” (Invitrogen), partiendo de 5 µg de RNA total libre de DNA genómico y siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial.

III.3.4. Análisis de RNA mediante PCR cuantitativa en tiempo real

El análisis de expresión de los genes de las *BGLC* de olivo se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) usando el termociclador Mx3000P™ (Stratagene) y el “Brilliant SYBR® Green QPCR Master Mix” (Stratagene).

Los oligonucleótidos utilizados (Tab. 4) se diseñaron con el programa *Primer3* 4.0 (<http://primer3.ut.ee/>) a partir de la secuencia de los extremos 3' de cada uno de los genes (incluyendo parte de la región codificante 3' final y parte de la región 3' no codificante), excepto en el caso del gen de la ubiquitina 2 (*UBQ2*) de olivo donde únicamente se usó la región 3' no codificante, de forma que la longitud fuese de 19-23 pb, la T_m de 60 ± 1 °C y que generasen amplicones de 100-250 pb. Los oligonucleótidos seleccionados fueron analizados con el programa *Gene Runner* 3.05 (Hastings Software Inc.) para comprobar que no se formaban estructuras secundarias inter e intracatenarias. Por último, se comprobó mediante búsqueda en BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) que las secuencias eran específicas de cada gen.

Tab. 4. Oligonucleótidos utilizados en la qRT-PCR.

Gen	Nombre	Secuencia	Amplicón (pb)
<i>OepBGLC1</i>	CR15	5'-CTAGCGATGGACCAAGGTG-3'	197
	CR16	5'-AATGGAACTGCTGTAGGCTTG-3'	
<i>OepBGLC2</i>	DV65	5'-TGTGAGGGGATACTTTCTCTGG-3'	195
	DV66	5'-AACTTGGGAAATTAGCTGTTGG-3'	
<i>OepBGLC3</i>	DV57	5'-CCATGTAATACACACAGCCACAC-3'	215
	DV62	5'-TATCCGAAGCTTTCTGCACAC-3'	
<i>OepBGLC4</i>	DV71	5'-AGTTGTTGGGTGGCTATTGG-3'	243
	DV72	5'-GTACAAATGCAGGAGCGAGA-3'	
<i>OeUBQ2</i>	OeUBQ2f3	5'-AATGAAGTCTGTCTCTCCTTTGG-3'	132
	OeUBQ2r3	5'-AAGGGAAATCCCATCAACG-3'	

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 25 µl, Brilliant SYBR® Green QPCR Master Mix 1x, oligonucleótidos directo y reverso 100 nM cada uno y 1 µl de la dilución adecuada del cDNA, la cual se seleccionó en función de la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos. Las reacciones, incluyendo los controles negativos,

se llevaron a cabo por duplicado en placas de polipropileno de 96 pocillos (Sorenson Bioscience) cubiertas con tiras de tapones con calidad óptica (CMB-Bioline, España).

El programa de PCR utilizado constaba de una etapa inicial de desnaturalización y activación de la DNA polimerasa durante 10 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos consistentes en una etapa de desnaturalización durante 30 s a 95 °C, otra de hibridación de los oligonucleótidos de 1 min a 60 °C y una etapa de extensión durante 30 s a 72 °C.

Para confirmar la presencia de un único producto de amplificación y descartar la formación de dímeros de oligonucleótidos, se realizó para cada muestra una curva de disociación inmediatamente después de finalizar la reacción, que consistió en una etapa de desnaturalización inicial de 1 min a 95 °C y otra de hibridación a 55 °C seguida de un incremento de temperatura de 0,2 °C s⁻¹ hasta volver a alcanzar los 95 °C.

Como método de generación de fluorescencia se empleó SYBR Green, el cual emite fluorescencia al unirse al cDNA de doble cadena, de manera que ésta aumenta proporcionalmente a la cantidad de cDNA inicial. Cuando el incremento de fluorescencia (ΔR) se expresa frente al número de ciclos, se obtiene una curva de amplificación (Fig. 12). El ciclo umbral (Ct) es el primer ciclo de la reacción de PCR en el que el instrumento es capaz de distinguir la fluorescencia generada frente al fondo. A partir de este punto es cuando la reacción se encuentra en fase exponencial, existiendo una relación lineal entre el logaritmo del incremento de fluorescencia y el número de ciclos. El valor de Ct es inversamente proporcional al número de copias de cDNA de partida, de manera que cuanto mayor es la cantidad de cDNA molde inicial, menos ciclos son necesarios para que el producto de reacción se acumule y pueda ser detectado, alcanzándose más rápidamente el Ct. De esta forma el Ct nos permite cuantificar el cDNA de partida presente en la muestra que, dado que proviene del mRNA retrotranscrito, permite cuantificar el nivel de expresión génica.

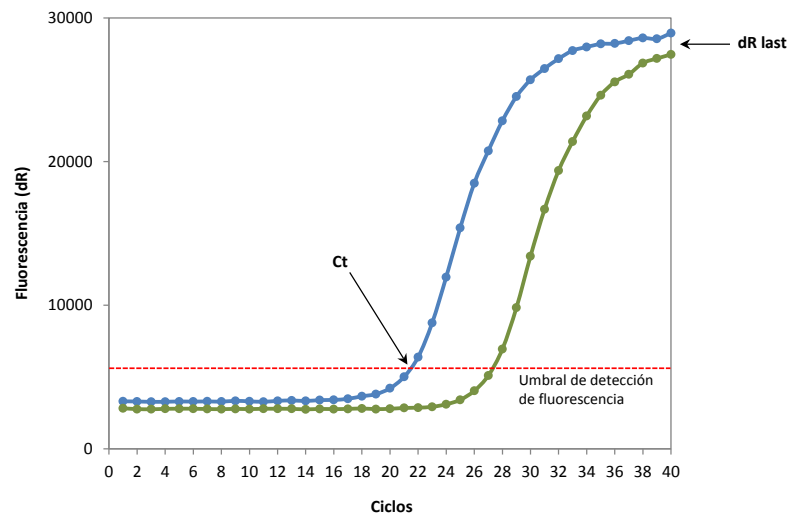


Fig. 12. Curva de amplificación de la qRT-PCR.

Para determinar la eficiencia de amplificación de cada pareja de oligonucleótidos, se realizó la curva estándar por triplicado, preparando diluciones seriadas de las muestras de cDNA (1:2,5, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320) y representando los valores de Ct frente al logaritmo de las diferentes diluciones de cDNA. En todos los casos, el valor de la pendiente de la recta estaba comprendido entre -3,1 y -3,6, lo que significaba que la reacción tenía una eficiencia de amplificación ($E = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1 \times 100$) de 90-110 %. Asimismo, el coeficiente de regresión era $\geq 0,985$, lo cual indicaba que las condiciones del ensayo eran aceptables en términos de precisión, reproducibilidad y sensibilidad.

Los niveles de expresión de los genes *BGLCs* de olivo fueron calculados mediante cuantificación relativa referida al valor de Ct de una de las muestras (calibrador) de cada experimento, usando el gen de expresión constitutiva *OeUBQ2* como control endógeno (normalizador o *housekeeping*), ya que su nivel de expresión no variaba en ninguna de las muestras de los experimentos realizados. Para los cálculos numéricos de los niveles relativos de expresión se empleó el método " $2^{-\Delta\Delta Ct}$ " (Livak y Schmittgen, 2001) tras comprobar que la eficiencia de amplificación de las muestras eran comparables:

$$\Delta Ct (\text{muestra}) = Ct (\text{muestra}) - Ct (\text{normalizador})$$

$$\Delta Ct (\text{calibrador}) = Ct (\text{calibrador}) - Ct (\text{normalizador})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{muestra}) - \Delta Ct (\text{calibrador})$$

$$\text{Proporción de expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

La determinación de los niveles de expresión de cada muestra se realizó por triplicado en placas independientes, realizando dos réplicas en cada placa. Los resultados obtenidos están expresados como la media \pm desviación estándar (SD).

III.4. AISLAMIENTO DE CLONES DE cDNA CORRESPONDIENTES A β -GLUCOSIDASAS DE OLIVO

III.4.1. Identificación de nuevas secuencias

A partir de la base de datos de ESTs (*Expressed sequence tags*) de olivo generada en el proyecto OLEAGEN (Muñoz-Mérida *et al.*, 2013), se realizaron búsquedas de nuevos genes que presentaran un alto grado de similitud con el gen *BGLC* de olivo *OepBGLC1* previamente aislado en el grupo (Romero-Segura, 2010). De las secuencias identificadas, se seleccionaron aquéllas que presentaron un alto nivel de expresión en el mesocarpo determinado mediante el análisis de expresión *in silico* generado también dentro del proyecto OLEAGEN. De esta manera, se seleccionaron tres secuencias que se denominaron *OepBGLC2*, *OepBGCL3* y *OepBGLC4*. El análisis dichas secuencias reveló que mientras que las correspondientes a los genes *OepBGLC2* y *OepBGLC3* poseían sus regiones codificantes completas y las regiones 3' y 5' no codificantes, la del gen *OepBGLC4* carecía del extremo 5' codificante y también de la región 5' no codificante.

III.4.2. Amplificación por PCR del extremo 5' del gen *OepBGLC4*

Para la obtención del extremo 5' del gen *OepBGLC4*, se diseñaron los oligonucleótidos reversos DV19 y DV20 (Tab. 5) a partir de la secuencia de la región 5', de

manera que formasen pareja con el oligonucleótido directo SK (5'-CGCTCTAGAATAGTGGATC-3') específico del extremo 5' del sitio de clonación múltiple del vector de la genoteca Uni-ZAP XR. La primera reacción de PCR se realizó con la pareja SK/DV20, empleando como DNA molde una alícuota de la genoteca y la MyTaq™HS DNA polimerasa. La segunda reacción de PCR se llevó a cabo con la pareja SK/DV19, utilizando como DNA molde el producto purificado de la reacción anterior (PCR anidada) y la enzima MyTaq™ DNA polimerasa. El fragmento amplificado en esta segunda reacción se clonó en el vector pGEM-T Easy y se secuenció.

III.4.3. Aislamiento de clones completos de cDNA de *BGLC* de olivo

A partir las secuencias 5' y 3' no codificantes conocidas de los genes *OepBGLC2*, *OepBGLC3* y *OepBLGC4*, se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos para cada gen, excepto en el caso del gen *OepBGLC4* donde dada la escasa longitud de la región 5' no codificante obtenida se diseñaron tres nuevos oligonucleótidos, uno único directo que abarcaba el final de la región 5' no codificante y el inicio de la codificante, y dos reversos situados sobre la región 3' no codificante (Tab. 5). Posteriormente, se llevaron a cabo dos reacciones de PCR por clon con la enzima VELOCITY DNA polimerasa, una primaria usando como molde una alícuota de la genoteca y otra secundaria anidada empleando como molde los productos purificados de las reacciones primarias. Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector pSPARK® I y se secuenciaron en los dos sentidos, comprobándose que se trataba de clones completos.

Tab. 5. Oligonucleótidos utilizados para la obtención de clones de cDNA correspondientes a BGLCs de olivo.

Gen	Nombre	Secuencia	Descripción
<i>OepBGLC2</i>	DV14	5'-TTGTAGATGGTGGGAATGCC-3'	Oligonucleótidos empleados para la amplificación del clon completo de cDNA del gen <i>OepBGLC2</i> . La pareja DV14/DV24 se utilizó en la PCR primaria y la pareja DV16/DV27 en la anidada.
	DV24	5'-CAAGGGCATATCTCGACTCC-3'	
	DV16	5'-AATGCCCTCGTGGTAATATTC-3'	
	DV27	5'-CGTGATCATTCTTAGTTGTC-3'	
<i>OepBGLC3</i>	DV10	5'-AGCTTACAACATGCTAGAGTC-3'	Oligonucleótidos empleados para la amplificación del clon completo de cDNA del gen <i>OepBGLC3</i> . La pareja DV10/DV22 se utilizó en la PCR primaria y la pareja DV11/DV12 en la anidada.
	DV22	5'-GAATGCACGTTGACCTCTGA-3'	
	DV11	5'-TGACCTCTGACTAGTCATATG-3'	
	DV12	5'-AGACGGTACGCGATATCGC-3'	
<i>OepBGLC4</i>	DV19	5'-GCCTTGACCATGATATCGAC-3'	Oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR para la amplificación del extremo 5' del gen <i>OepBGLC4</i> .
	DV20	5'-ACTCGTCGTCGAGTGCCTGC-3'	
<i>OepBGLC4</i>	DV36	5'- TGATATGTTGCAACCAAGCGC-3'	Oligonucleótidos empleados para la amplificación del clon completo de cDNA del gen <i>OepBGLC4</i> . La pareja DV36/DV26 se utilizó en la PCR primaria y la pareja DV36/DV30 en la anidada.
	DV26	5'- TTGCCCAACATGTACTIONACC-3'	
	DV30	5'- TACGTGCATACCTATGATACG-3'	

III.5. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS GENES *BGLC* DE OLIVO EN *E. coli*

Para la expresión funcional de los genes *OepBGLC1*, *OepBGLC2*, *OepBGLC3* y *OepBGLC4* en *E. coli*, se amplificaron mediante PCR utilizando la enzima ACCUZYME™ DNA polimerasa, las correspondientes regiones codificantes de cada gen excluyendo el péptido señal excepto en el caso del gen *OepBGLC3*, cuya región codificante fue amplificada incluyendo y excluyendo el posible péptido señal de su región N- terminal al no quedar suficientemente confirmada su existencia según las predicciones bioinformáticas obtenidas. Para ello, se diseñaron, para cada uno de los genes, oligonucleótidos directos y reversos para cada uno de ellos, que contenían los sitios de restricción de las enzimas correspondientes (Tab. 6).

Tab. 6. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones codificantes de los genes *BGLC* de olivo para la expresión heteróloga en *E. coli*. Los sitios de restricción aparecen subrayados.

Gen	Nombre	Secuencia	Enzima
<i>OepBGLC1</i>	DV56	5'-GT <u>GAGCTCG</u> CCAAATCCACCAAAGAAAGGATCAAAC-3'	<i>SacI</i>
	DV57	5'-ATGC <u>CTGCAG</u> CTAGGTGCTGCCTCTAAGCCTTTTAC-3'	<i>PstI</i>
<i>OepBGLC2</i>	DV58	5'-GT <u>GAGCTCC</u> ATCTCAAACTCTGAAATACAGATCTGAC-3'	<i>SacI</i>
	DV59	5'-ATGC <u>CTGCAG</u> TTAGCTGTTGGCTCTAGGTTGAGCTCT-3'	<i>PstI</i>
<i>OepBGLC3</i>	DV61	5'-GT <u>GAGCTCG</u> GCGATTATAGCAGAGCAGACTTTCC-3'	<i>SacI</i>
	DV62	5'-ATGC <u>CTGCAG</u> TAACTATCCATGGAACAAATGCGTTATC-3'	<i>PstI</i>
<i>OepBGLC3+SP</i>	DV60	5'-GT <u>GAGCTCT</u> TGCTACAAGCAAGCTCCCTTCTCTC-3'	<i>SacI</i>
	DV62	5'-ATGC <u>CTGCAG</u> TAACTATCCATGGAACAAATGCGTTATC-3'	<i>PstI</i>
<i>OepBGLC4</i>	DV63	5'-GT <u>GAGCTCG</u> GAGACTACAACAGAGCAGACTTTC-3'	<i>SacI</i>
	DV64	5'-ATGC <u>CTGCAG</u> TAACTGTTTCGAGGAACAATAGTATTATACC-3'	<i>PstI</i>

Tras comprobar que los fragmentos amplificados obtenidos tenían el tamaño esperado, se digirieron con las enzimas de restricción *SacI/PstI* y se ligaron al plásmido pET-45b(+) previamente desfosforilado y digerido con las mismas enzimas de restricción, quedando las regiones codificantes de cada gen bajo el control del promotor inducible T7 y fusionadas a motivo 6xHis en el extremo N-terminal. Posteriormente, las construcciones se secuenciaron para descartar cualquier error en las uniones vector-inserto o cualquier mutación en la secuencia.

Antes de proceder a la inducción de la expresión de los genes *BGLC*, se transformó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), que está optimizada para expresión de proteínas recombinantes, empleando como DNA transformante las construcciones obtenidas previamente y el vector pET-45b(+) sin inserto como control negativo. Después de seleccionar a los transformantes en placas de Petri con medio LB con ampicilina, se inocularon precultivos de 3 ml de medio LB con ampicilina a partir de colonias aisladas y se incubaron hasta alcanzar una A_{600} de 0,5. A continuación, se inocularon cultivos de 100 ml de medio LB con ampicilina con el precultivo completo y se incubaron hasta alcanzar una A_{600} de 0,6. En ese momento se indujo la expresión de los genes añadiendo IPTG 0,5 mM al cultivo, incubándose posteriormente a 15 °C con agitación orbital de 200 rpm hasta alcanzar una A_{600} de 2,0.

III.6. EXPRESIÓN HETERÓLOGA TRANSITORIA DE LOS GENES *BGLC* DE OLIVO EN HOJAS DE *N. benthamiana*

III.6.1. Expresión heteróloga de isoenzimas recombinantes *BGLC* de olivo fusionadas a un motivo 6xHis

Para la expresión funcional transitoria en hojas de *N. benthamiana* de las cuatro isoenzimas recombinantes *BGLC* de olivo fusionadas a una cola de polihistidina, se amplificaron mediante PCR las correspondientes regiones codificantes de cada gen utilizando la enzima Phusion® High-Fidelity DNA polimerasa. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos directos a partir del extremo 5' codificante de cada gen añadiendo las bases CACC a sus extremos 5', y oligonucleótidos reversos que sustituían la señal de parada original por un codón que codifica a la glicina (GGG), seguido de la secuencia codificante de un motivo 6xHis e incluyendo a continuación el codón de parada TAG (Tab. 7). Tras la reacción de clonación en el vector pENTR™/D-TOPO® del sistema GATEWAY, se transformó la cepa de *E. coli* One Shot® TOP10 y se secuenciaron las construcciones en ambos sentidos para descartar posibles errores en las secuencias.

Tab. 7. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones codificantes de los genes *BGLC* de olivo con el objeto de obtener isoenzimas recombinantes fusionadas a un motivo 6xHis en su extremo C-terminal.

Gen	Nombre	Secuencia
<i>OepBGLC1</i>	YDV1F	5'-CACCATGGATATCCAAAGCAAC-3'
	YDV1R+His	5'-CTAGTGATGGTGATGGTGATGCCCGGTGCTGCCTCTAAGCCTTTTAC-3'
<i>OepBGLC2</i>	YDV10F	5'-CACCATGGAGATTCTTCAAGT-3'
	YDV10R+His	5'-CTAGTGATGGTGATGGTGATGCCCGCTGTTGGCTCTAGGTTTCAG-3'
<i>OepBGLC3</i>	YDV7F	5'-CACCATGTTGCTACAAGCAAG-3'
	YDV7R+His	5'-CTAGTGATGGTGATGGTGATGCCACCTATCCATGGAACAAATGCG-3'
<i>OepBGLC4</i>	YDV11F	5'-CACCATGTTGCAACCAAGCGC-3'
	YDV11R+His	5'-CTAGTGATGGTGATGGTGATGCCCACTGTTTCGAGGAACAATAGTAT-3'

Tras la reacción de recombinación entre el vector binario de destino pH2GW7 y las construcciones donadoras, los genes *BGLC* de olivo quedaron bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S. De esta forma, se obtuvieron las construcciones pH2GW7-OepBGLCs+His para los cuatro genes (Fig. 13).

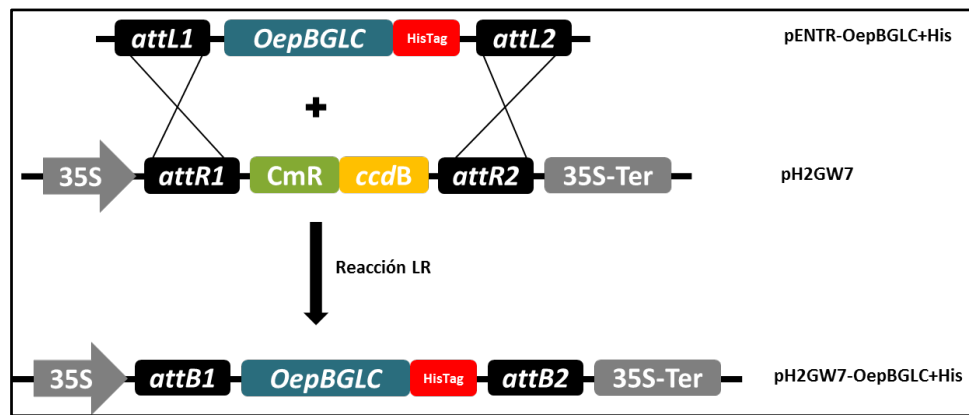


Fig. 13. Representación esquemática de las reacciones de recombinación para la obtención de las construcciones del vector pH2GW7.

A continuación, se transformó la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 con las construcciones obtenidas, seleccionándose los transformantes en placas LB con los antibióticos gentamicina y espectinomicina. Posteriormente, se inocularon cultivos líquidos de 20 ml de medio LB con gentamicina y espectinomicina a partir de colonias aisladas de *A. tumefaciens* transformadas con los genes de interés, de LB con gentamicina con la cepa no transformada (control negativo) y de LB con gentamicina y kanamicina con la cepa transformada con el supresor del silenciamiento génico p19 (Voinnet *et al.*, 2003). Tras incubar los cultivos hasta alcanzar una A_{600} de 1,0, se centrifugaron a 2.500 *g* durante 10 min a 4 °C y, una vez descartado el sobrenadante, los precipitados celulares se resuspendieron en 20 ml de tampón MMA estéril (ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) 10 mM pH 5,6, $MgCl_2$ 10 mM y acetosiringona 150 μ M). Después de incubar durante 4 h a temperatura ambiente, tanto las suspensiones bacterianas que contienen las construcciones de sobreexpresión de los genes *BGLC* como la de la cepa sin transformar se mezclaron en una proporción 1:1 con las suspensiones portadoras del supresor p19. Posteriormente, se procedió a la infiltración completa de cuatro hojas jóvenes por planta a través del envés con la ayuda de una jeringa de 1 ml (Fig. 14), ejerciendo una suave presión que rellenara progresivamente los espacios aéreos intercelulares. Las hojas tratadas se recolectaron 3 días después de la infiltración, se congelaron en nitrógeno líquido desprovistas de los haces vasculares mayores y se mantuvieron a -80 °C hasta su uso.



Fig. 14. Proceso de infiltración de las hojas de *N. benthamiana*. A través del envés y con la ayuda de una jeringa, las suspensiones celulares de *A. tumefaciens* se infiltran en la hoja rellenando los espacios aéreos intercelulares.

III.6.2. Expresión heteróloga de isoenzimas recombinantes BGLC de olivo fusionadas a eGFP

Para la expresión heteróloga en hojas de *N. benthamiana* de las distintas isoenzimas recombinantes BGLC de olivo fusionadas en su extremo C-terminal a la proteína fluorescente verde mejorada (eGFP), se amplificaron mediante PCR las regiones codificantes de los cuatro genes *BGLC* con la enzima Phusion® High-Fidelity DNA polimerasa. Para ello, se utilizaron los mismos oligonucleótidos directos que en el apartado anterior junto con nuevos oligonucleótidos reversos (Tab. 8), que se diseñaron a partir de los extremos 3' codificantes de los genes, excluyendo el correspondiente codón de parada. Tras la reacción de clonación en el vector pENTR™/D-TOPO® del sistema GATEWAY, se transformó la cepa de *E. coli* One Shot® TOP10 y se secuenciaron las construcciones en ambos sentidos para descartar posibles errores en las secuencias.

Tab. 8. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones codificantes de los genes *BGLC* de olivo con el objeto de obtener isoenzimas recombinantes fusionadas a eGFP en su extremo C-terminal.

Gen	Nombre	Secuencia
<i>OepBGLC1</i>	YDV1F	5'-CACCATGGATATCCAAAGCAAC-3'
	YDV1R-S	5'-GGTGCTGCCTCTAAGCCTTT-3'
<i>OepBGLC2</i>	YDV10F	5'-CACCATGGAGATTTCTTCAAGT-3'
	YDV10R-S	5'-GCTGTTGGCTCTAGGTTTCAAG-3'
<i>OepBGLC3</i>	YDV7F	5'-CACCATGTTGCTACAAGCAAG-3'
	YDV7R-S	5'-ACCTATCCATGGAACAAATGCG-3'
<i>OepBGLC4</i>	YDV11F	5'-CACCATGTTGCAACCAAGCGC-3'
	YDV11R-S	5'-ACTTGTTGAGGAACAATAGTAT-3'

Tras la reacción de recombinación entre el vector binario de destino pK7FGW2.0 y las construcciones donadoras, los genes *BGLC* de olivo quedaron bajo el control del promotor 35S del CaMV y las correspondientes isoenzimas quedaron fusionadas en fase en el extremo C-terminal con la eGFP. De esta forma, se obtuvieron las construcciones pK7FGW2.0-OepBGLCs+eGFP para los cuatro genes (Fig. 15).

Los procedimientos seguidos para la obtención de los correspondientes transformantes de *A. tumefaciens*, la inoculación y el crecimiento de los cultivos bacterianos y la preparación de las suspensiones celulares, fueron los mismos que en el apartado anterior, con la excepción de que el medio de resuspensión de las células estaba compuesto únicamente por MgCl₂ 10 mM y se omitió la incubación posterior de la suspensión celular. Transcurridos cinco días después de la infiltración, se visualizaron cortes de las hojas tratadas en el microscopio confocal. La toma de imágenes para captar la señal de emisión de eGFP se realizó mediante barrido secuencial. Las proteínas marcadas con eGFP se excitaron a 488 nm con un láser de argón de 30 mW y la emisión se capturó a través de un filtro de emisión de 505-530 de paso de banda.

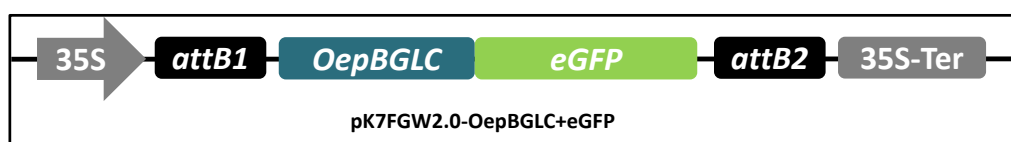


Fig. 15. Representación esquemática de las construcciones del vector de expresión pK7FGW2.0.

III.7. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ISOENZIMAS RECOMBINANTES BGLC DE OLIVO

III.7.1. Obtención de extractos crudos de *E. coli*

Las células bacterianas se recogieron mediante centrifugación a 2.500 *g* durante 10 min a 4 °C. Tras lavar los precipitados celulares con agua destilada estéril, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C. Las células descongeladas se resuspendieron en tampón de extracción (fosfato potásico 50 mM pH 7,0, Na₂EDTA 5 mM, NaCl 50 mM, PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1 mM y glicerol al 5 % (v/v)) con una relación de 5 ml de tampón de extracción por cada precipitado de células originado a partir de 100 ml de cultivo bacteriano. A continuación, se añadió lisozima a una concentración final de 2 mg/ml. Después de incubar 15 min con agitación orbital suave, se retiró una alícuota de 0,5 ml que constituyó la fracción total, y el resto de las células lisadas se centrifugó a 10.000 *g* durante 10 min a 4 °C, constituyendo el sobrenadante el extracto crudo o fracción soluble.

III.7.2. Purificación de isoenzimas recombinantes BGLC de olivo expresadas en hojas de *N. benthamiana*

Tanto la obtención del extracto crudo como la posterior purificación de las isoenzimas recombinantes se realizaron en frío (4 °C).

III.7.2.1. Obtención del extracto crudo

Para la obtención de extractos crudos a partir de hojas de *N. benthamiana*, se empleó un tampón de extracción compuesto por fosfato sódico 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, PVPP al 5 % (p/v) y PMSF 1 mM. Para ello, se añadieron 30 ml de tampón de extracción a 4 g de hojas, y se homogeneizaron empleando un Ultra-Turrax a 24.000 rpm con cinco pulsos de 1 min cada uno. Tras la centrifugación del homogeneizado a 27.000 *g* durante 20 min a 4 °C, el sobrenadante obtenido se filtró a través de tres capas de Miracloth (Calbiochem, Estados Unidos), obteniéndose el extracto crudo.

III.7.2.2. Purificación de isoenzimas recombinantes BGLC de olivo

Las proteínas BGLC recombinantes de fusión conteniendo el motivo 6xHis en el extremo C-terminal expresadas en *N. benthamiana* se purificaron mediante cromatografía de afinidad con Ni-Sefarosa utilizando las columnas His GraviTrap (GE Healthcare) de 1 ml. Tras equilibrar la columna con 10 ml de tampón fosfato sódico 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM e imidazol 20 mM, se aplicó el extracto crudo (30 ml) obtenido según el apartado anterior y se lavó con otros 10 ml del tampón mencionado. Las proteínas retenidas en la columna se eluyeron con 3 ml de tampón de elución (fosfato sódico 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM). A continuación, con objeto de eliminar el NaCl y el imidazol disueltos, la preparación se acondicionó al tampón fosfato sódico 20 mM pH 7,4 mediante una columna PD-10 (GE Healthcare). Seguidamente, las proteínas presentes en la preparación (3,5 ml) se concentraron por ultrafiltración mediante centrifugación a 2.000 *g* a 4 °C hasta un volumen final de 250 µl, empleando microconcentradores Vivaspín (GE Healthcare) con un filtro de membrana de 30 kDa. La actividad BGLC se ensayó en esta preparación concentrada.

III.8. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS DE MESOCARPO DE ACEITUNA

Para la obtención del extracto crudo se partió de polvo acetónico de pulpa de aceituna. El polvo se preparó triturando pulpa fresca de frutos recién cosechados con acetona a -20 °C, con una relación de 15 ml de acetona por g de pulpa. El extracto del tejido vegetal en acetona se filtró a vacío y tras varios lavados con acetona y éter a -20 °C se obtuvo un polvo fino que se secó y conservó a -20 °C.

La obtención del extracto crudo se llevó a cabo triturando 0,125 g de polvo acetónico en 8,75 ml de tampón de extracción (borato sódico 0,1 M pH 9,0, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM y ditioneitol (DTT) 0,25 % (p/v)). La mezcla se homogeneizó en Ultra-Turrax a 24.000 rpm con tres pulsos de 30 s cada uno. Tras centrifugar a 27.000 *g* durante 20 min a 4 °C, el sobrenadante se filtró a través de tres capas de Miracloth, constituyendo el extracto crudo.

III.9. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

III.9.1. β -glucosidasa

III.9.1.1. Ensayo *in vitro* espectrofotométrico

Para la medida espectrofotométrica de la actividad BGLC se empleó el método descrito por (Romero-Segura, 2010). La actividad se cuantificó midiendo el incremento de absorbancia con respecto al tiempo de la mezcla de reacción a 405 nm, longitud de onda a la que absorbe el *p*-nitrofenol formado como consecuencia de la hidrólisis del sustrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG) por la actividad de la enzima BGLC.

La mezcla de reacción contenía, para un volumen final de 1,5 ml: tampón acetato sódico 50 mM pH 5,5, pNPG 15 mM y 25-50 μ l de extracto crudo (10-35 μ g de proteína) obtenido a partir de pulpa o 3-de aceituna μ l de preparación enzimática purificada obtenida a partir de preparaciones purificadas de *N. benthamiana* (3-4 μ g de proteína). La mezcla de reacción se incubó directamente en una cubeta termostaticada a 45 °C durante un minuto. Los controles del ensayo se realizaron añadiendo extracto enzimático inactivado mediante calentamiento a 100 °C durante 1 h, en lugar de extracto activo. Una unidad de actividad BGLC se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol de pNPG por min. El coeficiente de extinción molar (ϵ) del *p*-nitrofenol en el medio de reacción empleado fue 552,8 M⁻¹ cm⁻¹.

III.9.1.2. Ensayo *in vitro* mediante cromatografía líquida de alta resolución

El segundo método empleado para medir la actividad BGLC se basó en la cuantificación directa de la hidrólisis del glucósido fenólico mayoritario en el fruto de aceituna, la oleuropeína, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El equipo empleado y las condiciones de análisis se describen con más detalle en el apartado III.11.5.

La mezcla de reacción (200 μ l) estaba compuesta por acetato sódico 50 mM pH 5,5, oleuropeína 6,5 mM y 3-5 μ l de preparación enzimática purificada (3-4 μ g de proteína). La reacción se llevó a cabo durante 5 min a 40 °C, parándose mediante la adición del mismo

volumen de metanol y enfriando en hielo. Los controles del ensayo, igual que en el ensayo espectrofotométrico, se realizaron añadiendo extracto enzimático inactivado mediante calentamiento a 100 °C durante 1 h, en lugar de extracto activo. Una unidad de actividad BGLC se definió como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 μ mol de oleuropeína por min.

III.10. OTROS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

III.10.1. Determinación de la concentración de proteínas

El contenido de proteína de las distintas preparaciones enzimáticas se determinó según el método descrito por Bradford (1976), empleando dos tipos de reactivos comerciales diferentes.

Cuando se utilizó el reactivo de Bradford de la casa comercial Sigma-Aldrich (Estados Unidos) se tomó una alícuota de la muestra, se llevó hasta un volumen final de 0,25 ml con agua destilada y se añadieron 0,75 ml de reactivo. Después de agitar vigorosamente, la muestra se incubó durante 20 min y se determinó la A_{595} .

Si el reactivo empleado fue proporcionado por la casa comercial Bio-Rad (Estados Unidos), la alícuota de la muestra se llevó a un volumen final de 0,8 ml con agua destilada, se añadieron 0,2 ml de reactivo y la mezcla se agitó vigorosamente. Transcurridos 20 min de incubación se determinó la A_{595} .

Para cada tipo de reactivo se realizó la correspondiente recta de calibrado utilizando seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich) como patrón.

III.10.2. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE) al 10 % (p/v) en presencia del detergente SDS (dodecilsulfato sódico) se llevó a cabo según el protocolo de Laemmli (1970), empleando el equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad).

El gel separador se preparó mezclando 1,65 ml de una disolución de acrilamida/bisacrilamida (37,5:1) al 30 % (p/v), 1,25 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 50 μ l de

SDS al 10 % (p/v), 25 μ l de persulfato amónico (APS) al 10 % (p/v) y 2,5 μ l de N,N,N',N'-tetrametil-1,2-diaminometano (TEMED), completando con agua destilada hasta un volumen final de 5 ml. La preparación se aplicó entre las placas de cristal selladas, se cubrió con isopropanol y se esperó hasta su completa polimerización. A continuación, se preparó el gel de compactación, compuesto por 0,35 ml de la disolución de acrilamida/bisacrilamida (37,5:1) al 30 % (p/v), 0,65 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 25 μ l de SDS al 10 % (p/v), 25 μ l de azul de bromofenol 0,3 % (p/v), 25 μ l de APS al 10 % (p/v) y 5 μ l de TEMED, completando con agua destilada hasta un volumen final de 2,5 ml. Seguidamente, se retiró el isopropanol del gel de separación polimerizado, se aplicó la preparación del gel de compactación y se introdujo el peine para la formación de los pocillos. Después de la polimerización del gel de compactación, se retiró el peine y se lavaron los pocillos con agua destilada.

Las muestras de proteínas (5-15 μ g) se mezclaron con el volumen adecuado de tampón de desnaturalización 6x (Tris-HCl 0,35 M pH 6,8, SDS al 10 % (p/v), glicerol al 30 % (v/v), DTT 0,6 M y azul de bromofenol 0,175 mM), completando con agua destilada hasta un volumen final no superior a 25 μ l. Seguidamente, se desnaturalizaron las proteínas mediante incubación de las muestras durante 2 min a 100 °C y, tras enfriar en hielo, se aplicaron a los pocillos. La electroforesis vertical se llevó a cabo en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y SDS al 0,1 % (p/v)), aplicando una corriente de 10 mA por placa durante el gel de compactación y de 20 mA por placa una vez que el frente había llegado al gel de separación. Además de las muestras, se aplicó el marcador de peso molecular "PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder" (Thermo Scientific).

Cuando se quisieron visualizar las proteínas separadas después de la electroforesis, el gel se sumergió en la solución de tinción (azul coomasie R-250 al 0,1 % (p/v), metanol al 40 % (v/v) y ácido acético glacial al 7 % (v/v)) durante 20 min con agitación suave. Posteriormente, se destiñó en repetidas ocasiones sumergiéndolo en una solución de metanol al 5 % (v/v) y ácido acético glacial al 7 % (v/v) hasta que las bandas de proteínas aparecían teñidas de azul y el gel se decoloraba totalmente.

Para la determinación de la masa molecular de la proteína de interés, se representó el logaritmo de las masas moleculares de las proteínas patrón frente a sus movilidades electroforéticas relativas respecto al frente de electroforesis. La Fig. 16 muestra la recta patrón utilizada para la determinación de las masas moleculares de las BGLCs expresadas heterológicamente.

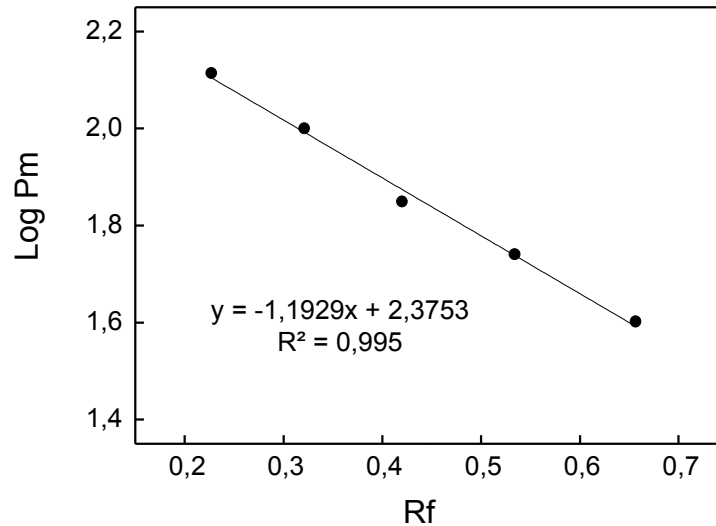


Fig. 16. Recta de calibrado del movimiento relativo de las proteínas patrón en función de su masa molecular en SDS-PAGE. Las masas moleculares de las proteínas patrón empleadas para la recta de calibrado fueron, de mayor a menor, 170, 130, 100, 70, 55 y 35 kDa.

III.10.3. Western blot y detección inmunológica de proteínas

Para la realización de esta técnica, una vez finalizada la electroforesis en condiciones desnaturizantes, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Sigma-Aldrich) mediante la aplicación de un campo eléctrico y se detectaron posteriormente mediante anticuerpos específicos. La transferencia se llevó a cabo en el equipo Mini Trans-Blot® (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, el gel se sumergió en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y metanol al 20 % (v/v)) durante 20 min. En la carpeta de transferencia se colocaron en orden ascendente los siguientes componentes previamente empapados en tampón de transferencia y evitando burbujas de aire entre las distintas capas: esponja, papel Whatman, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa, papel Whatman y esponja. Una vez cerrado y sellado, el conjunto se introdujo en el soporte y éste a su vez en la cubeta de transferencia que contenía el mencionado tampón previamente enfriado junto con una unidad de frío congelada. Posteriormente, se situó la cubeta sobre un agitador magnético y se transfirieron las proteínas mediante la aplicación de una corriente constante de 100 V durante 1 h. La calidad de la transferencia se comprobó mediante el empleo de patrones

de masa molecular preteñidos (“PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder”, Thermo Scientific). Además, el gel se tiñó después de la transferencia con azul de coomasie tal y como se indica en el apartado anterior para descartar transferencias incompletas.

Para bloquear la membrana de nitrocelulosa, ésta se sumergió durante toda la noche con agitación en una solución compuesta por tampón PBS (Na_2HPO_4 10,1 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM, pH 7,3) con leche desnatada en polvo al 10 % (p/v) y Tween-20 al 0,05 % (v/v). Seguidamente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario a la dilución adecuada en la mencionada solución de bloqueo durante 1 h con agitación suave. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó tres veces durante 5 min con agitación en tampón PBS y Tween-20 al 0,05 % (v/v). Posteriormente, la membrana se introdujo en la solución de bloqueo conteniendo el anticuerpo secundario a la dilución adecuada y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Tras tres nuevos lavados iguales a los anteriores, se procedió al revelado de la membrana.

Durante el desarrollo de este trabajo se han utilizado dos anticuerpos primarios diferentes. El primero de ellos fue un anticuerpo monoclonal comercial “Anti-His Antibody” (GE Healthcare) desarrollado en ratón, y que era específico para proteínas que contienen el motivo 6xHis. El segundo de ellos fue un anticuerpo policlonal anti BGLC desarrollado en conejo por el Servicio General de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla, empleando como antígeno una isoenzima BGLC purificada a partir de mesocarpo de aceituna mediante el método descrito por Romero-Segura *et al.* (2009). Por su parte, el anticuerpo secundario frente a anticuerpos primarios de ratón fue suministrado por Invitrogen, mientras que el anticuerpo secundario frente a anticuerpos primarios de conejo fue proporcionado por Sigma-Aldrich. Ambos anticuerpos secundarios utilizados estaban conjugados con fosfatasa alcalina.

Para la detección de la actividad fosfatasa alcalina después de la incubación con el anticuerpo secundario, la membrana se sumergió en una solución (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) 0,15 mg/ml y nitroazul de tetrazolio (NBT) 0,30 mg/ml), obtenida al disolver una pastilla “SIGMAFAST™ BCIP®/NBT” (Sigma-Aldrich) en 10 ml de agua destilada, y se incubó sin agitación hasta que se apreciaron las bandas detectadas, parándose la reacción al introducir la membrana en agua destilada.

III.11. CARACTERIZACIÓN DE ISOENZIMAS RECOMBINANTES PURIFICADAS BGLC DE OLIVO EXPRESADAS EN HOJAS DE *N. benthamiana*

III.11.1. Especificidad y selectividad de sustrato

Ante la imposibilidad de disponer del resto de los glucósidos fenólicos naturalmente presentes en el fruto de la aceituna además de la oleuropeína de forma individual, se realizó una mezcla de diferentes extractos fenólicos obtenidos a partir de distintas partes de la aceituna, como son la pulpa, la membrana seminal y el cotiledón (apartados III.12.3 y III.12.4), tratando de obtener concentraciones similares de todos los sustratos. La solución obtenida contuvo oleuropeína 5,1 mM, ligustrósido 3,9 mM y demetiloleuropeína 5,5 mM. La reacción enzimática se llevó a cabo tal y como se indica en el apartado III.9.1.2. de Materiales y Métodos.

III.11.2. Determinación de parámetros cinéticos

Con el objeto de determinar los parámetros cinéticos K_m y $V_{máx}$ de las isoenzimas purificadas, se realizó el correspondiente ensayo de la actividad enzimática descrito en el apartado III.9.1.2., utilizando oleuropeína como sustrato en un rango de concentración de 0,5-30 mM.

III.11.3. Efecto del pH

Con idea de establecer el pH óptimo de actuación de las isoenzimas purificadas, se llevaron a cabo medidas de actividad en diferentes soluciones tamponadas en un rango de pH entre 3,0 y 9,0 (tampones acetato, fosfato y borato sódico 50 mM), siguiendo el método descrito en el apartado III.9.1.2. con oleuropeína como sustrato.

III.11.4. Efecto de la temperatura

La determinación de la temperatura óptima de actuación de las isoenzimas recombinantes se llevó a cabo ensayando la actividad enzimática en un rango de

temperatura de 15-60 °C según el método descrito en el apartado III.9.1.2. con oleuropeína como sustrato. Para el estudio de estabilidad térmica de las isoenzimas recombinantes se incubaron alícuotas de las preparaciones purificadas a las temperaturas 40, 50, 55 y 60 °C durante diferentes tiempos en el rango de 0-60 min. Tras la incubación en hielo durante 2 min, se realizaron las medidas de actividad enzimáticas correspondientes tal y como se indica en el apartado III.9.1.2. con oleuropeína como sustrato.

III.12. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS

III.12.1. Extracción de aceite de oliva virgen

Los aceites se obtuvieron utilizando el sistema Abencor (Comercial Abengoa, S.A., Sevilla, España) que simula a escala de laboratorio el proceso industrial de producción de AOV (Martínez *et al.*, 1975). La molienda de las aceitunas (0,5-1 kg) se llevó a cabo en un molino de martillos de acero inoxidable a 3000 rpm equipado con un tamiz de 5 mm. La pasta resultante se sometió inmediatamente al proceso de batido en contenedores de acero inoxidable de 1,2 l a 50 rpm durante 30 min a 30 °C. Después del batido se procedió al centrifugado de la pasta empleando la centrífuga abierta del sistema Abencor a 3.500 rpm durante 1 min. Tras la centrifugación y posterior decantación, el aceite se filtró a través de papel y se almacenó inmediatamente a -20 °C en tubos de vidrio en atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación del aceite.

III.12.2. Extracción de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen

La extracción de compuestos fenólicos del AOV se llevó a cabo utilizando el método descrito por Mateos *et al.* (2001). Para el fraccionamiento de los fenoles del AOV se emplearon columnas de extracción en fase sólida (EFS) cuya fase diol retiene los compuestos polares y más específicamente aquellos que presentan grupos hidroxilo en su estructura molecular. Para la extracción se pesaron 2,5 g de aceite en un matraz cónico y se añadieron 0,5 ml de una disolución de patrones externos para la cuantificación de las

muestras que contenía los ácidos *p*-hidroxifenilacético y *o*-cumárico disueltos en metanol, en concentraciones 0,12 y 0,01 mg/ml, respectivamente. Tras la evaporación del metanol de las muestras mediante corriente de nitrógeno, el residuo oleoso se redisolvió en 6 ml de hexano. Seguidamente se activaron las columnas diol haciendo pasar 6 ml de metanol y 6 ml de hexano, evitando en todo momento el secado de la columna. Una vez cargada la disolución oleosa en la columna, se realizó un primer lavado con 6 ml de hexano para arrastrar aquellos componentes más apolares que hubieran quedado retenidos en la columna, tales como triglicéridos, ceras, tocoferoles e hidrocarburos, y un segundo lavado con 4 ml de hexano:acetato de etilo 85:15 (v/v) para eluir aquellos compuestos más polares, tales como los triglicéridos oxidados, esteroides y diglicéridos. Finalmente, los compuestos fenólicos se eluyeron con 10 ml de metanol sobre un matraz cónico y el disolvente se evaporó hasta sequedad en un rotavapor. El residuo seco se resuspendió en 0,5 ml de metanol:agua 1:1 (v/v) y se dejó reposar en oscuridad durante 4 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el extracto fenólico se filtró a través de un filtro de 0,2 μm y se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Todas las extracciones de fenoles de aceite se realizaron por duplicado.

III.12.3. Extracción de compuestos fenólicos de mesocarpo de aceituna

Para la extracción de compuestos fenólicos de la pulpa se siguió el método descrito por Del Río *et al.* (2003) con algunas modificaciones. En primer lugar, se sonicó durante 5 min pulpa de aceituna sumergida en DMSO en una proporción de 0,165 g de tejido por ml de DMSO, dejándose reposar durante 24 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se volvió a sonicar la mezcla durante 5 min y se centrifugó a 1.143 g durante 2 min. El extracto fenólico en DMSO se filtró a través de un filtro de 0,2 μm y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Todas las extracciones de fenoles de fruto se realizaron por duplicado.

III.12.4. Extracción de compuestos fenólicos de semilla de aceituna

La extracción de compuestos fenólicos presentes en la semilla de aceituna se llevó a cabo a partir de dos tejidos diferentes, el cotiledón y la membrana seminal, procedentes de aceitunas de la variedad Arbequina con 18 SDF. Se partió de 3 g de cotiledones y de 0,87

g de membrana seminal que se extrajeron por separado en frío utilizando 5 ml de etanol al 80 % (v/v) por g de tejido. La mezcla se homogeneizó empleando un Ultra-Turrax a 24.000 rpm mediante pulsos de 1 min. Tras la centrifugación a 27.000 g durante 30 min a 4 °C, se evaporó completamente el etanol mediante corriente de nitrógeno y el residuo seco se resuspendió en 1 ml de MeOH:H₂O (1:1). Las muestras se pasaron a través de un filtro de 0,22 µm para su posterior análisis por HPLC.

III.12.5. Análisis de compuestos fenólicos mediante cromatografía líquida de alta resolución

Los análisis de los extractos fenólicos de aceite, pulpa, semilla y membrana seminal se realizaron mediante HPLC según el método descrito por Mateos *et al.* (2001) con ligeras modificaciones. El equipo empleado fue un cromatógrafo líquido Beckman Coulter equipado con un módulo de bomba 126 y detector diodo array 168 y una columna de fase reversa (C₁₈) "Mediterranea Sea 18" (4,0 mm d.i. x 250 mm, micropartícula de relleno 5 µm) (Teknokroma, Barcelona, España). La fase móvil utilizada fue una mezcla de ácido fosfórico (0,5 % v/v) (disolvente A) y metanol:acetonitrilo (50:50 v/v) (disolvente B), con un flujo de 1 ml/min. El análisis de los compuestos se realizó bajo control de temperatura a 35 °C. La detección se llevó a cabo a 235, 280 y 335 nm y el *loop* de inyección de muestra fue de 20 µl. El gradiente de elución utilizado se describe en la Tab. 9.

Tab. 9. Gradiente de elución aplicado en el análisis de los compuestos fenólicos por HPLC. % B: Porcentaje de la fase B (metanol:acetonitrilo 50:50 v/v).

Tiempo (min)	% B
0-25	5-30
25-35	30-38
35-40	38-38
40-45	38-45
45-50	45-100
50-53	100-100
53-54	100-5
54-61	5-5

La cuantificación del ácido cinámico y los compuestos fenólicos, excepto el ácido ferúlico y las flavonas, se realizó a 280 nm utilizando el ácido *p*-hidroxifenilacético como patrón interno. Las flavonas y el ácido ferúlico se cuantificaron a 335 nm, siendo el ácido *o*-cumárico el patrón interno utilizado en este caso. Se calcularon los factores de respuesta de los distintos compuestos y se confirmó su identidad por HPLC acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) usando una bomba 126 con un detector diodo array 168 (Beckman, Inc., USA) en línea con un espectrómetro de masas (Finnigan Mat, Bremen, Alemania) equipado con una fuente de ionización ESI-II con la misma columna y condiciones de gradiente previamente descritas.

En la Fig. 17 y la Fig. 18 se presentan los cromatogramas correspondientes a extractos fenólicos de muestras de aceites y frutos de las variedades Picual y Arbequina registrados a 280 y 335 nm.

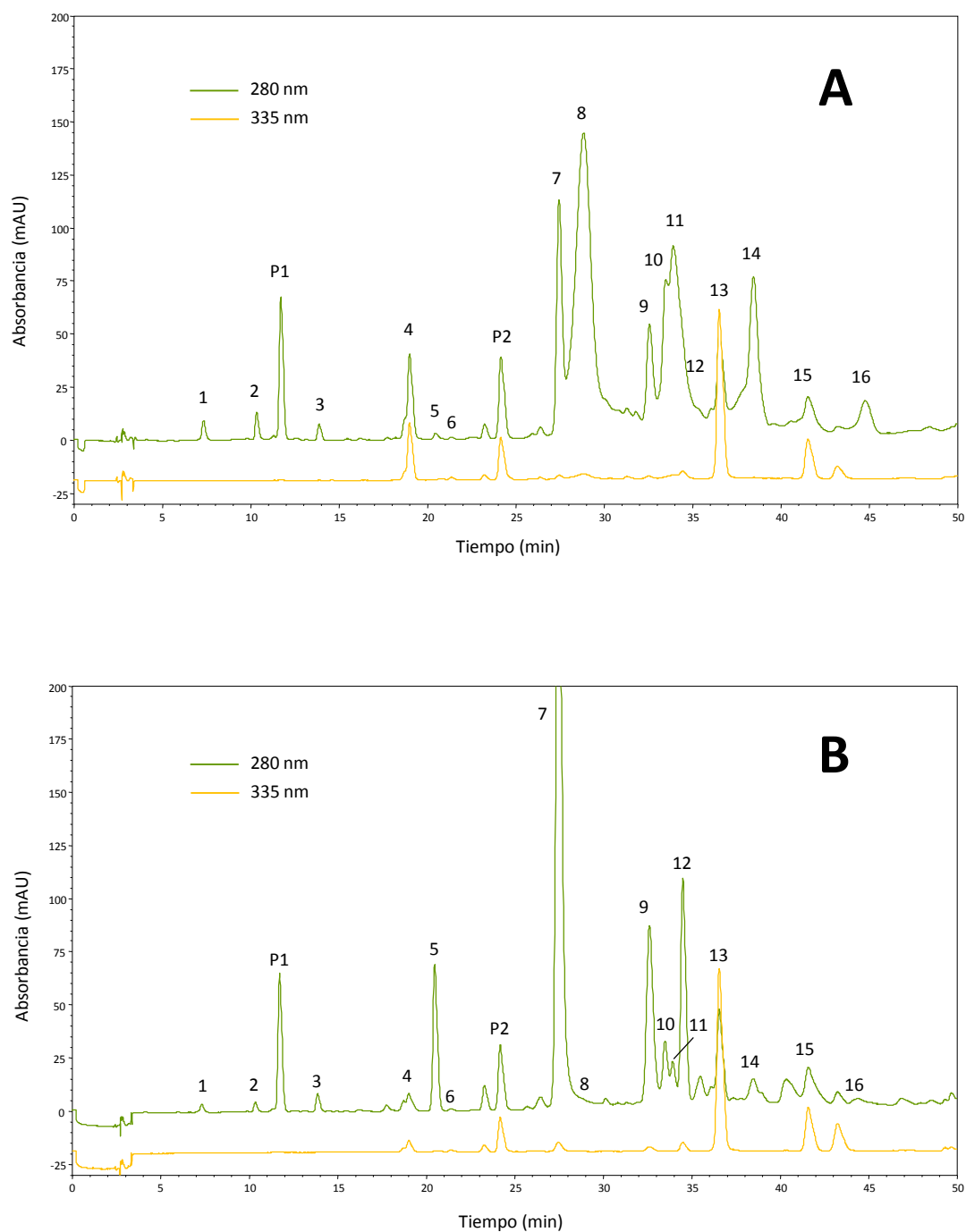


Fig. 17. Perfiles fenólicos típicos de aceites de la variedad Picual (A) y Arbequina (B) registrados a 280 y 335 nm. Los picos cromatográficos de los análisis A y B corresponden a los siguientes compuestos: 1. Hidroxitirosol, 2. Tirosol, P1 (patrón interno 1) Ácido *p*-hidroxiacético, 3. Ácido vanílico, 4. Ácido *p*-cumárico, 5. Acetato de hidroxitirosol, 6. Ácido ferúlico, P2 (patrón interno 2). Ácido *o*-cumárico, 7. Forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína descarboximetilada (DAOD), 8. Isómeros de AAO, 9. Forma dialdehídica de la aglucona del ligustrósido descarboximetilado (DALD), 10. Pinorresinol, 11. Ácido cinámico, 12. 1-Acetoxipinorresinol, 13. Luteolina, 14. Forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína (AAO), 15. Apigenina, 16. Forma aldehídica de la aglucona del ligustrósido (AAL).

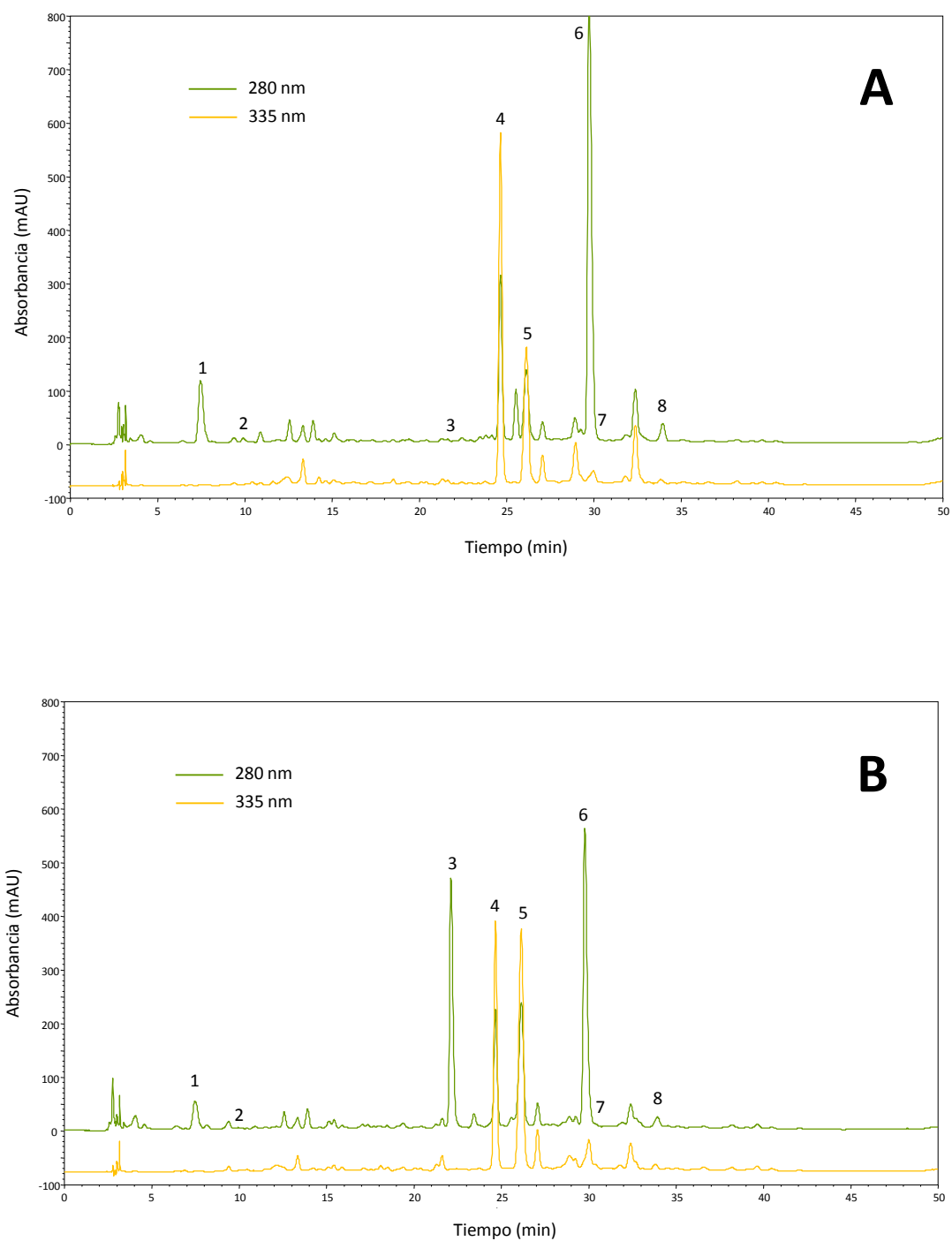


Fig. 18. Perfiles fenólicos típicos de frutos de la variedad Picual (A) y Arbequina (B) registrados a 280 y 335 nm. Los picos cromatográficos de los análisis C y D corresponden a los siguientes compuestos: 1. Glucósido de hidroxitirosol + Hidroxitirosol, 2. Tirosol, 3. Demetiloleuropeína, 4. Verbascósido, 5. Luteolin-7-glucósido, 6. Oleuropeína, 7. Apigenin-7-glucósido, 8. Ligustrósido.

En la Fig. 19 se muestran los perfiles de compuestos fenólicos resultantes de los análisis de los extractos fenólicos de cotiledón y membrana seminal registrados a 280 y 335 nm.

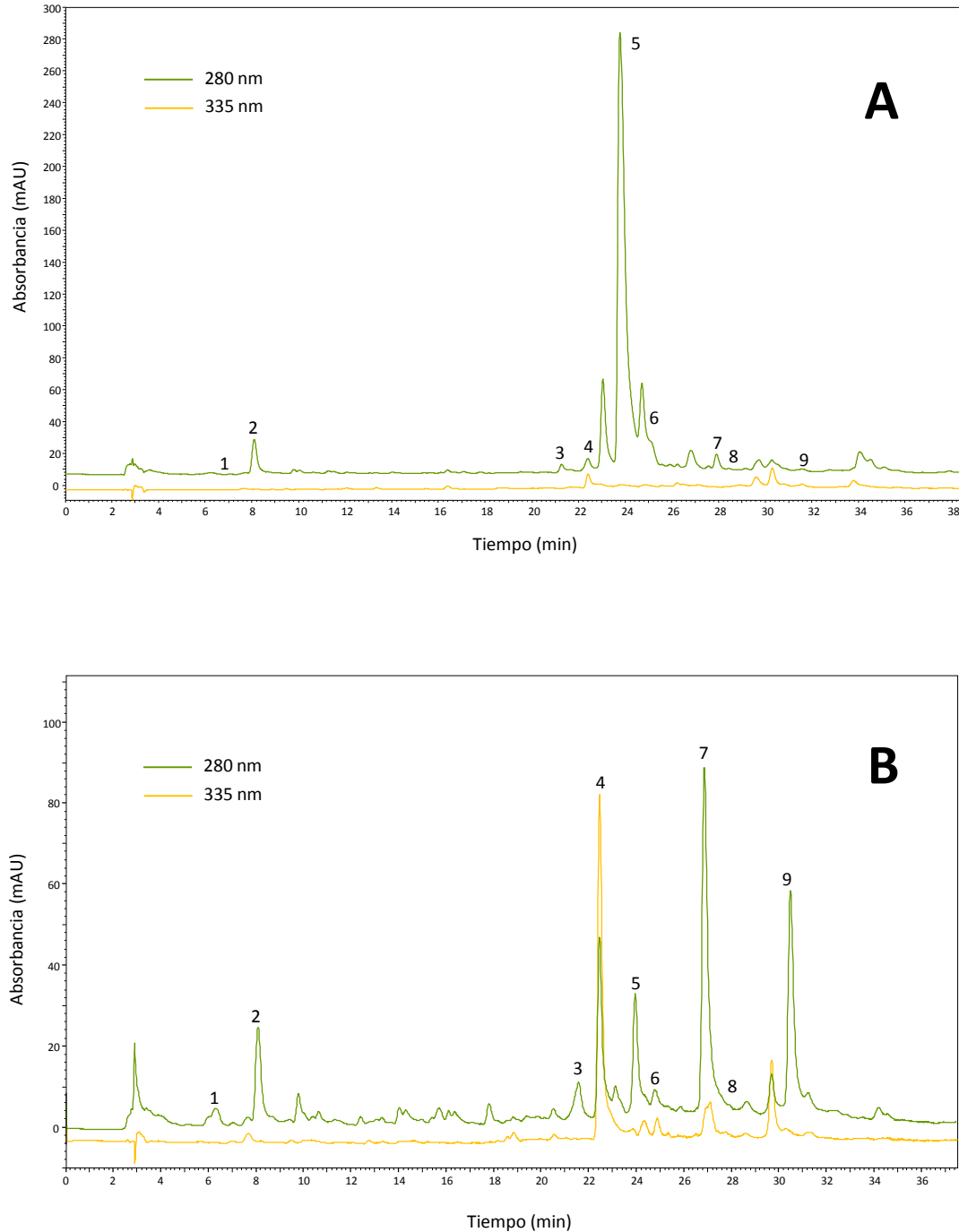


Fig. 19. Perfiles fenólicos obtenidos a partir de extractos etanólicos de cotiledón (A) y membrana seminal (B) registrados a 280 y 335 nm. Los picos cromatográficos de los análisis A y B corresponden a los compuestos: 1. Glucósido de hidroxitirosol + Hidroxitirosol, 2. Tiroso, 3. Demetiloleuropeína, 4. Verbascósido, 5. Nuzhénido; 6. Luteolin-7-glucósido, 7. Oleuropeína, 8. Apigenin-7-glucósido, 9. Ligustrósido.

III.13. REACTIVOS Y APARATOS

III.13.1. Reactivos

Los componentes empleados para la preparación de los medios de cultivo y la agarosa fueron suministrados por Pronadisa (España).

Todos los tampones orgánicos, sales orgánicas e inorgánicas, detergentes, enzimas, compuestos orgánicos, membranas de nitrocelulosa, reactivo revelador de la actividad fosfatasa alcalina, solución de acrilamida/bisacrilamida, solución de reactivo de Bradford, azul de Coomasie y antibióticos fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

El papel Whatman y la solución de reactivo de Bradford fueron suministrados por Bio-Rad.

Los disolventes orgánicos, ácidos y bases utilizados en los estudios bioquímicos fueron suministrados por Panreac (España), mientras que los empleados en biología molecular se adquirieron a Merck (Alemania).

El IPTG, X-Gal, tampones de carga, enzimas de restricción, RNasa A, marcadores de masa molecular de ácidos nucleicos y proteínas, y dNTPs fueron proporcionados por Thermo Scientific. El azul de bromofenol fue suministrado por Millipore (Estados Unidos).

Los glucósidos fenólicos oleuropeína y verbascósido fueron suministrados por Extrasynthese (Francia), mientras que el resto de ellos fueron obtenidos a partir de extractos de diferentes partes del fruto.

El fenol fue suministrado por Applichem (Alemania).

Las columnas de Ni-sefarosa para la purificación de proteínas, las columnas de Sephadex G25 PD-10 y los microconcentradores para la ultrafiltración fueron suministrados por GE Healthcare (Reino Unido).

Los gases utilizados fueron suministrados por Carbuos Metálicos y Air Liquide, al igual que el nitrógeno líquido.

El agua utilizada en los experimentos de bioquímica se purificó mediante ósmosis inversa y posteriormente se desionizó mediante un desionizador "Sation" modelo 8000P. Para biología molecular y para la preparación de medios de cultivo se utilizó agua de grado Milli-Q, purificada mediante un sistema de cartuchos de purificación de agua Millipore.

III.13.2. Aparatos

El estudio del efecto de los factores abióticos se realizó en incubadores de precisión con control de temperatura, luz y humedad J.P. Selecta, modelo HOTCOLD-GL.

Para el crecimiento de microorganismos se utilizó el incubador con agitación orbital Infors modelo Ecotron ET25-TA-RC. La campana de flujo laminar horizontal usada para trabajar en condiciones de esterilidad fue de la marca Telstar, modelo AH-100.

Para la esterilización por filtración se usaron filtros de 0,2 μm (Sarstedt, Alemania) y en el caso de autoclavado se utilizó un Presoclave de 75 l J.P. Selecta.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en diferentes tipos de centrífugas dependiendo del volumen y la velocidad requerida. Para centrifugaciones a baja velocidad se usaron las centrífugas de mesa J.P. Selecta y Heraeus refrigerada modelo Megafuge 1.0 R. Para centrifugaciones a alta velocidad se usaron una centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC5C, equipada con los rotores SS-34 y GSA.

Para el homogeneizado de las muestras se empleó un equipo dispersor Ultra-Turrax® modelo T25 basic (Ika®-Werke, Alemania).

Las amplificaciones por PCRs se realizaron en un termociclador MJ Research modelo PTC-200 y para las qRT-PCR se utilizó el termociclador MX3000P de Stratagene.

El sistema de electroforesis horizontal de DNA y el sistema de electroforesis vertical de proteínas Mini-PROTEAN® Tetra Cell acoplado al de transferencia de proteínas a membranas Mini Trans-Blot®, fueron de la casa Bio-Rad.

La visualización de bandas de ácidos nucleicos separadas en geles de agarosa y poliacrilamida se realizó en un transiluminador ChemiGenius2 (Syngene, Estados Unidos), el cual incluye una cámara FIREWIRE CCD de alta resolución y está acoplado a un ordenador con el programa GeneSnap para determinar las condiciones de captura de la fotografía del gel. Cuando las bandas de DNA separadas en geles de agarosa se cortaron para su posterior purificación, se visualizaron en un transiluminador Vilber Lourmat (Alemania) modelo ECX-20.M.

La cuantificación de proteínas, la determinación de la densidad óptica de cultivos de microorganismos y la medida de actividad BGLC se llevó a cabo en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-640, equipado con lámparas de tungsteno (visible) y deuterio (ultravioleta). Para la cuantificación de ácidos nucleicos se usó un espectrofotómetro ND-

1000 (Nanodrop, Estados Unidos) que permite la determinación de la absorbancia usando solamente 1 μ l de muestra.

Para el análisis de los compuestos fenólicos mediante HPLC se utilizó un cromatógrafo líquido Beckman Coulter (Beckman Inc., Estados Unidos) equipado con un módulo de bomba 126 y detector diodo array 168 y una columna de fase reversa (C18) Mediterránea Sea 18 (4,0 mm d.i. x 250 mm, micropartícula de relleno 5 μ m) (Teknokroma, Barcelona, España). La identificación de los compuestos fenólicos analizados fue confirmada mediante HPLC-MS usando el equipo antes mencionado acoplado a un detector de masas MAT 95S (Finnigan, Alemania) equipado con una interfase de electroevaporación ESI-II.

El equipo confocal de barrido láser utilizado en los experimentos de localización subcelular fue el modelo Zeiss LSM 510 META, dotado con un microscopio Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss Ltd, Reino Unido). Las imágenes se adquirieron usando los objetivos Plan-Neofluar 20x/0,5 y Apochromat 63x/1,4 de inmersión.

IV. RESULTADOS

IV.1. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE cDNAs CORRESPONDIENTES A β -GLUCOSIDASAS DE OLIVO

IV.1.1. Aislamiento de clones de cDNA

A partir de la base de datos de ESTs de olivo generada en el proyecto OLEAGEN, se realizaron búsquedas de nuevas secuencias que mostraran un alto grado de similitud con la del gen *BGLC* de olivo de la variedad picual *OepBGLC1*, previamente aislado y caracterizado en nuestro grupo (Romero-Segura, 2010). Tras confirmar que las secuencias obtenidas presentaban una alta similitud con otras proteínas BGLC de plantas, se escogieron aquéllas que mostraban un alto nivel de expresión en mesocarpo a partir de los datos del análisis de expresión *in silico* generado también en el proyecto OLEAGEN. De esta forma, se seleccionaron tres nuevas secuencias que se denominaron *OepBGLC2*, *OepBGLC3* y *OepBGLC4*. Mientras que en las secuencias *OepBGLC2* y *OepBGLC3* se pudo distinguir una región codificante completa, la secuencia *OepBGLC4* carecía del extremo 5' codificante y no codificante, tratándose por tanto de una secuencia parcial.

El extremo 5' ausente en la secuencia parcial de *OepBGLC4* se obtuvo mediante amplificación por PCR. Para ello, se diseñaron dos oligonucleótidos reversos específicos de la región 5' de la secuencia parcial. Estos oligonucleótidos, junto con el mismo oligonucleótido directo SK específico de la región 5' del sitio de clonación múltiple del vector Uni-ZAP XR, se usaron en la reacción de PCR utilizando como molde una alícuota de la genoteca de cDNA de aceituna. De esta forma se obtuvo el fragmento correspondiente a la región 5' de *OepBGLC4*, el cual se aisló y se secuenció. El fragmento obtenido presentaba una región 5' no codificante y un codón de iniciación de la traducción (ATG), seguido de una secuencia codificante que solapaba con la secuencia de la región 5' ya conocida del gen *OepBGLC4*.

Finalmente, para la obtención de los clones completos de cDNA de los genes *OepBGLC2*, *OepBGLC3* y *OepBGLC4*, se diseñaron parejas de oligonucleótidos directos y reversos a partir de las regiones 5' y 3' no codificantes de cada gen. Estos oligonucleótidos se usaron en la reacción de PCR junto a una alícuota de la genoteca de cDNA de aceituna, utilizándose una DNA polimerasa con actividad correctora de errores para evitar fallos en las secuencias introducidos durante la amplificación. Como resultado se obtuvieron tres

fragmentos de diferentes tamaños, los cuales fueron aislados y secuenciados en las dos direcciones para comprobar que se trataba de clones completos de cDNA.

OepBGLC2, *OepBGLC3* y *OepBGLC4* presentaron un tamaño de 1771, 1761 y 1688 pb, respectivamente. A partir de las regiones codificantes de los genes *BGLC*, se dedujeron proteínas de 517, 506 y 513 aminoácidos con una masa molecular calculada de 58,6, 56,9 y 57,8 kDa y pI de 5,4, 5,7 y 5,8 para *OepBGLC2*, *OepBGLC3* y *OepBGLC4*, respectivamente. A ambos lados de las regiones codificantes de los genes se encontraban las regiones 5' y 3' no codificantes de 36 y 181 pb, respectivamente, para *OepBGLC2*; de 30 y 210 pb, respectivamente, para *OepBGLC3*; y de 6 y 140 pb, respectivamente, para *OepBGLC4*. del péptido señal de 493, 485 y 486 aminoácidos con una masa molecular de 56, 54,7 y 55,0 kDa, un punto isoeléctrico de 5,6, 5,6 y 5,7, respectivamente.

IV.1.2. Análisis de las secuencias

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes *BGLC* de olivo (Fig. 20) mostró que *OepBGLC2*, *OepBGLC3* y *OepBGLC4* presentaban un 40, 38 y 38 % de identidad con respecto a *OepBGLC1*, respectivamente. Además, *OepBGLC2* presentó un 43 y 41 % de identidad con respecto a *OepBGLC3* y *OepBGLC4*, respectivamente, mientras que *OepBGLC3* y *OepBGLC4* compartían entre sí un 80 % de identidad. Las secuencias de aminoácidos de *OepBGLC2*, *OepBGLC3* y *OepBGLC4* mostraron altas similitudes con las secuencias conocidas de *BGLCs* de plantas. La *BGLC* de *Vitis vinifera* (*VvBGLC2*; XM_003632325) mostró los valores más altos de identidad tanto con *OepBGLC3* (66 %) como con *OepBGLC4* (63 %), mientras que en el caso de *OepBGLC2*, el máximo valor se obtuvo con las *BGLC* de *Pinus contorta* (*PcBGLC*, AF072736) con una identidad del 50 %.

Como se muestra en la Fig. 20, las secuencias de las *BGLCs* de olivo poseían los motivos típicos de la familia GH1 (YRFS, TLNEP, LGINYY, YITENG y DNFEW), conservados en un mayor o menor grado según la secuencia considerada. Dos de estas regiones altamente conservadas (TLNEP y YITENG) poseen sendos residuos de ácido glutámico implicados en el sitio activo de la enzima y responsables de la catálisis enzimática. También se observan los residuos altamente conservados del bolsillo de unión a la parte azucarada de la molécula de sustrato. Todos estos residuos estaban presentes en las cuatro *BGLCs* de olivo con la excepción del último, un residuo de triptófano que está presente en *OepBGLC1* y

OepBGLC2 en las posiciones 490 y 472, respectivamente, y que ha sido reemplazado por un residuo de leucina en el caso de OepBGLC3 y OepBGLC4 en las posiciones 448 y 449, respectivamente. El análisis de las secuencias con los programas informáticos “NCBI conserved domain search” y “Pfam” reveló que todas las BGLCs de olivo contenían un único dominio conservado que confirmaba su pertenencia a la familia GH1. Las predicciones sobre los posibles sitios de N-glicosilación que se realizaron con el programa “NetNGlyc 1.0” mostraron que mientras OepBGLC1 poseía un único sitio posible de N-glicosilación en la posición N83, el resto de las BGLCs de olivo presentaron varios: 3 para OepBGLC2 en las posiciones N225, N279 y N423; 4 para OepBGLC3 en las posiciones N219, N268, N405 y N430; y 4 para OepBGLC4 en las posiciones N215, N220, N269 y N406 (Fig. 20).

Las predicciones de tres programas bioinformáticos (Target P, WoLF PSORT y ProtComp) sugerían una localización en el espacio extracelular o apoplasto para OepBGLC3 y OepBGLC4, mientras que para OepBGLC2, no existió consenso entre los programas empleados, siendo la localización apoplástica la más probable. Además, dichas predicciones indicaron que OepBGLC2, OepBGLC3 y OepBLGC4 presentaban péptidos señal en el extremo N-terminal de 24, 21 y 22 aminoácidos, respectivamente (Fig. 20).

OepBGLC1 : MDIQSNVLTITSGSSPTDTSNGQAAKSTKERIKRSDFPSDFVFGAATAS : 50
 OepBGLC2 : MEISSHIVFLILGVLLSPFLVECHLKTLYRSDTSQFPPNFLILGTSSSS : 50
 OepBGLC3 : MLLQASSLLSLT-----FLILTT--AAHGGDYSRADFPADFI FGSGTSA : 41
 OepBGLC4 : -MLQPSAFLSLT-----FLILAASAAAHGGDYNRADFPADFVFGSGTSA : 42

OepBGLC1 : YQVEGAWNEGGKMSNWDYFTQSOPGGISDFSNETTAIDHFNMFKDDVVV : 100
 OepBGLC2 : YQVEGAYTADGKGLSNWDVFTHEQGT-IADGTNGDIAADQYHRYLEDIDL : 99
 OepBGLC3 : YQVEGAAFDDGRTPSIWDI FAHSG---RTHGATGDVACDGYHKYKEDIGL : 88
 OepBGLC4 : YQVEGAAFEDGRTPSIWDTMAYSG---HSGGATGDVACDGYHKYKEDIGL : 89

OepBGLC1 : MKKLGKAYRFSLSWPRIIPGGRLCHGVSKEGVQFYNDLIDALLAADIEP : 150
 OepBGLC2 : MASMGNRYRFSISWARILPKGKY-GAVNLAGIDYNNKLIDALLLKEIQP : 148
 OepBGLC3 : MVDTNLEAFRLSISWSRLIPNGR--GPINPKGLEYYNNLIDELISHGIQP : 136
 OepBGLC4 : MLDMHLEAFRLSISWSRLIPNGR--GPINPKGLEYYNNLIDELISHGIQP : 137

OepBGLC1 : YITLHFWDI PQCLQLEYGGFLHERVVQDFIEYSEICFWFEGDRVKYWITL : 200
 OepBGLC2 : FPTLVHYDI PQDLEERYGGWLSPKSQEDLEYFADVCFQNFQDRVKYWVTF : 198
 OepBGLC3 : HVTLNHIDL PQALEDEYGGWLSRKIVKDFVYADTCFREFGDRVLYWTTV : 186
 OepBGLC4 : HVTLHMDLPQALDDEYGGWLSLKIIVKDFVYADTCFREFGDRVLYWTTI : 187

OepBGLC1 : NEPWSFTVQGYVAGAFPPNRRGVT PKDTEETKKHARLHRGGKLLTAFKYG : 250
 OepBGLC2 : NEPNVEAIAQAYRFGRYPPS-----HCSKGFQ-NCTTG : 229
 OepBGLC3 : NEANIEAIAAGYNDGI IAPG-----RCSPSLGTNCSTG : 218
 OepBGLC4 : NEANIEAIAAGYDEGSSPPG-----HCSLPVQNNCSKG : 219

OepBGLC1 : NPGTEPMKVAHNLI LCHAHAVDIYRTKYQESQGGKIGITNCISWNEPLTD : 300
 OepBGLC2 : NSETEPFTAAHNMI LAHAAVNLYRTKYKKQGGGLIGLTVQDLWFEPKSN : 279
 OepBGLC3 : NSSIEPYIVVHNILLAHSAATKLYRKKYKFTONGFLGLNVYTLWFIPDIN : 268
 OepBGLC4 : NSSIEPYIVGHNILLAHSAAVKLYKKYKSTONGFVGFNIYSFWFVPIYN : 269

OepBGLC1 : SQEDKDAATRGNDFMLGWFVEPVVTGEYPESMIKNVGDRLPKFSEKEEKL : 350
 OepBGLC2 : STADKLAIERAHAF LSNWFDPVILGKYPTMKDILGSTLPEFSKNDLVK : 329
 OepBGLC3 : STEDVIATQRAKDFYVGWLVDPVIFGDYPDIVKKNVGKRLPAFTYEESKQ : 318
 OepBGLC4 : STEDVIATQRAKDFYIGWLVDPVIYGDYPESVKNVVGKRLPAFTKYESEQ : 319

OepBGLC1 : VKGSYDFELGINYYTSTYTS-----DPTKPTTDSYLTDSRTKTSHERNKV : 395
 OepBGLC2 : IQSSIDFELGINYYAAFYVEDCMFSTCPAIPGAS--RTEGFIKQTTQKDKGI : 377
 OepBGLC3 : IKGSVDFELGVNHYITVHIKD-----KPSILKMN--NRD-FYDDMAVKIYY : 360
 OepBGLC4 : IKGSIDFELGVNHYITLYIKD-----NPGNLQID--NRD-FDTDIAIEIKY : 361

```

OepBGLC1 : PIGAQAGSDWLYIVPWGIYRVMVDMKKRYNDPVIYITENGVDEVNDKSKT : 445
OepBGLC2 : PLCEPTGMPYFHAYPEGLEKMTYIKERFNNTPIIITENGYCDDSNSTST : 427
OepBGLC3 : DQGNPEP-TDEYATMPWGLYGVLEYLQVYGNLPIYVHENGQMTFRNGT-- : 407
OepBGLC4 : SQCKEI-PDQYPTMPOGLYGVLEYLQVYGNLPIYVHENGQLARFNGT-- : 408

```

*

```

OepBGLC1 : STEATKDDIRTHYHQEHLYYLKLAMDQGVNLKGYFIWLSLFDNFEWAAGFS : 495
OepBGLC2 : IEESVNDIKRVKFAQSYLDALSTAIRKGADVIRGYFLWSLFDNFEWTFGYT : 477
OepBGLC3 : ----LYDKSRVEYLRAYIGGMLDAIRNGSNTRGYFAWTFDCELELLDGYG : 453
OepBGLC4 : ----LYDKSRVEYMHAYIGSMLDAIRNGSNTRGYFQWTFDCELELLGGYW : 454

```

▲ ▲

```

OepBGLC1 : VREGVMYVDYANGRYTRLPKRSAVWWRNFLTKPTAVPLKNEPEKSEDRRK : 545
OepBGLC2 : KRYGLYYVDQ--VTIERTPKLSATWFRNFIAE----NIR-----AEPRAN : 516
OepBGLC3 : TSFGLLYVDLDDKNLTRYPKLSAHWYSNFLKG----KSTSSNAITEVGDN : 499
OepBGLC4 : PSFGLYYVDLDDKNLTRYPKLSAHWYSNFLKR----KLAASNAITEVGYN : 500

```

```

OepBGLC1 : RLRGSTM : 552
OepBGLC2 : S----- : 517
OepBGLC3 : AFVPWIG : 506
OepBGLC4 : TIVPRTS : 507

```

Fig. 20. Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes *BGLC* de olivo.

Los residuos idénticos y similares se muestran con un fondo negro y gris, respectivamente. Los motivos conservados de la familia GH1 se muestran encuadrados en color naranja. Los dos residuos conservados de ácido glutámico implicados en el centro activo se indican con un asterisco. Los residuos conservados implicados en la unión de la enzima con la molécula de glucosa se encuentran señalados con un triángulo azul. Las secuencias de los péptidos señal se encuentran subrayadas en verde. Los sitios de N-glicosilación se encuentran encuadrados en amarillo.

En la Fig. 21 pueden observarse las estructuras tridimensionales obtenidas para las cuatro isoenzimas con el programa Swiss Model tomando como referencia dos modelos cristalográficos diferentes: 3u57B correspondiente a una BGLC de *Rauvolfia serpentina* con número de acceso AF149311 (Xia *et al.*, 2012) para OepBGLC1, y 3gnpA correspondiente a la BGLC de *Oryza sativa* con número de acceso AY129294 (Seshadri *et al.*, 2009) para OepBGLC2, OepBGLC3 y OepBGLC4.

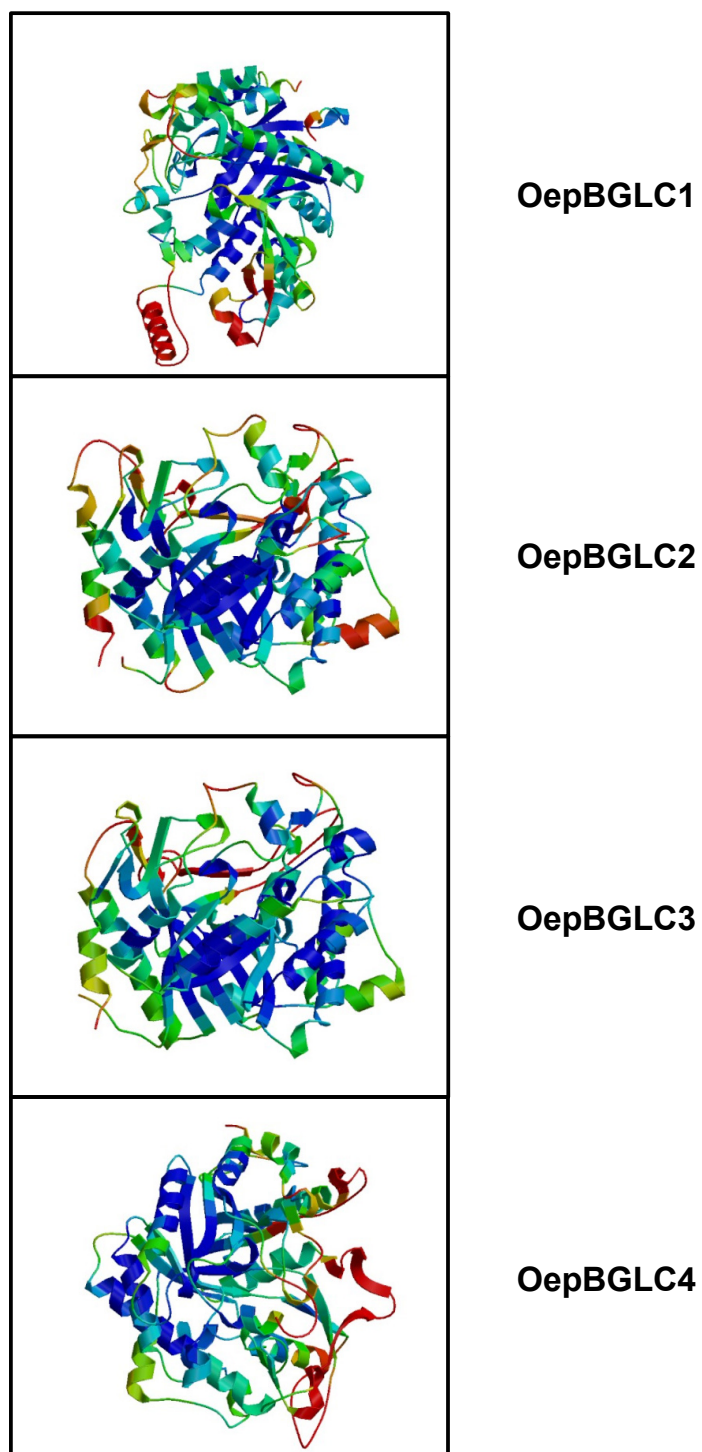


Fig. 21. Modelado de la estructura tridimensional de las BGLC de olivo. En las estructuras tridimensionales obtenidas con Swiss Model, las regiones con predicción más fiable están coloreadas en azul, mientras que las marcadas en rojo tienen una menor fiabilidad.

Para establecer las relaciones filogenéticas de los genes *BGLC* de olivo, se incluyeron en un dendograma sus secuencias de aminoácidos deducidas junto con las secuencias de aminoácidos seleccionadas de BGLCs de plantas (Fig. 22). El árbol filogenético se enraizó con la BGLC de *Caenorhabditis elegans*. Las isoenzimas vegetales BGLC se agrupaban según su pertenencia al grupo de las monocotiledóneas o dicotiledóneas. Por otra parte, OepBGLC1 se situó claramente en una rama diferente respecto a OepBGLC2, OepBGLC3 y OepBGLC4, las cuales quedaron ubicadas en el dendograma muy próximas entre sí. Mientras OepBGLC1 queda agrupada con un conjunto de isoenzimas implicadas en el metabolismo secundario de diversos compuestos, el resto de isoenzimas BGLC de olivo se sitúan en una rama del árbol en la junto con otras BGLCs de las cuales existe escasa información sobre los sustratos que hidrolizan.

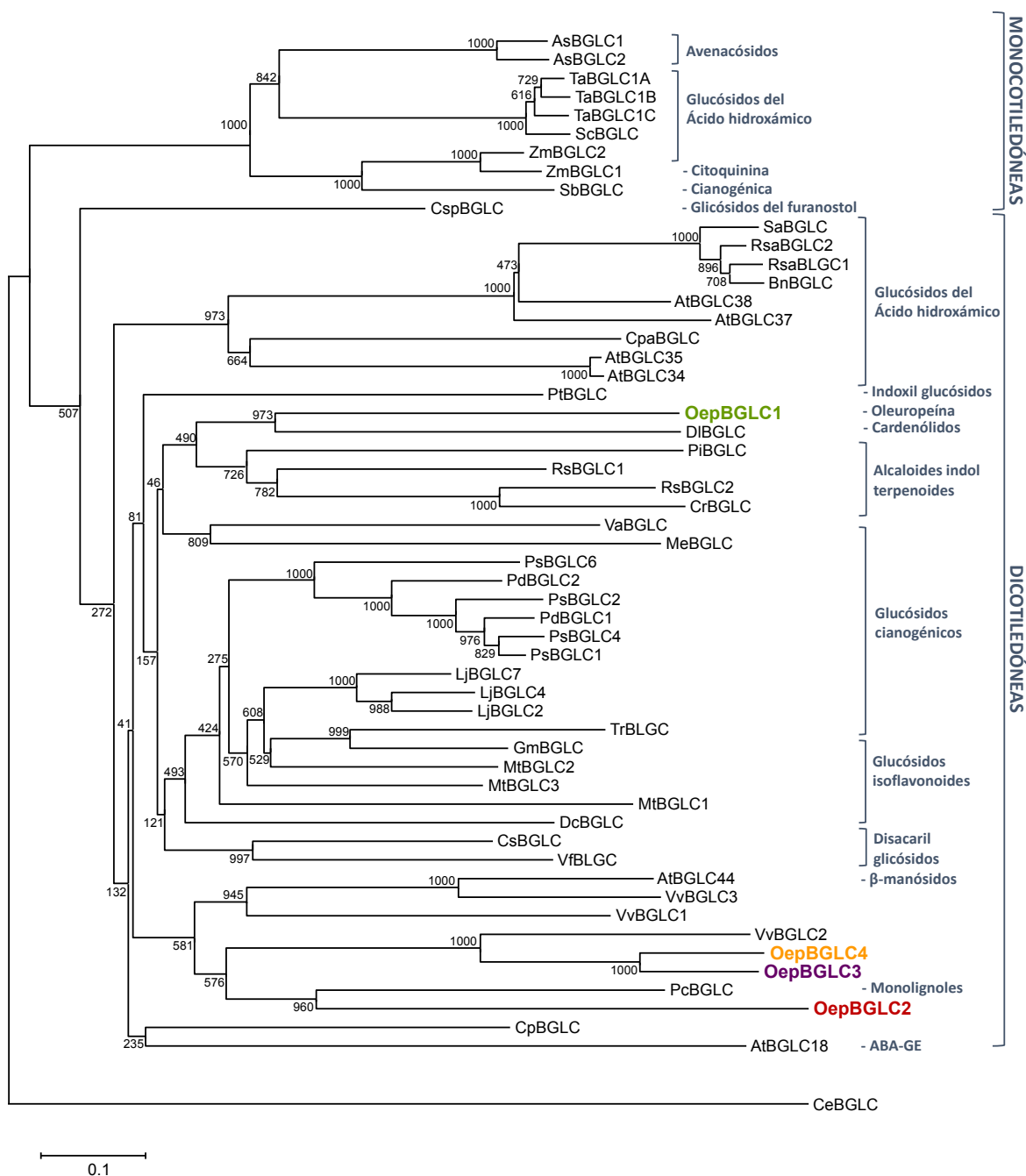


Fig. 22. Análisis filogenético de las enzimas BGLC de plantas. Las BGLCs de olivo caracterizadas en este trabajo se encuentran resaltadas en el árbol con colores. Los números de acceso de las BGLCs incluidas en este análisis se encuentran recogidos en el cuadro anexo de la Tab. 16.

IV.2. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS GENES *BGLC* DE OLIVO Y PURIFICACIÓN DE LAS ISOENZIMAS RECOMBINANTES

IV.2.1. Sobreexpresión de los genes *BGLC* de olivo en *E. coli*

Para confirmar la identidad funcional de los cuatro genes *BGLC* de olivo y caracterizar las propiedades bioquímicas de las isoenzimas recombinantes, se amplificaron por PCR las regiones codificantes de dichos genes excluyendo las secuencias N-terminales de los péptidos señal con la salvedad del gen *OepBGLC3*, que fue amplificado con y sin el posible péptido señal ya que la probabilidad de su existencia no era especialmente alta de acuerdo con la predicción bioinformática obtenida. Los correspondientes fragmentos amplificados se subclonaron en el vector pET-45b(+) bajo el control del promotor inducible T7. Los plásmidos obtenidos se denominaron pET-45b(+)OepBGLC1, pET-45b(+)OepBGLC2, pET-45b(+)OepBGLC3, pET-45b(+)OepBGLC3+SP y pET-45b(+)OepBGLC4 y se utilizaron para la transformación de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*. Tras la inducción de la expresión de los genes que codifican las proteínas BGLC recombinantes de fusión conteniendo el motivo 6xHis en el extremo N-terminal, se llevó a cabo la rotura de las células y se obtuvieron los correspondientes extractos crudos. El análisis de las distintas preparaciones obtenidas mediante SDS-PAGE mostró la presencia en las fracciones totales de las células transformadas de bandas con la masa molecular esperada para proteínas BGLC, las cuales no se observaban en la fracción total obtenida de las células transformadas con el plásmido vacío (Fig. 23A). Sin embargo, las bandas de proteínas mencionadas no se observaron en los correspondientes extractos crudos (Fig. 23B). Este hecho indicaba que las proteínas estaban siendo expresadas en forma insoluble, muy posiblemente debido a la formación de cuerpos de inclusión. Las masas moleculares de las proteínas sobreexpresadas fueron de 66,7, 63,5, 60,1, 59,8 y 60,1 kDa para OepBGLC1, OepBGLC2, OepBGLC3+SP, OepBGLC3 y OepBGLC4, respectivamente.

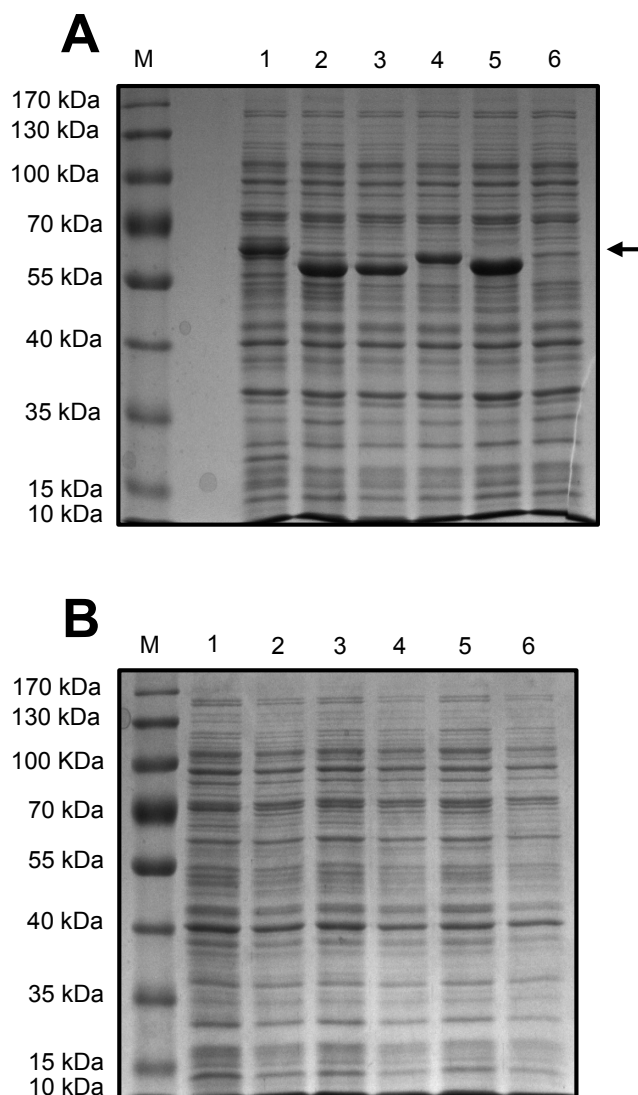


Fig. 23. SDS-PAGE de fracciones totales (A) y extractos crudos (B) de células de *E. coli* que sobreexpresan los genes *BGLC* de olivo. Se obtuvieron extractos crudos de células de *E. coli* transformadas con el plásmido pET-45b(+)*OepBGLC1* (1), pET-45b(+)*OepBGLC3+SP* (2), pET-45b(+)*OepBGLC3* (3), pET-45b(+)*OepBGLC2* (4), pET-45b(+)*OepBGLC4* (5) y pET-45b(+) (6). Se aplicaron 15 μ g de proteína en cada calle y las electroforesis y las tinciones de los geles se llevaron a cabo según se indica en apartado Materiales y Métodos.

Las fracciones totales conteniendo las proteínas sobreexpresadas se analizaron mediante western blot seguido de detección inmunológica con anticuerpos específicos. Dado que las proteínas recombinantes incluían un motivo 6xHis en el extremo N-terminal, todas ellas fueron detectadas cuando se usó como anticuerpo primario uno específico del citado motivo, confirmando que se estaban expresando heterológamente (Fig. 24A). Las masas moleculares obtenidas en este caso a partir de las bandas detectadas inmunológicamente fueron idénticas a las deducidas del gel de SDS-PAGE correspondiente

a las fracciones totales, confirmándose que las bandas visualizadas en dicho gel corresponden a las proteínas recombinantes. Sin embargo, cuando se usó como anticuerpo primario uno obtenido frente a la BGLC de olivo purificada siguiendo el método de Romero-Segura *et al.* (2009), se observó una banda intensa para OepBGLC1 y una muy tenue en el caso de OepBGLC2, no detectándose banda para OepBGLC3 y OepBGLC4 (Fig. 24B). Además, se detectó una banda intensa en el caso de la preparación de BGLC de olivo purificada que presentaba una masa molecular de 65,8 kDa. Por otra parte, cuando se analizaron los correspondientes extractos crudos mediante western blot seguido de detección inmunológica empleando el anticuerpo anti 6xHis, el nivel de detección de las proteínas recombinantes fue extremadamente bajo (datos no mostrados), lo cual indicó que una mínima parte de las proteínas sobreexpresadas estaba presente en la fracción soluble.

A continuación, se probaron diferentes temperaturas y tiempos de inducción y distintos métodos y tampones de rotura con presencia y ausencia del detergente Tritón X-100, no consiguiéndose en ningún caso la solubilización de las proteínas sobreexpresadas.

Asimismo, se ensayó la actividad de las proteínas sobreexpresadas tanto en las distintas fracciones totales como en los correspondientes extractos crudos, no detectándose en ningún caso actividad BGLC.

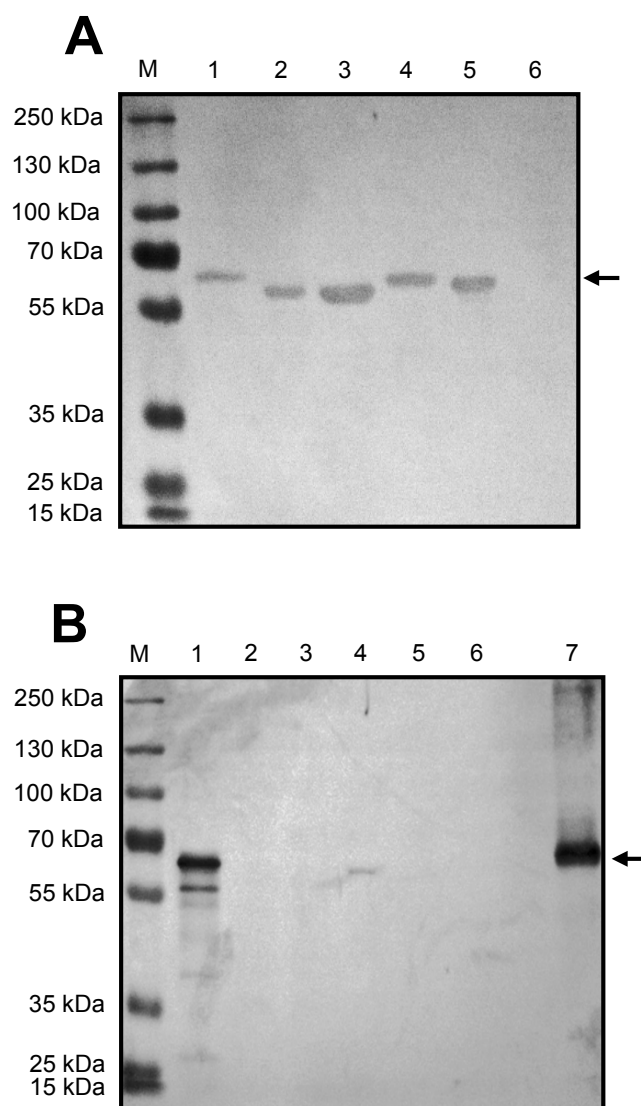


Fig. 24. Análisis de western blot de fracciones totales de células de *E. coli* que sobreexpresan los genes *BGLC* de olivo usando como anticuerpo primario anti 6xHis (A) o anti *BGLC* de olivo (B). Se obtuvieron extractos crudos de células de *E. coli* transformadas con el plásmido pET-45b(+)*OepBGLC1* (1), pET-45b(+)*OepBGLC3+SP* (2), pET-45b(+)*OepBGLC3* (3), pET-45b(+)*OepBGLC2* (4), pET-45b(+)*OepBGLC4* (5) y pET-45b(+) (6), y además proteína *BGLC* de olivo purificada (7). Se aplicaron 5 μ g de proteína en cada calle y las electroforesis, las tinciones de los geles y el análisis de western blot se llevaron a cabo según se indica en Materiales y Métodos. Las diluciones de los anticuerpos primarios empleadas fueron de 1:5000 (A) y 1:3000 (B), mientras que la del anticuerpo secundario fue de 1:50000 en ambos casos.

IV.2.2. Sobreexpresión de los genes *BGLC* de olivo en *N. benthamiana*

Como alternativa para confirmar la identidad funcional de los genes *BGLC* de olivo y caracterizar bioquímicamente las isoenzimas correspondientes, se utilizó el sistema de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*. Para ello, se amplificaron por PCR las

regiones codificantes de cada gen incluyendo en el extremo C-terminal la secuencia codificante de un motivo 6xHis y se subclonaron en el vector pH2GW7 mediante la tecnología GATEWAY®. Los plásmidos obtenidos se denominaron pH2GW7-OepBGLC1+His, pH2GW7-OepBGLC2+His, pH2GW7-OepBGLC3+His y pH2GW7-OepBGLC4+His y se utilizaron para transformar la cepa de *A. tumefaciens* GV3101. Tras la incubación de los cultivos bacterianos, se obtuvieron las correspondientes suspensiones celulares que fueron empleadas para la infiltración de hojas de *N. benthamiana* junto con el supresor del silenciamiento génico p19, utilizando como control negativo hojas infiltradas con el plásmido vacío. Posteriormente, se estableció un proceso de optimización de la expresión basado en la recolección y el análisis de las hojas a los 3, 5 y 9 días después de la infiltración, determinándose que el tiempo 3 días después de la infiltración era el que producía mayores cantidades de proteínas recombinantes. El análisis mediante SDS-PAGE de los extractos crudos y de las preparaciones purificadas mediante cromatografía de afinidad Ni-sefarosa mostró que, mientras en los geles cargados con los extractos crudos no se visualizaron las bandas con la masa molecular esperada para las isoenzimas recombinantes BGLC de olivo (Fig. 25A), en el caso de las preparaciones purificadas se detectaron bandas intensas para OepBGLC1 y OepBGLC2 y bandas más tenues para OepBGLC3 y OepBGLC4 (Fig. 25B). En el caso de OepBGLC3 se detectaban dos bandas de tamaño muy similar. Las masas moleculares obtenidas a partir del gel SDS-PAGE de las preparaciones purificadas fueron de 65,5, 66,4, 68,9, 67,4 y 70,3 kDa para OepBGLC1, OepBGLC2, OepBGLC3-1, OepBGLC3-2 y OepBGLC4, respectivamente.

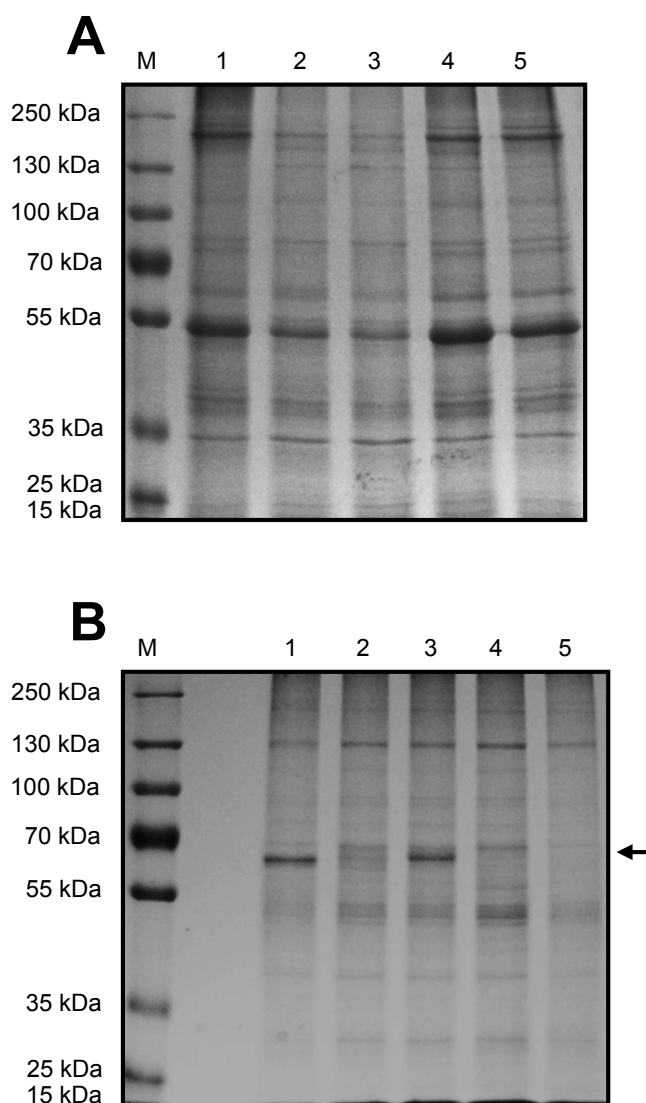


Fig. 25. SDS-PAGE de extractos crudos (A) y preparaciones purificadas (B) obtenidos a partir de hojas de *N. benthamiana* que expresan transitoriamente los genes *BGLC* de olivo. Se obtuvieron extractos crudos y preparaciones purificadas a partir de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con cultivos de células de *A. tumefaciens* transformadas con las construcciones pH2GW7OepBGLC1+His (1), pH2GW7OepBGLC3+His (2), pH2GW7OepBGLC2+His (3) y pH2GW7OepBGLC4+His (4) y con cultivos de *A. tumefaciens* sin transformar (5). Se aplicaron 6 μ g de proteína en cada calle y las electroforesis y las tinciones de los geles se llevaron a cabo según se indica en apartado Materiales y Métodos.

Las preparaciones purificadas se analizaron mediante western blot empleando de nuevo los dos anticuerpos primarios diferentes. Mientras el anticuerpo primario anti 6xHis detectó las cuatro isoformas BGLC recombinantes de olivo (Fig. 26A), el anticuerpo específico anti BGLC de olivo detectó fuertemente a OepBGLC1 y ligeramente a OepBGLC2 (Fig. 26B), repitiéndose el mismo patrón de detección que en el caso de la expresión en *E. coli*. Las masas moleculares deducidas de las bandas reveladas inmunológicamente fueron

idénticas a las deducidas del gel de SDS-PAGE correspondiente a las preparaciones purificadas, confirmándose que las proteínas detectadas corresponden a las isoenzimas BGLC recombinantes. Además, la banda intensa que se observa correspondiente a la proteína purificada a partir de mesocarpo de aceituna detectada con el anticuerpo anti BGLC tuvo una masa molecular de 65,0 kDa.

A continuación, se llevó a cabo un proceso de optimización de la expresión basado en la obtención de preparaciones purificadas a partir de hojas recogidas a diferentes tiempos después de la infiltración, determinándose que el tiempo 3 días después de la infiltración era el que producía un mayor rendimiento en términos de proteína recombinante expresada, por lo que se fijó este tiempo en el procedimiento de sobreexpresión.

Para confirmar la identidad funcional de las proteínas BGLC recombinantes de olivo, se ensayó *in vitro* la actividad BGLC tanto en los extractos crudos como en las preparaciones purificadas de las cuatro isoenzimas. En el caso de los extractos crudos, no se detectó actividad para ninguna de las 4 isoenzimas cuando se usó pNPG como sustrato. En cambio, se encontró enzima activa sólo en el caso de la preparación purificada correspondiente a OepBGLC1, que mostró una actividad específica de $1,4 \text{ U mg}^{-1}$ utilizando como sustrato pNPG y $67,6 \text{ U mg}^{-1}$ con oleuropeína. Esta preparación purificada fue la que se usó para realizar la caracterización bioquímica de la isoenzima OepBGLC1 recombinante de olivo.

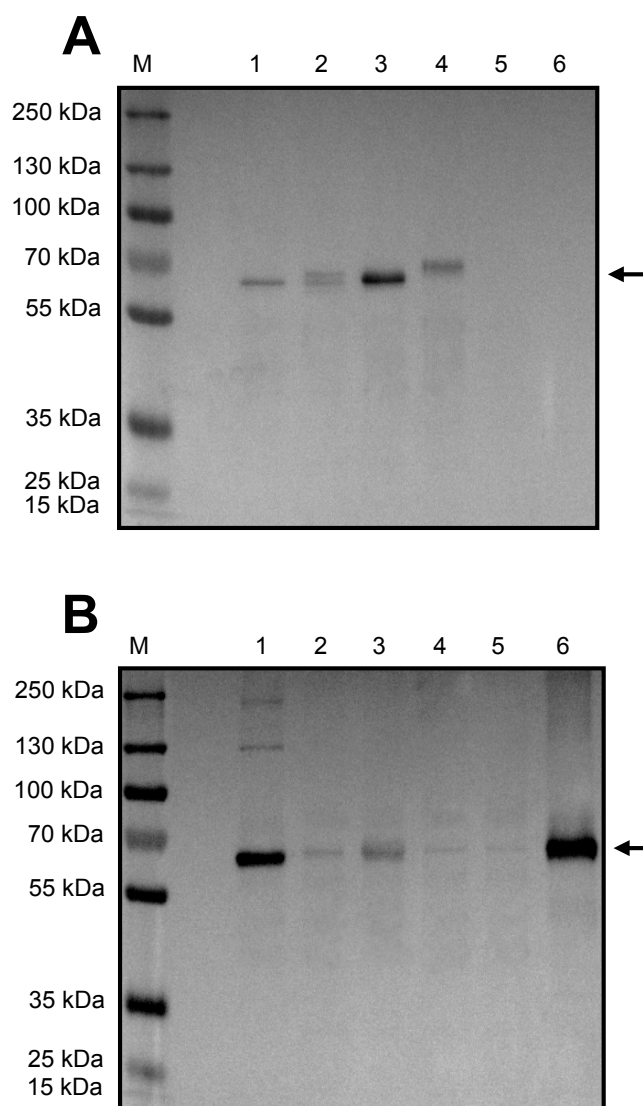


Fig. 26. Análisis de western blot de preparaciones purificadas obtenidas a partir de hojas de *N. benthamiana* que expresan transitoriamente los genes *BGLC* de olivo usando como anticuerpo primario anti 6xHis (A) o anti *BGLC* de olivo (B). Se obtuvieron preparaciones purificadas a partir de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con cultivos de células de *A. tumefaciens* transformadas con las construcciones pH2GW7OepBGLC1+His (1), pH2GW7OepBGLC3+His (2), pH2GW7OepBGLC2+His (3) y pH2GW7OepBGLC4+His (4) y con cultivos de *A. tumefaciens* sin transformar (5). Además, se cargó proteína *BGLC* de olivo purificada (6). Se aplicaron 6 μ g de proteína en cada calle y las electroforesis, las tinciones de los geles y el análisis de western blot se llevaron a cabo según se indica en Materiales y Métodos. Las diluciones de los anticuerpos primarios empleadas fueron de 1:1500 (A) y 1:5000 (B), mientras que la del anticuerpo secundario fue de 1:2:500 (A) y 1:10000 (B).

IV.3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ISOENZIMA OepBGLC1 RECOMBINANTE

La caracterización bioquímica de la isoenzima recombinante OepBGLC1 se realizó utilizando su sustrato natural, la oleuropeína. En primer lugar se optimizaron las condiciones de incubación de la isoenzima recombinante OepBGLC1, eligiéndose un tiempo de incubación de 5 min y una cantidad de preparación purificada en el rango de 3-4 μg de proteína, debido a que en estas condiciones se obtuvieron descensos de área que permitieron cuantificar niveles máximos de actividad BGLC. En la Fig. 27 se muestran una serie de cromatogramas correspondientes a la hidrólisis de la oleuropeína por la acción de la isoenzima recombinante OepBGLC1 a distintos tiempos de reacción, que van desde 1 hasta 60 min. En el primer minuto se observa un ligero descenso del pico correspondiente a la oleuropeína donde aún no se observa la formación de ningún producto de reacción. A los 5 min de reacción más del 50 % de la oleuropeína inicial ya ha sido hidrolizada apareciendo el primer producto de la reacción que son los isómeros AAO, los cuales como puede observarse eluyen un par de minutos antes que la oleuropeína formando un único pico bastante ancho. A medida que avanza la reacción van apareciendo progresivamente otros productos como consecuencia de la estabilización de los isómeros formados anteriormente. Estos productos son la AAO, el producto principal de la hidrólisis de la oleuropeína por la BGLC de olivo, y posteriormente el hidroxitirosol formado por hidrólisis no enzimática. A partir del tiempo 15 min la hidrólisis de la oleuropeína tiene lugar muy lentamente debido probablemente a que la isoenzima se ve inhibida por la formación de productos. A tiempo 60 min aún existe un 10 % de oleuropeína intacta en el medio de reacción.

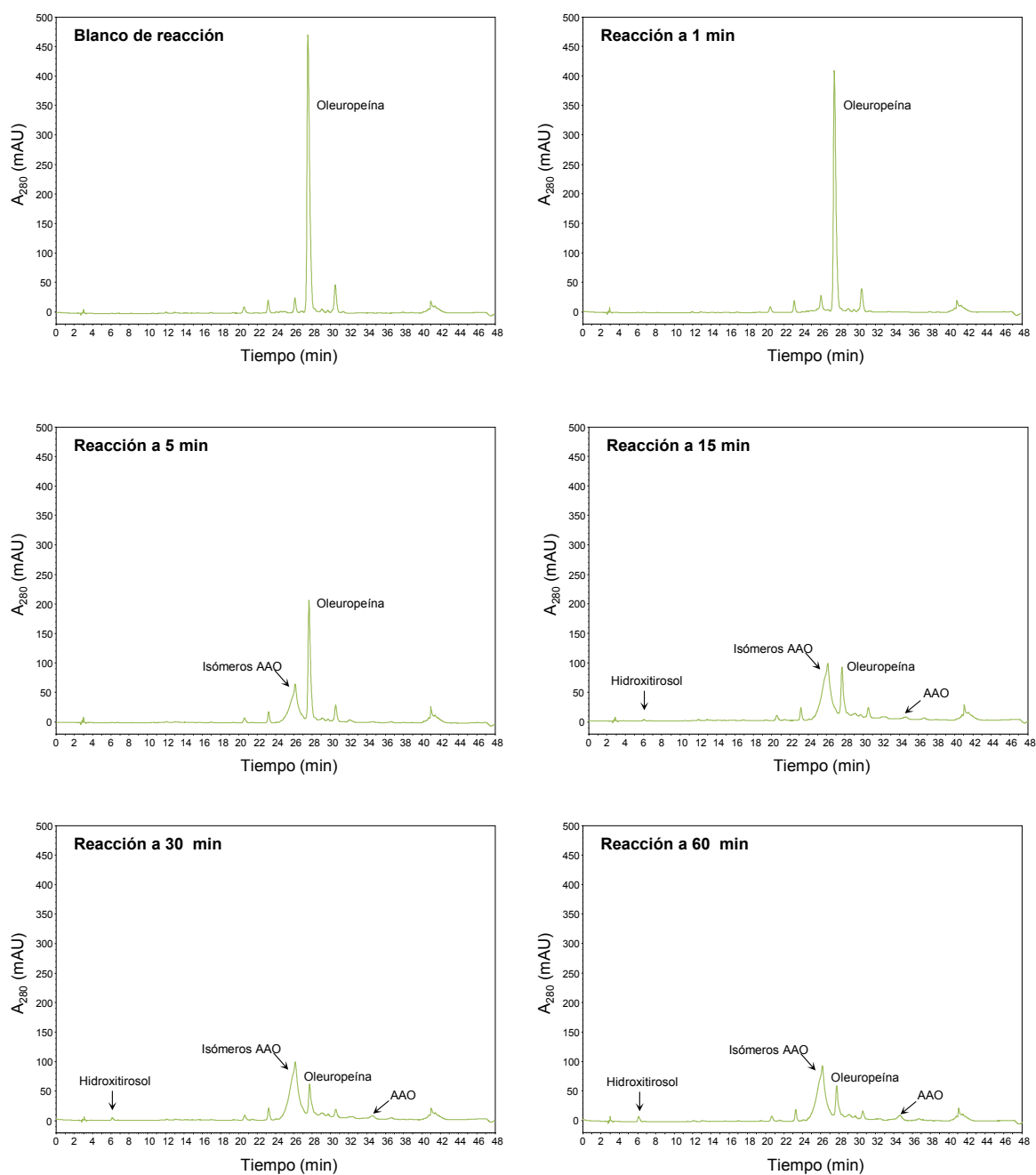


Fig. 27. Hidrólisis de la oleuropeína por la acción de la isoforma OepBGLC1 a distintos tiempos de reacción. La reacción enzimática y el posterior análisis se llevaron a cabo según se describe en el apartado III.9.1.2. de Materiales y Métodos.

IV.3.1. Efecto del pH

La isoenzima recombinante OepBGLC1 purificada exhibió la curva de pH que se presenta en la Fig. 28, en la que se observó un máximo de actividad a pH 5,5 seguido de un rápido descenso de actividad a pHs más básicos, siendo prácticamente indetectable a pH 9,0.

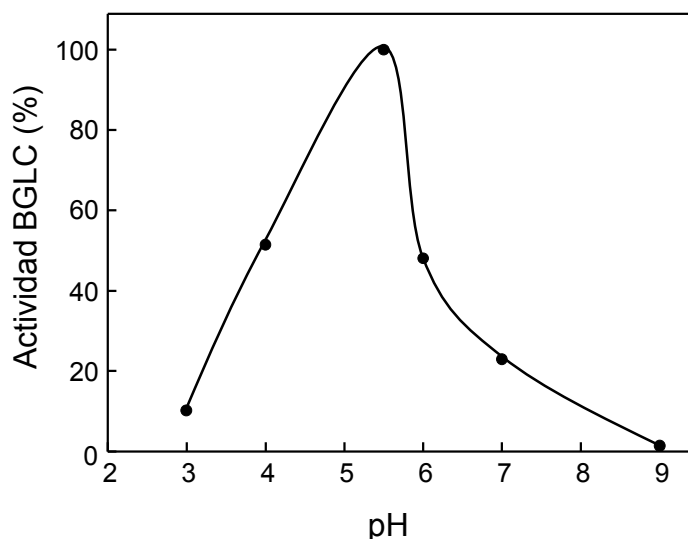


Fig. 28. Determinación del pH óptimo de la actividad BGLC de la isoenzima recombinante OepBGLC1. Se ensayó la actividad BGLC en preparaciones purificadas de OepBGLC1 con oleuropeína como sustrato según se indica en el apartado III.11.3. de Materiales y Métodos. El 100 % de actividad fue de 37,46 U ml⁻¹.

IV.3.2. Efecto de la temperatura

Para determinar la temperatura óptima de la isoenzima OepBGLC1, se realizaron ensayos de actividad enzimática en un rango amplio de temperaturas, estableciéndose que la enzima tenía su valor máximo de actividad a 40 °C (Fig. 29).

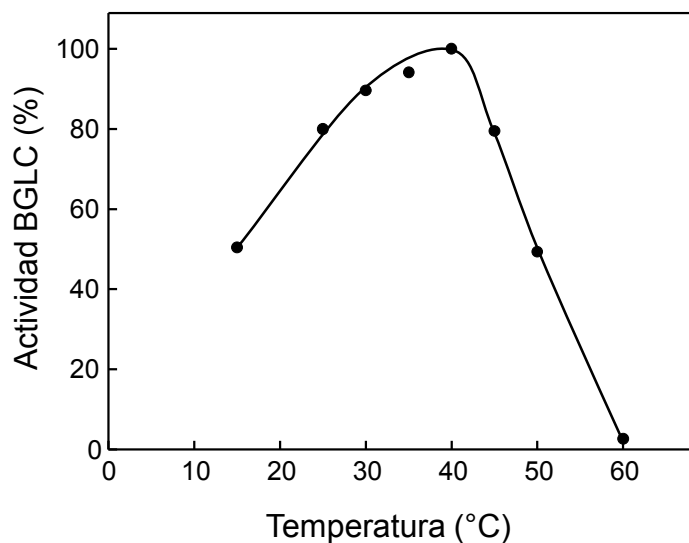


Fig. 29. Determinación de la temperatura óptima de la actividad BGLC de la isoenzima recombinante OepBGLC1. Se ensayó la actividad BGLC en preparaciones purificadas de OepBGLC1 con oleuropeína como sustrato según se indica en el apartado III.11.4. de Materiales y Métodos. El 100 % de actividad fue de 50,94 U ml⁻¹.

IV.3.3. Selectividad de sustrato

Una vez determinada la capacidad de la isoenzima recombinante OepBGLC1 para hidrolizar el glucósido fenólico mayoritario en la pulpa de aceituna, la oleuropeína, se realizaron una serie de reacciones enzimáticas para evaluar el comportamiento de la isoenzima frente a mezclas de compuestos fenólicos naturalmente presentes en la aceituna, tratando de simular lo que sucede durante el proceso de obtención del AOV. Para ello, se llevó a cabo un estudio de selectividad de sustrato de forma que en un mismo ensayo de actividad BGLC estuvieran presentes 3 de los sustratos naturales mayoritarios de la enzima (oleuropeína, ligustrósido y demetiloleuropeína), como sucede tras la molturación de la aceituna en el proceso de obtención del aceite, donde se ponen en contacto la enzima y los posibles sustratos, si bien en el citado proceso éstos últimos no están siempre presentes en concentraciones equimolares tal y como ocurre en el experimento *in vitro*. Para incorporar los principales glucósidos fenólicos de la aceituna en un misma mezcla de reacción se combinaron diferentes extractos fenólicos concentrados obtenidos a partir de distintas partes del fruto, fundamentalmente pulpa y membrana

seminal que es rica en ligustrósido, tratando de alcanzar concentraciones equimolares de los 3 glucósidos mayoritarios: oleuropeína, ligustrósido y demetiloleuropeína. En la Fig. 30 se exponen los cromatogramas correspondientes al blanco de reacción y a la reacción en el min 5. Como puede observarse, el mayor grado de hidrólisis tiene lugar con la oleuropeína, seguido por el ligustrósido, y por último la demetiloleuropeína. Observando con detalle el cromatograma correspondiente a la reacción de 5 min, se pudo distinguir la formación de los productos de la reacción de hidrólisis de los glucósidos oleuropeína y ligustrósido situados a la izquierda de sus picos, los isómeros AAO y AAL, respectivamente. El bajo grado de hidrólisis de la demetiloleuropeína no permite identificar con claridad el pico correspondiente a su derivado hidrolizado, el FDAO, que eluye inmediatamente antes de los isómeros AAO y queda enmascarado por éstos en el cromatograma. Tal y como cabía esperar al tratarse de un compuesto de estructura química significativamente diferente a los otros tres glucósidos fenólicos presentes en la reacción, la isoenzima recombinante OepBGLC1 no tuvo capacidad hidrolítica sobre el verbascósido. Los resultados de este ensayo se resumen en la Tab. 10.

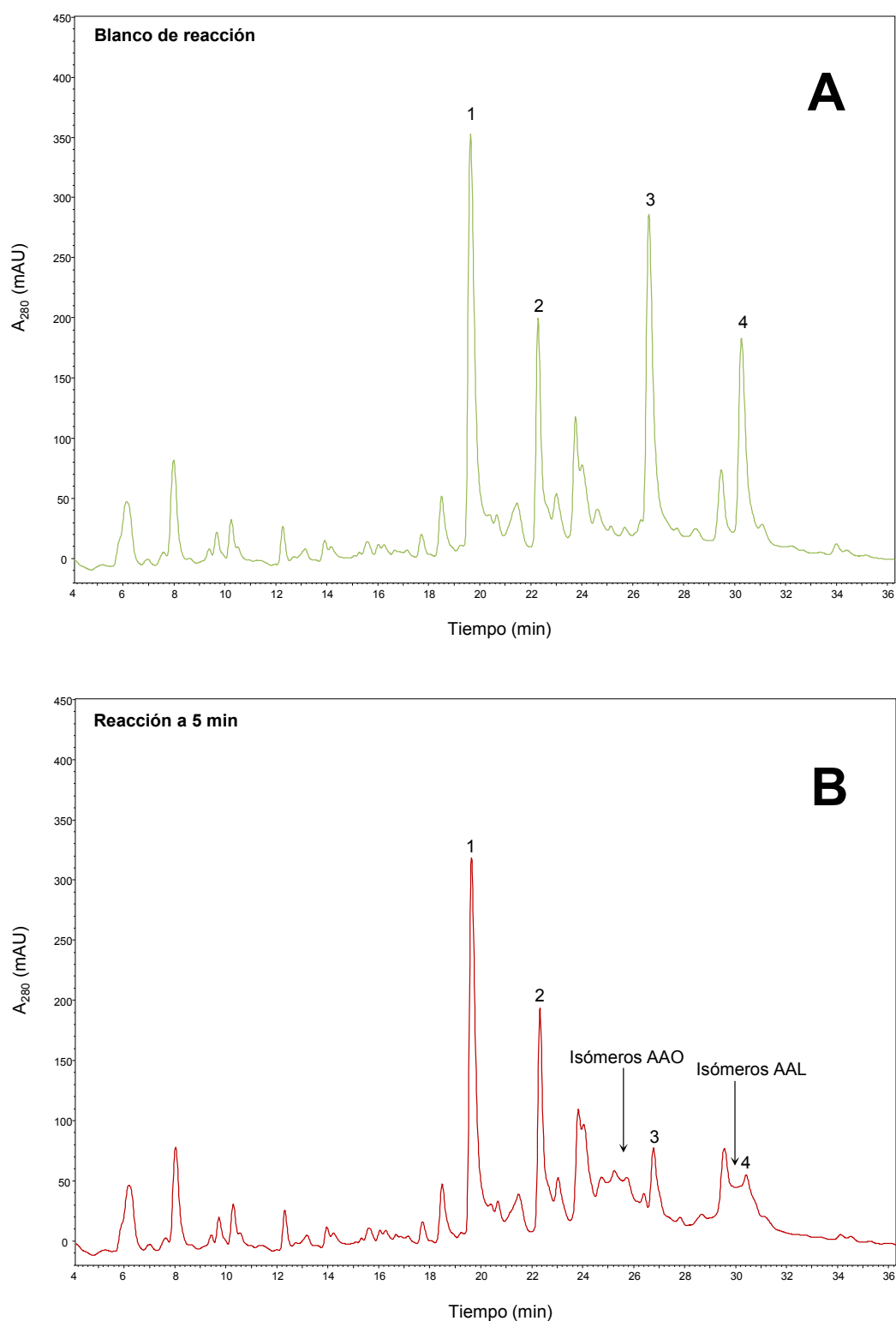


Fig. 30. Reacción de la isoenzima recombinante OepBGLC1 con una mezcla de glucósidos fenólicos obtenida a partir de extractos fenólicos de pulpa y tegumento. La extracción de la fracción fenólica de pulpa y membrana seminal se llevó a cabo según se indica en los apartados III.12.3. y III.12.4 de Materiales y Métodos. La reacción enzimática se llevó a cabo tal y como se indica en el apartado III.11.1. de Materiales y Métodos. 1: Demetiloleuropeína. 2: Verbascósido. 3: Oleuropeína. 4: Ligustrósido.

Tab. 10. Actividad de la isoenzima recombinante OepBGLC1 frente a distintos glucósidos fenólicos contenidos en una mezcla de extractos fenólicos de pulpa y membrana seminal de aceituna. Los datos de actividad están expresados como % de actividad relativa con respecto a la actividad que presenta la enzima frente a la oleuropeína.

Sustrato	Concentración inicial en la reacción (mM)	Actividad relativa (%)
Oleuropeína	5,1	100,0
Ligustrósido	3,9	25,6
Demetiloleuropeína	5,5	15,6

Tras evaluar la actividad de la enzima frente a los glucósidos mayoritarios de la pulpa, se realizaron ensayos adicionales de actividad BGLC frente al nuzhénido, un glucósido fenólico minoritario en la pasta de aceituna pero muy abundante en la semilla que posee dos enlaces glucosídicos en su estructura. En la Fig. 31 se muestran los cromatogramas correspondientes al blanco de reacción y a la reacción en el min 5. Tal y como se observa en la reacción a 5 min, la enzima recombinante OepBGLC1 mostró actividad frente al nuzhénido, observándose un descenso claro del pico correspondiente al glucósido y apareciendo en su lugar un pico ancho que probablemente corresponde a una mezcla de isómeros de sus derivados hidrolizados cuya naturaleza exacta aún no se ha podido identificar. Así mismo, el cromatograma de la reacción en el min 5 muestra un ligero incremento del pico correspondiente al tirosol previsiblemente formado por hidrólisis química a partir de los derivados hidrolizados del nuzhénido.

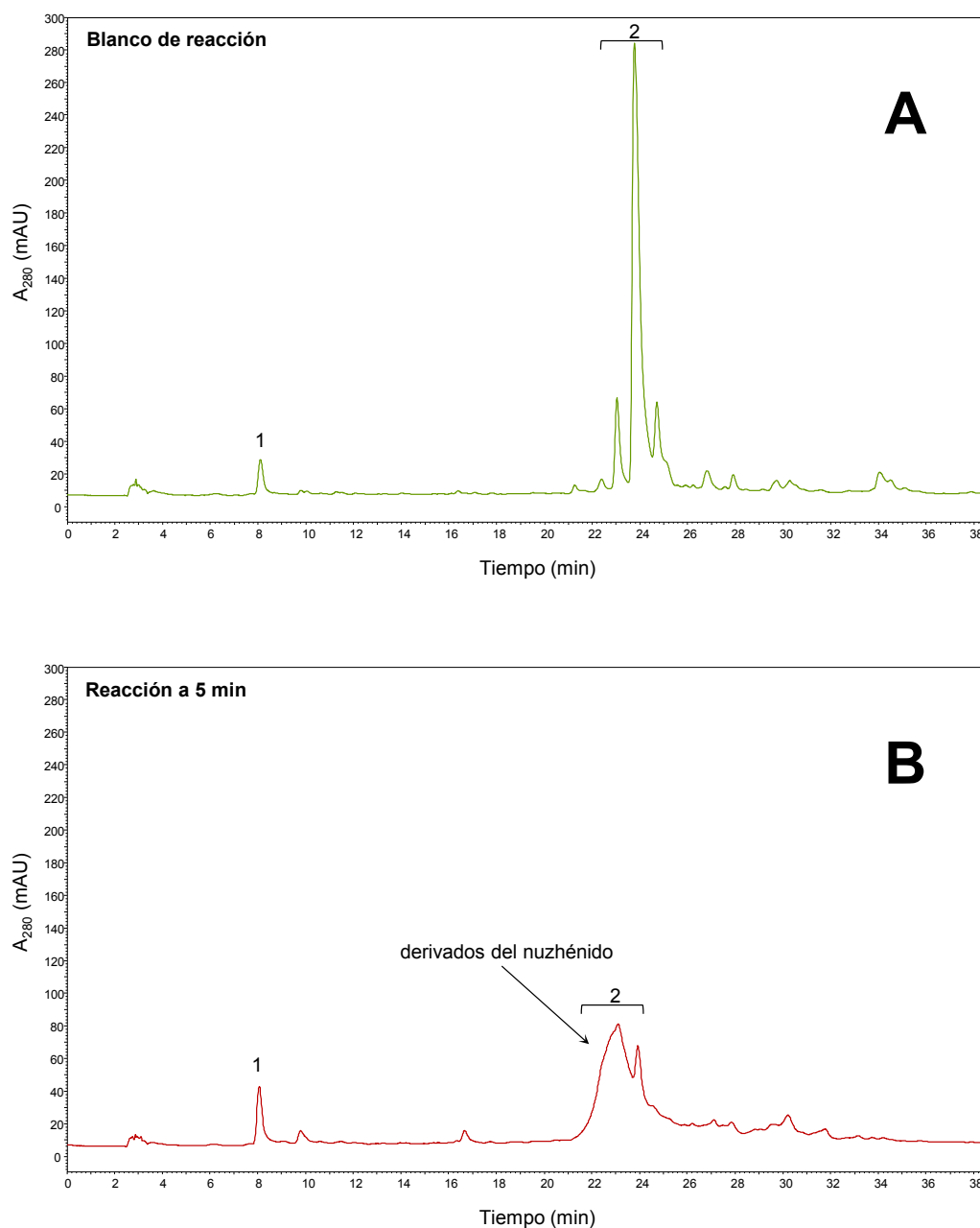


Fig. 31. Reacción de la isoenzima recombinante OepBGLC1 con compuestos fenólicos de un extracto de cotiledón de semilla de aceituna. La extracción de la fracción fenólica de cotiledón se llevó a cabo según se indica en el apartado III.12.4. de Materiales y Métodos. La reacción enzimática se llevó a cabo tal y como se indica en el apartado III.9.1.2. de Materiales y Métodos. 1: Tirosol. 2: Nuzhénido.

IV.3.4. Cinéticas de reacción

Para el cálculo de los parámetros cinéticos de la isoenzima recombinante OepBGLC1 se determinaron, medidas en condiciones óptimas, las velocidades de reacción para concentraciones variables de oleuropeína (Fig. 32A). La velocidad de reacción fue máxima para una concentración de sustrato en torno a 20 mM, observándose una disminución de la actividad para concentraciones superiores posiblemente debida a al fenómeno de inhibición por sustrato. La isoenzima recombinante pareció mostrar una cinética típica de Michelis-Menten, aunque el ajuste lineal tras representar los dobles inversos (representación de Lineweaver-Burk) no fue excesivamente bueno (Fig. 32B).

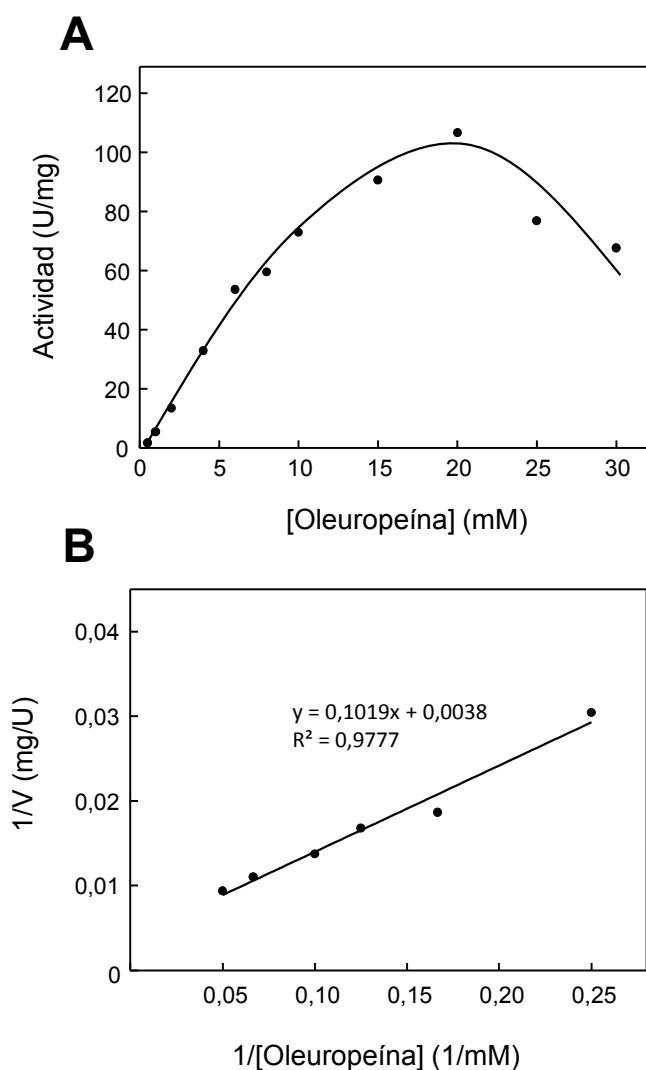


Fig. 32. Efecto de la concentración de oleuropeína sobre la velocidad de la isoenzima recombinante OepBGLC1 (A) y su correspondiente representación de Lineweaver-Burk (B).

La representación de Lineweaver-Burk permitió la determinación de la constante aparente de Michaelis-Menten (K_m), la velocidad máxima de reacción ($V_{m\acute{a}x}$) y la eficacia catalítica ($V_{m\acute{a}x}/K_m$) de la isoenzima recombinante OepBGLC1 (Tab. 11).

Tab. 11. Parámetros cinéticos de la isoenzima recombinante OepBGLC1 calculados a partir de la representación de Lineweaver-Burk.

$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}/K_m$ (U/mg.mM)
263,16	26,82	9,81

Debido a que el ajuste lineal obtenido con la representación de los dobles inversos no fue del todo satisfactorio, se aplicó el modelo cinético propuesto por Hill a los valores de velocidad obtenidos. Aunque en la representación lineal los datos se ajustaran mejor a una recta, los parámetros cinéticos obtenidos fueron incongruentes y no permitieron concluir que la isoenzima presentaba un comportamiento alostérico.

IV.3.5. Inactivación térmica

Para el estudio de la estabilidad térmica, alícuotas de la preparación purificada se incubaron a distintos tiempos y diferentes temperaturas, y posteriormente se realizaron los ensayos de actividad. Los perfiles de inactivación obtenidos se muestran en la Fig. 33. La isoenzima OepBGLC1 de olivo resultó ser estable a 40 °C, manteniendo porcentajes de actividad altos (80%) tras 1 h de incubación. A 50-55 °C se observaron importantes disminuciones de la actividad, mientras que a 60 °C la isoenzima se desnaturalizó en los primeros minutos de la incubación, no detectándose actividad a tiempos superiores a 10 min.

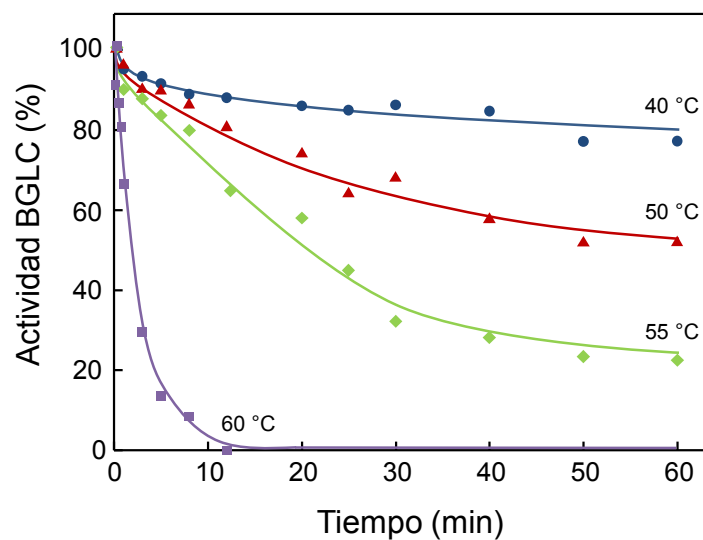


Fig. 33. Cinéticas de inactivación térmica de la isoenzima recombinante OepBGLC1. Alícuotas de preparaciones purificadas de OepBGLC1 se incubaron a diferentes temperaturas según se indica en el apartado III.11.4. de Materiales y Métodos. Tras el tiempo indicado, se determinó la actividad enzimática usando oleuropeína como sustrato. El 100 % de actividad fue de 56,85 U ml⁻¹.

IV.4. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LOS GENES *BGLC* DE OLIVO

Para determinar la localización subcelular de las cuatro isoenzimas *BGLC* de olivo e investigar el papel fisiológico que desempeñan, se amplificaron por PCR las regiones codificantes de cada gen desprovistas del codón de parada de la traducción para ser subclonadas en el vector pK7FGW2.0 mediante la tecnología GATEWAY®. El citado vector fusiona en fase la secuencia codificante de eGFP al extremo C-terminal de las proteínas recombinantes. Una vez obtenidos los plásmidos denominados pK7FGW2.0-OepBGLC1, pK7FGW2.0-OepBGLC2, pK7FGW2.0-OepBGLC3 y pK7FGW2.0-OepBGLC4, se utilizaron para transformar la cepa de *A. tumefaciens* GV3101. Posteriormente, se inocularon e incubaron los cultivos correspondientes para obtener las suspensiones celulares que fueron utilizadas para la infiltración de las hojas de *N. benthamiana* junto con el supresor del silenciamiento génico p19. Transcurridos 5 días después de la infiltración, se observaron cortes de las hojas en el microscopio confocal, obteniendo las imágenes microscópicas que quedan recogidas en la Fig. 34. La localización de cada isoenzima se muestra en un grupo de tres imágenes, una correspondiente sólo a la señal fluorescente eGFP (color verde), otra donde se muestra la autofluorescencia de los cloroplastos (color rojo) y una última que resulta de la superposición de las dos anteriores.

En el caso OepBGLC1, la señal de eGFP apareció como corpúsculos redondeados de unas 15 µm de diámetro en los que la señal fluorescente se interrumpe discretamente en forma de pequeños círculos, lo cual indicó que la isoenzima OepBGLC1 se encontraba localizada en el núcleo celular, correspondiendo las interrupciones de la señal de eGFP al nucleolo.

Por su parte, las isoenzimas OepBGLC2 y OepBGLC4 mostraron el mismo patrón de distribución, apareciendo marcados el retículo endoplasmático, la porción de éste último que rodea al núcleo y el exterior celular o apoplasto, indicando que se trataba de isoenzimas que son direccionadas al exterior celular por la ruta de secreción vía retículo endoplasmático.

Por último, la señal eGFP detectada en el caso del gen OepBGLC3 apareció en forma de pequeños puntos que en algunos casos parecen agruparse ordenadamente en estructuras fusiformes, en las cuales se pueden distinguir incluso regiones donde la fluorescencia es más densa.

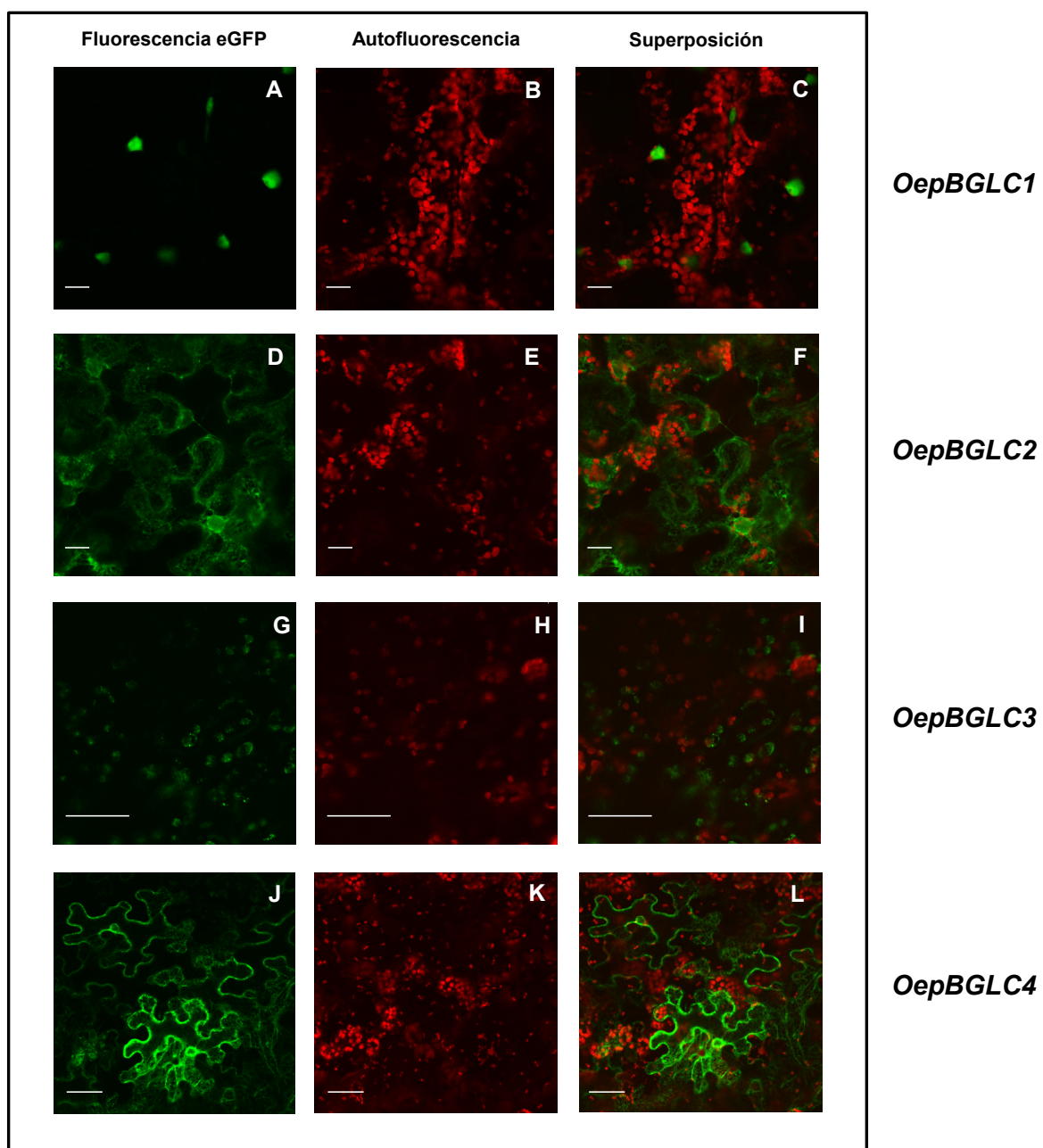


Fig. 34. Localización subcelular de las β -glucosidasas de olivo. Las imágenes obtenidas con el microscopio confocal muestran la localización de la proteína eGFP fusionada en C-terminal a OepBGLC1 (A-C), OepBGLC2 (D-F), OepBGLC3 (G-I) y a OepBGLC4 (J-L). Las barras de escala corresponden a 20 μm (A-F) y 50 μm (G-L). La expresión transitoria de las construcciones eGFP en hojas de *N. benthamiana* se consiguió mediante la técnica de agroinfiltración, según se indica en el apartado de Materiales y Métodos.

IV.5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *BGLC* DE OLIVO

IV.5.1. Regulación espacial y temporal

Con el objeto de investigar el papel fisiológico y la posible contribución al perfil fenólico del AOV de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4*, se han determinado sus niveles de expresión relativa mediante qRT-PCR en distintos tejidos de la planta, tales como la drupa, el mesocarpo, la semilla y la hoja. Como se observa en la Fig. 35, el gen *OeBGLC2* mostraba los niveles de expresión más altos en mesocarpo de ambas variedades, mientras que en semillas fueron prácticamente indetectables. Con respecto a *OeBGLC3*, se observaron unos mayores niveles de transcrito en Arbequina que en Picual, siendo éstos especialmente altos en mesocarpo, semilla de 31 SDF y hojas. En cambio, se detectaron niveles bajos de expresión en semilla de 16 SDF de ambas variedades. Por su parte, el gen *OeBGLC4* se expresaba fuertemente en mesocarpo de 28 SDF tanto de Picual como de Arbequina, mientras que en drupa los niveles de transcrito detectados eran muy bajos.

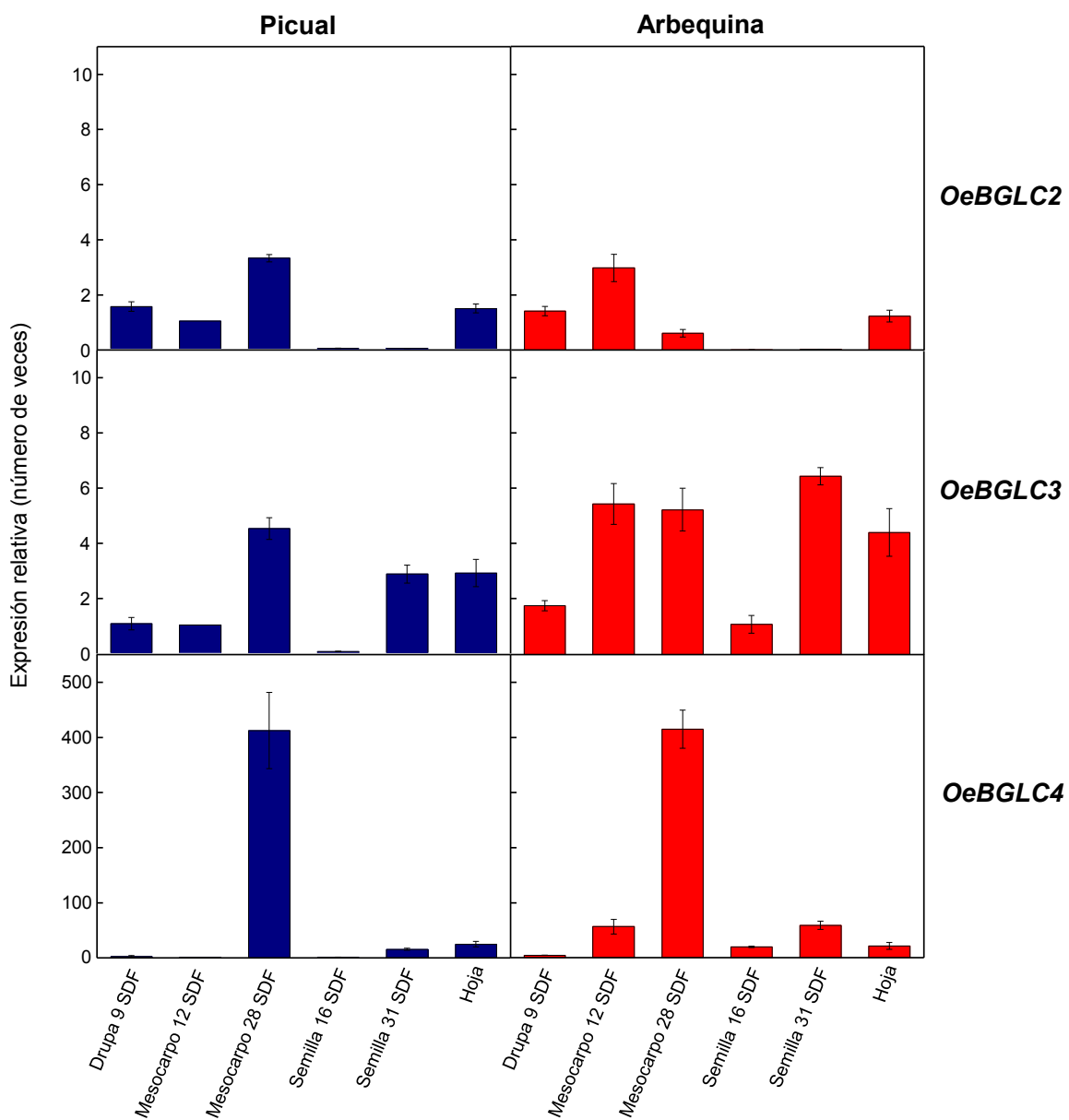


Fig. 35. Niveles de expresión relativa de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en diferentes tejidos de las variedades Picual y Arbequina. Los niveles de expresión relativa se determinaron mediante qRT-PCR usando como calibrador el nivel de expresión del gen correspondiente en el mesocarpo de la variedad Picual de 12 SDF, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

A continuación, se estudió con más detalle la evolución del nivel de expresión relativa de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en mesocarpo y semilla de aceituna, que son los tejidos que más contribuyen a la composición fenólica final del AOV. En la Fig. 36 se muestran los niveles de expresión del mesocarpo. En el caso de *OeBGLC2*, los niveles de transcrito mostraban un ligero y progresivo descenso a lo largo del desarrollo y la maduración en ambas variedades, excepto en Picual de 28 SDF, donde se observa un pequeño máximo. Por su parte, los niveles de expresión del gen *OeBGLC3* se mantenían prácticamente constantes durante el desarrollo y la maduración del fruto de ambas variedades y disminuían al final de la maduración, existiendo de nuevo un máximo de actividad a 28 SDF en el caso de Picual. En cambio, los niveles de expresión de *OeBGLC4* presentaban un fuerte y progresivo incremento a lo largo del desarrollo y maduración en el caso de la variedad Arbequina, mientras que en la variedad Picual se observaba un ligero aumento de los niveles de transcrito durante el desarrollo, seguido de un pronunciado máximo a las 28 SDF y de un posterior descenso al final de la maduración hasta alcanzar los valores iniciales.

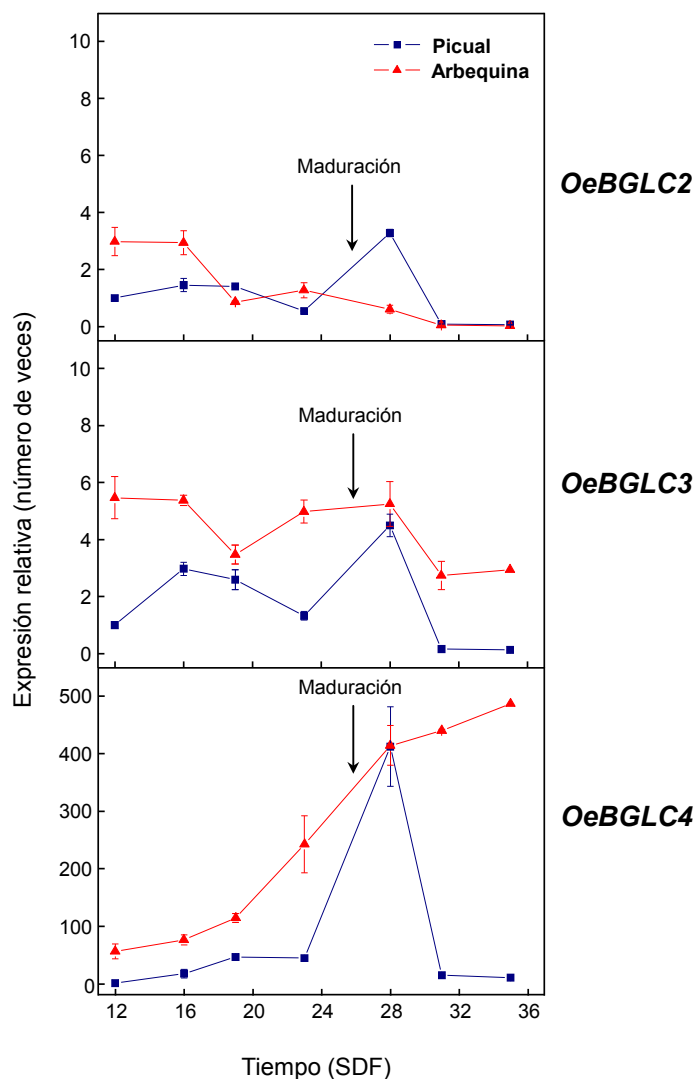


Fig. 36. Evolución de los niveles de expresión relativa de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en mesocarpio de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina a lo largo del desarrollo y maduración del fruto. A los tiempos indicados, los niveles de expresión relativa se determinaron mediante qRT-PCR usando como calibrador el nivel de expresión del gen correspondiente en el mesocarpio de la variedad Picual de 12 SDF, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Una vez analizados los niveles de expresión relativa de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en mesocarpo, se llevó a cabo el mismo estudio en semilla (Fig. 37). Los niveles de expresión del gen *OeBGLC2* fueron prácticamente indetectables a lo largo del desarrollo y maduración del fruto tanto en la variedad Picual como en Arbequina. Por el contrario, los niveles de transcrito de los genes *OeBGLC3* y *OeBGLC4* aumentaban progresivamente en ambas variedades, disminuyendo ligeramente al final de la maduración.

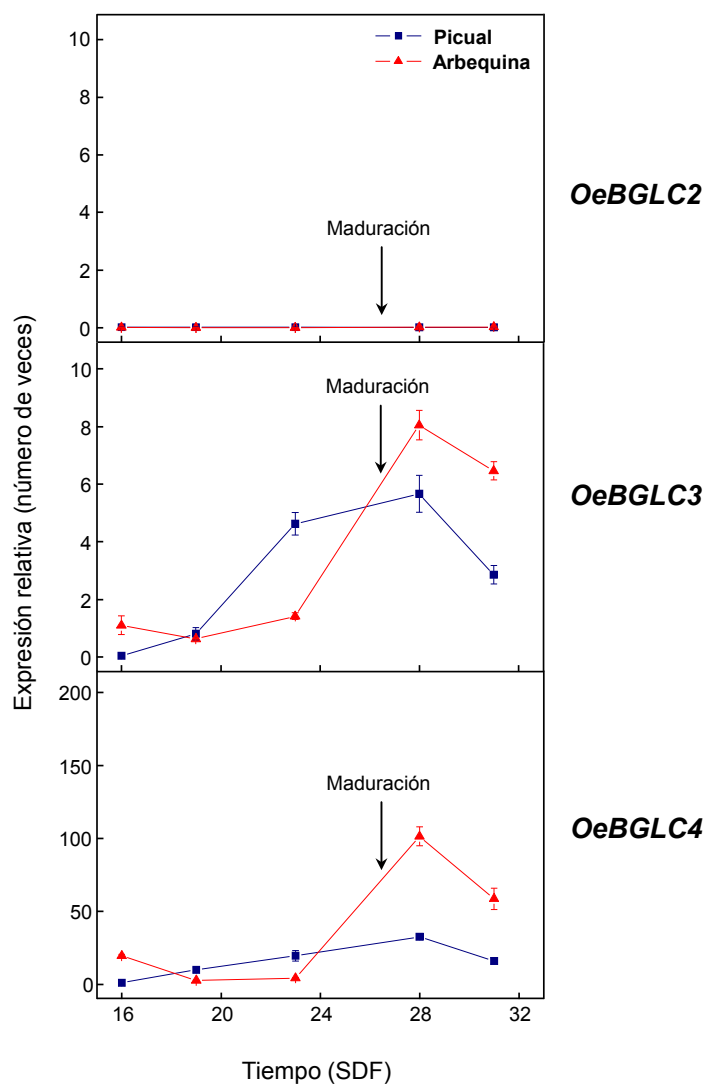


Fig. 37. Evolución de los niveles de expresión relativa de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en semilla de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina a lo largo del desarrollo y maduración del fruto. A los tiempos indicados, los niveles de expresión relativa se determinaron mediante qRT-PCR usando como calibrador el nivel de expresión del gen correspondiente en el mesocarpo de la variedad Picual de 12 SDF, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

IV.5.2. Efecto de la variedad

El estudio anterior realizado en las variedades Picual y Arbequina se amplió incluyendo otras variedades de importancia económica en nuestro país, como son Picudo, Hojiblanca y Manzanilla (Fig. 38). En este caso, se utilizó mesocarpo de aceitunas de dichas variedades en tres estadios diferentes que abarcan desde el comienzo de la maduración hasta el periodo de recolección de la aceituna para la producción de aceite. No se observaron cambios importantes en los niveles de expresión del gen *OeBGLC2* a lo largo de la maduración del fruto en las variedades estudiadas excepto en Picual, en la que se detectó un máximo a las 28 SDF como se ha descrito en el apartado anterior. En el caso del gen *OeBGLC3*, los niveles de transcrito de las variedades Hojiblanca y Manzanilla disminuyeron desde las 23 hasta las 35 SDF, permaneciendo bajos y constantes en la variedad Picudo en ese mismo periodo. Para este mismo gen, los niveles de expresión en Arbequina son siempre los más altos durante la maduración, mientras que Picual mostraba de nuevo un máximo a las 28 SDF. Por su parte, los niveles de expresión relativa del gen *OeBGLC4* no presentaban cambios importantes en las variedades Picudo, Hojiblanca y Manzanilla durante la maduración del fruto, mientras que Arbequina presentaba un aumento progresivo, mostrando niveles de expresión más altos que el resto de las variedades, y Picual exhibía de nuevo un máximo de expresión a las 28 SDF alcanzando valores cercanos a los de Arbequina.

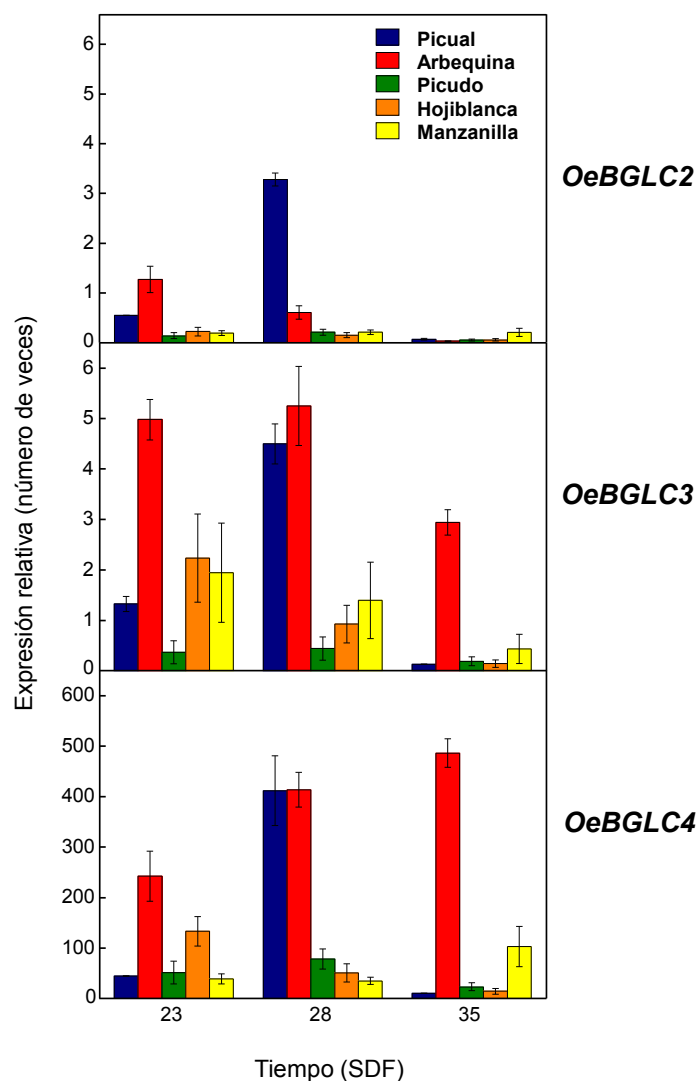


Fig. 38. Efecto de la variedad sobre los niveles de expresión relativa de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en mesocarpio de aceitunas de diferentes variedades. A los tiempos indicados, los niveles de expresión relativa se determinaron mediante qRT-PCR usando como calibrador el nivel de expresión del gen correspondiente en el mesocarpio de la variedad Picual de 12 SDF, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

IV.5.3. Efecto del régimen hídrico

Para estudiar el efecto del régimen hídrico sobre los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* de olivo, se midieron sus niveles de expresión relativa en mesocarpo de aceitunas de la variedad Picual y Arbequina, cultivadas en regadío y en seco (Fig. 39). En general, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión relativa del gen *OeBGLC2* en ninguna de las variedades. *OeBGLC3* no sufrió efecto alguno en la variedad Picual pero sin embargo en la variedad Arbequina sí parece que se incrementó la expresión en el tratamiento de regadío. En el caso del gen *OeBGLC4*, los niveles de expresión fueron más altos en seco que en regadío para la variedad Picual y superiores en regadío que en seco para la variedad Arbequina.

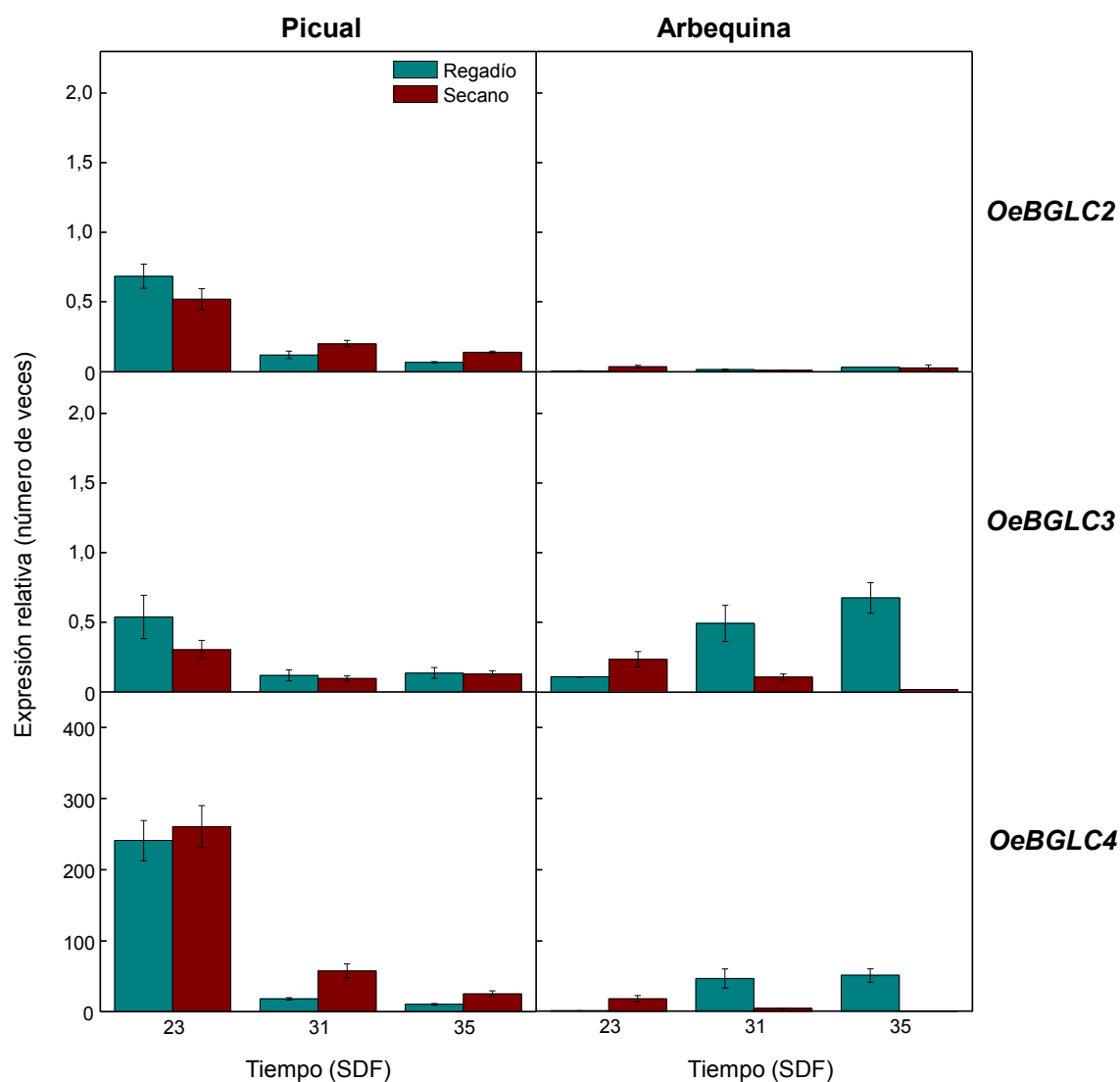


Fig. 39. Efecto del régimen hídrico sobre los niveles de expresión relativa de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en mesocarpio de aceitunas de las variedades *Picual* y *Arbequina*. A los tiempos indicados, los niveles de expresión relativa se determinaron mediante qRT-PCR usando como calibrador el nivel de expresión del gen correspondiente en el mesocarpio de la variedad *Picual* de 12 SDF en regadío, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Para analizar el efecto del riego deficitario sobre los niveles de expresión de los cuatro genes *BGLC*, se midieron sus niveles de expresión en mesocarpio de aceitunas de la variedad *Arbequina* sometidas a tres niveles de riego diferentes: 30, 60 y 100 %. Tal y como se muestra en la Fig. 40, el nivel de transcrito de los genes *OeBGLC1*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* fue más alto en mesocarpio de 29 SDF de *Arbequina* cultivada con un nivel de riego del 30 % en comparación con 60 y 100 %, mientras que en el resto de estadios no se observaron efectos significativos.

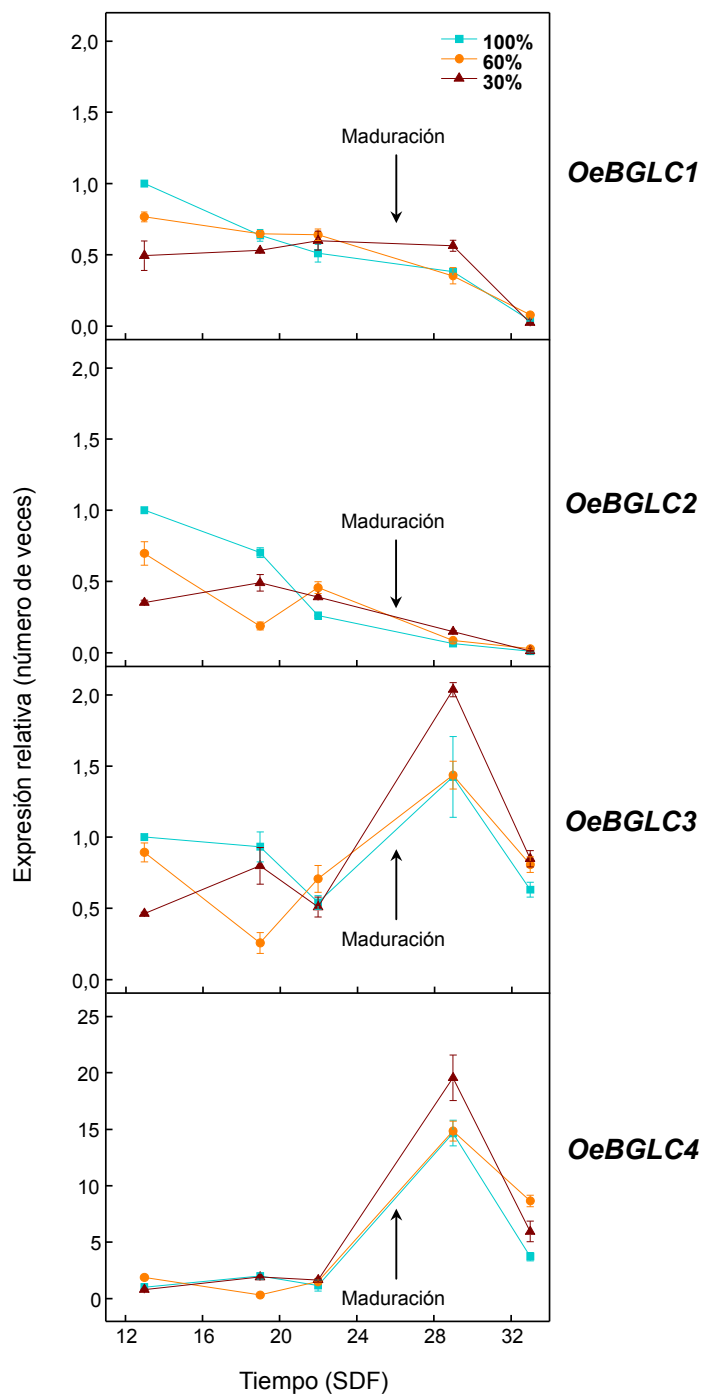


Fig. 40. Efecto del riego deficitario sobre los niveles de expresión relativa de los genes *OeBGLC1*, *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en mesocarpio de aceitunas de la variedad *Arbequina*. En los tejidos indicados, los niveles de expresión relativa se determinaron mediante qRT-PCR usando como calibrador el nivel de expresión del gen correspondiente a 13 SDF con nivel de riego 100%, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

IV.5.4. Efecto de distintos estreses abióticos

Para estudiar el efecto de distintos estreses abióticos sobre los niveles de expresión de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* de aceituna manteniendo condiciones similares a las fisiológicas en el árbol, se tomaron ramas de olivo de las variedades Picual y Arbequina con aceitunas de 28 SDF y se incubaron durante 24 h, empleando como condiciones estándar 25 °C y un ciclo 12 h luz/12 h oscuridad. Las condiciones estándar se modificaron en cada caso según el efecto a estudiar, como se indica más adelante. Es de destacar que en condiciones estándar no se detectaron cambios en los niveles de expresión del gen estudiado (datos no mostrados), por lo que se consideraron como condiciones control de los efectos estudiados.

IV.5.4.1. Efecto de la temperatura

Al incubar las ramas de olivo a temperatura baja (15 °C), manteniendo el resto de las condiciones estándar, se produjo un aumento de los niveles de transcrito de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en el mesocarpo de ambas variedades (Fig. 41), alcanzándose máximos de expresión tras 1-3 h de incubación, con valores más altos en el caso de Picual. Posteriormente, los niveles de expresión se mantuvieron constantes o descendieron, según el caso.

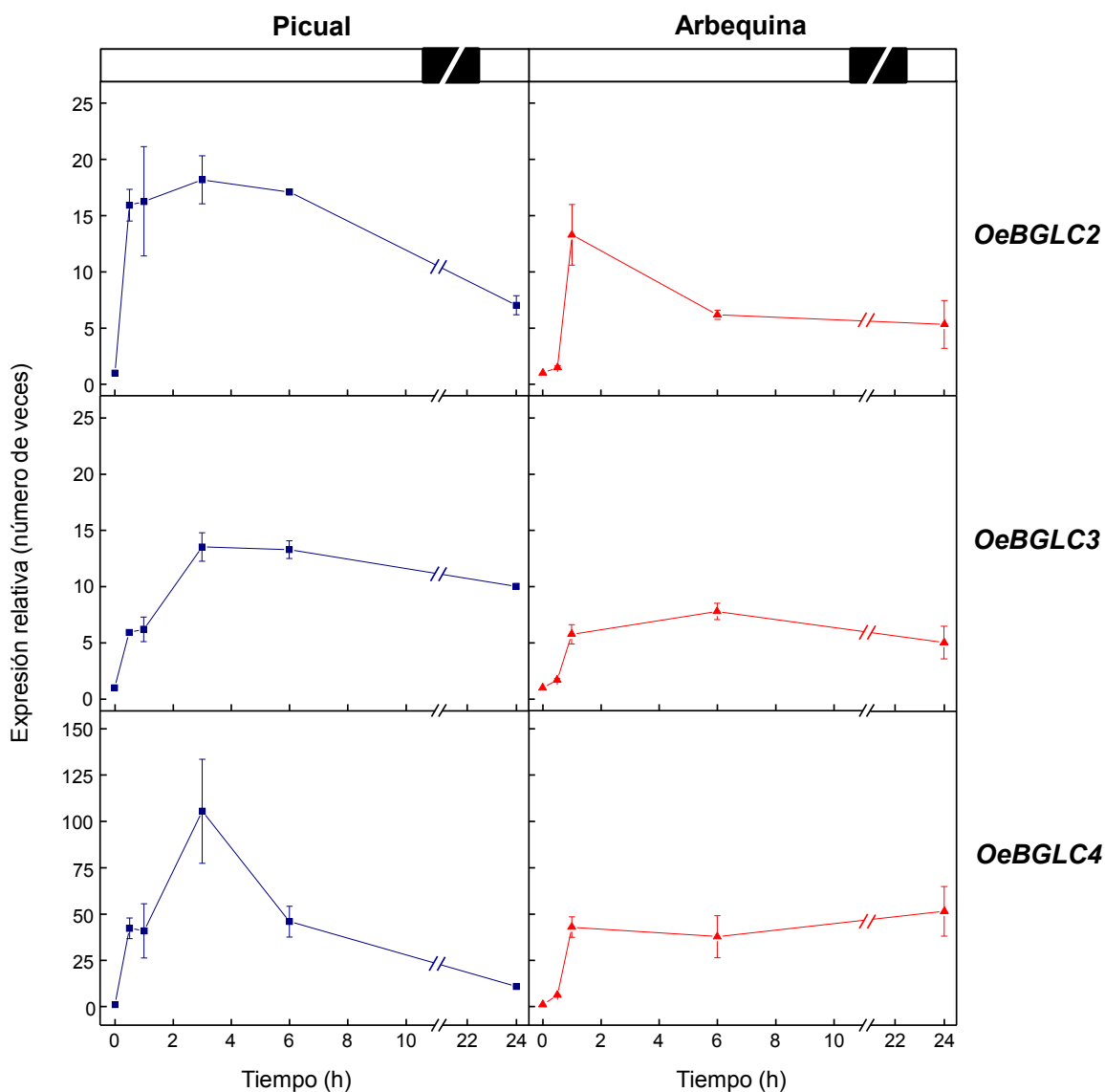


Fig. 41. Efecto de la temperatura baja sobre los niveles de expresión relativa de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en mesocarpio de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina. Ramas de olivo con frutos de 28 SDF se incubaron a 15 °C durante 24 h con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. A los tiempos indicados se determinaron los niveles de expresión relativa mediante qRT-PCR, usando como calibrador el nivel de expresión del gen correspondiente al tiempo cero del experimento según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

El análisis de la expresión de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* tras la incubación de las ramas de olivo a 35 °C (Fig. 42), reveló que mientras que en la variedad Picual la temperatura alta no provocaba cambios importantes en los niveles de transcrito de los tres genes estudiados, en la variedad Arbequina se produjo una disminución progresiva hasta alcanzar niveles prácticamente indetectables.

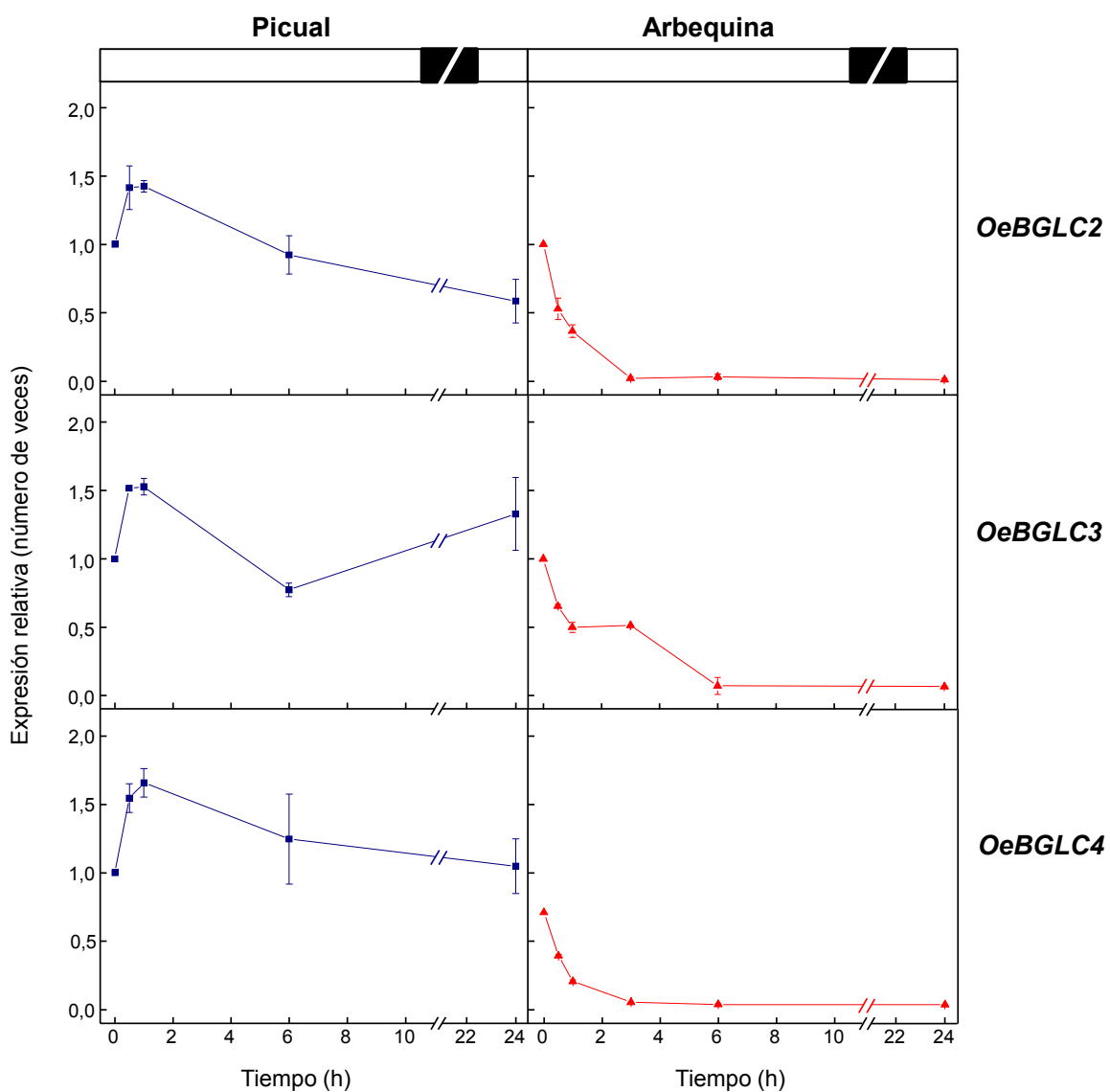


Fig. 42. Efecto de la temperatura alta sobre los niveles de expresión relativa de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en mesocarpio de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina. Ramas de olivo con frutos de 28 SDF se incubaron a 35 °C durante 24 h con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. A los tiempos indicados se determinaron los niveles de expresión relativa mediante qRT-PCR, usando como calibrador el nivel de expresión del gen correspondiente al tiempo cero del experimento según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

IV.5.4.2. Efecto de la oscuridad

Para estudiar el efecto de la oscuridad sobre los niveles de expresión relativa de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en mesocarpo de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina, se incubaron ramas de olivo en condiciones estándar, excepto que el experimento se llevó a cabo en oscuridad. Para todos los genes se observó una disminución de los niveles de expresión tanto en la variedad Picual como en Arbequina (Fig. 43), siendo el descenso más acusado en el caso de Picual alcanzándose niveles indetectables, y más suave en el caso de Arbequina, con reducciones de los niveles de transcrito en torno al 50%.

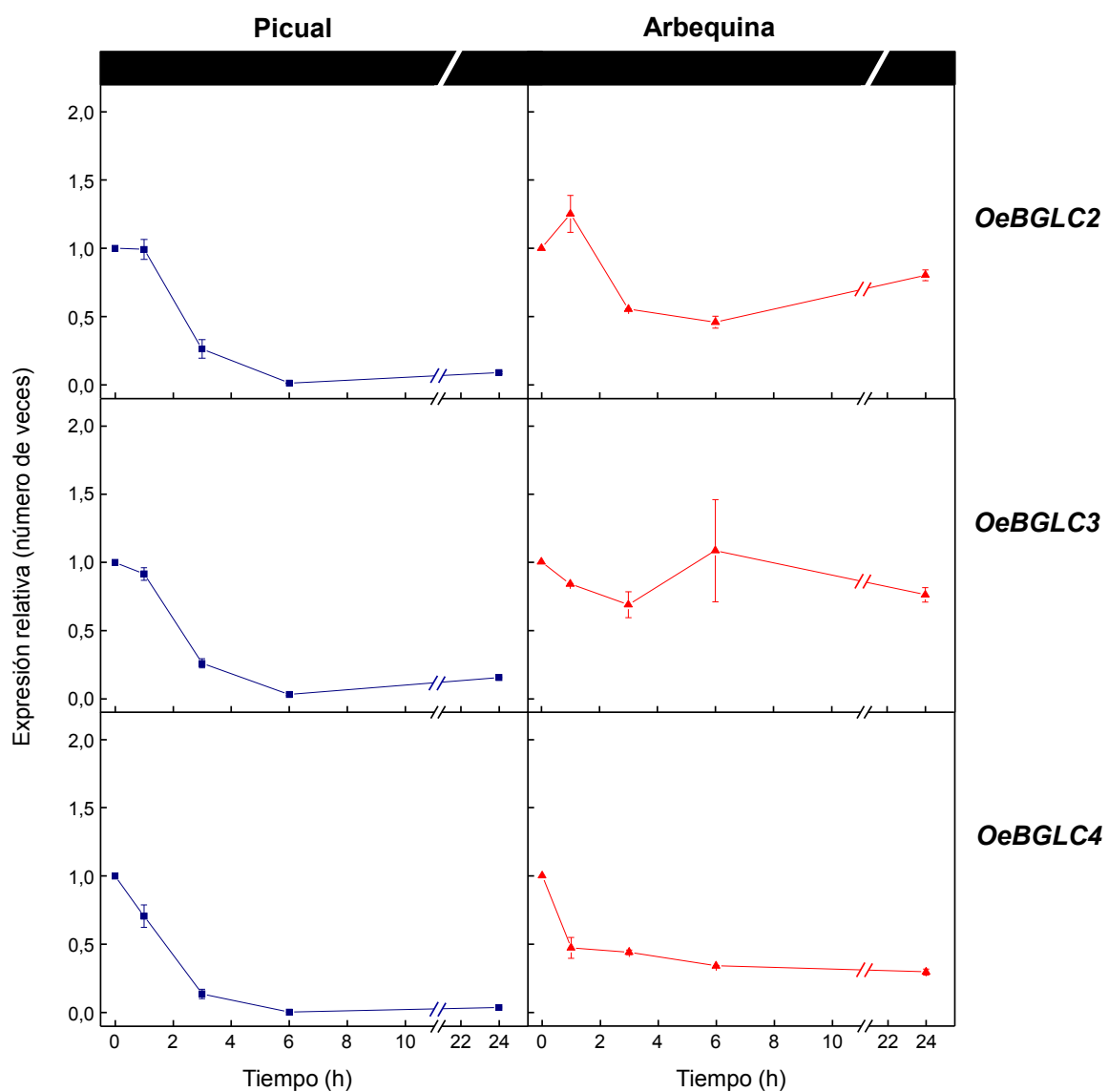


Fig. 43. Efecto de la oscuridad sobre los niveles de expresión relativa de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en mesocarpio de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina. Ramas de olivo con frutos de 28 SDF se incubaron a 25 °C durante 24 h en oscuridad. A los tiempos indicados se determinaron los niveles de expresión relativa mediante qRT-PCR, usando como calibrador el nivel de expresión del gen correspondiente al tiempo cero del experimento según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

IV.5.4.3. Efecto de la herida

Con el objeto de estudiar el efecto que provoca la herida sobre los niveles de expresión de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en mesocarpo de aceituna de las variedades Picual y Arbequina (Fig. 44), se incubaron en las condiciones estándar ramas de olivo de ambas variedades cuyos frutos habían sido previamente sometidos a daño por herida mediante la presión con pinzas planas. En el caso de Picual, se observó una disminución de los niveles de transcrito de los tres genes estudiados, excepto tras 6 h de tratamiento donde se detectó un valor ligeramente mayor. En cambio, en la variedad Arbequina, los niveles de expresión de dichos genes disminuían hasta las 3 h para luego incrementarse progresivamente hasta alcanzar prácticamente los niveles iniciales.

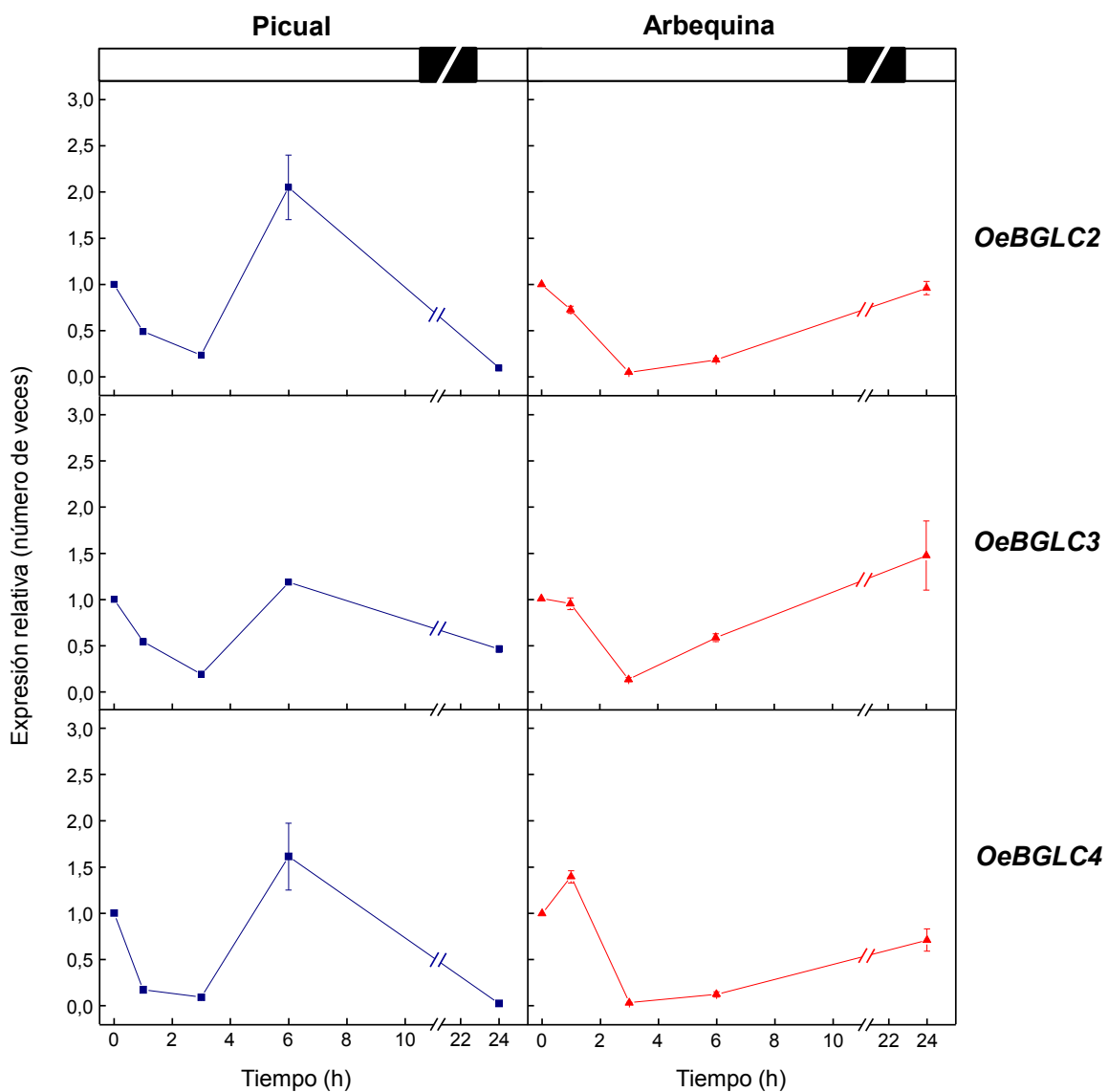


Fig. 44. Efecto de la herida sobre los niveles de expresión relativa de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en mesocarpio de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina. Ramas de olivo con frutos de 28 SDF se incubaron a 25 °C durante 24 h con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, tras provocar en las aceitunas daño por herida mediante presión con pinzas planas. A los tiempos indicados se determinaron los niveles de expresión relativa mediante qRT-PCR, usando como calibrador el nivel de expresión del gen correspondiente al tiempo cero del experimento según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

IV.6. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DE LAS β -GLUCOSIDASAS DE OLIVO EN LAS VARIEDADES MENYA Y SHENGEH DURANTE LA MADURACIÓN DEL FRUTO

Para profundizar en el conocimiento de la contribución de las distintas BGLCs de olivo sobre el perfil fenólico del AOV, se seleccionaron las variedades Menya y Shengeh de la Colección Nuclear CN36, cuyos aceites se caracterizan por poseer contenidos fenólicos muy altos y muy bajos, respectivamente. Utilizando frutos de ambas variedades en cuatro estadios de desarrollo y maduración diferentes se determinaron los niveles de expresión relativa de los cuatro genes *BGLC* en mesocarpo, se midieron los niveles de actividad BGLC y se realizaron análisis de la composición fenólica tanto de los frutos como de los aceites obtenidos a partir de ellos.

IV.6.1. Evolución de los niveles de expresión de los genes *BGLC* de olivo en mesocarpo durante la maduración del fruto

Se determinaron los niveles de expresión relativa de los cuatro genes *BGLC* en mesocarpo durante la maduración de los frutos de las variedades Menya y Shengeh mediante qRT-PCR (Fig. 45). Los niveles de expresión de *OeBGLC1* y *OeBGLC2* disminuían a lo largo de la maduración del fruto en ambas variedades. Respecto al gen *OeBGLC3*, se observaba un máximo en sus niveles de expresión a 31 SDF en el caso de Shengeh, mientras que en Menya no se detectaron cambios significativos. Por último, el gen *OeBGLC4* mostraba un máximo en sus niveles de transcrito a 28 SDF en ambas variedades. Por otro lado, los niveles de expresión de los genes *OeBGLC1* y *OeBGLC3* fueron superiores en la variedad Shengeh que en Menya, al contrario de lo que sucede con los genes *OeBGLC2* y *OeBGLC4*, donde los niveles de transcrito son superiores en Menya en comparación con Shengeh.

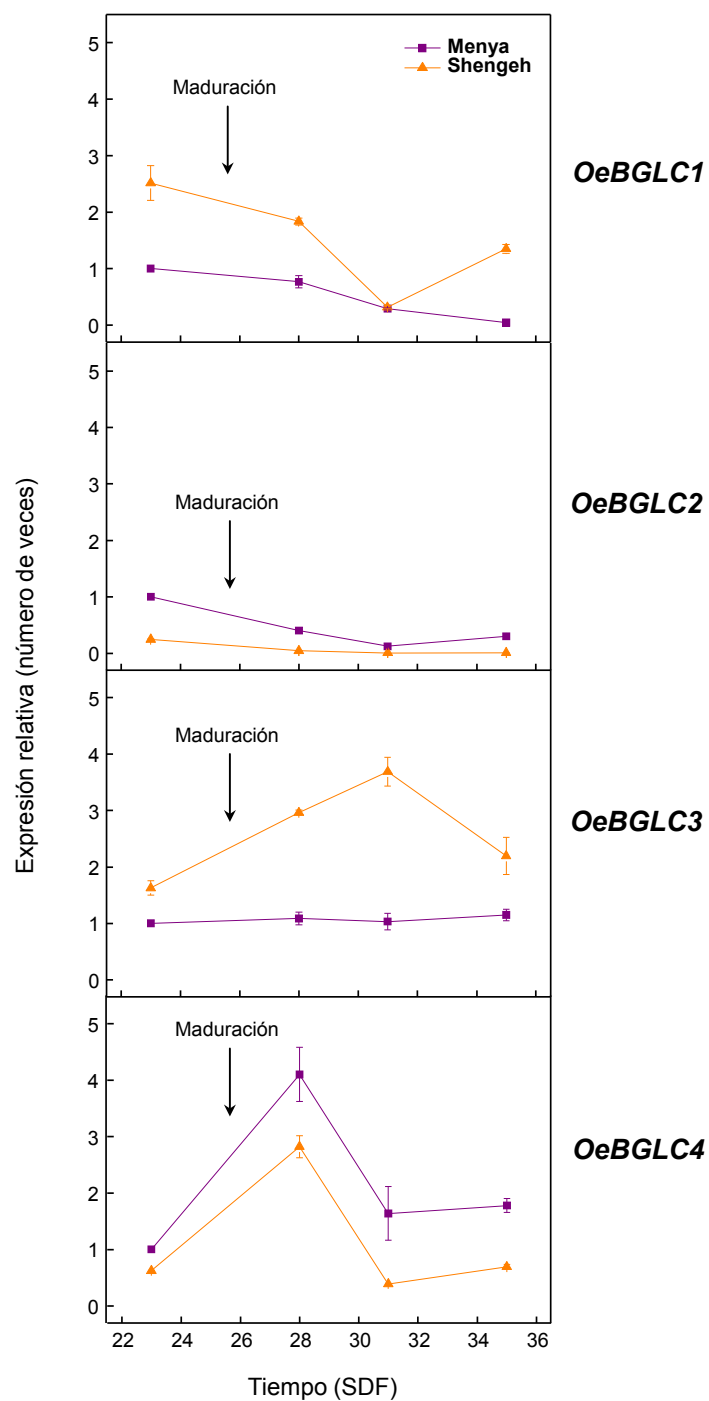


Fig. 45. Evolución de los niveles de expresión relativa de los genes *OeBGLC1*, *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en mesocarpio de aceitunas de las variedades Menya y Shengeh durante la maduración del fruto. A los tiempos indicados, los niveles de expresión relativa se determinaron mediante qRT-PCR usando como calibrador el nivel de expresión del gen correspondiente de la variedad Menya con 23 SDF, según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

IV.6.2. Evolución de la actividad BGLC durante la maduración del fruto

Para efectuar las medidas de actividad BGLC en frutos de las variedades Menya y Shengeh a lo largo de su maduración, se obtuvieron extractos crudos a partir de mesocarpo y se determinaron los niveles de actividad mediante el método espectrofotométrico utilizando como sustrato pNPG (Fig. 46). Los niveles de actividad de la variedad Menya fueron significativamente superiores a los de Shengeh en todos los estadios estudiados. Ambas variedades mostraban su mayor nivel de actividad BGLC a las 28 SDF.

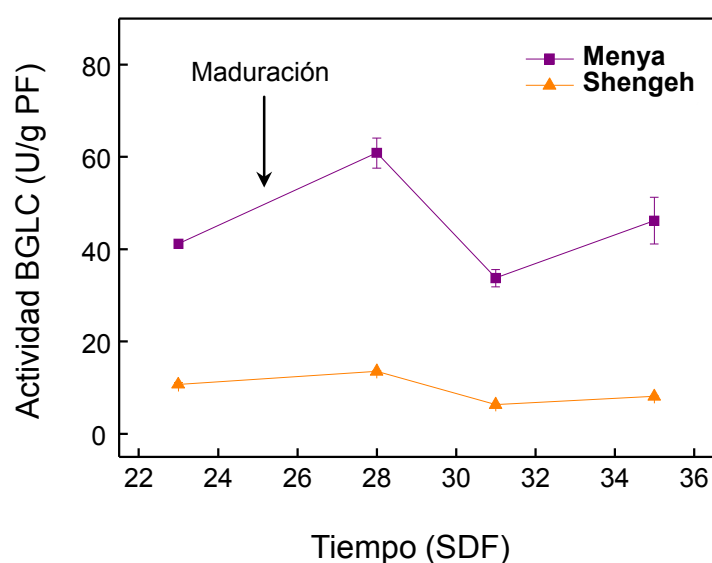


Fig. 46. Evolución de la actividad β -glucosidasa en pulpa de aceitunas de las variedades Menya y Shengeh durante la maduración. La medida de actividad enzimática se llevó a cabo con el método espectrofotométrico descrito en el apartado III.9.1.1. a partir de los correspondientes extractos de polvos acetónicos obtenidos según el apartado III.8. Los resultados, expresados en ambos casos como U por g de peso fresco de pulpa, representan la media \pm SD de tres extractos y medidas independientes.

IV.6.3. Análisis de la composición fenólica de mesocarpo del fruto y de los correspondientes aceites

Los análisis detallados de los compuestos fenólicos de frutos y aceites de ambas variedades quedan recogidos en las tablas Tab. 12, Tab. 13, Tab. 14 y Tab. 15. Tal y como puede observarse en las tablas Tab. 12 y Tab. 13, las diferencias en la composición fenólica de los frutos de ambas variedades son tanto cualitativas como cuantitativas. El principal glucósido fenólico presente en los frutos de la variedad Shengeh fue la oleuropeína cuya concentración experimenta un ligero descenso a las 28 SDF manteniéndose prácticamente constante hasta el final de la maduración. Los frutos de la variedad Menya presentan un contenido fenólico total mucho más elevado mostrando además concentraciones muy significativas de varios glucósidos, entre los que destacan la oleuropeína y la demetiloleuropeína. La primera alcanza su máxima concentración a las 23 SDF y desciende de forma pronunciada a lo largo de la maduración mientras que la segunda sigue una tendencia inversamente proporcional y alcanza su máxima concentración a las 35 SDF. El perfil fenólico de los aceites de ambas variedades muestra también diferencias significativas. Así el contenido fenólico de Shengeh sufre muy pocas modificaciones a lo largo de la maduración (Tab. 15) mientras que en la variedad Menya (Tab. 14) se aprecia un descenso progresivo del contenido fenólico total paralelo a la maduración.

Tab. 12. Contenido de compuestos fenólicos de pulpa de aceitunas de la variedad Menya durante la maduración. La concentración de cada uno de los compuestos está expresada como μmol por g de peso fresco de pulpa. Los compuestos fenólicos de pulpa fueron extraídos y analizados según se describe en Materiales y Métodos.

Compuesto fenólico ($\mu\text{mol/g}$ PF)	Tiempo (SDF)			
	23	28	31	35
Hidroxitirosol	0,140*	1,007	1,221	1,915
Tirosol	Nd**	Nd	Nd	Nd
Demetiloleuropeína	1,514	22,712	34,823	66,452
Verbascósido	0,092	Nd	0,139	0,786
Luteolina-7-glucósido	0,638	0,452	0,211	0,480
Oleuropeína	54,463	9,668	1,172	Nd
Apigenina-7-glucósido	Nd	Nd	Nd	Nd
Ligustrósido	5,306	0,629	Nd	Nd

*Cada dato es la media de cuatro determinaciones analíticas realizadas sobre dos extractos fenólicos independientes. En todos los casos, el coeficiente de variación (CV) fue inferior al 8%.

**No detectado.

Tab. 13. Contenido de compuestos fenólicos de pulpa de aceitunas de la variedad Shengeh durante la maduración. La concentración de cada uno de los compuestos está expresada como μmol por gramo de peso fresco de pulpa. Los compuestos fenólicos de pulpa fueron extraídos y analizados según se describe en Materiales y Métodos.

Compuesto fenólico ($\mu\text{mol/g}$ PF)	Tiempo (SDF)			
	23	28	31	35
Hidroxitirosol	3,833*	3,967	5,095	3,987
Tirosol	Nd**	Nd	Nd	Nd
Demetiloleuropeína	Nd	Nd	Nd	Nd
Verbascósido	0,089	Nd	Nd	Nd
Luteolina-7-glucósido	Nd	Nd	Nd	Nd
Oleuropeína	10,827	7,218	6,156	6,513
Apigenina-7-glucósido	Nd	Nd	Nd	Nd
Ligustrósido	1,011	Nd	Nd	Nd

*Cada dato es la media de cuatro determinaciones analíticas realizadas sobre dos extractos fenólicos independientes. En todos los casos, el coeficiente de variación (CV) fue inferior al 8%.

**No detectado.

Tab. 14. Composición fenólica de aceites obtenidos a partir de aceitunas de la variedad Menya durante la maduración. La concentración de cada uno de los compuestos está expresada como μmol por g de aceite. La fracción fenólica del aceite fue extraída y analizada según se describe en Materiales y Métodos.

Compuesto fenólico ($\mu\text{mol/g}$ aceite)	Tiempo (SDF)			
	23	28	31	35
Hidroxitirosol	0,015*	0,008	0,004	0,006
Tirosol	0,018	0,021	0,029	0,025
Ácido vanílico	Nd**	Nd	Nd	Nd
Ácido <i>p</i> -cumárico	Nd	Nd	Nd	Nd
Acetato de hidroxitirosol	Nd	0,069	0,108	0,096
DAOD	0,394	0,975	1,229	0,962
Isómeros AO	1,5433	0,6468	0,2742	0,045
Acetato de tirosol	Nd	Nd	Nd	Nd
DALD	0,410	0,566	1,159	0,837
Pinorresinol	0,014	0,007	0,016	0,009
Ácido cinámico	0,011	0,003	0,001	0,001
1-acetoxipinorresinol	0,056	0,034	0,023	0,028
AAO	1,015	0,300	0,060	0,046
AAL	1,7436	0,5965	0,2076	0,0703
Ácido ferúlico	Nd	Nd	Nd	Nd
Luteolina	0,003	0,006	0,005	0,007
Apigenina	0,001	0,002	0,001	0,001

*Cada dato es la media de cuatro determinaciones analíticas realizadas sobre dos extractos fenólicos independientes. En todos los casos, el coeficiente de variación (CV) fue inferior al 8%.

**No detectado.

Tab. 15. Composición fenólica de aceites obtenidos a partir de aceitunas de la variedad Shengeh durante la maduración. La concentración de cada uno de los compuestos está expresada como μmol por g de aceite. La fracción fenólica del aceite fue extraída y analizada según se describe en Materiales y Métodos.

Compuesto fenólico ($\mu\text{mol/g}$ aceite)	Tiempo (SDF)			
	23	28	31	35
Hidroxitirosol	0,012*	0,005	0,004	0,010
Tirosol	0,023	0,022	0,013	0,021
Ácido vanílico	0,004	0,003	0,001	0,002
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,002	0,002	0,001	0,003
Acetato de hidroxitirosol	0,014	0,008	0,006	0,006
Isómeros AO	0,060	0,048	0,037	0,039
DAOD	0,074	0,025	0,020	0,015
Acetato de tirosol	Nd**	Nd	Nd	Nd
DALD	0,102	0,054	0,044	0,035
Pinorresinol	0,007	0,007	0,006	0,005
Ácido cinámico	0,001	0,001	0,001	0,001
1-acetoxipinorresinol	0,026	0,021	0,018	0,025
AAO	0,043	0,085	0,108	0,039
AAL	0,037	0,025	Nd	Nd
Ácido ferúlico	Nd	Nd	Nd	Nd
Luteolina	0,006	0,008	0,010	0,112
Apigenina	0,002	0,003	0,002	0,003

*Cada dato es la media de cuatro determinaciones analíticas realizadas sobre dos extractos fenólicos independientes. En todos los casos, el coeficiente de variación (CV) fue inferior al 8%.

**No detectado.

Examinando los resultados obtenidos cabe destacar, en primer lugar, las grandes diferencias observadas en el contenido de glucósidos fenólicos de los frutos de ambas variedades, siendo éstos considerablemente superiores en la variedad Menya que en Shengeh en todos los estadios considerados (Fig. 47) y asimismo, la diferente evolución de estos contenidos a lo largo de la maduración. En segundo lugar, también son destacables los diferentes perfiles fenólicos de los aceites obtenidos de ambas variedades (Fig. 48), siendo los aceites de Menya los que mostraron un mayor contenido fenólico con respecto a los de Shengeh en todos los estadios considerados. También en este caso se apreciaron importantes diferencias en los cambios de contenido fenólico de ambas variedades a lo largo de la maduración.

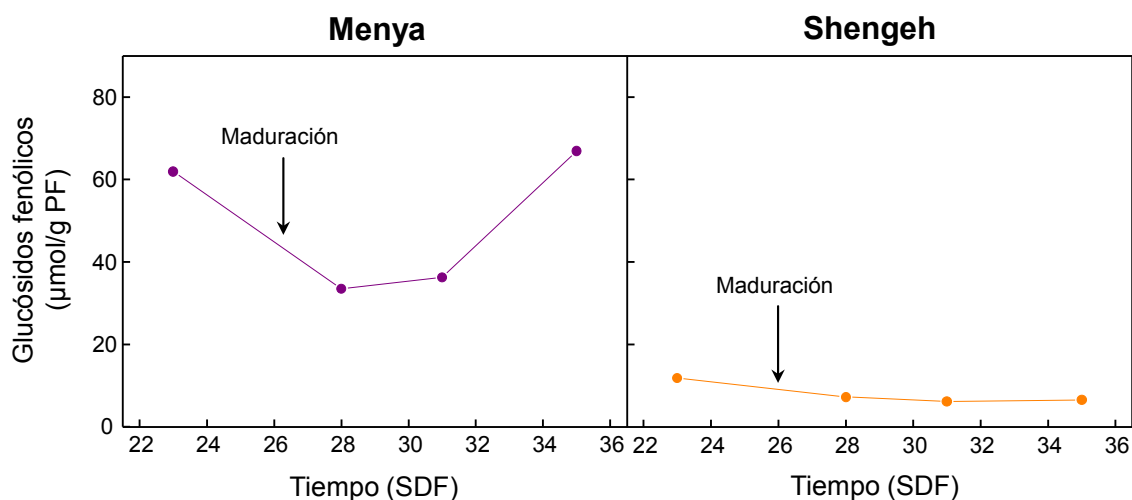


Fig. 47. Evolución del contenido de glucósidos fenólicos en pulpa de frutos de las variedades Menya y Shengeh a lo largo de la maduración del fruto. La fracción fenólica de la pulpa fue extraída y analizada según se describe en Materiales y Métodos.

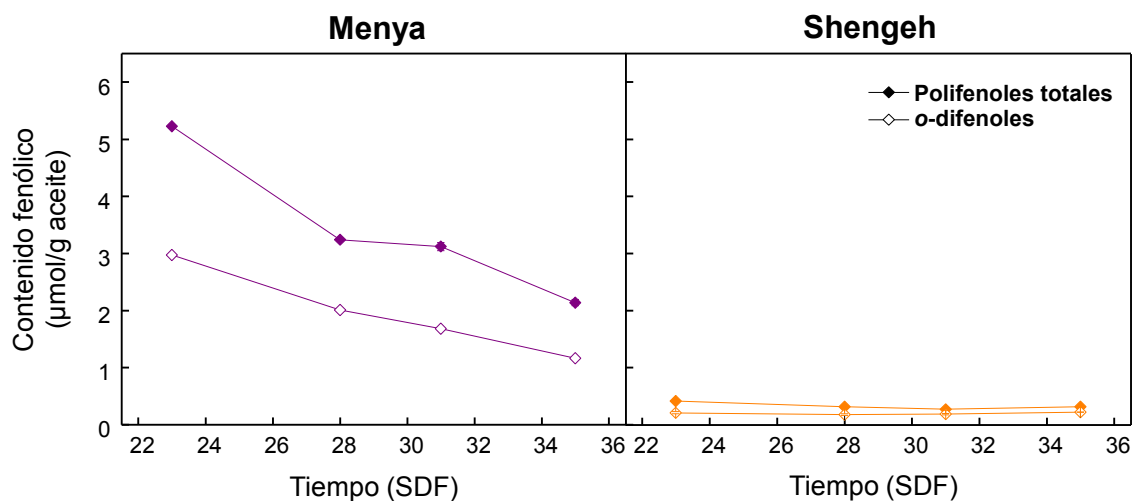


Fig. 48. Evolución del contenido fenólico de aceites procedentes de aceitunas de las variedades Menya y Shengeh a lo largo de la maduración. La fracción fenólica del aceite fue extraída y analizada según se describe en Materiales y Métodos.

Del análisis global de los datos obtenidos se deduce que mientras que en la variedad Shengeh existe una correlación entre la cantidad de glucósidos fenólicos del fruto y el contenido de compuestos fenólicos del acetite, en la variedad Menya no se aprecia esta tendencia, poniendo de manifiesto la influencia de otros factores que están determinando la composición fenólica de los aceites.

V. DISCUSIÓN

La composición fenólica del AOV se encuentra determinada por las transformaciones enzimáticas y/o químicas que tienen lugar durante el procesado de los frutos, las cuales a su vez están muy condicionadas tanto por el contenido de compuestos fenólicos de la aceituna como por el nivel de actividad de las enzimas endógenas responsables de su transformación. Las condiciones de molienda y batido inciden sobre la actividad de estas enzimas y afectan, por lo tanto, al perfil fenólico final del AOV. A pesar de que han sido muchos los estudios realizados sobre la composición fenólica de frutos y aceites de distintas variedades extraídos en diferentes condiciones, son escasos los estudios puramente bioquímicos encaminados a desvelar la implicación de cada una de las enzimas que intervienen en la transformación de los compuestos fenólicos durante el proceso de obtención del AOV. Del conjunto de estas enzimas, la actividad catalítica de la enzima BGLC desempeña un papel crucial en la transformación de los glucósidos fenólicos del fruto generando distintos derivados secoiridoideos a partir de sus correspondientes agluconas, que gracias a su carácter anfipático son transferidos al AOV.

Aunque en estudios anteriores realizados en nuestro grupo se ha clonado un gen *BGLC* de olivo (*OepBGLC1*) y se han analizado sus niveles de expresión en distintos tejidos durante el desarrollo y maduración del fruto (Romero-Segura, 2010), hasta la fecha, no se ha realizado una caracterización bioquímica, molecular y celular de las distintas isoenzimas y genes *BGLC* de olivo. El presente trabajo de investigación tiene como objetivo fundamental la identificación y caracterización de genes e isoenzimas *BGLC* de aceituna que participan en la transformación de los compuestos fenólicos del AOV, así como el estudio de su regulación y función fisiológica.

El primer paso fue la búsqueda de nuevos genes *BGLC* de olivo a partir de la base de datos de ESTs generada en el proyecto OLEAGEN (Muñoz-Mérida *et al.*, 2013) partiendo de la secuencia del gen *OepBGLC1* (Romero-Segura, 2010). Debido a que los niveles de actividad *BGLC* detectados en la semilla son extraordinariamente bajos comparados con los encontrados en mesocarpo (Romero-Segura, 2010), se eligió el mesocarpo como el tejido más adecuado para aislar nuevos genes *BGLCs*. De esta forma, se identificaron numerosos genes candidatos *BGLC* de olivo, de los cuales siete se expresaban en mesocarpo. De éstos, únicamente se seleccionaron tres que presentaban niveles de expresión significativamente elevados en el mesocarpo según datos del análisis de

expresión *in silico*, ya que el número de ESTs que constituye cada secuencia ensamblada es indicativo del nivel de expresión del gen correspondiente.

Una vez llevado a cabo el aislamiento de los tres nuevos genes *BGLC* de olivo, denominados *OepBGLC2*, *OepBGLC3* y *OepBGLC4*, el análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos deducidas mostró que existían altos grados de similitud con las secuencias conocidas de BGLCs de plantas, así como la presencia de regiones altamente conservadas que sirven como huella para identificar a las BGLCs de la familia GH1 (Fig. 20) (Esen, 2003). Aunque históricamente en la literatura se habla de la existencia de una serie de motivos conservados en esta familia (YRFSI, TFNEP, LGLNYY, YITENG y DNFEW), los únicos motivos mencionados por todos los autores de las secuencias de BGLCs de plantas de la familia GH1 que se han empleado en el estudio filogenético presentado en este trabajo son los que contienen a los dos ácidos glutámicos directamente implicados en la catálisis: TFNEP (catálisis ácido base) y YITENG (nucleófilo). Además, el análisis de los dominios conservados realizado con el programa del NCBI y con el programa Pfam identificó en todas las secuencias BGLC de olivo único dominio denominado “Glyco_hydro_1”, característico de las BGLCs de la familia GH1 y que abarca prácticamente a toda la secuencia. Una característica importante que poseen las BGLCs es que disponen de dos bolsillos de unión al sustrato (Ketudat Cairns y Esen, 2010). El primero de ellos, es responsable de la unión al azúcar del glucósido y está formado por aminoácidos altamente conservados que se sitúan en torno al centro activo y que están presentes en casi todas las BGLCs de plantas incluidas las de olivo (Fig. 20). Dentro de este bolsillo, sólo el residuo conservado de triptófano situado próximo a la región C-terminal no se encontró en las posiciones equivalentes de *OepBGLC3* y *OepBGLC4* ni en las BGLCs de *Vitis vinífera* (*VvBGLC2*) y de *Psychotria ipecacuana* (*PiBGLC*), estando sustituido en todos los casos por un residuo de leucina. El segundo de los bolsillos de unión al sustrato está encargado de las interacciones con la aglucona, la parte no azucarada del glucósido, y está mucho menos conservado. La mayor variabilidad de los residuos situados en esta zona de unión con la aglucona constituye de hecho la base de la especificidad de sustrato de estas enzimas y por tanto de sus diferentes funciones fisiológicas asignadas. También se encontraron en las cuatro secuencias de BGLC de olivo posibles sitios de N-glicosilación. Mientras que *OepBGLC1* poseía un único sitio posible en la posición N83, el resto de las BGLCs de olivo presentaron varios: 3 para *OepBGLC2* en las posiciones N225, N279 y N423; 4 para *OepBGLC3* en las posiciones N219,

N268, N405 y N430; y 4 para OepBGLC4 en las posiciones N215, N220, N269 y N406 (Fig. 20). Sólo dos de los sitios de N-glicosilación predichos estaban conservados en las tres isoenzimas OepBGLC2, OepBGLC3 y OepBGLC4 en las posiciones N279, N268 y N269, y N423, N405 y N406, respectivamente.

En cuanto a la predicción de la localización subcelular, OepBGLC2, OepBGLC3 y OepBGLC4 presentaban extensiones en el extremo N-terminal que darían lugar a péptidos señal de 24, 21 y 22 aminoácidos, respectivamente. Además, distintos programas bioinformáticos indican una localización extracelular o apoplástica para OepBGLC3 y OepBGLC4, mientras que para OepBGLC2 no se obtenía una predicción clara, siendo la localización apoplástica la más probable. Para las tres isoenzimas BGLC de olivo OepBGLC2, OepBGLC3 y OepBGLC4 se producían proteínas maduras tras el procesamiento proteolítico del péptido señal de 493, 485 y 486 aminoácidos con una masa molecular de 56, 54,7 y 55,0 kDa, un punto isoelectrico de 5,6, 5,6 y 5,7, respectivamente. De esta forma, las masas moleculares teóricas se situaban en el rango de 55-65 kDa descrito para la mayoría de monómeros de BGLCs de plantas (Esen, 2003).

El análisis filogenético de los genes *BGLC* de olivo estableció que OepBGLC1 se situaba junto con otras BGLCs que están implicadas en la hidrólisis de una familia de sustratos que participan en rutas del metabolismo secundario de las plantas y cuyas agluconas poseen además propiedades tóxicas y antimicrobianas (Fig. 22). En cambio, OepBGLC2, OepBGLC3 y OepBGLC4 se ubican en una rama diferente, que se desglosa a su vez en otras dos: una donde OepBGLC2 se sitúa junto a la BGLC de *Pinus contorta* implicada en procesos de lignificación (Dharmawardhana *et al.*, 1999), y otra en la que OepBGLC3 y OepBGLC4 se agrupa con BGLC2 de *Vitis vinifera* implicada en la modulación de los niveles celulares de ABA (Zhang *et al.*, 2013).

Conocido el papel que la actividad BGLC tiene sobre la transformación de los compuestos fenólicos del fruto y la repercusión de dicho proceso sobre la composición fenólica del AOV, se procedió a la expresión heteróloga de los cuatro genes *BGLC* de olivo. De esta forma, también se trataba de confirmar la identidad funcional de los clones aislados. En primer lugar, la expresión heteróloga se realizó con el vector pET-45b(+) en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), comprobándose previamente que la actividad BGLC en los extractos crudos de células transformadas con el vector sin inserto era prácticamente indetectable. Posteriormente se llevó a cabo un proceso de optimización de las condiciones

de inducción realizando varios ensayos en los que se modificaron tanto la temperatura como el tiempo de incubación. A pesar de llevar a cabo la inducción de la expresión de las BGLC recombinantes a baja temperatura para evitar la formación de cuerpos de inclusión, el análisis de las distintas fracciones celulares obtenidas mediante SDS-PAGE (Fig. 23) mostró que, aunque todas las isoenzimas recombinantes estaban siendo expresadas, su presencia sólo era detectable en las fracciones totales no encontrándose en los extractos crudos, lo que indicaba que en todos los casos se estaban formando agregados insolubles en forma de cuerpos de inclusión. Aunque las masas moleculares calculadas de las proteínas recombinantes se ajustaban a las esperadas para todas las BGLCs, los ensayos de actividad realizados tanto en las fracciones totales como en los extractos crudos fueron negativos en todos los casos. La formación de cuerpos de inclusión explicaría por un lado la inactividad de las isoenzimas recombinantes, que se encontrarían completamente desnaturalizadas, y por otro la imposibilidad de solubilizar dichas proteínas. La obtención de cuerpos de inclusión durante la expresión heteróloga de BGLCs en *E. coli* se ha descrito previamente tanto en plantas monocotiledóneas (Zouhar *et al.*, 1999) como dicotiledóneas (Minami *et al.*, 1999; Mizutani *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002; Toonkool *et al.*, 2006), si bien es cierto que el fenómeno es más común en éstas últimas. En los casos mencionados, la formación de cuerpos de inclusión y la no funcionalidad de las proteínas recombinantes se ha relacionado con la falta de glicosilación. En este sentido, hay que destacar la falta de consenso respecto al papel definitivo que juega la glicosilación en la actividad catalítica de proteínas BGLCs, encontrándose en la bibliografía casos como los anteriores en los que no se obtuvieron proteínas funcionales, otros en los que la expresión en *E. coli* sólo permitió obtener niveles muy bajos de actividad (Dharmawardhana *et al.*, 1999; Framm *et al.*, 2000) y otros en los que BGLCs de plantas tanto monocotiledóneas (Cicek y Esen, 1999; Nikus *et al.*, 2003; Sue *et al.*, 2006) como dicotiledóneas (Warzecha *et al.*, 2000; Barleben *et al.*, 2007; Nomura *et al.*, 2008) se pudieron expresar como proteínas recombinantes completamente funcionales. Esta disparidad de resultados parece sugerir que la glicosilación es un factor importante pero no decisivo para que las enzimas BGLCs sean activas. La glicosilación de las proteínas, particularmente la N-glicosilación, suele afectar profundamente a la estabilidad, al plegamiento y a la tendencia a la oligomerización (Mitra *et al.*, 2006), lo que parece indicar la expresión de muchas de estas proteínas en su forma

insoluble se debe a la inexistencia de estas modificaciones postraduccionales al estar siendo expresadas en *E. coli*.

Las fracciones totales de *E. coli* donde se detectaron las proteínas insolubles se analizaron mediante western blot seguido de inmunodetección usando dos tipos de anticuerpos, uno específico del motivo 6xHis que el vector pET-45b(+) incluye en la posición N-terminal de las proteínas recombinantes, y otro obtenido a partir de la proteína BGLC purificada de mesocarpo de aceituna (Fig. 24). La detección con el anticuerpo anti 6xHis de las bandas que se observaban en SDS-PAGE en las calles correspondientes a las fracciones totales de las células que estaban expresando las BGLCs, confirmó que se trataba de las cuatro BGLCs recombinantes. Sin embargo, el anticuerpo anti BGLC únicamente fue capaz de detectar intensamente a la isoenzima recombinante OepBGLC1 y muy débilmente a la isoenzima OepBGLC2. Estos resultados sugieren que la preparación purificada de BGLC obtenida a partir de mesocarpo de aceituna (Romero-Segura *et al.*, 2009) corresponde a la isoenzima OepBGLC1, mientras que OepBGLC2 puede haber sido reconocida débilmente debido a que presente reacción cruzada con los anticuerpos obtenidos frente a OepBGLC1.

Teniendo en cuenta que en la bibliografía se han descrito algunas BGLCs fueron expresadas con actividad en la levadura *Pichia pastoris* (Cairns *et al.*, 2000; Hartel y Brandt, 2002; Zhou *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2004; Toonkool *et al.*, 2006; Naoumkina *et al.*, 2007; Andersson *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009), que posee la capacidad de realizar N-glicosilación como modificación postraducciona, se decidió emplear un sistema de expresión alternativo basado en dicha levadura para tratar de expresar con actividad las BGLCs de olivo. Sin embargo, a pesar de ensayar distintas condiciones de inducción y realizar análisis mediante SDS-PAGE, western blot seguido de inmunodetección y ensayos de actividad enzimática, no se detectó proteína sobreexpresada ni actividad BGLC en ningún caso (datos no mostrados).

Descartados los dos sistemas de expresión ya mencionados se decidió llevar a cabo la expresión de las cuatro isoenzimas BGLC de olivo utilizando el sistema de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*. Al tratarse de isoenzimas propias de un organismo vegetal expresadas en una planta, además siendo ambas dicotiledóneas, parecía razonable que las modificaciones postraduccionales se llevaran a cabo de una forma adecuada. Para la preparación de las construcciones plasmídicas con el vector pH2GW7 se tuvo en cuenta la necesidad de incluir en las futuras proteínas recombinantes una secuencia 6xHis en el

extremo C-terminal que facilitase la purificación posterior, dejando intacto el extremo N-terminal para que *N. benthamiana* lo procesase adecuadamente. Tras la infiltración completa de las hojas de *N. benthamiana* con las suspensiones celulares de *A. tumefaciens*, se determinó que 3 días después de la infiltración era el tiempo óptimo de máxima acumulación de proteína sobreexpresada. Como se muestra en la Fig. 25, sólo se observaban las proteínas recombinantes BGLC de olivo en el SDS-PAGE de las preparaciones purificadas mediante cromatografía de afinidad, siendo imposible detectarlas en el SDS-PAGE se observaban de extractos crudos, lo que permite concluir que la expresión de las isoenzimas BGLC recombinantes se realizó en su forma soluble.

El análisis de las distintas preparaciones purificadas mediante western blot e inmunodetección (Fig. 26) utilizando tanto el anticuerpo específico del motivo 6xHis como el anticuerpo específico anti BGLC mostró que todas las isoenzimas recombinantes eran detectadas por el anticuerpo anti 6xHis, lo que confirmó no sólo su correcta expresión sino también la incorporación del citado motivo en sus extremos C-terminales. Tal y como sucedió en el caso de la expresión heteróloga en *E. coli*, el anti cuerpo anti BGLC detectó de forma mayoritaria a la isoenzima OepBGLC1 y de una forma menos marcada a OepBGLC2. Además, la masa molecular de OepBGLC1 (65,5 kDa) coincide prácticamente con la de la proteína BGLC purificada en mesocarpo de aceituna (65,0 kDa), confirmando de nuevo que se trata de la misma isoenzima. En cambio, las masas moleculares obtenidas para las otras tres isoenzimas (66,4, 68,9, 67,4 y 70,3 kDa para OepBGLC2, OepBGLC3-1, OepBGLC3-2 y OepBGLC4, respectivamente) fueron significativamente superiores a las esperadas (56, 54,7 y 55,0 kDa para OepBGLC2, OepBGLC3, y OepBGLC4, respectivamente) y a las calculadas para las proteínas expresadas en *E. coli* (63,5, 60,1, 59,8 y 60,1 kDa para OepBGLC2, OepBGLC3+SP, OepBGLC3 y OepBGLC4, respectivamente), indicando que podrían estar sufriendo modificaciones postraduccionales. En este sentido, conviene mencionar que la predicción bioinformática indicaba la existencia de varios sitios susceptibles de sufrir N-glicosilación para estas tres isoenzimas, mientras que revelaba un único sitio para OepBGLC1.

Una vez conseguida la expresión heteróloga de las isoenzimas BGLC de olivo en hojas de *N. benthamiana* en su forma soluble, se llevaron a cabo los correspondientes ensayos de actividad. Estos ensayos se realizaron con preparaciones purificadas obtenidas a partir de extractos crudos tanto de hojas frescas cómo congeladas en nitrógeno líquido y

almacenadas a -80 °C, con el objeto de descartar la inactivación de las isoenzimas recombinantes por congelación y disponer de material almacenado para futuras determinaciones, no encontrándose diferencias de actividad entre ambos materiales de partida. La única isoenzima que resultó ser activa en el ensayo espectrofotométrico con el sustrato cromogénico pNPG fue OepBGLC1, no detectándose actividad en ningún caso en el resto de isoformas BGLC de olivo. Para evaluar la capacidad hidrolítica de las cuatro isoformas frente al principal glucósido fenólico del fruto, la oleuropeína, se llevaron a cabo reacciones con las preparaciones purificadas que posteriormente se analizaron cromatográficamente. De nuevo, únicamente se detectó hidrólisis del sustrato en los ensayos realizados con las preparaciones purificadas de la isoenzima OepBGLC1, no detectándose consumo alguno de sustrato en las preparaciones purificadas de las tres isoenzimas restantes incluso tras una hora de incubación. Este dato, junto con la detección inmunológica mayoritaria del anticuerpo anti BGLC de la isoenzima recombinante OepBGLC1, obtenida tanto en los experimentos de expresión heteróloga de *E. coli* como en los de *N. benthamiana*, permitió concluir que el gen que codifica a la proteína purificada en mesocarpo de aceituna y que posee la capacidad de hidrolizar los glucósidos fenólicos del fruto durante el proceso de obtención del AOV es *OepBGLC1*. Sin embargo, no se puede descartar la implicación del resto de las isoformas en la hidrólisis de los glucósidos fenólicos del fruto, ya que existen diversos factores que pueden haber provocado que no se detectase actividad. El primer lugar y tal y como se ha mencionado anteriormente, la producción de proteínas recombinantes en el sistema de *N. benthamiana* resultó ser bastante escasa, pudiendo no haberse alcanzado la cantidad mínima de proteína necesaria para detectar actividad en las condiciones experimentales empleadas. Además es importante tener en cuenta que en el contexto de la estructura tridimensional de las isoenzimas el motivo 6xHis puede situarse en posiciones relativamente inaccesibles que dificulten su retención en la columna cromatográfica de afinidad (Toonkool *et al.*, 2006) y de esta manera provocar que la concentración de la proteína recombinante sea inferior a lo esperable en las preparaciones purificadas. En segundo lugar, y teniendo en cuenta que ninguna de las tres isoformas demuestra tener la capacidad de hidrolizar ni pNPG ni oleuropeína, pudiera ocurrir que las modificaciones postraduccionales realizadas por *N. benthamiana* de alguna forma hubieran bloqueado el acceso del sustrato a los centros activos provocando la inactivación de las enzimas. En tercer lugar, y tal y como se ha

comentado en la introducción, la forma activa de muchas de las enzimas BGLCs requiere de la adopción de complejas estructuras binarias o cuaternarias, y cualquier factor ausente o presente que dificulte la adquisición de dichas formas multiméricas podría conducir a la pérdida de actividad. Por último, y dada la enorme diversidad de sustratos que poseen las BGLCs, podría darse el caso de que estas tres isoenzimas tuvieran muy poca afinidad por la oleuropeína y el pNPG, lo que podría haber provocado que en las condiciones ensayadas no haya sido posible detectar la hidrólisis de ambos sustratos. En los estudios de caracterización bioquímica de las BGLCs debe tenerse en cuenta que pueden existir enzimas que no sean activas frente a un sustrato natural abundante sin ser por ello inactivas, y que degraden muy eficientemente sustratos artificiales como el pNPG. Por otra parte, también es posible errar en la detección isoenzimas BGLC fisiológicamente relevantes por su limitada capacidad para hidrolizar el sustrato artificial seleccionado en el ensayo (Esen, 2003). En este sentido, se han descrito en la bibliografía algunas BGLCs que son poco eficientes en la hidrólisis del pNPG, constituyendo un ejemplo extremo la BGLC purificada de sorgo SbBGLC (Cicek y Esen, 1998), que únicamente es activa frente a su sustrato natural y es prácticamente incapaz de hidrolizar pNPG (Hosel *et al.*, 1987; Esen, 2003).

En las condiciones ensayadas, la proteína recombinante OepBGLC1 mostró tener un nivel actividad específica de $1,4 \text{ U mg}^{-1}$ utilizando como sustrato pNPG y $67,6 \text{ U mg}^{-1}$ con oleuropeína. Aunque los diferentes métodos de medida de la actividad enzimática empleados no permitan hacer comparaciones cuantitativas entre estos dos valores, en términos cualitativos la isoenzima OepBLGC1 demostró tener una clara preferencia por su sustrato natural, la oleuropeína. Teniendo en cuenta la trascendencia que puede tener el comportamiento de la isoenzima OepBGLC1 en la transformación de los compuestos secoiridoideos que tiene lugar durante el proceso de obtención del AOV, toda la caracterización bioquímica de la isoenzima recombinante OepBGLC1 se llevó a cabo utilizando oleuropeína como sustrato.

En primer lugar se realizó la optimización del ensayo de la actividad enzimática (Fig. 27), determinándose que el tiempo 5 min era el que permitía tasas de consumo de oleuropeína más adecuadas para valorar el efecto del resto de los factores que afectan a la actividad enzimática. La comparación de los datos obtenidos en estos ensayos preliminares con la isoenzima recombinante con los mostrados por la enzima nativa purificada en unas

condiciones de ensayo similares (Romero-Segura, 2010), permitió constatar que la enzima nativa era más eficiente en la hidrólisis de la oleuropeína. Así, mientras que la isoenzima recombinante a los 5 min había consumido sólo un 50 % de la oleuropeína del medio de reacción (6.5 mM), la enzima nativa consume la práctica totalidad del sustrato a los 3 min. De hecho, la hidrólisis catalizada por la isoenzima recombinante OepBGLC1 progresa muy lentamente, ya que a los 15 min la isoenzima recombinante solo había consumido el 80 % de la oleuropeína inicial, ralentizándose progresivamente la reacción de manera que después de 1 h de incubación quedaba todavía un 10 % de sustrato en el medio. El primer producto de reacción que aparece son los isómeros AAO que se forman tras la hidrólisis del glucósido y que eluyen en un pico bastante ancho un par de minutos antes que la oleuropeína. Parece ser que la eliminación de la molécula de glucosa desestabiliza a la aglucona fenólica y que en el transcurso de la reacción los isómeros formados tienden a estabilizarse rindiendo la forma AAO, que simultáneamente y por procesos exclusivamente químicos, ya que la única enzima presente en el ensayo es la isoenzima recombinante, da lugar a hidroxitirosol. La isoenzima recombinante OepBGLC1 fue activa en un rango de pH 3-9 con un óptimo de actividad a pH 5,5 (Fig. 28) y presentó una temperatura óptima de a 40 °C (Fig. 29), valores que coinciden con la enzima BGLC nativa purificada (Romero-Segura *et al.*, 2009). El valor de pH óptimo obtenido concuerda con el de otras enzimas descritas en la bibliografía cuyos pHs óptimos se sitúan en el rango de 4,5-5,5 (Inoue y Ebizuka, 1996; Akiyama *et al.*, 1998; Cameron *et al.*, 2001; Barbagallo *et al.*, 2007), aunque también se han descrito BGLCs con pHs óptimos menos ácidos en el rango de 6-7 (Esen, 1992; Luijendijk *et al.*, 1998; Odoux *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2007). Con respecto a la temperatura, las BGLCs suelen tener, salvo contadas excepciones, óptimos de actividad a temperaturas comprendidas en el rango de 40-50 °C (Esen, 1992; Cameron *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). La isoenzima recombinante (Fig. 33) resultó ser bastante termoestable entre 40 y 50 °C, obteniéndose valores sensiblemente inferiores de actividad a 55 °C (30 %) y desnaturalizándose por completo en los primeros minutos del ensayo a 60 °C. Estos datos coinciden con los existentes en la bibliografía (Esen, 2003) y están también de acuerdo con los datos obtenidos con la enzima BGLC nativa (Romero-Segura *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta el perfil de estabilidad térmica obtenido, la isoenzima OepBGLC1 podría actuar en principio durante toda la etapa de batido de la pasta, dentro del proceso de obtención del AOV, donde no suelen emplearse temperaturas superiores a 30 °C. Sin embargo, estudios

recientes demuestran que tras 15 minutos de batido a dicha temperatura ya no se detecta en la pasta actividad BGLC remanente (García-Rodríguez, 2014), posiblemente por la presencia de inhibidores que pudieran inactivarla. En la misma línea, los datos obtenidos para OepBGLC1 concuerdan con estudios anteriores que describen cómo el tratamiento térmico de las aceitunas de diferentes variedades a temperaturas entre 56-68 °C justo antes de la molturación conduce a una marcada reducción de los niveles de derivados secoiridoideos de los aceites (Yousfi *et al.*, 2010), por reducción de la tasa de hidrólisis de los glucósidos fenólicos, que podría explicarse en base a que estas temperaturas provocan una inactivación acusada de la isoenzima OepBGLC1.

Una vez demostrada la capacidad de la isoenzima recombinante OepBGLC1 para hidrolizar el glucósido mayoritario de la pulpa de aceituna, la oleuropeína, se realizaron ensayos de selectividad de sustrato con otros glucósidos de la aceituna. En estos ensayos, diseñados para conocer el grado de competencia de los distintos glucósidos por ocupar el centro activo de la enzima, se utilizaron mezclas de diferentes extractos fenólicos de aceituna que permitieran simular lo que sucede en la pasta de la aceituna tras la molturación de los frutos (Fig. 30). Los resultados obtenidos mostraron que la isoenzima recombinante OepBGLC1 mostró un mayor grado de selectividad por la oleuropeína (100,0 %), seguido a distancia por el ligustrósido (25,6 %) y por último la demetiloleuropeína (15,6 %), no encontrándose actividad frente al verbascósido (Tab. 10). Estos resultados, que coinciden con los encontrados con la enzima nativa, corroboran la capacidad de OepBGLC1 para hidrolizar los tres glucósidos fenólicos más interesantes entre los presentes en la aceituna, ya que son los precursores de los principales derivados secoiridoideos del AOV.

Además de evaluar la actividad frente a los tres glucósidos principales, se realizaron ensayos adicionales frente al glucósido mayoritario del cotiledón, el nuzhénido, con el fin de evaluar la capacidad hidrolítica de la isoenzima recombinante OepBGLC1 sobre éste (Fig. 31). Los resultados obtenidos demostraron que la isoenzima recombinante reaccionaba con el nuzhénido formándose, igual que ocurría en el caso de la oleuropeína, una mezcla inicial de isómeros que eluye un par de minutos antes del glucósido e incrementándose ligeramente el pico correspondiente al tirosol, que procedería de la hidrólisis química de los isómeros formados.

La oleuropeína fue el sustrato utilizado para realizar la determinación de parámetros cinéticos de la isoenzima. El estudio llevado a cabo con concentraciones crecientes de

oleuropeína indicó que la isoenzima recombinante OepBGLC1 no se ajustaba exactamente a las características cinéticas de la enzima nativa con el mismo sustrato, obteniéndose un peor ajuste lineal mediante la representación de Lineweaver-Burk y datos de K_m y V_{max} (26,82 mM y 236,16 U/mg, respectivamente) sensiblemente distintos de los encontrados en la enzima nativa (3,8 mM y 2500 U/mg, respectivamente) e indicativos de una menor eficiencia catalítica de la enzima recombinante. Aunque todas las enzimas de BGLCs de plantas descritas, incluida la enzima purificada de olivo, se ajustan al modelo cinético de Michaelis-Menten (Fig. 32), los datos obtenidos con OepBGLC1 sugieren que el propio sistema de expresión empleado, el proceso de extracción y purificación o a la inclusión de un motivo 6xHis en el extremo C-terminal hayan podido alterar el mecanismo de catálisis. En este sentido, se ha descrito en la bibliografía que la cinética de la actividad BGLC de las vainas de *Vanilla planifolia*, tras sufrir un calentamiento suave como parte del procedimiento de su curado, se ajustaba aparentemente a un modelo alostérico cuando originalmente describía un comportamiento de tipo Michaelis-Menten (Brillouet y Odoux, 2010). Se pone de manifiesto, por tanto, que la desnaturalización parcial de este tipo de enzimas puede conducir a un cambio en su comportamiento cinético tal y como podría suceder en el caso de la isoenzima recombinante OepBGLC1, debido a que las posibles alteraciones anteriormente mencionadas podrían perturbar su estructura tridimensional y modificar sus propiedades cinéticas sin que la enzima deje de ser funcional. Los mismos factores que se han mencionado para explicar la reducida eficiencia catalítica de la isoenzima OepBGLC1, podrían ser los causantes de la ausencia de actividad detectada en las otras tres isoenzimas recombinantes.

Debido a que las BGLCs de la familia GH1 pueden estar implicadas en diversos procesos fisiológicos, unido al hecho de que generalmente los organismos presentan un gran número de isoformas distintas, los estudios de localización subelular resultan claves para investigar el papel específico que desempeña cada una de ellas en un determinado organismo. El análisis de las secuencias N-terminales de las isoformas BGLC de olivo con los distintos programas bioinformáticos sugirió la presencia de péptidos señal de secreción extracelular con un tamaño 21 y 22 aminoácidos para OepBGLC3 y OepBGLC4, respectivamente. En el caso de OepBGLC2, no existió consenso entre los programas empleados aunque la opción más probable predecía la existencia de un péptido señal de 24 aminoácidos que dirigiría a la isoenzima al exterior celular. Por su parte, el análisis de la

secuencia de aminoácidos deducida a partir del gen *OepBGLC1* con los mismos programas no consiguió predecir en ningún caso su localización subcelular (Romero-Segura, 2010).

Para determinar la localización subcelular de cada una de las cuatro isoformas BGLC de olivo se realizaron experimentos de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*. Para ello, cada una de dichas isoformas se fusionó en C-terminal a la proteína fluorescente eGFP. La localización subcelular de la isoenzima *OepBGLC1* fue nuclear (Fig. 34), coincidiendo con los resultados obtenidos para la isoenzima G1 de *Medicago truncatula* (Naoumkina *et al.*, 2007) con capacidad hidrolítica sobre glucósidos de flavonas e isoflavonas implicados en procesos de defensa, no quedando totalmente claro el papel que desempeña esta enzima en el núcleo. Tampoco en el caso de la isoenzima *OepBGLC1* de olivo queda completamente claro el papel fisiológico que ésta desempeña en el núcleo de las células intactas. Sin embargo, el hecho de que esté alojada en un compartimento distinto que el de sus sustratos naturales (los glucósidos fenólicos están localizados en la vacuola) implica que únicamente tras la lisis celular se pondrán en contacto la enzima y sus sustratos, tal y como sucede cuando se daña el tejido por la infestación por la mosca del olivo (Gómez-Caravaca *et al.*, 2008), o tal y como ocurre durante la molturación del fruto en el proceso de extracción del AOV. La localización subcelular de *OepBGLC1* resultó bastante inusual, ya que por norma general las enzimas descritas en la bibliografía con función de defensa están localizadas en los cloroplastos (dicotiledóneas) o en el apoplasto (monocotiledóneas). La distinta compartimentalización de los glucósidos fenólicos y la isoenzima explican a su vez la ausencia de derivados hidrolizados en frutos intactos. En estudios *in situ* realizados por Mazzuca *et al.* (2006) con un sustrato cromogénico sobre cortes histológicos de mesocarpo de aceituna se encontró actividad BGLC en el núcleo, los cloroplastos y las gotas de aceite. En dicho estudio, sin embargo, se atribuye a las proteínas de dichas gotas lipídicas y de los cloroplastos mayor especificidad para hidrolizar oleuropeína que a la BGLC localizada en el núcleo. Sin embargo, nuestros resultados prueban de manera inequívoca la capacidad de la isoenzima *OepBGLC1* localizada en el núcleo para hidrolizar oleuropeína

En los experimentos de localización para las isoenzimas *OepBGLC2* y *OepBGLC4* (Fig. 34), la proteína fluorescente eGFP mostró un patrón de distribución similar, detectándose tanto en el retículo endoplasmático como en el apoplasto, lo que indicó que muy posiblemente estaban siendo dirigidas al exterior celular a través de la ruta de secreción

endoplasmática (Vitale y Denecke, 1999), coincidiendo en ambos casos la predicción de la localización realizada por los programas bioinformáticos con la determinada experimentalmente. Esta localización coincide también con la descrita por Mazzuca *et al.* (2006) para la actividad BGLC en gotas de aceite, ya que puede explicarse por la presencia de restos de retículo endoplasmático englobados dentro de ellas. El hecho de que el retículo endoplasmático sea el orgánulo celular encargado de realizar la glicosilación de proteínas como modificación postraducciona concuerda con la demostrada presencia de dichas moléculas en estas enzimas. La BGLC de *Glycine max* (GmBLGC), que presenta actividad catalítica frente a glucósidos de isoflavonas con papel defensivo, mostró un patrón de localización similar (Suzuki *et al.*, 2006). En la literatura también se han descrito otras BGLCs de dicotiledóneas con función de defensa que presentan en sus extremos N-terminales péptidos señal típicos de proteínas apoplásticas y cuyos sustratos naturales son glucósidos cianogénicos, tales como VaBGLC de *Vicia angustifolia* (Ahn *et al.*, 2007), MeBGLC de *Manihot esculenta* (Hughes *et al.*, 1992), LjBGLC2 y LjBGLC4 de *Lotus japonicus* (Morant *et al.*, 2008a) y PdBLGC1 y PdBLGC2 de *Prunus dulcis*.

En cuanto a la localización subcelular de la isoenzima OepBGLC3 (Fig. 34), se detectó la señal de eGFP en pequeños acúmulos discretos esparcidos por todo el citoplasma sin que pueda distinguirse de forma clara y concluyente el compartimiento subcelular que ocupan. Un patrón de distribución similar presenta la BGLC de *Prunus serotonina* PsBGLC1 (Swain *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 2002), encargada de la hidrólisis de prunasina y que se encuentra localizada en cuerpos proteicos. Nuestros resultados para esta isoenzima también concuerdan con los obtenidos por Matsushima *et al.* (2003), que describen en *Arabidopsis thaliana* la existencia de un nuevo compartimiento derivado del retículo endoplásmico al que llaman cuerpos del retículo endoplásmico implicados en procesos de defensa y que tienen la capacidad de acumular específicamente BGLCs. No obstante, no se puede descartar que la señal eGFP detectada para esta isoenzima esté provocada por un procesamiento anómalo por parte de *N. benthamiana* de la isoenzima recombinante.

Una vez realizada la expresión heteróloga de los genes BGLC de olivo, se llevó a cabo el análisis de la expresión relativa de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en diferentes tejidos del fruto tales como drupa joven, mesocarpo y semillas, así como en hojas, con el objeto de investigar su papel fisiológico. Estos genes mostraron distintos niveles de expresión en los tejidos estudiados (Fig. 35), poniendo de manifiesto que están regulados

especialmente. Con excepción de los genes *OeBGLC1* (Romero-Segura, 2010) y *OeBGLC2*, cuyos niveles de expresión en semilla fueron prácticamente indetectables, el resto de genes se expresan en todos los tejidos estudiados. Los genes *BGLCs* de plantas están regulados durante el desarrollo de la planta (Morant et al., 2008) y pueden presentar patrones de expresión espacial tan diversos como las funciones fisiológicas que se les asignan. Así, podemos encontrar genes *BGLCs* que se expresen exclusivamente en un solo tejido como *CpaBGLC* de *Carica papaya* (Wang et al., 2009), *GmBGLC* de *Glycine max* (Suzuki et al., 2006) y *AtBGLC34* y *AtBGLC35* de *Arabidopsis thaliana* (Andersson et al., 2009) con expresión específica en raíces, y otros que se expresan en todos los tejidos de la planta aunque preferentemente en los tejidos donde se acumulan sus sustratos naturales, como *RsaBGLC1* de *Raphanus sativus* (Hara et al., 2000) con mayor expresión en raíz y *VaBGLC* de *Vicia angustifolia* (Ahn et al., 2007) con mayor expresión en semilla.

Debido a que los cambios en los niveles de expresión relativa detectados en mesocarpo entre las 12 y las 28 SDF ponen de manifiesto la existencia de regulación temporal, se llevó a cabo un estudio más minucioso sobre los niveles de expresión en mesocarpo de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* durante el desarrollo y la maduración del fruto (Fig. 36). El patrón de expresión del gen *OeBGLC3*, sobre todo el obtenido para la variedad Picual, es muy parecido al que presenta el gen *VvBGLC2* de la pulpa de la uva durante su desarrollo y maduración (Zhang et al., 2013). Por su parte, los niveles de expresión relativa del gen *OeBGLC4* se incrementaron notablemente durante el desarrollo y la maduración del fruto, sobre todo entre las 24 y las 28 SDF cuando los frutos comienzan a madurar, del mismo modo que sucede en fruto con los genes *VvBGLC1* de *Vitis vinifera* (Zhang et al., 2013) y *CIBGLC1* de *Citrullus lanatus* (Li et al., 2012). Estos últimos autores establecen una correlación entre el aumento de los niveles de ABA y el incremento del nivel de expresión de estos genes durante el desarrollo y la maduración del fruto, ya que el ABA se almacena en forma de glucósido (ABA-GE) y las *BGLCs* están implicadas en su metabolismo. Debido a que las secuencias de aminoácidos de *VvBGLC1* y *VvBGLC2* guardan también altos grados de similitud con las de *OepBGLC3* y *OepBGLC4*, la función fisiológica de estos genes de olivo podría estar relacionada con la regulación de los niveles de ABA del fruto. De igual forma se analizaron los niveles de expresión de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en semilla (Fig. 37). Mientras que no se detectó expresión

en este tejido para *OeBGLC2*, los niveles de *OeBGLC3* y *OeBGLC4* fueron incrementándose notablemente durante el desarrollo y la maduración del fruto.

La ampliación del estudio de los niveles de expresión de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* a otras tres variedades españolas de relevancia económica en tres estadios diferentes en torno a la maduración (Fig. 38) dio lugar a resultados muy similares a los observados en Picual y Arbequina. Mientras que en la variedad Picudo no se detectaron cambios importantes durante la maduración en ninguno de los genes, los niveles de expresión de Hojiblanca y Manzanilla fueron siendo progresivamente menores en el caso del gen *OeBGLC3*. Por su parte, los niveles de expresión del gen *OeBGLC4* experimentaron un ligero aumento al final de la maduración en el caso de la variedad Manzanilla y un progresivo descenso en la variedad Hojiblanca. En el caso del gen *OeBGLC2*, las nuevas variedades incluidas en el ensayo no experimentaron cambios significativos. A la vista de los resultados obtenidos, se hace conveniente la realización de un estudio más completo durante el desarrollo y la maduración de estas variedades.

Aunque tradicionalmente el cultivo del olivo se ha llevado a cabo en condiciones de secano, es decir, recibiendo únicamente el agua de la lluvia, en los últimos años ha aumentado de forma importante el número de olivares en regadío, ya que incluso con pequeñas cantidades de agua se consigue un incremento notable de la producción. Sin embargo, los diferentes regímenes hídricos pueden modificar la composición y calidad del AOV. Los estudios realizados en distintas variedades de olivo revelan que la influencia del régimen hídrico sobre la composición de compuestos fenólicos del AOV, mostrando una correlación negativa entre la cantidad de agua aportada en el riego y el contenido de compuestos fenólicos del aceite, afectándose muy especialmente el contenido en derivados secoiridoideos (Artajo *et al.*, 2006; Gómez-Rico *et al.*, 2006; Servili *et al.*, 2007). Algunos autores atribuyen el efecto observado a que la disponibilidad de agua del olivo podría influir en la síntesis de los glucósidos fenólicos del fruto y repercutir, por tanto, sobre el contenido fenólico del AOV. Así, se ha descrito que los niveles de actividad de la enzima PAL, clave en la primera etapa de biosíntesis de los compuestos fenólicos en plantas, se incrementan en condiciones de déficit hídrico (Tovar *et al.*, 2002). El estudio del efecto del régimen hídrico sobre los niveles de expresión de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4* (Fig. 39) reveló distintos comportamientos. Mientras que los niveles de expresión de *OeBGLC2* no se vieron afectados en ninguna de las variedades, el gen *OeBGLC3* no mostró

diferencias en el caso de la variedad Picual pero sí incrementó sus niveles de expresión en el régimen de regadío en la variedad Arbequina. Por último, el gen *OeBGLC4* mostró niveles de expresión superiores en Picual para el régimen de secano, siendo en variedad Arbequina superiores en el tratamiento de regadío. El estudio realizado por Romero-Segura (2010) sobre el efecto del régimen hídrico sobre los niveles de expresión del gen *OeBGLC1* en las variedades Picual y Arbequina también indicó que las condiciones de secano incrementan el nivel de transcrito del gen. El aumento de los niveles de expresión en alguno de los genes *BGLC* de olivo estudiados, traducido en el correspondiente aumento de la actividad *BGLC*, podría explicar el mayor contenido de compuestos secoiridoideos encontrado en aceites extraídos de frutos cultivados en régimen de secano.

Con el objeto de evaluar más profundamente el efecto que produce el riego deficitario, se midieron los niveles de expresión de los cuatro genes *BGLC* de olivo en frutos de la variedad Arbequina pertenecientes a árboles que fueron sometidos a tres niveles de riego diferentes (30, 60 y 100 %) (Fig. 40). Con excepción del gen *OeBGLC4*, el nivel de expresión del resto de los genes a las 13 SDF fue inferior en las aceitunas cuyos árboles fueron sometidos a un régimen deficitario de riego, situación que sin embargo revierte justo al inicio de la maduración. A las 29 SDF todos los genes con la excepción de *OeBGLC2* mostraron un mayor nivel de expresión en el nivel de riego del 30 %. Es importante señalar que el contenido fenólico de los aceites obtenidos a partir de frutos de Arbequina recolectados a las 29 SDF fue superior en aquellos árboles sometidos a menor nivel de riego (30%) siendo estas diferencias especialmente significativas en relación a los compuestos secoiridoideos (García *et al.*, 2014). El aumento del nivel de expresión del gen *OeBGLC1* con el 30 % de riego deficitario concuerda con el incremento anteriormente mencionado en las medidas realizadas para este mismo gen en aceitunas sometidas a régimen de secano (Romero-Segura, 2010). Por otra parte, el marcado incremento de los niveles de expresión de los genes *OeBGLC3* y *OeBGLC4* con el tratamiento de riego deficitario del 30 % concuerda con los estudios de expresión realizados en otros genes *BGLC* sometidos a estrés hídrico, como *VvBGLC1* de uva (Zhang *et al.*, 2013), *CpBGLC* de hojas de calabacín (van de Ven *et al.*, 2000), *AtBGLC18* en hojas de *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2006) y *CIBGLC2* en las raíces y hojas de *Citrullus lanatus* (Li *et al.*, 2012). A todos estos genes, con la salvedad de *CpBGLC* de función desconocida, los autores les asignan un papel clave en la regulación de los niveles de ABA, obteniéndose en algunos casos buenas correlaciones entre los niveles de

la hormona y los niveles de expresión de los genes *BGLC* encargados de su liberación. Dado que el ABA resulta clave en la tolerancia al estrés hídrico, el incremento de los niveles de expresión de los genes *OeBGLC3* y *OeBGLC4* frente al déficit hídrico podría indicar que su papel fisiológico está también relacionado con el metabolismo de esta hormona.

Por último, se ha estudiado el efecto de distintos estreses abióticos, como temperatura alta y baja, oscuridad y daño por herida sobre los niveles de expresión relativa de los genes *OeBGLC2*, *OeBGLC3* y *OeBGLC4*, tanto en la variedad Picual como en Arbequina. La exposición de las ramas de olivo a temperatura baja (Fig. 41) provocó la inducción de la expresión de todos los genes en ambas variedades, siendo el efecto más acusado en la variedad Picual que en Arbequina. Estos datos coinciden con los descritos por Lee *et al.* (2006) para el gen *AtBGLC18*, que aumenta sus niveles expresión en hojas cuando son expuestas a estrés por frío (4 °C). Sin embargo, mientras que los niveles de expresión de todos los genes en los frutos sometidos a temperatura alta (Fig. 42) prácticamente no se vieron afectados en Picual, en la variedad Arbequina sí pudo observarse una marcada represión. La mayoría de estos datos coinciden con los obtenidos por Romero-Segura (2010) con el gen *OeBGLC1* con la excepción de la represión observada para dicho gen tras el tratamiento de las ramas de olivo con temperatura alta. Está demostrado que el estrés térmico induce la ruta biosintética de los fenilpropanoides (Dixon y Paiva, 1995) provocando la acumulación de compuestos de esta familia en frutos como el tomate y la sandía (Rivero *et al.*, 2001). Sin embargo, también es cierto que la disminución de la expresión del gen *OeBGLC1* a temperatura alta descrita, habida cuenta de su demostrada capacidad para hidrolizar los glucósidos fenólicos del fruto, podría explicar el menor contenido en derivados secoiridoideos de los aceites obtenidos de aceitunas sometidas durante 24 h a un tratamiento térmico en el rango 30-50 °C (García *et al.*, 2001). El tratamiento con oscuridad de los frutos (Fig. 43) de la variedad Picual y Arbequina provocó la represión de los tres genes *BGLC* estudiados. Este efecto, también observado para el gen *OeBGLC1*, parece indicar que la luz es un factor que posiblemente esté implicado en la regulación de la expresión de estos genes y podría estar relacionado con una pérdida de la actividad fotosintética. El último de los estreses estudiados fue el efecto que ocasiona el daño por herida sobre la expresión de los tres genes *BGLC* (Fig. 44). En ambas variedades se produjo una disminución de la expresión de todos los genes estudiados a las 3 h, seguida en la variedad Arbequina de una recuperación progresiva

hasta alcanzar los valores iniciales, y en Picual de un ligero aumento a las 6 h que fue mayor en los genes *OeBGLC2* y *OeBGLC4*. Algo similar se ha descrito para el gen *OeBGLC1* (Romero-Segura, 2010). El gen *CpBGLC* de *Cucurbita pepo* induce su expresión cuando las hojas son infectadas por la mosca blanca (van de Ven *et al.*, 2000). También se ha descrito que los cuatro genes *BGLC* de *Medicago truncatula* incrementan su expresión en respuesta a la exposición de metil jasmonato (Naoumkina *et al.*, 2007), cuya producción por parte de la planta se produce generalmente tras la exposición a estreses abióticos y bióticos. Aunque resulta razonable pensar que se produzca una inducción de la expresión de los genes *BGLC* asociados a funciones defensivas frente a patógenos y herbívoros (Konno *et al.*, 1999; Minic, 2008; Morant *et al.*, 2008b), como sucede con el gen *Oep2LOX1* de olivo involucrado en la biosíntesis de oxilipinas (Padilla *et al.*, 2012), es cierto que en el caso de las *BGLCs* la regulación de los procesos de defensa suele realizarse por compartimentalización, ya que las enzimas y los sustratos precursores de los compuestos implicados en mecanismos de defensa se encuentran localizados diferencialmente a nivel subcelular y sólo se ponen en contacto cuando se produce un daño importante en el tejido que afecta a la integridad celular.

Como ya se ha mencionado en la Introducción, el contenido fenólico de los aceites está fuertemente condicionado por la variedad. Para profundizar en el conocimiento del papel que juegan las *BGLCs* de olivo en las diferencias varietales de los AOVs, se realizaron estudios bioquímicos y moleculares con aceitunas de las variedades Menya y Shengeh seleccionadas de la Colección Nuclear (CN36) del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba por dar lugar a aceites con un contenido fenólico muy elevado y muy escaso, respectivamente. En primer lugar se estudiaron los niveles de expresión de los genes *BGLCs* a lo largo de la maduración de los frutos de ambas variedades (Fig. 45). Los niveles de expresión de *OeBGLC1* y *OeBGLC2* disminuyeron a lo largo de la maduración en ambas variedades, siendo globalmente superiores en Shengeh con respecto a Menya en el caso del gen *OeBGLC1*, e inferiores en Shengeh con respecto a Menya en el caso de *OeBGLC2*. Por su parte, los niveles de *OeBGLC3* mostraron una tendencia distinta en ambas variedades, manteniéndose constantes los valores de expresión de Menya y mostrando un pico a las 31 SDF en el caso de Shengeh. Por último, *OeBGLC4* mostró un pico de expresión tras el comienzo de la maduración para volver después a los valores iniciales, siendo globalmente los niveles de expresión más altos en Menya que en Shengeh. Las medidas de

actividad realizadas con extractos de los frutos de las variedades Menya y Shengeh (Fig. 46) en los mismos estados de maduración empleados en los estudios de expresión, revelaron que Menya tiene un nivel de actividad superior a Shengeh en todos los estadios considerados. Tras la maduración, se produjo un incremento de la actividad BGLC más pronunciado en Menya que en Shengeh que después se revierte hasta alcanzar valores próximos a los iniciales. Los datos de expresión del gen *OeBGLC1* no correlacionaron con la actividad BGLC de ninguna de las variedades. Aunque *OepBGLC1* es la única isoenzima recombinante con la cual hemos podido detectar hidrólisis de pNPG y oleuropeína, los niveles de actividad detectados en el mesocarpo de ambas variedades podrían deberse al resto de las BGLCs estudiadas aunque no se haya conseguido expresarlas de forma activa en *N. benthaminana*. En ese caso habría que tener especialmente en cuenta la contribución de los genes *OeBGLC2* y *OeBGLC4* que son los que presentan mayores niveles de expresión en Menya con respecto a Shengeh en todos los estadios de maduración estudiados, aunque tampoco puede descartarse la existencia de otros genes BGLC que pudieran estar implicados. El análisis de los glucósidos fenólicos de las aceitunas de las variedades Menya y Shengeh (Fig. 47) en los cuatro estadios de maduración empleados para los anteriores estudios, indicó que la composición inicial de compuestos fenólicos de ambos frutos es radicalmente distinta tanto cuantitativa como cualitativamente. La variedad Menya presenta un contenido fenólico total muy superior a Shengeh, observándose importantes cambios cualitativos a lo largo de la maduración (Tab. 12 y Tab. 13), con un progresivo descenso de la oleuropeína a expensas del aumento de demetiloleuropeína, lo que lleva a pensar que la primera actúa como precursor de la biosíntesis de la segunda, tal y como apuntan estudios anteriores (Gómez-Rico *et al.*, 2006). Por otro lado, la variedad Shengeh no presenta demetiloleuropeína en ninguno de los estadios de maduración estudiados y su contenido en oleuropeína se reduce a lo largo de la maduración. El análisis del contenido fenólico de los aceites obtenidos de ambas variedades (Fig. 48), mostró que tanto el contenido en fenoles totales, como lógicamente el de *o*-difenoles, es muy superior en aceites de la variedad Menya en todos los estadios de maduración. La evolución de los perfiles fenólicos de los aceites a lo largo de la maduración es también muy distinta. Mientras que los contenidos fenólicos de los aceites de Shengeh varían muy poco, los de Menya sí sufren una disminución progresiva. Es evidente que tanto el contenido de glucósidos fenólicos de los frutos como el nivel de actividad BGLC detectado explican las

enormes diferencias encontradas en los perfiles fenólicos de ambas variedades, aunque los estudios de expresión no aporten datos concluyentes.

El presente trabajo de investigación se ha centrado en el estudio de genes *BGLC* que se expresan en el mesocarpo de la aceituna con el objeto de conocer su implicación en la transformación de compuestos fenólicos durante el proceso de obtención del AOV, así como determinar la implicación de cada gen en procesos puramente fisiológicos del olivo. Los experimentos de expresión heteróloga sólo han permitido establecer la identidad funcional de la isoenzima recombinante OepBGLC1, cuya demostrada capacidad hidrolítica sobre los principales glucósidos fenólicos del fruto pone de manifiesto su implicación en la generación de los derivados secoiridoideos presentes en el AOV. La localización subcelular nuclear de esta isoenzima, distinta de localización vacuolar de los glucósidos fenólicos, explicaría la ausencia de los derivados fenólicos típicos del AOV en el fruto intacto. De este modo, sólo cuando se produzcan daños mecánicos en el fruto que conduzcan a la lisis celular, y a la consecuente desorganización de los orgánulos, se pondrán en contacto la enzima y los sustratos y podrán originarse los derivados secoiridoideos. Además del interés biotecnológico de la isoenzima recombinante OepBGLC1 por su papel clave en el proceso de obtención del AOV, está bien descrita la implicación de los derivados secoiridoideos en el mecanismo de defensa del olivo contra la depredación y las infecciones (Kubo *et al.*, 1985), actuando en este caso como una isoenzima “detonadora” del mecanismo de defensa de la planta (Morant *et al.*, 2008b) que sólo actuaría cuando se producen daños derivados del ataque de patógenos o depredadores. En este sentido, es importante señalar, que tal y como se ha demostrado en aligustre, otro árbol de la familia oleaceae, la los productos de la hidrólisis de la oleuropeína por BGLC tienen mucha mayor actividad biológica que el propio glucósido (Konno *et al.*, 1999). Por lo tanto, esta isoenzima resulta doblemente interesante ya que su actividad catalítica sobre los glucósidos secoiridoideos es determinante tanto en la conformación del perfil fenólico del AOV como desde un punto de vista fisiológico para la defensa de la planta (Fig. 49).

La localización subcelular de las isoformas OepBGLC2, OepBGLC3 y OepBGLC4 junto con los estudios de expresión realizados en los genes que las codifican, a falta del establecimiento de las correspondientes identidades funcionales, proporcionan interesantes datos sobre los posibles papeles fisiológicos que desempeñan. Así, la inducción de los genes *OeBGLC3* y *OeBGLC4* en condiciones de déficit hídrico, la relación

de ambas con el retículo endoplasmático y la similitud de sus secuencias con otros genes *BGLCs* que están implicados en el metabolismo del ABA, permiten inferir la posible participación de las isoenzimas OepBGLC3 y OepBGLC4 en la regulación de los niveles de ABA y como respuesta al estrés hídrico, aunque serían necesarios otros experimentos que permitan confirmar la función propuesta. Con respecto al gen *OeBGLC2*, no se dispone de datos suficientes como para poder especular sobre su papel fisiológico. En cualquier caso, no se puede descartar que las isoenzimas OepBGLC2, OepBGLC3, OepBGLC4 puedan contribuir a la hidrólisis de oleuropeína u otros glucósidos secoiridoideos, lo que permitiría establecer su identidad funcional y completar su caracterización. En este sentido, es evidente la necesidad de continuar con la expresión heteróloga de estas y otras posibles isoenzimas BGLC para poder establecer su identidad funcional y avanzar en el conocimiento de sus implicaciones fisiológicas y biotecnológicas.

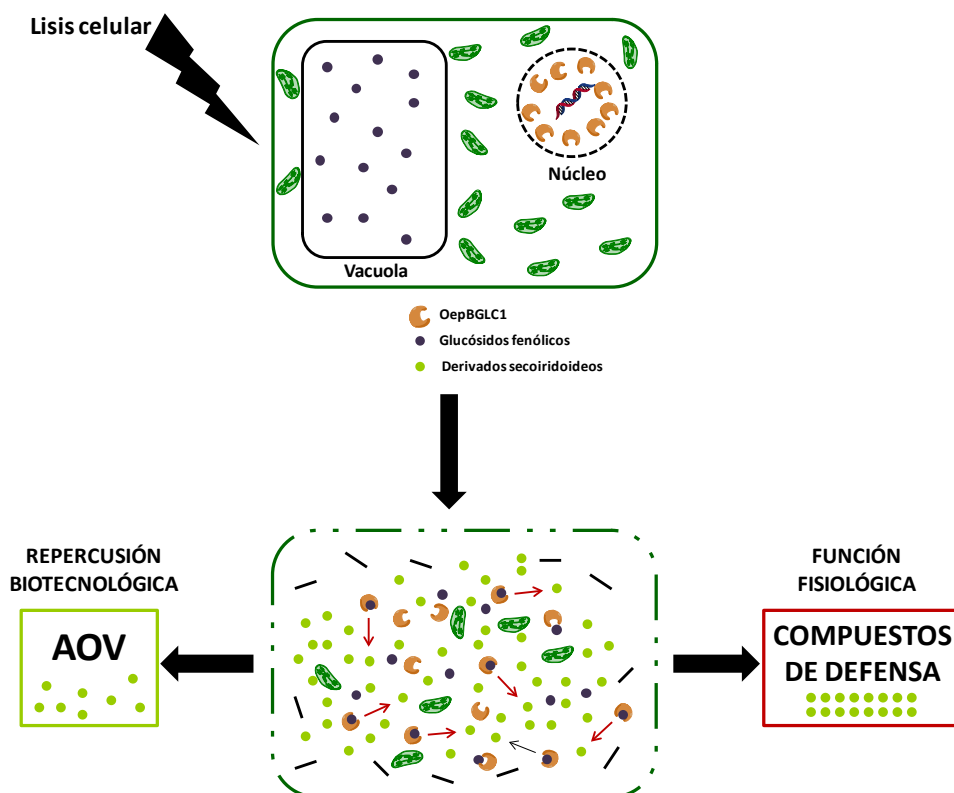


Fig. 49. Esquema que ilustra la generación de derivados secoiridoideos por la actividad de la isoenzima nuclear OepBGLC1 tras producirse la lisis de las células del mesocarpo. La generación de estos compuestos tras la ruptura de las células genera compuestos fenólicos con función fisiológica de defensa que también tienen repercusión biotecnológica durante el proceso de obtención

VI. CONCLUSIONES

1. Se han aislado y secuenciado tres clones completos de cDNA de olivo que, al igual que el gen *OepBGLC1* previamente aislado, codifican tres nuevas β -glucosidasas *OepBGLC2*, *OepBGLC3* y *OepBGLC4*, mostrando sus secuencias de aminoácidos deducidas las características típicas de estas enzimas.

2. El análisis filogenético de las tres isoenzimas BGLC de olivo estableció que mientras *OepBGLC2*, *OepBGLC3* y *OepBGLC4* se situaban en una misma rama del árbol junto con otras enzimas implicadas en procesos de lignificación o en la modulación de los niveles de ABA, la isoenzima *OepBGLC1* se ubicó en una rama diferente con otras enzimas que participan en rutas del metabolismo secundario de las plantas y cuyas agluconas poseen propiedades tóxicas y antimicrobianas. Los tres genes *BGLC* de olivo clonados en este trabajo tienen, por lo tanto, un origen evolutivo distinto que *OepBGLC1*.

3. El patrón de inmunodetección de las isoenzimas recombinantes BGLC de olivo obtenidas con los sistemas de expresión de *Escherichia coli* y *Nicotiana benthamiana* con el anticuerpo específico anti BGLC, demostró que la única isoenzima presente en la preparación purificada BGLC de olivo obtenida a partir de mesocarpo de aceituna y con capacidad hidrolítica sobre los principales glucósidos fenólicos del fruto, era *OepBGLC1*.

4. La identidad funcional del gen *OepBGLC1* de olivo se confirmó mediante expresión funcional heteróloga en *Nicotiana benthamiana*, no pudiéndose establecer la identidad funcional del resto de los genes *BGLC* de olivo.

5. La isoenzima recombinante *OepBGLC1* presentó actividad BGLC frente a los principales compuestos secoiridoideos del mesocarpo de la aceituna, mostrando una clara preferencia por el glucósido fenólico mayoritario, la oleuropeína, seguido por el ligustrósido y la demetiloleuropeína, y demostró además tener capacidad hidrolítica sobre el principal compuesto fenólico de la semilla, el nuzhénido. Presentó un pH óptimo de 5,5 y una temperatura óptima de actuación de 40 °C, valores similares a los de la enzima purificada. Sin embargo, el comportamiento cinético con respecto a la enzima nativa fue

diferente, posiblemente debido a las modificaciones inherentes al propio sistema de expresión.

6. La isoenzima *OepBGLC1* se encuentra localizada en el núcleo y los glucósidos fenólicos en la vacuola, de forma que sólo cuando se produce la lisis celular se ponen en contacto la isoenzima y los sustratos dando lugar a los derivados secoiridoideos que forman parte del mecanismo de defensa natural del olivo frente a patógenos y depredadores, y que son los principales compuestos fenólicos del AOV.

7. Las isoenzimas *OepBGLC2* y *OepBGLC4* presentaron una localización subcelular apoplástica, siendo secretadas al exterior celular vía retículo endoplasmático. La localización de *OepBGLC3* no pudo establecerse claramente, pudiéndose localizar en cuerpos proteicos, en cuerpos del retículo endoplasmático o tener simplemente una localización errónea.

8. Los análisis de expresión de los genes *OepBGLC2*, *OepBGLC3* y *OepBGLC4* de olivo en distintos tejidos y a lo largo del desarrollo y la maduración de la aceituna pusieron de manifiesto que estaban regulados de forma espacial y temporal.

9. La temperatura regula la transcripción de los genes *OepBGLC2*, *OepBGLC3* y *OepBGLC4*, provocando una inducción de todos los genes a temperatura baja en ambas variedades. En el caso de la temperatura alta, mientras que no produjo efectos en la variedad Picual, en la variedad Arbequina provocó la represión de los tres genes. La oscuridad y la herida provocaron una disminución de la expresión de todos los genes *BGLC* estudiados.

10. El riego deficitario incrementó los niveles de expresión de los genes *OepBGLC1*, *OepBGLC3* y *OepBGLC4* tras la maduración de los frutos, lo que podría explicar el mayor contenido de derivados secoiridoideos de los aceites procedentes de frutos que han sufrido déficit hídrico. Además, la inducción de los genes *OepBGLC3* y *OepBGLC4* en condiciones

de riego deficitario podría estar relacionada con la regulación de los niveles de ABA y la respuesta al estrés hídrico.

11. Los niveles de glucósidos fenólicos de los frutos de la variedad Menya son muy superiores a los de la variedad Shengeh al igual que el contenido en derivados secoiridoideos de sus aceites. Tanto el contenido fenólico de los frutos como el nivel de actividad BGLC detectado explican las enormes diferencias encontradas en los perfiles fenólicos de ambas variedades, aunque en este caso los estudios de expresión no aporten datos concluyentes.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, Y.O.; Mizutani, M.; Saino, H.; Sakata, K. (2004) Furcatin hydrolase from *Viburnum furcatum* Blume is a novel disaccharide-specific acuminosidase in glycosyl hydrolase family 1. *J Biol Chem* 279: 23405-23414.
- Ahn, Y.O.; Saino, H.; Mizutani, M.; Shimizu, B.; Sakata, K. (2007) Vicianin hydrolase is a novel cyanogenic beta-glycosidase specific to beta-vicianoside (6-O-alpha-L-arabinopyranosyl-beta-D-glucopyranoside) in seeds of *Vicia angustifolia*. *Plant Cell Physiol* 48: 938-947.
- Ahn, Y.O.; Shimizu, B.I.; Sakata, K.; Gantulga, D.; Zhou, C.H.; Bevan, D.R.; Esen, A. (2010) Scopolin-hydrolyzing beta-glucosidases in roots of *Arabidopsis* (vol 51, pg 132, 2010). *Plant Cell Physiol* 51: 339-339.
- Akiyama, T.; Kaku, H.; Shibuya, N. (1998) A cell wall-bound beta-glucosidase from germinated rice: purification and properties. *Phytochemistry* 48: 49-54.
- Alba, J. (2008) Elaboración del aceite de oliva virgen. En: El cultivo del olivo (eds. Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L.), pp. 657-698. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Amiot, M.J.; Fleuriet, A.; Macheix, J.J. (1986) Importance and Evolution of Phenolic-Compounds in Olive during Growth and Maturation. *J Agric Food Chem* 34: 823-826.
- Anastasopoulos, E.; Kalogeropoulos, N.; Kaliora, A.C.; Kountouri, A.; Andrikopoulos, N.K. (2011) The influence of ripening and crop year on quality indices, polyphenols, terpenic acids, squalene, fatty acid profile, and sterols in virgin olive oil (Koroneiki cv.) produced by organic versus non-organic cultivation method. *Int J Food Sci Tech* 46: 170-178.
- Andersson, D.; Chakrabarty, R.; Bejai, S.; Zhang, J.; Rask, L.; Meijer, J. (2009) Myrosinases from root and leaves of *Arabidopsis thaliana* have different catalytic properties. *Phytochemistry* 70: 1345-1354.
- Aparicio, R.; Aparicio-Ruiz, R.; García-González, D.L. (2007) Rapid methods for testing of oil authenticity: the case of olive oil. En: Rapid Methods for Food and Feed Quality Determination (eds. Amerongen, A.V.; Barug, D.; Lauwaars, M.), pp. 163-188. Países bajos.
- Aparicio, R.; Morales, M.T. (1998) Characterization of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil. *J Agric Food Chem* 46: 1116-1122.
- Artajo, L.S.; Romero, M.P.; Suárez, M.; Motilva, M.J. (2007) Partition of phenolic compounds during the virgin olive oil industrial extraction process. *Eur Food Res Technol* 225: 617-625.
- Artajo, L.S.; Romero, M.P.; Tovar, M.J.; Motilva, M.J. (2006) Effect of irrigation applied to olive trees (*Olea europaea* L.) on phenolic compound transfer during olive oil extraction. *Eur J Lipid Sci Tech* 108: 19-27.

- Baiano, A.; Terracone, C.; Viggiani, I.; Del Nobile, M.A. (2013) Effects of Cultivars and Location on Quality, Phenolic Content and Antioxidant Activity of Extra-Virgin Olive Oils. *J Am Oil Chem Soc* 90: 103-111.
- Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 99: 191-203.
- Baldioli, M.; Servili, M.; Perretti, G.; Montedoro, G.F. (1996) Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 73: 1589-1593.
- Barbagallo, R.N.; Palmeri, R.; Fabiano, S.; Rapisarda, P.; Spagna, G. (2007) Characteristic of beta-glucosidase from sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation. *Enzyme Microb Tech* 41: 570-575.
- Barleben, L.; Panjikar, S.; Ruppert, M.; Koepke, J.; Stockigt, J. (2007) Molecular architecture of strictosidine glucosidase: the gateway to the biosynthesis of the monoterpene indole alkaloid family. *Plant Cell* 19: 2886-2897.
- Barranco, D. (2008) Variedades y patrones. En: El cultivo del olivo (eds. Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L.), pp. 63-92. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Barrett, T.; Suresh, C.G.; Tolley, S.P.; Dodson, E.J.; Hughes, M.A. (1995) The crystal structure of a cyanogenic beta-glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. *Structure* 3: 951-960.
- Bayliss, C.; Canny, M.J.; McCully, M.E. (1997) Retention in situ and spectral analysis of fluorescent vacuole components in sections of plant tissues. *Biotech Histochem* 72: 123-128.
- Bendini, A.; Cerretani, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; Gómez-Caravaca, A.M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Lercker, G. (2007) Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules* 12: 1679-1719.
- Benito, M.; Lasa, J.M.; Gracia, P.; Oria, R.; Abenoza, M.; Varona, L.; Sánchez-Gimeno, A.C. (2013) Olive oil quality and ripening in super-high-density Arbequina orchard. *J Sci Food Agric* 93: 2207-2220.
- Blanchard, D.J.; Cicek, M.; Chen, J.; Esen, A. (2001) Identification of beta-glucosidase aggregating factor (BGAF) and mapping of BGAF binding regions on Maize beta-glucosidase. *J Biol Chem* 276: 11895-11901.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56: 317-333.
- Brenes-Balbuena, M.; García-García, P.; Garrido-Fernández, A. (1992) Phenolic compounds related to the black color formed during the processing of ripe olives. *J Agric Food Chem* 40: 1192-1196.
- Brenes, M.; Hidalgo, F.J.; García, A.; Ríos, J.J.; García, P.; Zamora, R.; Garrido, A. (2000) Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 77: 715-720.
- Breton, C.; Terral, J.F.; Pinatel, C.; Medail, F.; Bonhomme, F.; Berville, A. (2009) The origins of the domestication of the olive tree. *C R Biol* 332: 1059-1064.
- Brillouet, J.-M.; Odoux, E. (2010) In vivo kinetics of beta-glucosidase towards glucovanillin and related phenolic glucosides in heat-treated vanilla pod (*Vanilla planifolia*, Orchidaceae). *Fruits* 65: 85-95.
- Brzobohaty, B.; Moore, I.; Kristoffersen, P.; Bako, L.; Campos, N.; Schell, J.; Palme, K. (1993) Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* 262: 1051-1054.
- Burmeister, W.P.; Cottaz, S.; Driguez, H.; Iori, R.; Palmieri, S.; Henrissat, B. (1997) The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure* 5: 663-675.
- Cairns, J.R.K.; Champattanachai, V.; Srisomsap, C.; Wittman-Liebold, B.; Thiede, B.; Svasti, J. (2000) Sequence and expression of Thai rosewood beta-glucosidase/beta-fucosidase, a family 1 glycosyl hydrolase glycoprotein. *J Biochem* 128: 999-1008.
- Cameron, R.G.; Manthey, J.A.; Baker, R.A.; Grohmann, K. (2001) Purification and characterization of a beta-glucosidase from *Citrus sinensis* var. Valencia fruit tissue. *J Agric Food Chem* 49: 4457-4462.
- Catania, P.; Vallone, M.; Pipitone, F.; Inglese, P.; Aiello, G.; La Scalia, G. (2013) An oxygen monitoring and control system inside a malaxation machine to improve extra virgin olive oil quality. *Biosystems Eng* 114: 1-8.
- Cicek, M.; Blanchard, D.; Bevan, D.R.; Esen, A. (2000) The aglycone specificity-determining sites are different in 2, 4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA)-glucosidase (Maize beta -glucosidase) and dhurrinase (Sorghum beta -glucosidase). *J Biol Chem* 275: 20002-20011.
- Cicek, M.; Esen, A. (1998) Structure and expression of a dhurrinase (beta-glucosidase) from sorghum. *Plant Physiol* 116: 1469-1478.

- Cicek, M.; Esen, A. (1999) Expression of soluble and catalytically active plant (monocot) beta-glucosidases in *E. coli*. *Biotechnol Bioeng* 63: 392-400.
- Cicerale, S.; Conlan, X.A.; Sinclair, A.J.; Keast, R.S. (2009) Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49: 218-236.
- Conn, E.E. (1993) β -Glycosidases in plants: substrate specificity. En: β -Glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology (eds. Esen, A.), pp. 15-26. American Chemical Society, ACS Symposium series 553, Washington.
- Criado, M.N.; Romero, M.P.; Motilva, M.J. (2007) Effect of the technological and agronomical factors on pigment transfer during olive oil extraction. *J Agric Food Chem* 55: 5681-5688.
- Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* 26: 1001-1043.
- Chuenchor, W.; Pengthaisong, S.; Robinson, R.C.; Yuvaniyama, J.; Oonanant, W.; Bevan, D.R.; Esen, A.; Chen, C.J.; Opassiri, R.; Svasti, J.; Cairns, J.R. (2008) Structural insights into rice BGLu1 beta-glucosidase oligosaccharide hydrolysis and transglycosylation. *J Mol Biol* 377: 1200-1215.
- De Stefano, G.; Piacquadio, P.; Servili, M.; Di Giovacchino, L.; Sciancalepore, V. (1999) Effect of extraction systems on the phenolic composition of virgin olive oils. *Fett-Lipid* 101: 328-332.
- Del Carlo, M.; Sacchetti, G.; Di Mattia, C.; Compagnone, D.; Mastrocola, D.; Liberatore, L.; Cichelli, A. (2004) Contribution of the phenolic fraction to the antioxidant activity and oxidative stability of olive oil. *J Agric Food Chem* 52: 4072-4079.
- Del Río, J.A.; Baidez, A.G.; Botia, J.M.; Ortuno, A. (2003) Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. *Food Chem* 83: 75-78.
- Dharmawardhana, D.P.; Ellis, B.E.; Carlson, J.E. (1999) cDNA cloning and heterologous expression of coniferin beta-glucosidase. *Plant Mol Biol* 40: 365-372.
- Di Giovacchino, L.; Sestili, S.; Di Vincenzo, D. (2002) Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *Eur J Lipid Sci Tech* 104: 587-601.
- Dietz, K.J.; Sauter, A.; Wichert, K.; Messdaghi, D.; Hartung, W. (2000) Extracellular beta-glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *J Exp Bot* 51: 937-944.
- Dixon, R.A.; Achnine, L.; Kota, P.; Liu, C.J.; Reddy, M.S.; Wang, L. (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Mol Plant Pathol* 3: 371-390.

- Dixon, R.A.; Paiva, N.L. (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- El Riachy, M.; Priego-Capote, F.; León, L.; Luque de Castro, M.D.; Rallo, L. (2012) Virgin olive oil phenolic profile and variability in progenies from olive crosses. *J Sci Food Agric* 92: 2524-2533.
- El Riachy, M.; Priego-Capote, F.; León, L.; Rallo, L.; Luque de Castro, M.D. (2011) Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 2: Biosynthesis and biotransformation of phenolic compounds in virgin olive oil as affected by agronomic and processing factors. *Eur J Lipid Sci Tech* 113: 692-707.
- Escuderos, M.E.; Sayago, A.; Morales, M.T.; Aparicio, R. (2009) Evaluation of alpha-tocopherol in virgin olive oil by a luminiscent method. *Grasas Y Aceites* 60: 336-342.
- Esen, A. (1992) Purification and Partial Characterization of Maize (*Zea mays* L.) beta-Glucosidase. *Plant Physiol* 98: 174-182.
- Esen, A. (2003) β -Glucosidase. En: Handbook of Food Enzymology (eds. Whitaker, J.; Voragen, A.; Wong, D.), pp. 791-802. Marcel Dekker, Estados Unidos.
- Esen, A.; Blanchard, D.J. (2000) A specific beta-glucosidase-aggregating factor is responsible for the beta-glucosidase null phenotype in maize. *Plant Physiol* 122: 563-572.
- Estruch, R.; Ros, E.; Salas-Salvado, J.; Covas, M.I.; Corella, D.; Aros, F.; Gómez-Gracia, E.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Fiol, M.; Lapetra, J.; Lamuela-Raventos, R.M.; Serra-Majem, L.; Pinto, X.; Basora, J.; Muñoz, M.A.; Sorli, J.V.; Martínez, J.A.; Martínez-González, M.A.; Investigators, P.S. (2013) Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* 368: 1279-1290.
- Falk, A.; Taipalensuu, J.; Ek, B.; Lenman, M.; Rask, L. (1995) Characterization of rapeseed myrosinase-binding protein. *Planta* 195: 387-395.
- Falk, A.; Xue, J.P.; Lenman, M.; Rask, L. (1992) Sequence of a Cdna Clone Encoding the Enzyme Myrosinase and Expression of Myrosinase in Different Tissues of *Brassica-Napus*. *Plant Science* 83: 181-186.
- Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, R.; Guillén, R.; Jiménez, A.; Heredia, A. (1995) Activity of cell wall-associated enzymes in ripening olive fruit. *Physiol Plant* 93: 651-658.
- Fernández, J.E.; Pérez-Martín, A.; Torres-Ruiz, J.M.; Cuevas, M.V.; Rodríguez-Domínguez, C.M.; Elsayed-Farag, S.; Morales-Sillero, A.; García, J.M.; Hernández-Santana, V.; Díaz-Espejo, A. (2013) A regulated deficit irrigation strategy for hedgerow olive orchards with high plant density. *Plant and Soil* 372: 279-295.
- Fieldes, M.A.; Gerhardt, K.E. (1994) An Examination of the Beta-Glucosidase (Linamarase) Banding-Pattern in Flax Seedlings Using Ferguson Plots and Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel-Electrophoresis. *Electrophoresis* 15: 654-661.

- Framm, J.J.; Peterson, A.; Thoeringer, C.; Pangert, A.; Hornung, E.; Feussner, I.; Luckner, M.; Lindemann, P. (2000) Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cDNA encoding cardenolide 16'-O-glucohydrolase from *Digitalis lanata* Ehrh. *Plant Cell Physiol* 41: 1293-1298.
- Frankel, E.; Bakhouch, A.; Lozano-Sanchez, J.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. (2013) Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols. *J Agric Food Chem* 61: 5179-5188.
- Gallardo-Guerrero, L.; Gandul-Rojas, B.; Roca, M.; Mínguez-Mosquera, I. (2005) Effect of storage on the original pigment profile of Spanish virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 82: 33-39.
- Gandul-Rojas, B.; Cepero, M.R.L.; Mínguez-Mosquera, M.I. (2000) Use of chlorophyll and carotenoid pigment composition to determine authenticity of virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 77: 853-858.
- García-González, D.L.; Aparicio-Ruiz, R.; Aparicio, R. (2008) Virgin olive oil - Chemical implications on quality and health. *Eur J Lipid Sci Tech* 110: 602-607.
- García-González, D.L.; Viera, M.; Tena, N.; Aparicio, R. (2007) Evaluation of the methods based on triglycerides and sterols for the detection of hazelnut oil in olive oil. *Grasas Y Aceites* 58: 344-350.
- García-Rodríguez, R. (2014) Factores bioquímicos implicados en la degradación oxidativa de compuestos fenólicos durante el proceso de obtención del aceite de oliva virgen. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- García-Rodríguez, R.; Romero-Segura, C.; Sanz, C.; Sánchez-Ortiz, A.; Pérez, A.G. (2011) Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Res Int* 44: 629-635.
- García, J.M.; Perez, A.G.; Morales-Sillero, A.; Fernández, J. (2014) Response of the virgin olive oil quality to two deficit irrigation strategies of 'Arbequina' olive trees cultivated in hedgerow. *Agr Water Manage*: enviado para su publicación.
- García, J.M.; Yousfi, K.; Mateos, R.; Olmo, M.; Cert, A. (2001) Reduction of oil bitterness by heating of olive (*Olea europaea*) fruits. *J Agric Food Chem* 49: 4231-4235.
- Gardener, H.; Wright, C.B.; Gu, Y.; Demmer, R.T.; Boden-Albala, B.; Elkind, M.S.; Sacco, R.L.; Scarmeas, N. (2011) Mediterranean-style diet and risk of ischemic stroke, myocardial infarction, and vascular death: the Northern Manhattan Study. *Am J Clin Nutr* 94: 1458-1464.
- Geerlings, A.; Ibanez, M.M.L.; Memelink, J.; van der Heijden, R.; Verpoorte, R. (2000) Molecular cloning and analysis of strictosidine beta-d-glucosidase, an enzyme in

- terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *J Biol Chem* 275: 3051-3056.
- Gerardi, C.; Blando, F.; Santino, A.; Zacheo, G. (2001) Purification and characterisation of a beta-glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Plant Sci* 160: 795-805.
- Gloster, T.M.; Turkenburg, J.P.; Potts, J.R.; Henrissat, B.; Davies, G.J. (2008) Divergence of catalytic mechanism within a glycosidase family provides insight into evolution of carbohydrate metabolism by human gut flora. *Chem Biol* 15: 1058-1067.
- Gómez-Caravaca, A.M.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Del Carlo, M.; Compagnone, D.; Cichelli, A. (2008) Effects of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the phenolic profile and selected chemical parameters of olive oil. *J Agric Food Chem* 56: 4577-4583.
- Gómez-Rico, A.; Inarejos-García, A.M.; Salvador, M.D.; Fregapane, G. (2009) Effect of malaxation conditions on phenol and volatile profiles in olive paste and the corresponding virgin olive oils (*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra). *J Agric Food Chem* 57: 3587-3595.
- Gómez-Rico, A.; Salvador, M.D.; La Greca, M.; Fregapane, G. (2006) Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management. *J Agric Food Chem* 54: 7130-7136.
- Gómez Del Campo, M.; García, J.M. (2013) Summer deficit-irrigation strategies in a hedgerow olive cv. Arbequina orchard: effect on oil quality. *J Agric Food Chem* 61: 8899-8905.
- Günata, Z. (2003) Flavor enhancement in fruit juices and derived beverages by exogenous glycosidases and consequences of the use of enzyme preparations. En: Handbook of Food Enzymology (eds. Whitaker, J.; Voragen, A.; Wong, D.), pp. 303-329. Marcel Dekker, Estados Unidos.
- Gusmayer, S.; Brunner, H.; Schneiderpoetsch, H.A.W.; Lottspeich, F.; Eckerskorn, C.; Grimm, R.; Rudiger, W. (1994) The Amino-Acid-Sequence Previously Attributed to a Protein-Kinase or a Tcp1-Related Molecular Chaperone and Copurified with Phytochrome Is a Beta-Glucosidase. *Febs Lett* 347: 51-54.
- Gutiérrez-Rosales, F.; Ríos, J.J.; Gómez-Rey, M.L. (2003) Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 51: 6021-6025.
- Gutteridge, J.M.C. (1995) Lipid-Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue-Damage. *Clin Chem* 41: 1819-1828.

- Hara, M.; Fujii, Y.; Sasada, Y.; Kuboi, T. (2000) cDNA cloning of radish (*Raphanus sativus*) myrosinase and tissue-specific expression in root. *Plant Cell Physiol* 41: 1102-1109.
- Haralampidis, K.; Milioni, D.; Sanchez, J.; Baltrusch, M.; Heinz, E.; Hatzopoulos, P. (1998) Temporal and transient expression of stearyl-ACP carrier protein desaturase gene during olive fruit development. *J Exp Bot* 49: 1661-1669.
- Hartel, F.V.; Brandt, A. (2002) Characterization of a *Brassica napus* myrosinase expressed and secreted by *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 24: 221-226.
- Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280 (Pt 2): 309-316.
- Hermoso, M.; Uceda, M.; García, A.; Morales, B.; Frías, M.; Fernández, A. (1991) Elaboración de aceite de oliva de calidad. *Consejería de Agricultura y Pesca, Serie Apuntes 5/92*, Sevilla.
- Herrera, C.G. (2007) Matter transfer during virgin olive oil elaboration. *Grasas Y Aceites* 58: 194-205.
- Hosel, W.; Tober, I.; Eklund, S.H.; Conn, E.E. (1987) Characterization of beta-glucosidases with high specificity for the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) moench seedlings. *Arch Biochem Biophys* 252: 152-162.
- Hsieh, M.C.; Graham, T.L. (2001) Partial purification and characterization of a soybean beta-glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry* 58: 995-1005.
- Hughes, M.A.; Brown, K.; Pancoro, A.; Murray, B.S.; Oxtoby, E.; Hughes, J. (1992) A molecular and biochemical analysis of the structure of the cyanogenic beta-glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Cranz). *Arch Biochem Biophys* 295: 273-279.
- Hutzler, P.; Fischbach, R.; Heller, W.; Jungblut, T.P.; Reuber, S.; Schmitz, R.; Veit, M.; Weissenbock, G.; Schnitzler, J.P. (1998) Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J Exp Bot* 49: 953-965.
- Impellizzeri, J.; Lin, J. (2006) A simple high-performance liquid chromatography method for the determination of throat-burning oleocanthal with probated antiinflammatory activity in extra virgin olive oils. *J Agric Food Chem* 54: 3204-3208.
- Inarejos-García, A.M.; Fregapane, G.; Salvador, M.D. (2011) Effect of crushing on olive paste and virgin olive oil minor components. *Eur Food Res Technol* 232: 441-451.
- Inoue, K.; Ebizuka, Y. (1996) Purification and characterization of furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase from *Costus speciosus* rhizomes. *Febs Letters* 378: 157-160.

- Inoue, K.; Shibuya, M.; Yamamoto, K.; Ebizuka, Y. (1996) Molecular cloning and bacterial expression of a cDNA encoding furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase of *Costus speciosus*. *Febs Letters* 389: 273-277.
- Issaoui, M.; Dabbou, S.; Brahmi, F.; Ben Hassine, K.; Ellouze, M.H.; Hammami, M. (2009) Effect of extraction systems and cultivar on the quality of virgin olive oils. *Int J Food Sci Tech* 44: 1713-1720.
- Issaoui, M.; Flamini, G.; Chehab, H.; Cioni, P.L.; Braham, M.; Hammami, M. (2013) Irrigation Regimes and Growing Area Effects on Chetoui Olive Oil Quality. *J Food Biochem* 37: 185-192.
- Kalua, C.M.; Allen, M.S.; Bedgood, D.R., Jr.; Bishop, A.G.; Prenzler, P.D. (2005) Discrimination of olive oils and fruits into cultivars and maturity stages based on phenolic and volatile compounds. *J Agric Food Chem* 53: 8054-8062.
- Kaniewski, D.; Van Campo, E.; Boiy, T.; Terral, J.F.; Khadari, B.; Besnard, G. (2012) Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: palaeobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East. *Biol Rev Camb Philos Soc* 87: 885-899.
- Kara, H.E.; Sinan, S.; Turan, Y. (2011) Purification of beta-glucosidase from olive (*Olea europaea* L.) fruit tissue with specifically designed hydrophobic interaction chromatography and characterization of the purified enzyme. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 879: 1507-1512.
- Karimi, M.; Inze, D.; Depicker, A. (2002) GATEWAY(TM) vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7: 193-195.
- Ketudat Cairns, J.R.; Esen, A. (2010) beta-Glucosidases. *Cell Mol Life Sci* 67: 3389-3405.
- Kim, Y.W.; Kang, K.S.; Kim, S.Y.; Kim, I.S. (2000) Formation of fibrillar multimers of oat beta-glucosidase isoenzymes is mediated by the As-Glu1 monomer. *J Mol Biol* 303: 831-842.
- Kittur, F.S.; Yu, H.Y.; Bevan, D.R.; Esen, A. (2010) Deletion of the N-terminal dirigent domain in maize beta-glucosidase aggregating factor and its homolog sorghum lectin dramatically alters the sugar-specificities of their lectin domains. *Plant Physiol Biochem* 48: 731-734.
- Koidis, A.; Boskou, D. (2006) The contents of proteins and phospholipids in cloudy (veiled) virgin olive oils. *Eur J Lipid Sci Tech* 108: 323-328.
- Konno, K.; Hirayama, C.; Yasui, H.; Nakamura, M. (1999) Enzymatic activation of oleuropein: A protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree. *P Natl Acad Sci USA* 96: 9159-9164.

- Kubo, I.; Matsumoto, A.; Takase, I. (1985) A multichemical defense mechanism of bitter olive *Olea europaea* (oleaceae) : Is oleuropein a phytoalexin precursor? *J Chem Ecol* 11: 251-263.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee, K.H.; Piao, H.L.; Kim, H.-Y.; Choi, S.M.; Jiang, F.; Hartung, W.; Hwang, I.; Kwak, J.M.; Lee, I.-J.; Hwang, I. (2006) Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* 126: 1109-1120.
- Li, Q.; Li, P.; Sun, L.; Wang, Y.; Ji, K.; Sun, Y.; Dai, S.; Chen, P.; Duan, C.; Leng, P. (2012) Expression analysis of beta-glucosidase genes that regulate abscisic acid homeostasis during watermelon (*Citrullus lanatus*) development and under stress conditions. *J Plant Physiol* 169: 78-85.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- López, S.; Bermúdez, B.; Varela, L.M.; Ortega, A.; Jaramillo, S.; Abia, R.; Muriana, F.J.G. (2013) Olives and olive oil: diet and health impacts. Tesis doctoral. .
- Luijendijk, T.J.C.; Stevens, L.H.; Verpoorte, R. (1998) Purification and characterisation of strictosidine beta-D-glucosidase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Plant Physiol Biochem* 36: 419-425.
- Lukic, M.; Lukic, I.; Krapac, M.; Sladonja, B.; Pilizota, V. (2013) Sterols and triterpene diols in olive oil as indicators of variety and degree of ripening. *Food Chem* 136: 251-258.
- Maeda, H.; Dudareva, N. (2012) The shikimate pathway and aromatic amino Acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol* 63: 73-105.
- Mafra, I.; Amaral, J.S.; Oliveira, M.B.P.P. (2010) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in Olive Oils and Other Vegetable Oils; Potential for Carcinogenesis. En: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (eds. Preedy, V.R.; Watson, R.R.), pp. 489-498. Academic Press (Elsevier), Estados Unidos.
- Martínez, J.; Muñoz, E.; Alba, J.; Lanzón, A. (1975) Report about the use of the "Abencor" analyser. *Grasas Y Aceites* 26: 379-385.
- Martínez Nieto, L.; Hodaifa, G.; Lozano Pena, J.L. (2010) Changes in phenolic compounds and Rancimat stability of olive oils from varieties of olives at different stages of ripeness. *J Sci Food Agric* 90: 2393-2398.
- Mateos, R.; Cert, A.; Pérez-Camino, M.C.; García, J.M. (2004) Evaluation of virgin olive oil bitterness by quantification of secoiridoid derivatives. *J Am Oil Chem Soc* 81: 71-75.

- Mateos, R.; Domínguez, M.M.; Espartero, J.L.; Cert, A. (2003) Antioxidant effect of phenolic compounds, alpha-tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *J Agric Food Chem* 51: 7170-7175.
- Mateos, R.; Espartero, J.L.; Trujillo, M.; Rios, J.J.; Leon-Camacho, M.; Alcudia, F.; Cert, A. (2001) Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *J Agric Food Chem* 49: 2185-2192.
- Matsushima, R.; Kondo, M.; Nishimura, M.; Hara-Nishimura, I. (2003) A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a beta-glucosidase with an ER-retention signal in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 33: 493-502.
- Mazzuca, S.; Spadafora, A.; Innocenti, A.M. (2006) Cell and tissue localization of beta-glucosidase during the ripening of olive fruit (*Olea europaea*) by in situ activity assay. *Plant Sci* 171: 726-733.
- Medina, I.; Gallardo, J.M.; González, M.J.; Lois, S.; Hedges, N. (2007) Effect of molecular structure of phenolic families as hydroxycinnamic acids and catechins on their antioxidant effectiveness in minced fish muscle. *J Agric Food Chem* 55: 3889-3895.
- Minami, Y.; Shigeta, Y.; Tokumoto, U.; Tanaka, Y.; Yonekura-Sakakibara, K.; Oh-oka, H.; Matsubara, H. (1999) Cloning, sequencing, characterization, and expression of a beta-glucosidase cDNA from the indigo plant. *Plant Sci* 142: 219-226.
- Minic, Z. (2008) Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta* 227: 723-740.
- Mitra, N.; Sinha, S.; Ramya, T.N.; Surolia, A. (2006) N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends Biochem Sci* 31: 156-163.
- Mizutani, M.; Nakanishi, H.; Ema, J.; Ma, S.J.; Noguchi, E.; Inohara-Ochiai, M.; Fukuchi-Mizutani, M.; Nakao, M.; Sakata, K. (2002) Cloning of beta-primeverosidase from tea leaves, a key enzyme in tea aroma formation. *Plant Physiol* 130: 2164-2176.
- Montedoro, G.; Baldioli, M.; Selvaggini, R.; Begliomini, A.L.; Taticchi, A.; Servili, M. (2002) Relationships between phenolic composition of olive fruit and olive oil: the importance of the endogenous enzymes. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Olive Growing, Vols 1 and 2*: 551-556.
- Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M.; Miniati, E. (1992a) Simple and Hydrolyzable Phenolic-Compounds in Virgin Olive Oil .1. Their Extraction, Separation, and Quantitative and Semiquantitative Evaluation by Hplc. *J Agric Food Chem* 40: 1571-1576.
- Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M.; Miniati, E. (1992b) Simple and Hydrolyzable Phenolic-Compounds in Virgin Olive Oil .2. Initial Characterization of the Hydrolyzable Fraction. *J Agric Food Chem* 40: 1577-1580.

- Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M.; Selvaggini, R.; Miniati, E.; Macchioni, A. (1993) Simple and Hydrolyzable Compounds in Virgin Olive Oil .3. Spectroscopic Characterizations of the Secoiridoid Derivatives. *J Agric Food Chem* 41: 2228-2234.
- Monteleone, E.; Carlucci, A.; Caporale, G.; Pagliarini, E. (1997) Use of slope analysis to characterize consumer preference for virgin olive oil. *Ital J Food Sci* 9: 133-140.
- Morales, M.T.; Aparicio, R. (1999) Effect of extraction conditions on sensory quality of virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 76: 295-300.
- Morales, M.T.; Luna, G.; Aparicio, R. (2005) Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chem* 91: 293-301.
- Morant, A.V.; Bjarnholt, N.; Kragh, M.E.; Kjaergaard, C.H.; Jorgensen, K.; Paquette, S.M.; Piotrowski, M.; Imberty, A.; Olsen, C.E.; Moller, B.L.; Bak, S. (2008a) The beta-glucosidases responsible for bioactivation of hydroxynitrile glucosides in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 147: 1072-1091.
- Morant, A.V.; Jorgensen, K.; Jorgensen, C.; Paquette, S.M.; Sánchez-Pérez, R.; Moller, B.L.; Bak, S. (2008b) beta-Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* 69: 1795-1813.
- Morelló, J.R.; Romero, M.P.; Motilva, M.J. (2004) Effect of the maturation process of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga, and Morrut cultivars. *J Agric Food Chem* 52: 6002-6009.
- Moreno-Luna, R.; Muñoz-Hernández, R.; Miranda, M.L.; Costa, A.F.; Jiménez-Jiménez, L.; Vallejo-Vaz, A.J.; Muriana, F.J.; Villar, J.; Stiefel, P. (2012) Olive oil polyphenols decrease blood pressure and improve endothelial function in young women with mild hypertension. *Am J Hypertens* 25: 1299-1304.
- Muñoz-Mérida, A.; González-Plaza, J.J.; Canadá, A.; Blanco, A.M.; García-López Mdel, C.; Rodríguez, J.M.; Pedrola, L.; Sicardo, M.D.; Hernández, M.L.; De la Rosa, R.; Belaj, A.; Gil-Borja, M.; Luque, F.; Martínez-Rivas, J.M.; Pisano, D.G.; Trelles, O.; Valpuesta, V.; Beuzon, C.R. (2013) De novo assembly and functional annotation of the olive (*Olea europaea*) transcriptome. *DNA Res* 20: 93-108.
- Nagano, A.J.; Fukao, Y.; Fujiwara, M.; Nishimura, M.; Hara-Nishimura, I. (2008) Antagonistic jacalin-related lectins regulate the size of ER body-type beta-glucosidase complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 49: 969-980.
- Naoumkina, M.; Farag, M.A.; Sumner, L.W.; Tang, Y.; Liu, C.J.; Dixon, R.A. (2007) Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17909-17915.
- Nikus, J.; Esen, A.; Jonsson, L.M.V. (2003) Cloning of a plastidic rye (*Secale cereale*) beta-glucosidase cDNA and its expression in *Escherichia coli*. *Physiologia Plantarum* 118: 337-345.

- Ninfali, P.; Bacchiocca, M.; Biagiotti, E.; Servili, M.; Montedoro, G. (2002) Validation of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) parameter as a new index of quality and stability of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* 79: 977-982.
- Nisius, A. (1988) The stromacentre in Avena plastids: an aggregation of beta-glucosidase responsible for the activation of oat-leaf saponins. *Planta* 173: 474-481.
- Nomura, T.; Quesada, A.L.; Kutchan, T.M. (2008) The new beta-D-glucosidase in terpenoid-isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Psychotria ipecacuanha*. *J Biol Chem* 283: 34650-34659.
- Obied, H.K.; Prenzler, P.D.; Ryan, D.; Servili, M.; Taticchi, A.; Esposito, S.; Robards, K. (2008) Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Nat Prod Rep* 25: 1167-1179.
- Odoux, E.; Chauwin, A.; Brillouet, J.M. (2003) Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews) beta-D-glucosidase. *J Agric Food Chem* 51: 3168-3173.
- Olías, J.M.; Pérez, A.G.; Ríos, J.J.; Sanz, L.C. (1993) Aroma of Virgin Olive Oil - Biogenesis of the Green Odor Notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 2368-2373.
- Opassiri, R.; Pomthong, B.; Onkoksoong, T.; Akiyama, T.; Esen, A.; Ketudat Cairns, J.R. (2006) Analysis of rice glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12 beta-glucosidase. *BMC Plant Biol* 6: 33.
- Owen, R.W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Haubner, R.; Wurtele, G.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. (2000) Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol* 1: 107-112.
- Oxtoby, E.; Dunn, M.A.; Pancoro, A.; Hughes, M.A. (1991) Nucleotide and derived amino acid sequence of the cyanogenic beta-glucosidase (linamarase) from white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Mol Biol* 17: 209-219.
- Padilla, M.N.; Hernández, M.L.; Pérez, A.G.; Sanz, C.; Martínez-Rivas, J.M. (2010) Isolation, expression, and characterization of a 13-hydroperoxide lyase gene from olive fruit related to the biosynthesis of the main virgin olive oil aroma compounds. *J Agric Food Chem* 58: 5649-5657.
- Padilla, M.N.; Hernández, M.L.; Sanz, C.; Martínez-Rivas, J.M. (2009) Functional characterization of two 13-lipoxygenase genes from olive fruit in relation to the biosynthesis of volatile compounds of virgin olive oil. *J Agric Food Chem* 57: 9097-9107.
- Padilla, M.N.; Hernández, M.L.; Sanz, C.; Martínez-Rivas, J.M. (2012) Molecular cloning, functional characterization and transcriptional regulation of a 9-lipoxygenase gene from olive. *Phytochemistry* 74: 58-68.

- Pauwels, E.K. (2011) The protective effect of the Mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk. *Med Princ Pract* 20: 103-111.
- Pérez-Jiménez, F.; de Cienfuegos, G.A.; Badimon, L.; Barja, G.; Battino, M.; Blanco, A.; Bonanome, A.; Colomer, R.; Corella-Piquer, D.; Covas, I.; Chamorro-Quirós, J.; Escrich, E.; Gaforio, J.J.; Luna, P.P.G.; Hidalgo, L.; Kafatos, A.; Kris-Etherton, P.M.; Lairon, D.; Lamuela-Raventos, R.; López-Miranda, J.; López-Segura, F.; Martínez-González, M.A.; Mata, P.; Mataix, J.; Ordoñas, J.; Osada, J.; Pacheco-Reyes, R.; Perucho, M.; Pineda-Priego, M.; Quiles, J.L.; Ramírez-Tortosa, M.C.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Sánchez-Rovira, P.; Solfrizzi, V.; Soriguer-Escofet, F.; de la Torre-Fornell, R.; Trichopoulos, A.; Villalba-Montoro, J.M.; Villar-Ortiz, J.R. (2005) International conference on the healthy effect of virgin olive oil - Consensus report, Jaen (Spain) 2004. *Eur J Clin Invest* 35: 421-424.
- Perona, J.S.; Cabello-Moruno, R.; Ruiz-Gutiérrez, V. (2006) The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem* 17: 429-445.
- Poulton, J.E. (1990) Cyanogenesis in plants. *Plant Physiol* 94: 401-405.
- Raederstorff, D. (2009) Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: a review. *Int J Vitam Nutr Res* 79: 152-165.
- Raina, B.L. (1995) En: Handbook of fruit science and technology: production, composition, storage and processing (eds. Salunkhe, D.K.; Kadam, S.S.), pp. Marcel Dekker Inc, Nueva York (Estados Unidos).
- Rangel, B.; Platt, K.A.; Thomson, W.W. (1997) Ultrastructural aspects of the cytoplasmic origin and accumulation of oil in olive fruit (*Olea europaea*). *Physiol Plant* 101: 109-114.
- Rapoport, H.F. (2008) Botánica y Morfología. En: El cultivo del olivo (eds. Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L.), pp. 37-62. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Rivero, R.M.; Ruiz, J.M.; García, P.C.; López-Lefebvre, L.R.; Sánchez, E.; Romero, L. (2001) Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci* 160: 315-321.
- Robards, K.; Prenzler, P.D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem* 66: 401-436.
- Romero-Segura, C. (2010) Aspectos bioquímicos determinantes de la composición fenólica del aceite de oliva virgen. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- Romero-Segura, C.; García-Rodríguez, R.; Sánchez-Ortiz, A.; Sanz, C.; Pérez, A.G. (2012) The role of olive beta-glucosidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Res Int* 45: 191-196.

- Romero-Segura, C.; Sanz, C.; Pérez, A.G. (2009) Purification and characterization of an olive fruit beta-glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics. *J Agric Food Chem* 57: 7983-7988.
- Rovellini, P.; Cortesi, N.; Fedeli, E. (1997) Analysis of flavonoids from *Olea Europaea* by HPLC-UV and HPLC-electrospray-MS. *Riv Ital Sostanze Gr* 74: 273-279.
- Ryan, D.; Antolovich, M.; Prenzler, P.; Robards, K.; Lavee, S. (2002) Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Sci Hort* 92: 147-176.
- Ryan, D.; Robards, K.; Lavee, S. (1999) Determination of phenolic compounds in olives by reversed-phase chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr A* 832: 87-96.
- Rye, C.S.; Withers, S.G. (2000) Glycosidase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 4: 573-580.
- Sakai, M.; Tomita, S.; Hirata, H.; Asai, T.; Dohra, H.; Hara, M.; Watanabe, N. (2008) Purification and characterization of beta-glucosidase involved in the emission of 2-phenylethanol from rose flowers. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 219-221.
- Sakouhi, F.; Absalon, C.; Harrabi, S.; Vitry, C.; Sebei, K.; Boukhchina, S.; Fouquet, E.; Kallel, H. (2009) Dynamic accumulation of 4-desmethylsterols and phytosterols during ripening of Tunisian Meski olives (*Olea europaea* L.). *Food Chem* 112: 897-902.
- Salvador, M.D.; Aranda, F.; Gómez-Alonso, S.; Fregapane, G. (2003) Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. *Food Chem* 80: 359-366.
- Samaniego-Sánchez, C.; Oliveras-López, M.J.; Quesada-Granados, J.J.; Villalón-Mir, M.; Serrana, H.L.G. (2012) Alterations in picual extra virgin olive oils under different storage conditions. *Eur J Lipid Sci Tech* 114: 194-204.
- Sambrook, J.; Fritsh, E.; Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez-Ortiz, A.; Pérez, A.G.; Sanz, C. (2013) Synthesis of aroma compounds of virgin olive oil: Significance of the cleavage of polyunsaturated fatty acid hydroperoxides during the oil extraction process. *Food Res Int* 54: 1972-1978.
- Sánchez-Ortiz, A.; Romero-Segura, C.; Gazda, V.E.; Graham, I.A.; Sanz, C.; Pérez, A.G. (2012a) Factors limiting the synthesis of virgin olive oil volatile esters. *J Agric Food Chem* 60: 1300-1307.
- Sánchez-Ortiz, A.; Romero-Segura, C.; Sanz, C.; Pérez, A.G. (2012b) Synthesis of volatile compounds of virgin olive oil is limited by the lipoxygenase activity load during the oil extraction process. *J Agric Food Chem* 60: 812-822.

- Sánchez-Pérez, R.; Saez Belmonte, F.; Borch, J.; Dicenta, F.; Moller, B.L.; Jorgensen, K. (2012) Prunasin Hydrolases during Fruit Development in Sweet and Bitter Almonds. *Plant Physiol* 158: 1916-1932.
- Sánchez, J. (1994) Lipid photosynthesis in olive fruit. *Prog Lipid Res* 33: 97-104.
- Schliemann, W. (1984) Hydrolysis of Conjugated Gibberellins by beta-Glucosidases from Dwarf Rice (*Oryza sativa* L. cv. <<Tan-ginbozu>>). *J Plant Physiol* 116: 123-132.
- Servili, M.; Baldioli, M.; Selvaggini, R.; Macchioni, A.; Montedoro, G. (1999) Phenolic compounds of olive fruit: one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of Nuzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *J Agric Food Chem* 47: 12-18.
- Servili, M.; Esposto, S.; Lodolini, E.; Selvaggini, R.; Taticchi, A.; Urbani, S.; Montedoro, G.; Serravalle, M.; Gucci, R. (2007) Irrigation effects on quality, phenolic composition, and selected volatiles of virgin olive oils cv. Leccino. *J Agric Food Chem* 55: 6609-6618.
- Servili, M.; Montedoro, G. (2002) Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur J Lipid Sci Tech* 104: 602-613.
- Servili, M.; Selvaggini, R.; Esposto, S.; Taticchi, A.; Montedoro, G.; Morozzi, G. (2004) Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J Chromatogr A* 1054: 113-127.
- Seshadri, S.; Akiyama, T.; Opasiri, R.; Kuaprasert, B.; Cairns, J.K. (2009) Structural and enzymatic characterization of Os3BGlu6, a rice beta-glucosidase hydrolyzing hydrophobic glycosides and (1->3)- and (1->2)-linked disaccharides. *Plant Physiol* 151: 47-58.
- Silva, S.; Gomes, L.; Leitao, F.; Bronze, M.; Coelho, A.V.; Boas, L.V. (2010) Secoiridoids in olive seed: characterization of nuzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Grasas Y Aceites* 61: 157-164.
- Soler-Rivas, C.; Espin, J.C.; Wichers, H.J. (2000) Oleuropein and related compounds. *J Sci Food Agr* 80: 1013-1023.
- Stefanoudaki, E.; Williams, M.; Harwood, J. (2010) Changes in virgin olive oil characteristics during different storage conditions. *Eur J Lipid Sci Tech* 112: 906-914.
- Stockigt, J.; Zenk, M.H. (1977) Strictosidine (Isovincoside) - Key Intermediate in Biosynthesis of Monoterpenoid Indole Alkaloids. *J Chem Soc Chem Comm*: 646-648.

- Sue, M.; Yamazaki, K.; Yajima, S.; Nomura, T.; Matsukawa, T.; Iwamura, H.; Miyamoto, T. (2006) Molecular and structural characterization of hexameric beta-D-glucosidases in wheat and rye. *Plant Physiol* 141: 1237-1247.
- Suzuki, H.; Takahashi, S.; Watanabe, R.; Fukushima, Y.; Fujita, N.; Noguchi, A.; Yokoyama, R.; Nishitani, K.; Nishino, T.; Nakayama, T. (2006) An isoflavone conjugate-hydrolyzing beta-glucosidase from the roots of soybean (*Glycine max*) seedlings - Purification, gene cloning, phylogenetics, and cellular localization. *Journal of Biological Chemistry* 281: 30251-30259.
- Swain, E.; Li, C.P.; Poulton, J.E. (1992) Tissue and Subcellular Localization of Enzymes Catabolizing (R)-Amygdalin in Mature *Prunus serotina* Seeds. *Plant Physiol* 100: 291-300.
- Tomás-Barberan, F.; Espin, J.C. (2001) Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 853-876.
- Toonkool, P.; Metheenukul, P.; Sujiwattanasat, P.; Paiboon, P.; Tongtubtim, N.; Ketudat-Cairns, M.; Ketudat-Cairns, J.; Svasti, J. (2006) Expression and purification of dalcochinase, a beta-glucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, in yeast and bacterial hosts. *Protein Expr Purif* 48: 195-204.
- Tovar, M.J.; Romero, M.P.; Girona, J.; Motilva, M.J. (2002) L-phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea* L cv Arbequina) fruit grown under different irrigation regimes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 892-898.
- Trichopoulou, A.; Lagiou, P.; Kuper, H.; Trichopoulos, D. (2000) Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 869-873.
- Tripoli, E.; Giammanco, M.; Tabacchi, G.; Di Majo, D.; Giammanco, S.; La Guardia, M. (2005) The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev* 18: 98-112.
- Uceda, M.; Hermoso, M.; García-Ortiz, A.; Jimenez, A.; Beltrán, G. (1999) Intraspecific variation of oil contents and the characteristics of oils in olive cultivars. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Olive Growing, Vols 1 and 2* 474: 659-662.
- van de Ven, W.T.; LeVesque, C.S.; Perring, T.M.; Walling, L.L. (2000) Local and systemic changes in squash gene expression in response to silverleaf whitefly feeding. *Plant Cell* 12: 1409-1423.
- Vitale, A.; Denecke, J. (1999) The endoplasmic reticulum - Gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* 11: 615-628.

- Voinnet, O.; Rivas, S.; Mestre, P.; Baulcombe, D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33: 949-956.
- Wang, M.; Li, D.Q.; Sun, X.P.; Zhu, Y.J.; Nong, H.; Zhang, J.M. (2009) Characterization of a root-specific beta-thioglucoside glucohydrolase gene in *Carica papaya* and its recombinant protein expressed in *Pichia pastoris*. *Plant Science* 177: 716-723.
- Warzecha, H.; Gerasimenko, I.; Kutchan, T.M.; Stockigt, J. (2000) Molecular cloning and functional bacterial expression of a plant glucosidase specifically involved in alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* 54: 657-666.
- Xia, L.; Ruppert, M.; Wang, M.; Panjikar, S.; Lin, H.; Rajendran, C.; Barleben, L.; Stockigt, J. (2012) Structures of alkaloid biosynthetic glucosidases decode substrate specificity. *ACS Chem Biol* 7: 226-234.
- Xu, Z.; Escamilla-Trevino, L.; Zeng, L.; Lalgondar, M.; Bevan, D.; Winkel, B.; Mohamed, A.; Cheng, C.L.; Shih, M.C.; Poulton, J.; Esen, A. (2004) Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant Mol Biol* 55: 343-367.
- Xue, J.; Jorgensen, M.; Pihlgren, U.; Rask, L. (1995) The myrosinase gene family in *Arabidopsis thaliana*: gene organization, expression and evolution. *Plant Mol Biol* 27: 911-922.
- Xue, J.P.; Lenman, M.; Falk, A.; Rask, L. (1992) The Glucosinolate-Degrading Enzyme Myrosinase in Brassicaceae Is Encoded by a Gene Family. *Plant Mol Biol* 18: 387-398.
- Yousfi, K.; Moyano, M.J.; Martínez, F.; Cayuela, J.A.; García, J.M. (2010) Postharvest Heat Treatment for Olive Oil Debittering at the Industrial Scale. *J Am Oil Chem Soc* 87: 1053-1061.
- Yu, H.-L.; Xu, J.-H.; Lu, W.-Y.; Lin, G.-Q. (2007) Identification, purification and characterization of beta-glucosidase from apple seed as a novel catalyst for synthesis of O-glucosides. *Enzyme Microb Technol* 40: 354-361.
- Zeder, M.A.; Emshwiller, E.; Smith, B.D.; Bradley, D.G. (2006) Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology. *Trends Genets* 22: 139-155.
- Zhang, C.Z.; Yu, H.S.; Bao, Y.M.; An, L.J.; Jin, F.X. (2001) Purification and characterization of ginsenoside-beta-glucosidase from ginseng. *Chem Pharm Bull* 49: 795-798.
- Zhang, G.; Duan, C.; Wang, Y.; Wang, Y.; Ji, K.; Xu, H.; Dai, S.; Li, Q.; Chen, P.; Sun, Y.; Wu, Y.; Luo, H.; Leng, P. (2013) The expression pattern of beta-glucosidase genes (VvBGs) during grape berry maturation and dehydration stress. *J Plant Growth Regul* 70: 105-114.

- Zhou, J.M.; Hartmann, S.; Shepherd, B.K.; Poulton, J.E. (2002) Investigation of the microheterogeneity and aglycone specificity-conferring residues of black cherry prunasin hydrolases. *Plant Physiol* 129: 1252-1264.
- Zouhar, J.; Nanak, E.; Brzobohaty, B. (1999) Expression, single-step purification, and matrix-assisted refolding of a maize cytokinin glucoside-specific beta-glucosidase. *Protein Expression Purif* 17: 153-162.

VIII. ANEXO

Tab. 16. Cuadro anexo en el que quedan recogidos los números de acceso y las referencias bibliográficas de las secuencias de proteínas utilizadas para el análisis filogenético.

Nombre	Organismo	n.º de acceso	Referencia bibliográfica
AtBGLC38	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g26000	Xue <i>et al.</i> (1995)
AtBGLC37		At5g25980	
AtBGLC44	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g18080	Xu <i>et al.</i> (2004)
AtBGLC18	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g52400	Lee <i>et al.</i> (2006)
AtBGLC38	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g26000	Andersson <i>et al.</i> (2009)
AtBGLC34		At1g47600	
AtBGLC35		At1g51470	
AsBGLC1	<i>Avena sativa</i>	X78433	Gusmayer <i>et al.</i> (1994)
AsBGLC2	<i>Avena sativa</i>	AF082991	Kim <i>et al.</i> (2000)
BnBGLC	<i>Brassica napus</i>	X60214	Falk <i>et al.</i> (1992)
CsBGLC	<i>Camellia sinensis</i>	AB088027	Mizutani <i>et al.</i> (2002)
CpaBGLC	<i>Carica papaya</i>	FJ268800	Wang <i>et al.</i> (2009)
CrBGLC	<i>Catharanthus roseus</i>	AF112888	Geerlings <i>et al.</i> (2000)
CspBGLC	<i>Costus speciosus</i>	D83177	Inoue <i>et al.</i> (1996)
CpBGLC	<i>Cucurbita pepo</i>	AF170087	van de Ven <i>et al.</i> (2000)
DcBGLC	<i>Dalbergia cochinchinensis</i>	AF163097	Cairns <i>et al.</i> (2000)
DIBGLC	<i>Digitalis lanata</i>	Q9ZPB6	Framm <i>et al.</i> (2000)
GmBGLC	<i>Glycine max</i>	AB259819	Suzuki <i>et al.</i> (2006)
LjBGLC2	<i>Lotus japonicus</i>	EU710845	Morant <i>et al.</i> (2008a)
LjBGLC4		EU710844	
LjBGLC7		EU710846	
MeBGLC	<i>Manihot esculenta</i>	S35175	Hughes <i>et al.</i> (1992)
MtBGLC1	<i>Medicago truncatula</i>	EU078901	Naoumkina <i>et al.</i> (2007)
MtBGLC2		EU078902	
MtBGLC3		EU078903	
OepBGLC1	<i>Olea europaea</i>		Velázquez-Palmero <i>et al.</i> , (2014)
OepBGLC2			
OepBGLC3			
OepBGLC4			

PcBGLC	<i>Pinus contorta</i>	AF072736	Dharmawardhana <i>et al.</i> (1999)
PtBGLC	<i>Polygonum tinctorium</i>	AB003089	Minami <i>et al.</i> (1999)
PdBGLC1	<i>Prunus dulcis</i>	JQ268617	Sánchez-Pérez <i>et al.</i> (2012)
PdBGLC2		JQ268619	
PsBGLC1	<i>Prunus serotina</i>	U50201	Zhou <i>et al.</i> (2002)
PsBGLC2		AF221527	
PsBGLC4		AF411009	
PsBGLC6		AF411130	
PiBGLC	<i>Psychotria ipecacuanha</i>	AB455576	Nomura <i>et al.</i> (2008)
RsaBGLC1	<i>Raphanus sativus</i>	AB042186	Hara <i>et al.</i> (2000)
RsaBGLC2		AB042187	
RsBGLC1	<i>Rauvolfia serpentina</i>	AF149311	Warzecha <i>et al.</i> (2000)
RsBGLC2	<i>Rauvolfia serpentina</i>	AJ302044	Barleben <i>et al.</i> (2007)
ScBGLC	<i>Secale cereale</i>	AF293849	Nikus <i>et al.</i> (2003)
SaBGLC	<i>Sinapis alba</i>	X59879	Xue <i>et al.</i> (1992)
SbBGLC	<i>Sorghum bicolor</i>	U33817	Cicek y Esen (1998)
TrBGLC	<i>Trifolium repens</i>	X56734	Oxtoby <i>et al.</i> (1991)
TaBGLC1A	<i>Triticum aestivum</i>	AB100035	Sue <i>et al.</i> (2006)
TaBGLC1B		AB236422	
TaBGLC1C		AB236423	
VfBGLC	<i>Viburnum furcatum</i>	AB122081	Ahn <i>et al.</i> (2004)
VaBGLC	<i>Vicia angustifolia</i>	DQ371927	Ahn <i>et al.</i> (2007)
VvBGLC1	<i>Vitis vinifera</i>	GU480917	(Zhang <i>et al.</i> , 2013)
VvBGLC2		XM_003632325	
VvBGLC3		XM_002272377	
ZmBGLC1	<i>Zea mays</i>	X74217	Brzobohaty <i>et al.</i> (1993)
ZmBGLC2	<i>Zea mays</i>	U44087	Cicek y Esen (1999)