

RESUMEN (SUMMARY)

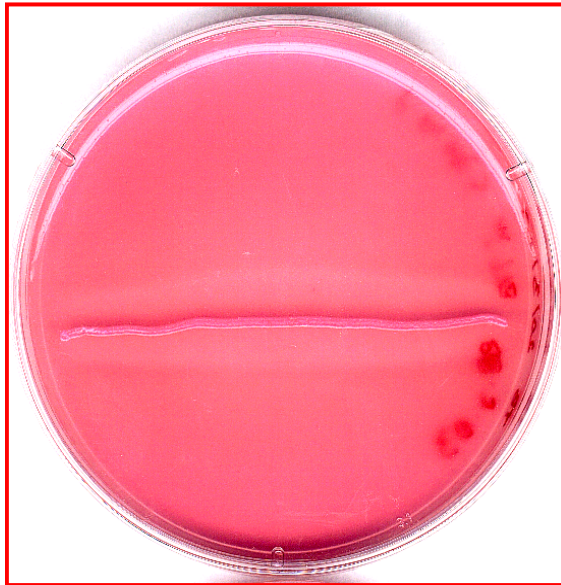


Figura R.1 Halo de degradación producido por un microorganismo lipolítico en una placa suplementada con tributirina y rodamina B.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1 LOS LÍPIDOS

El término “lípidos” define sustancias de origen biológico como aceites, grasas y ceras que son solubles en solventes orgánicos, pero que son insolubles o levemente solubles en agua. Por tanto, en ambientes acuosos tienden a asociarse mediante fuerzas no covalentes dando lugar a gotas oleosas, en el caso de los lípidos hidrofóbicos, o dando lugar a monocapas, bicapas o micelas, en el caso de los lípidos anfipáticos (Boyer, 2000; Mathews *et al.*, 2000).

Estas moléculas se encuentran en todos los seres vivos, en los que llevan a cabo funciones biológicas muy diversas debido a su elevada heterogeneidad química. Así, intervienen en la formación de las membranas biológicas, en el almacenamiento de energía, son aislantes, y actúan como moléculas mensajeras, vitaminas, pigmentos, transportadores de electrones, cofactores enzimáticos y detergentes, entre otras funciones (Boyer, 2000).

Los lípidos se pueden clasificar de diferentes maneras, aunque en general se dividen en:

- **Lípidos simples:** son los que contienen uno o dos tipos de moléculas diferentes, e incluyen, entre otros, a los hidrocarburos, los alcoholes, aldehídos y ácidos grasos, los eicosanoides, los polihidroxicanoatos, las cutinas, las suberinas, los cianolípidos, los acilgliceroles (o acilglicéridos), las ceras, las ceramidas, los lipoaminoácidos y lipopéptidos, los lípidos fenólicos, los terpenos, los alcaloides

isoprenicos, las quinonas lipídicas, los alcoholes vitamínicos y los esteroides (<http://www.cyberlipid.org>).

- **Lípidos complejos:** son aquellos que contienen glúcidos en su estructura, y los que están formados por tres o más tipos de moléculas diferentes. Incluyen a los gliceroalcolípidos, los glicerofosfolípidos, las esfingomielinas, los gangliósidos, los cerebrósidos, los lipoaminoácidos glicosídicos, los acilglicósidos, los lipopolisacáridos y los proteolípidos, entre otros (<http://www.cyberlipid.org>).

De los lípidos mencionados, los ácidos grasos y los acilglicéridos son de especial interés. Los ácidos grasos están formados por cadenas hidrocarbonadas saturadas o insaturadas que contienen al menos un grupo carboxílico en uno de sus extremos. Estas moléculas intervienen en múltiples funciones biológicas, y están en la base de la biosíntesis del resto de lípidos (Boyer, 2000).

Los acilglicéridos están formados por uno, dos o tres ácidos grasos esterificados a una molécula de glicerol (mono, di y triacilglicéridos, respectivamente), y están, implicados en varias funciones biológicas: reserva energética, aislamiento, señalización intra e intercelular, etc. Estos compuestos pueden ser hidrolizados mediante soluciones alcalinas (saponificación), o mediante la actividad de unas enzimas llamadas lipasas que liberan un ácido graso cada vez (Gunstone, 1999; Boyer, 2000).

2 PROPIEDADES GENERALES DE LAS LIPASAS

Las lipasas son éster hidrolasas carboxílicas que rompen los enlaces éster de los acilglicéridos mediante la adición de una molécula de agua, dando lugar a ácidos grasos libres y glicerol (Bornscheuer, 2002; Gupta *et al.*, 2004). Su función biológica es incierta en muchos casos, aunque parece que están relacionadas con la bioconversión de lípidos entre diferentes organismos y dentro del mismo organismo, en relación con diferentes procesos como el aprovechamiento de fuentes de carbono y la modificación o el reciclaje de las membranas celulares (Schmid & Verger, 1998; Bornscheuer, 2002),

así como en la detoxificación de biocidas y agentes contaminantes (Khalameyzer *et al.*, 1999; Margesin *et al.*, 2003). Además, estas enzimas pueden actuar como factores de virulencia en determinadas patologías (Jaeger *et al.*, 2004).

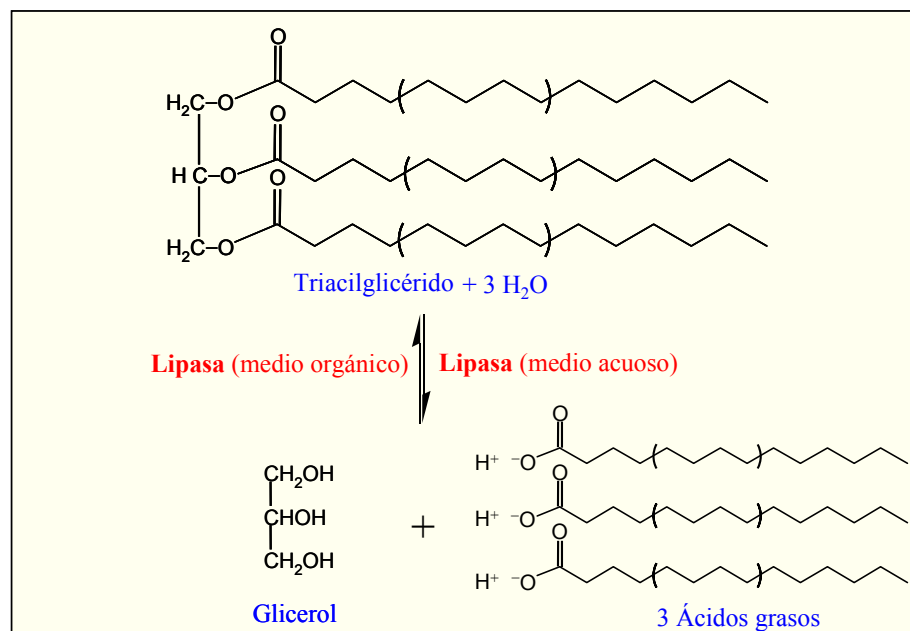


Figura R.2. Hidrólisis y síntesis de acilglicéridos mediante lipasas.

“Lipasa” o “enzima lipolítico” son términos genéricos que incluyen dos grupos principales de enzimas: (1) carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) y (2) lipasas “auténticas” (EC 3.1.1.3), aunque a veces también se incluyen otras enzimas que actúan sobre acilglicéridos y otros lípidos similares como las cutinasas, las fosfolipasas y las lipoproteína lipasas. El único criterio aceptado por el momento para diferenciar a las carboxilesterasas de las lipasas “auténticas” corresponde a la especificidad de sustrato. Las lipasas “auténticas” son específicas para acilglicéridos y otros ésteres con ácidos grasos de cadena larga (≥ 10 átomos de carbono), siendo la trioleína su sustrato de referencia, mientras que las carboxilesterasas actúan específicamente sobre acilglicéridos de cadena corta (< 10 átomos de carbono) y otros ésteres simples, siendo la tributirina su sustrato estándar (Jaeger *et al.*, 1999; Fojan *et al.*, 2000).

No obstante, estos dos tipos de enzimas se pueden diferenciar generalmente en base a otras características, varias de ellas relacionadas directamente con la especificidad de sustrato. Por ejemplo, las lipasas “auténticas” muestran preferencia por sustratos altamente hidrofóbicos, insolubles y agregados, y presentan sitios de unión largos para acomodar al ácido graso a escindir, mientras que las carboxilesterasas actúan sobre sustratos más solubles y con un grado de hidrofobicidad más variable, mostrando sitios de unión para el ácido graso a escindir más cortos. Además, las lipasas “auténticas” muestran un mayor número de aminoácidos no polares pequeños localizados en las zonas expuestas al solvente y en la región del centro activo que las carboxilesterasas, así como un rango de sustratos más amplio, una mayor regio y estereoespecificidad, una mayor estabilidad en solventes orgánicos, y un potencial electrostático en el centro activo más básico que las carboxilesterasas (Fojan *et al.*, 2000; Bornscheuer, 2002).

Sin embargo, una de las principales diferencias entre estos dos grupos de enzimas radica en la existencia de un fenómeno denominado “activación interfacial” y en la presencia de una estructura llamada “*lid*” (tapa) en la mayoría de lipasas “auténticas”, pero no en las carboxilesterasas. La activación interfacial consiste en un pronunciado incremento de la actividad enzimática en el momento en el que el sustrato lipídico pasa de un estado monomérico y soluble en medio acuoso a un estado agregado. El fenómeno está relacionado con los cambios conformacionales que se producen en estas enzimas cuando interaccionan con una interfase lípido–agua. Entre otros efectos, estos cambios hacen que se desplace la tapa, una estructura que se encuentra en la superficie de la enzima cubriendo el centro activo y que está formada por un bucle o por una o dos hélices α , lo que permite que el sustrato tenga acceso al centro catalítico de la enzima (Verger, 1997; Jaeger *et al.*, 1999; Fojan *et al.*, 2000).

Una de las principales características de las lipasas consiste en que son enzimas muy versátiles, ya que pueden catalizar reacciones de hidrólisis sobre un amplio rango de lípidos. En presencia de solventes orgánicos, son también capaces de catalizar reacciones de síntesis o de intercambio de grupos (transesterificación e interesterificación) entre diferentes moléculas, incluyendo lípidos, glúcidos y aminoácidos. Además, estas enzimas pueden realizar todas estas reacciones con una elevada especificidad de sustrato, así como de forma regio o enantioespecífica, lo que

hace de ellas unas de las enzimas más interesantes en el campo de la biotecnología (Pandey *et al.*, 1999; Gunstone, 1999; Bornscheuer, 2002).

Con respecto a su estructura, todas las lipasas presentan el plegamiento típico de las α/β hidrolasas (“ *α/β hydrolase fold*”), que consiste en una estructura central formada por 8 láminas β interconectadas por hélices α . El centro activo de estas enzimas, que puede estar cubierto por una tapa en las lipasas auténticas, tiene tres aminoácidos catalíticos cuya posición dentro del plegamiento suele estar conservada: una serina nucleofílica, un ácido aspártico o un ácido glutámico y una histidina. La serina catalítica está generalmente incluida en el pentapéptido conservado Gly(Ala)-Xaa-Ser-Xaa-Gly, el cual forma un giro entre la lámina β 5 y la siguiente hélice α cuya función es estabilizar y orientar la serina nucleofílica, y que es conocido como “*nucleophilic elbow*”. Además, el centro activo contiene otras estructuras que intervienen en la estabilización los intermediarios producidos durante la catálisis (“*oxyanion hole*”), o que se encargan de acomodar el ácido graso a escindir (“*scissile fatty acid binding pocket*”) u otras partes del sustrato, y cuyas características condicionan la especificidad de sustrato y la selectividad de estas enzimas (Jaeger *et al.*, 1999).

El mecanismo catalítico de las lipasas se basa en un sistema de intercambio de cargas que consta de 4 etapas. Tras la unión del sustrato, se produce el ataque nucleofílico por parte del grupo hidroxilo de la serina catalítica sobre enlace éster del lípido, lo que lleva a la rotura del enlace y a la formación de un intermediario entre el ácido graso y la serina nucleofílica. Seguidamente se libera el alcohol y se produce un segundo ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua que ataca el enlace éster del intermediario transitorio, lo que produce la liberación del ácido graso y la regeneración del centro catalítico (Bornscheuer, 2002).

Las dificultades que conlleva el hecho de que las lipasas sean enzimas solubles en medio acuoso que actúan sobre sustratos hidrofóbicos ha llevado al desarrollo de una gran cantidad de métodos para determinar la actividad de estas enzimas y su inhibición: (1) ensayos en placas con triacilglicéridos, (2) ensayos espectrofotométricos con sustratos naturales, derivados del *p*-nitrofenol o ésteres de resorufina, (3) ensayos espectrofluorimétricos con análogos de acilglicéridos que contienen fluoróforos como la 4-metilumbeliferona (MUF) o la resorufina, (4) ensayos cromatográficos para la

detección de moléculas como los ácidos grasos, el β -naftol o el *p*-nitrofenol liberados por las lipasas al hidrolizar los acilglicéridos o sus correspondientes análogos, (5) métodos titrimétricos, basados en la neutralización de la acidez generada por los ácidos grasos libres, (6) métodos tensiométricos que miden cambios en la tensión superficial de las monocapas lipídicas, (7) métodos radiométricos que utilizan sustratos marcados radiactivamente, y (8) otros métodos para la detección de la actividad lipolítica o de las propiedades fisicoquímicas de estas enzimas tales como ensayos conductimétricos, turbidimétricos, resonancia magnética nuclear, microscopia de fuerzas atómicas, cristalografía, etc. (Beisson *et al.*, 2000; Wahler & Reymond, 2001).

3 LIPASAS BACTERIANAS

Las lipasas bacterianas son motivo de un gran interés debido a su potencial biotecnológico y a su papel como factores de virulencia en algunas bacterias patógenas. Esto ha llevado a la clonación y caracterización de muchas de estas enzimas, así como al estudio de los mecanismos moleculares que controlan la expresión, el plegamiento y la secreción de estas enzimas (Rosenau & Jaeger, 2000).

Las lipasas bacterianas han sido clasificadas por Arpigny y Jaeger (1999) en ocho familias en base a su secuencia primaria y a sus propiedades biológicas, aunque la familia I, que en principio constaba de 6 subfamilias, ha sido posteriormente ampliada a 7 subfamilias por Jaeger y Eggert (2002).

La expresión génica de las lipasas bacterianas está altamente regulada, siendo la regulación dependiente de la densidad celular (“*Quorum sensing*”) el mecanismo más general. Sin embargo, existen activadores y represores adicionales que modulan la expresión génica de estas enzimas en respuesta a una gran variedad de señales ambientales (Jaeger *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2004).

Tras la síntesis proteica, la mayoría de estas enzimas se pliegan por si mismas en el citoplasma o durante su proceso de secreción, aunque en algunos casos su

plegamiento requiere de la intervención de chaperonas intramoleculares o intermoleculares, o de proteínas encargadas de establecer enlaces disulfuro (Jaeger *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2004). Muchas lipasas bacterianas son secretadas al medio externo, un proceso para el que hoy en día se conocen tres rutas distintas, (1) el sistema Sec–Xcp, (2) el sistema Tat y (3) el sistema ABC, que difieren en el tipo de proteínas transportadoras y en el péptido señal u otros motivos presentes en las lipasas transportadas (Jaeger & Eggert, 2002).

Respecto a sus propiedades enzimáticas, las lipasas bacterianas son activas en un amplio rango de sustratos en los que, como se mencionó anteriormente, realizan diferentes reacciones de hidrólisis, de síntesis o de intercambio de grupos, muchas veces de forma altamente quimio, regio o estereoespecífica, y sin llevar a cabo reacciones laterales o generar subproductos. Además, estas enzimas son altamente estables en un amplio rango de temperaturas, pHs y solventes orgánicos, aunque la mayoría son mesófilas o prefieren pHs neutros o básicos. Las lipasas bacterianas son también estables frente a diferentes detergentes, iones (aunque algunos pueden activar o inhibir la actividad de estas enzimas) y agentes químicos, y, en general, no requieren cofactores. Por estos motivos, y debido al conocimiento existente sobre estas enzimas, a su disponibilidad, y al hecho de que los procesos en los que intervienen son generalmente menos costosos y menos contaminantes, las lipasas bacterianas (y fúngicas) son las enzimas más versátiles y más ampliamente utilizadas en biotecnología (Gunstone, 1999; Schmidt-Dannert, 1999; Gupta *et al.*, 2004).

Entre otras aplicaciones, estas enzimas se utilizan en la industria alimentaria (producción de aromas, emulgentes, etc.), en química orgánica (síntesis de antibióticos, pesticidas, producción de compuestos enantiopuros, etc.), en detergentes (aditivos en detergentes, producción de surfactantes para jabones y productos de limpieza, etc.), en la industria papelera (eliminación del “pitch”, de tintas, etc.), así como en el tratamiento de productos residuales o tóxicos, en biosensores, en la producción de biodiesel, etc. (Gunstone, 1999; Pandey *et al.*, 1999; Reetz, 2002).

La importancia de estas aplicaciones ha llevado a la optimización de las reacciones catalizadas por las lipasas, a mejoras en la producción y purificación de estas enzimas, así como a la obtención de lipasas con nuevas propiedades catalíticas o una

mayor estabilidad, lo que se ha conseguido mediante la modificación de enzimas ya existentes, o mediante el aislamiento de nuevas lipasas (Schmidt-Dannert, 1999; Jaeger & Eggert, 2002).

Muchas de estas nuevas lipasas se han obtenido de microorganismos del suelo, donde se encuentran bacterias muy activas en el reciclaje de nutrientes como las pertenecientes al género *Bacillus* y otros géneros relacionados. Estos géneros están considerados como una de las mayores fuentes de enzimas con aplicación industrial debido a que, en general, son microorganismos no patógenos, bien estudiados y fáciles de manipular, que producen y secretan grandes cantidades de enzimas como lipasas, celulasas, etc. (Priest, 1993).

4 LIPASAS BACTERIANAS IMPLICADAS EN VIRULENCIA

Muchas bacterias y hongos lipolíticos están implicados en enfermedades infecciosas, aunque solo en algunos de ellos, como *Propionibacterium acnes* y *Helicobacter pylori*, estas enzimas parecen ser factores de virulencia importantes (Jaeger *et al.*, 1994).

P. acnes es una bacteria Gram-positiva que reside en los folículos pilosebáceos de la piel y que puede causar acné y otras enfermedades. El acné es una enfermedad inflamatoria crónica muy extendida entre la población de 10–30 años, aunque con diferentes grados de intensidad. Consiste en un sarpullido que comienza como un comedón que posteriormente puede inflamarse y romperse dando lugar a lesiones más graves como pápulas, pústulas, nódulos y quistes. La etiología del acné es multifactorial, aunque los principales agentes causales de la enfermedad son la sobreproducción de sebo, la hipercornificación de los conductos de las glándulas pilosebáceas, la multiplicación de *P. acnes* y la inflamación que se produce como resultado de los factores anteriores; y aunque existen diferentes terapias que actúan sobre estos factores, estas no siempre son efectivas (Brown & Salita, 1998; Toyoda & Morohashi, 2001; Jape, 2003).

P. acnes produce una lipasa extracelular (GehA; Miskin *et al.*, 1997) que es uno de los principales factores de virulencia de esta bacteria, ya que esta enzima es la principal responsable de la hidrólisis de los triacilglicéridos del sebo. El glicerol que genera sirve de fuente de carbono para esta bacteria, mientras que los ácidos grasos libres producen una inflamación muy intensa, aumentan la hipercornificación de los conductos debido a que aumentan la adhesión entre los queratinocitos y entre las células de *P. acnes*, y favorecen la colonización y la formación de biofilms por parte de este microorganismo. Por lo tanto, esta enzima ha sido considerada como una diana terapéutica muy importante, lo que ha llevado al estudio de su actividad y de su inhibición por varios compuestos utilizados en el tratamiento del acné (Toyoda & Morohashi, 2001; Burkhart & Burkhart, 2003; Higaki, 2003).

H. pylori es una bacteria Gram-negativa muy extendida que se encuentra en el estómago y el duodeno de los seres humanos y de otros animales, y que puede causar diferentes enfermedades como gastritis, úlcera péptica o diversos tipos de cáncer de estómago, además de otras enfermedades en el resto del organismo. Existen diferentes tratamientos para la erradicación de este patógeno aunque no siempre son efectivos, en parte, debido a la elevada variabilidad de este microorganismo (Nagorni, 2000).

Esta bacteria produce varios factores de virulencia como enzimas, citotoxinas, adhesinas, etc., los cuales favorecen la colonización de la mucosa estomacal e intestinal por parte de este microorganismo, e inducen una respuesta inflamatoria muy intensa que resulta dañina para el propio huésped. Entre estos factores de virulencia, se encuentran las lipasas y las fosfolipasas, que parecen estar relacionadas con la degradación de los lípidos que forman parte de la mucosidad que protege a las células epiteliales de la mucosa gástrica e intestinal, favoreciendo la colonización por parte de este patógeno, y exponiendo el epitelio a la acidez, la pepsina y las otras enzimas hidrolíticas del jugo gástrico. Las lipasas y fosfolipasas de *H. pylori* podrían estar también implicadas en otros procesos como la degradación de la membrana apical de las células epiteliales, en hemólisis, en la generación de lisofosfolípidos y otros lípidos proinflamatorios y citotóxicos, o en la adaptación de la membrana celular de este patógeno a condiciones ácidas (Smoot, 1997, Tsang & Lam, 1999; Tannaes *et al.*, 2001). Sin embargo, el conocimiento sobre estas enzimas es muy bajo, ya que la fosfolipasa A2 es el único

enzima lipolítico de esta bacteria que ha sido clonado y caracterizado en detalle (Dorrell *et al.*, 1999).

5 INHIBIDORES DE LIPASAS

Los inhibidores de lipasas tienen un elevado interés debido a que podrían ser útiles en la terapia de enfermedades en las que las lipasas son un factor importante como la obesidad, el acné y las úlceras producidas por *H. pylori*. De hecho, varios compuestos utilizados en el tratamiento de estas enfermedades tienen actividad antilipasa (Grippa *et al.*, 1999; Higaki, 2003, Gupta *et al.*, 2004). Además, los estudios de inhibición pueden ayudar a mejorar el conocimiento existente sobre el mecanismo de acción de estas enzimas de cara al diseño nuevos inhibidores o de cara a la obtención de lipasas adaptadas a nuevas aplicaciones biotecnológicas (Simons *et al.*, 1999).

Por lo tanto, existe un especial interés en la búsqueda de nuevos inhibidores de lipasas, especialmente si son de origen natural, como los ácidos grasos o los metabolitos secundarios de origen vegetal. Los ácidos grasos, a parte de ser productos de la actividad de las lipasas, actúan como inhibidores competitivos de estas enzimas, tanto en reacciones de hidrólisis como en reacciones de síntesis (Markweg-Hanke *et al.*, 1995; Hari Krishna & Karanth, 2001). Además, están implicados en la regulación de la expresión génica de lipasas y factores de virulencia, así como en la inhibición del crecimiento de varios microorganismos, incluyendo bacterias lipolíticas como *H. pylori* y *P. acnes* (Ruzin & Novick, 2000; Sun *et al.*, 2003; Higaki, 2003).

Los metabolitos secundarios vegetales presentes en plantas medicinales y varios alimentos han demostrado su utilidad en la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades (Singh *et al.*, 2003). Entre estos metabolitos destacan las saponinas, que están constituidas por un núcleo triterpénico o esteroideo unido a una o más cadenas glicosídicas (Milgate & Roberts, 1995), los flavonoides, que son compuestos fenólicos derivados de la benzo- γ -pirona (Di Carlo *et al.*, 1999), y los alcaloides, que son sustancias que contienen un nitrógeno básico que generalmente forma parte de un

sistema cíclico (Evans, 1996). Estos tres grupos de moléculas son una fuente de inhibidores de lipasas altamente prometedora debido a que se encuentran presentes a elevadas concentraciones en extractos de plantas que inhiben la lipasa pancreática porcina (Shimura *et al.*, 1992), así como en varias plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con las lipasas como la úlcera (Borrelli & Izzo, 1999) y el acné (Higaki, 2003). Además, recientes estudios han demostrado que saponinas como la platicodina D (Han *et al.*, 2002), flavonoides como la quercetina (Gatto *et al.*, 2002) y alcaloides como la berberina (Grippa *et al.*, 1999) son buenos inhibidores de lipasas. No obstante, son necesarios más estudios para dilucidar el efecto sobre diferentes lipasas de más metabolitos purificados pertenecientes a estos tres grupos, con el fin de seleccionar los más apropiados para la prevención o el tratamiento de las enfermedades relacionadas con las lipasas.

6 OBJETIVOS GENERALES

La presente tesis doctoral se enmarca en los objetivos generales de nuestro grupo de investigación, que consisten en el aislamiento, caracterización y sobreproducción de enzimas microbianas con interés biotecnológico como las lipasas, las celulasas, las xilanasas o las pectinasas.

Además, nuestro grupo está interesado en el aislamiento, caracterización e inhibición por sustancias naturales de lipasas microbianas implicadas en enfermedades como el acné y la úlcera. Este interés es el resultado de una colaboración iniciada en 2001 con el grupo del Dr. Luciano Saso de la Università degli studi di Roma “*La Sapienza*”, que está centrado estudio de la inhibición de lipasas por sustancias naturales con potencial farmacológico.

Por lo tanto, el objetivo general del presente trabajo consistió en el aislamiento, clonación, caracterización e inhibición por sustancias naturales de lipasas microbianas con interés en biotecnología y en enfermedades infecciosas.

CAPÍTULO 1:

Identificación, clonación y caracterización de las lipasas de *Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp. BP-6 y *Bacillus* sp. BP-7

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Como se ha mencionado anteriormente, existe un gran interés en aislar nuevas lipasas bacterianas ya que estas enzimas tienen un gran potencial biotecnológico (Jaeger *et al.*, 1999), siendo el género *Bacillus* una de las fuentes de nuevas lipasas más interesante debido a sus características (Priest, 1993), y debido al hecho de que muchas cepas de este género disponen de un sistema lipolítico apropiado para aplicaciones biotecnológicas (Zock *et al.*, 1994; Dröge *et al.*, 2000). Por este motivo, el presente capítulo se centra en el aislamiento y la caracterización de nuevas lipasas del género *Bacillus* con potencial biotecnológico. Los objetivos concretos fueron:

1. Analizar el sistema lipolítico de *Bacillus megaterium* CECT 370 y aislar, clonar y caracterizar la(s) lipasa(s) de este microorganismo.
2. Analizar el sistema lipolítico de *Bacillus* sp. BP-6 y aislar, clonar y caracterizar la(s) lipasa(s) de este microorganismo.
3. Aislar, clonar y caracterizar la(s) lipasa(s) de *Bacillus* sp. BP-7, una cepa lipolítica previamente estudiada en nuestro grupo de investigación.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas *B. megaterium* CECT 370 y *Bacillus* sp. BP-6 fueron seleccionadas entre 26 cepas de *Bacillus* y otros aislados Gram-positivos por su actividad lipolítica en placas con tributirina y aceite de oliva (Kouker & Jaeger, 1987; Prim *et al.*, 2000).

Posteriormente, se analizó la actividad lipolítica sobre MUF-butirato y MUF-oleato de los extractos intracelulares y los sobrenadantes de estas dos cepas mediante fluorimetría, y mediante zimogramas realizados tras separar las proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) y en geles de isoelectroenfoque (IEF) (Díaz *et al.*, 1999; Prim *et al.*, 2000).

El aislamiento de los genes que codifican las lipasas de las cepas *B. megaterium* CECT 370, *Bacillus* sp. BP-6 y *Bacillus* sp. BP-7 se realizó mediante PCR con cebadores consenso diseñados para la amplificación de la región central de genes relacionados con *B. subtilis lipA*. Posteriormente, se secuenciaron los fragmentos obtenidos y se diseñaron cebadores específicos para la amplificación mediante PCR inversa de los extremos de los genes detectados. Este proceso no nos permitió obtener la secuencia completa de estos genes, pero si determinar que eran altamente similares a *B. subtilis lipB* (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), lo que nos permitió amplificarlos en condiciones de baja astringencia mediante PCR con cebadores específicos para *B. subtilis lipB*.

Los genes obtenidos fueron estudiados mediante análisis informático (BLAST; ClustalW Multalign on-line software, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>; ExPASy proteomic server; <http://www.expasy.org>; etc.), y posteriormente fueron clonados mediante ligación en el plásmido pBR322 y transformación en *Escherichia coli* 5K (Sambrook *et al.*, 1989).

Las enzimas clonadas fueron caracterizadas bioquímica y molecularmente mediante ensayos en placa, zimograma, fluorimetría, y ensayos espectrofotométricos con derivados del *p*-nitrofenol, esencialmente como está descrito (Prim *et al.*, 2000). Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de MUF o *p*-nitrofenol por minuto, bajo las condiciones de ensayo.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas *B. megaterium* CECT 370 y *Bacillus* sp. BP-6 fueron escogidas entre una colección de 26 cepas de *Bacillus* y otros aislados Gram-positivos debido a su actividad sobre sustratos lipídicos, y por tener un sistema lipolítico completamente desconocido.

Los análisis zimográficos realizados revelaron que *B. megaterium* CECT 370 posee un sistema lipolítico compuesto por, al menos, dos lipasas extracelulares y, probablemente, dos lipasas intracelulares o unidas a membrana. Una de las lipasas extracelulares mostró un peso molecular de 57 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de 5,7, siendo por tanto de elevado interés, ya que no se conocen lipasas secretadas en el género *Bacillus* o en géneros afines que tengan estas características. La segunda lipasa secretada mostró un peso molecular de 19 kDa y un pI de 9,2, y corresponde muy posiblemente a la lipasa de esta cepa clonada en el presente trabajo. Con respecto a las lipasas no secretadas, estas mostraron un peso molecular de 43 y 37 kDa, respectivamente, y un pI de 5,5. El pI de estas lipasas no secretadas indica que podrían estar relacionadas con las carboxilesterasas intracelulares pertenecientes a la familia VII de lipasas bacterianas (Arpigny & Jaeger, 1999), aunque su peso molecular resulta algo bajo en comparación con el de estas carboxilesterasas.

En lo que respecta a *Bacillus* sp. BP-6, los zimogramas realizados mostraron que el sistema lipolítico de esta cepa contiene una o dos lipasas secretadas y entre una y cuatro lipasas intracelulares o unidas a membrana. Una de las lipasas secretadas mostró un peso molecular de 19 kDa y un pI de 9,2, por lo que probablemente corresponde a la lipasa de esta cepa clonada en el presente trabajo, mientras que la otra, con un peso molecular de 56 kDa y pI hipotético igual a 9,2, podría ser una enzima lipolítica adicional o un trímero de la lipasa de 19 kDa, ya que la agregación es un fenómeno frecuente entre las lipasas (Khalameyzer *et al.*, 1999). En lo referente a las lipasas no secretadas, estas mostraron un peso molecular de 27, 52, 86 y 110 kDa, respectivamente, y un pI de 5,2, por lo que podrían corresponder a diferentes lipasas o a diferentes multímeros de la misma enzima. En caso de tratarse de diferentes enzimas, la lipasa de de 52 kDa y pI igual a 5,2 presentaría las mismas propiedades moleculares que

las descritas en las carboxilesterasas intracelulares PnbA de *B. subtilis* (Zock *et al.*, 1994), EstA de *Paenibacillus* sp. BP-23 (Prim *et al.*, 2000) y EstA1 de *Bacillus* sp. BP-7 (Prim *et al.*, 2001), todas ellas pertenecientes a la familia VII de lipasas bacterianas (Arpigny & Jaeger, 1999).

No obstante, ambas cepas podrían presentar lipasas adicionales no detectadas bajo nuestras condiciones de ensayo. En cualquier caso, la elevada actividad lipolítica de ambas cepas y las diferentes enzimas lipolíticas detectadas en los zimogramas nos llevó a intentar aislar y clonar los genes que codificaban las lipasas de estas cepas. Para ello, se realizaron experimentos de PCR con cebadores consenso diseñados para la amplificación de la región central de genes relacionados con *B. subtilis lipA*, seguidos de experimentos de PCR inversa, lo que nos permitió obtener casi la totalidad de la secuencia de dos genes altamente homólogos a *B. subtilis lipB*. Ambos genes, que fueron denominados *B. megaterium lipA* (*BMLipA*) y *Bacillus* sp. BP-6 *lipA* (*BP6lipA*), fueron completamente aislados mediante PCR con cebadores específicos para la amplificación de *B. subtilis lipB*. Esta última estrategia nos permitió también obtener el gen *lipA* (*BP7lipA*) de *Bacillus* sp. BP-7, una cepa previamente caracterizada en nuestro grupo de investigación pero de la que sólo se había podido clonar y caracterizar una de sus lipasas (Prim *et al.*, 2001). Por el contrario, la utilización de cebadores específicos para la amplificación de *B. subtilis lipA* no produjo ningún resultado en las tres cepas analizadas. Finalmente, los genes obtenidos fueron clonados en *E. coli* 5K para la posterior caracterización de las correspondientes lipasas.

El análisis informático de los genes obtenidos reveló que el gen *BMLipA* presenta una homología del 99% con *BP6lipA* y *BP7lipA*, que son idénticos entre sí. Los tres genes contienen una pauta abierta de lectura de 633 nucleótidos, cuya secuencia de aminoácidos deducida corresponde a proteínas de 210 residuos, 99–100% homólogas entre ellas, cuyo peso molecular y pI deducidos son 22,3–22,4 kDa y 9,43–9,56, respectivamente. Como era de esperar, las proteínas deducidas mostraron la mayor homología (99%, 100% y 100%, respectivamente) con *B. subtilis* LipB (YfiP) (Yamamoto *et al.*, 1996; Kuntz *et al.*, 1997), mientras que la homología con *B. subtilis* LipA y otras lipasas secretadas de la subfamilia I.4 de lipasas bacterianas fue menor (70–75%), lo que indica que estas proteínas pertenecen a un reducido grupo de lipasas incluido en esta subfamilia.

A la vista de estos resultados, solo *BMLipA* y *BP6lipA* fueron seleccionados para posteriores estudios. La caracterización de sus correspondientes enzimas resultó de gran interés debido a que en aquel momento apenas existían estudios sobre la lipasa LipB de *B. subtilis*. Sin embargo, cuando la caracterización de las enzimas clonadas estaba casi completada apareció publicada la clonación y caracterización parcial de *B. subtilis* LipB (Eggert *et al.*, 2000), lo que nos permitió comparar y confirmar nuestros resultados.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de las proteínas deducidas BMLipA y BP6LipA reveló que ambas contienen un péptido señal de 28 residuos en su extremo N-terminal, que parece dirigir la secreción de estas enzimas mediante el sistema Sec–Xcp (Tjalsma *et al.*, 2000). El procesamiento de este péptido señal daría lugar a proteínas maduras con unas propiedades moleculares deducidas (19,4–19,5 kDa y pI igual a 9.2–9.4) muy similares a las de las lipasas de bajo peso molecular detectadas en los sobrenadantes de las correspondientes cepas parentales mediante zimograma, y muy similares también a las de *B. subtilis* LipB (Eggert *et al.*, 2000).

El aparato catalítico de las proteínas maduras BMLipA y BP6LipA estaría formado por los residuos serina⁷⁸ (localizado en el motivo AHS⁷⁸MG correspondiente al típico pentapéptido AXSXG de las lipasas pertenecientes a las subfamilias I.4 y I.5, Arpigny & Jaeger, 1999), ácido aspártico¹³⁴ e histidina¹⁵⁷. Con respecto a su estructura, el modelo tridimensional obtenido mediante modelado por homología a partir de la estructura de *B. subtilis* LipA (van Pouderoyen *et al.*, 2001) reveló que estas lipasas tienen una estructura globular formada por un solo dominio que presenta el plegamiento α/β característico de las lipasas. Este dominio, cuya parte central es muy similar al de *B. subtilis* LipA, está formado por 6 láminas β rodeadas por 5 hélices α en un lado y 3 hélices α en el otro lado, y no presenta una tapa (“lid”) que cubra el centro activo, lo que explica que estas lipasas no presenten activación interfacial pese a tener una composición aminoacídica típica de lipasas “auténticas”, rica en residuos no polares pequeños (47% del total). Curiosamente, los residuos diferentes entre BMLipA y BP6LipA (la posición 169 es tirosina en BMLipA y asparagina en BP6LipA, y la posición 172 es lisina en BMLipA y glutamato en BP6LipA), se encontraron muy cercanos entre sí, en la superficie de ambas proteínas, concretamente en la parte inferior de la hélice α que precede al extremo C-terminal de ambas lipasas (Figura R.3).

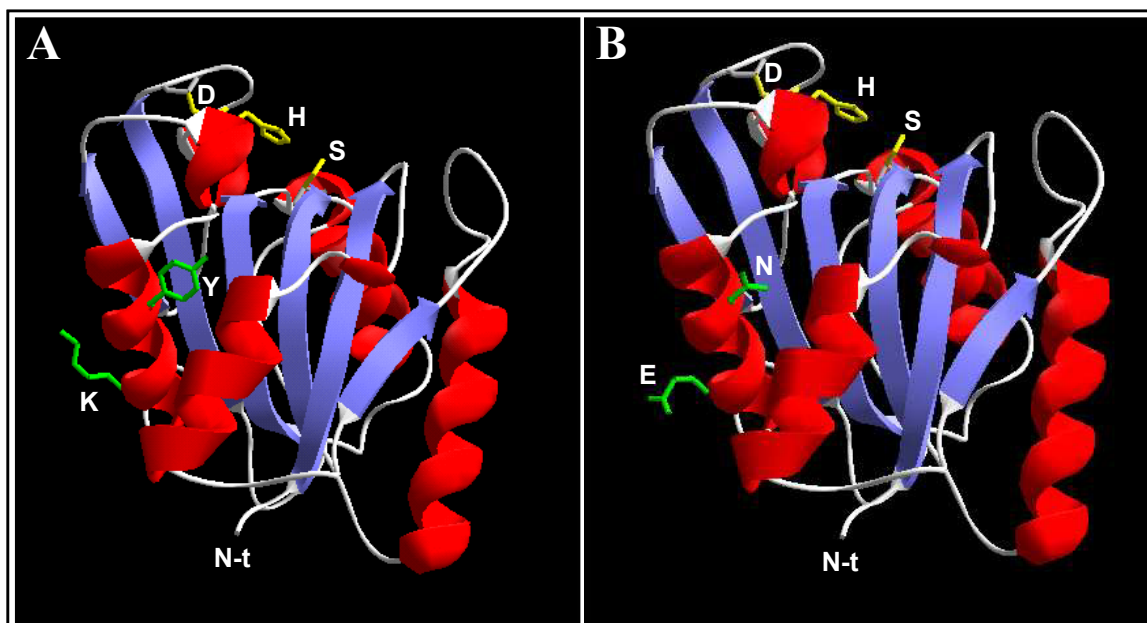


Figura R.3 Modelo de la estructura tridimensional de BMLipA y BP6LipA.

Las estructuras tridimensionales obtenidas para las proteínas maduras BMLipA (A) y BP6LipA (B) mediante modelado por homología se muestran en la misma orientación. Los residuos de la tríada catalítica están en amarillo: S (Ser⁷⁸), D (Asp¹³⁴) y H (His¹⁵⁷). Los residuos diferentes en ambas proteínas están en verde: Y (Tyr¹⁶⁹)/N(Asn¹⁶⁹) y K(Lys¹⁷²)/E(Glu¹⁷²), respectivamente. N-t: extremo N-terminal.

Cuando BMLipA y BP6LipA fueron caracterizadas bioquímicamente, ambas lipasas se comportaron como carboxilesterasas típicas, mostrando preferencia por sustratos de cadena corta (C₄–C₈; actividad máxima en tributirina, *p*-nitrofenil butirato y MUF-butirato), y mostrando cinéticas del tipo Michaelis-Menten, sin activación interfacial.

La actividad máxima de las enzimas clonadas se halló a 45 °C y pH 7, siendo su actividad también muy alta en un amplio rango de temperaturas (20–50 °C) y pHs (5,5–8,5). Además, estas lipasas mostraron una elevadísima estabilidad, ya que su actividad se mantuvo cuando se incubaron (a pH 7) durante 1 hora a temperaturas de hasta 45 °C, y cuando fueron incubadas durante 40 días a temperaturas de hasta 30 °C. También permanecieron estables en un rango de pHs de 4 a 12 cuando se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

Ambas lipasas mostraron también una elevada estabilidad frente a la mayoría de cationes, detergentes y otros agentes analizados. De hecho, sólo los iones Ag^+ , Hg^{2+} (a 1 y 10 mM) y Fe^{2+} (a 10 mM) produjeron una elevada inhibición de ambas enzimas, mientras que los iones Cu^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} inhibieron parcialmente estas lipasas sólo a una concentración de 10 mM. Además, BMLipA y BP6LipA no necesitaron cofactores para su actividad, aunque los iones Fe^{2+} (a 1 mM) y NH_4^+ produjeron una leve activación de ambas enzimas.

Por otro lado, los ensayos realizados con inhibidores de aminoácidos revelaron la importancia de los residuos serina y triptófano, pero no de los residuos cisteína o tirosina, en la actividad de estas lipasas. Otros agentes como el EDTA, el ácido fítico, el SDS, el Tritón X-100 y la urea también inhibieron las enzimas estudiadas, aunque también hay que destacar que bajas concentraciones de SDS produjeron una importantísima activación de ambas lipasas (actividad residual mayor del 800%).

Con respecto a la caracterización molecular de BMLipA y BP6LipA, los ensayos realizados revelaron que estas enzimas tenían un peso molecular calculado de 22 kDa y un pI calculado de 9,5, confirmándose por lo tanto los valores previamente obtenidos a partir del análisis de su secuencia aminoacídica.

Los resultados obtenidos durante la caracterización bioquímica y molecular de las lipasas clonadas, especialmente su tamaño, rango de sustratos y estabilidad, hace de estas enzimas interesantes candidatas para diferentes aplicaciones biotecnológicas como la formulación de detergentes (Pandey *et al.*, 1999), o la transformación de antibióticos y otros fármacos (Zock *et al.*, 1994; Drödge *et al.*, 2003)

4 CONCLUSIONES

I. Se ha analizado el sistema lipolítico de *B. megaterium* CECT 370 y *Bacillus* sp. BP.6, dos cepas seleccionadas por su elevada actividad sobre sustratos lipídicos y por tener un sistema lipolítico completamente desconocido.

II. Se ha aislado, clonado y caracterizado las lipasas LipA de *B. megaterium* CECT 370 y LipA de *Bacillus* sp. BP-6, dos carboxilesterasas muy similares a *B. subtilis* LipB, que son de elevado interés biotecnológico debido a su estabilidad y a sus propiedades bioquímicas y moleculares.

CAPÍTULO 2:

Aislamiento de microorganismos degradadores de lípidos y polisacáridos a partir de suelo de un bosque subtropical, y análisis de las cepas lipolíticas *Bacillus* sp. CR-179 y *Rhodococcus* sp. CR-53

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El creciente auge de la biotecnología ha comportado que exista un elevado interés en aislar nuevos microorganismos productores de nuevas enzimas tales como lipasas, celulasas, xilanasas y pectinasas, que puedan ser aplicables a diferentes procesos industriales (Cherry & Fidantsef, 2003). Los suelos son una de las principales fuentes de este tipo de microorganismos, ya que se trata de ambientes ricos en nutrientes en los que proliferan una gran cantidad de microorganismos degradadores. Por este motivo, el presente capítulo está centrao en aislar y caracterizar microorganismos del suelo que puedan ser de interés biotecnológico debido a sus actividades hidrolíticas sobre lípidos y polisacáridos. Los objetivos concretos fueron:

1. Aislar los microorganismos degradadores de lípidos y polisacáridos de tres muestras de suelo obtenidas de un bosque subtropical de Puerto Iguazú, y determinar la actividad lipasa de los aislados lipolíticos más activos.

2. Analizar las características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y moleculares de los aislados lipolíticos *Bacillus* sp. CR-179 y *Rhodococcus* sp. CR-53.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de tres muestras de suelo de un bosque subtropical de Puerto Iguazú (Argentina) se aislaron los microorganismos quimioheterótrofos aerobios o anaerobios facultativos, tanto esporulados como no esporulados, mediante siembra en placa de los correspondientes bancos de diluciones, como está descrito (Madrid *et al.*, 1997). Los medios de cultivo utilizados fueron: agar LB, agar Nutritivo, agar Sabouraud-cloramfenicol, agar CeNAN-aceite de oliva y agar Horikoshi-I, éste último específico para el crecimiento de bacterias alcalófilas. Los aislamientos se realizaron mediante incubación de todas las siembras a tres temperaturas diferentes: 20 °C, 30 °C y 42 °C.

Las 724 cepas aisladas fueron posteriormente sembradas en placas suplementadas con aceite de oliva, tributirina, carboximetilcelulosa, xilano y ácido poligalacturónico (PGA) para detectar la presencia en estos aislados de las actividades enzimáticas: lipasa “auténtica”, carboxilesterasa, celulasa, xilanasa y pectinasa, respectivamente (Kouker & Jaeger, 1987; Prim *et al.*, 2000; Blanco & Pastor, 1993; Blanco *et al.*, 1998; Soriano *et al.*, 2001).

Los 76 aislados más activos sobre los sustratos ensayados fueron analizados morfológicamente y conservados a -80 °C. Aquellos más activos sobre lípidos fueron sometidos un segundo proceso selección mediante ensayos en papel (Díaz *et al.*, 1999) y de espectroscopía de fluorescencia (Prim *et al.*, 2000), utilizando MUF-butirato y MUF-oleato como sustratos.

Las cepas CR-179 y CR-53, seleccionadas por su morfología y su actividad lipolítica, fueron preliminarmente identificadas en base a los ensayos morfológicos, bioquímicos y fisiológicos recomendados para el género *Bacillus* y otros Gram-

positivos (Gordon *et al.*, 1973), y para actinomicetos (Goodfellow *et al.*, 1998), así como mediante el análisis de la secuencia del rDNA 16S de estas cepas.

Finalmente, se estudió el sistema lipolítico estas dos cepas mediante SDS-PAGE y IEF seguidos de zimograma (Díaz *et al.*, 1999; Prim *et al.*, 2000), y en el caso de la cepa CR-179, mediante PCR con cebadores consenso y cebadores específicos para la amplificación de genes que codifican lipasas del género *Bacillus* (ver Capítulo 1).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron los microorganismos autóctonos de tres muestras de suelo recogidas de un bosque subtropical situado en Puerto Iguazú (Argentina), utilizando diferentes medios de cultivo y temperaturas. En general se obtuvieron valores similares de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo ($2-6 \cdot 10^5$) para los tres suelos.

A partir de las colonias aisladas que se consideraron que eran diferentes, se obtuvieron 724 aislados bacterianos y fúngicos en cultivo puro, los cuales fueron analizados para detectar las actividades enzimáticas de interés biotecnológico: lipasa “auténtica”, carboxilesterasa, celulasa, xilanasas y pectinasa. De estos aislados, 43 mostraron todas las actividades analizadas, mientras que 449 mostraron una o más de estas actividades: 331 fueron activos en aceite de oliva, 360 degradaron la tributirina, 114 degradaron el xilano, 116 hidrolizaron la carboximetilcelulosa y 82 fueron activos sobre el ácido poligalacturónico.

Los aislados con actividad sobre lípidos y/o polisacáridos fueron analizados morfológicamente, y los 76 más activos y/o con una morfología celular especial fueron seleccionados, conservados, y sometidos a un análisis más exhaustivo de su actividad lipolítica, incluyendo la cuantificación de la actividad sobre MUF-butirato y MUF-oleato de los 29 aislados que en los ensayos anteriores se habían mostrado como los más activos sobre sustratos lipídicos.

El aislado CR-179 resultó ser el que tenía mayor actividad lipolítica, ya que fue el más eficaz sobre MUF-butirato (extractos celulares: 1418.8 ± 7.5 mU mg^{-1} proteína, y $6.9 \pm 3.6 \cdot 10^{-2}$ mU ml^{-1} ; sobrenadantes: 7.6 ± 0.1 mU ml^{-1} cultivo) y fue uno de los más activos sobre MUF-oleato. Otros aislados, como la cepa CR-611 y las supuestas cepas fúngicas CR-31 y CR-563 también fueron muy activas en ambos sustratos. Los aislados CR-203, CR-445 y CR-522 mostraron también una elevada actividad sobre MUF-butirato, mientras que las cepas CR-53 y CR-377 fueron unas de las más activas sobre MUF-oleato.

Por lo tanto, la cepa CR-179 fue la primera que se seleccionó para posteriores estudios. Esta cepa fue aislada de la muestra de suelo nº 2 tras choque térmico y posterior siembra en agar Horikoshi-I a 42 °C durante 12 h. Fue seleccionada, además de por ser la que mostró una mayor actividad sobre MUF-butirato y ser una de las más activas sobre MUF-oleato, por ser una de las más activa sobre los lípidos y polisacáridos analizados mediante ensayos en placa, así como por su particular morfología colonial. Los resultados de los tests morfológicos, bioquímicos, fisiológicos y moleculares revelaron que esta cepa (Figura R.4A) es una bacteria Gram-positiva endosporulada que presenta un abundante matriz mucosa en su exterior, y que ha sido preliminarmente identificada como un miembro del grupo fenotípico II (Priest, 1993) y del grupo I de rRNA (Ash *et al.*, 1991) del género *Bacillus*. Aunque esta cepa es muy cercana a *B. subtilis*, no ha podido ser asignada a ninguna especie conocida. Por lo tanto, ha sido denominada *Bacillus* sp. CR-179 en espera de posteriores análisis que nos permitan determinar si esta cepa corresponde a una nueva especie.

El análisis mediante PCR y zimograma de esta cepa reveló que *Bacillus* sp. CR-179 tiene un sistema lipolítico parecido al de otras cepas de *Bacillus* como las analizadas en el Capítulo 1. Su sistema lipolítico está compuesto por, al menos, dos lipasas no secretadas: una de 32 kDa, y otra de 52 kDa que muestra las características típicas de las carboxilesterasas de la familia VII de lipasas bacterianas (Arpigny & Jaeger, 1999). Además, este aislado posee dos lipasas secretadas de la subfamilia I.4, una cuya región central es 66.6% homóloga a *B. subtilis* LipA (Dartois *et al.*, 1992) y otra 100% idéntica a *B. subtilis* LipB (Eggert *et al.*, 2000).

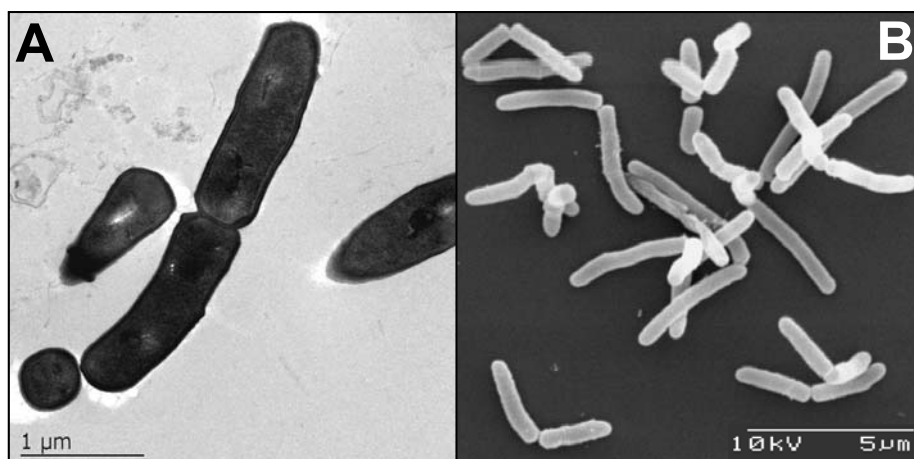


Figura R.4 Morfología celular de las cepas CR-179 y CR-53.

Microfotografías de las cepas CR-179 (A, microscopía electrónica de transmisión) y CR-53 (B, microscopía electrónica de rastreo).

La cepa CR-53 fue la segunda cepa que se seleccionó para posteriores estudios. Esta cepa, que fue aislada de la muestra de suelo n° 1 no tratada mediante choque térmico, fue obtenida tras siembra en agar LB a 20 °C durante 4 días. Se seleccionó por ser una de las más activas sobre MUF-oleato, por su elevada actividad sobre aceite de oliva, tributirina y trioleína, así como por sus propiedades morfológicas. Los estudios realizados de cara a su identificación revelaron que se trata de una bacteria Gram-positiva que forma bacilos ramificados y alguna formas cocoides (Figura R4.2), perteneciente al género *Rhodococcus* (Tsukamura, 1974; Goodfellow & Alderson, 1977), siendo *R. erythropolis* ATCC 4277^T la cepa tipo a la que más se parece. Sin embargo, posteriores estudios son necesarios para determinar si el aislado CR-53 puede ser asignado a esta especie o no, por lo que fue denominado *Rhodococcus* sp. CR-53.

El análisis zimográfico de esta cepa reveló que, como mínimo, *Rhodococcus* sp. CR-53 posee una lipasa no secretada con un peso molecular (60 kDa) parecido al de las carboxilesterasas de la familia VII de lipasas bacterianas (Arpigny & Jaeger, 1999) la cual presenta un gran interés por ser una de las pocas lipasas conocidas en el género *Rhodococcus*.

4 CONCLUSIONES

- I. A partir de tres muestras de suelo se han obtenido 724 aislados en cultivo puro, 449 de los cuales han mostrado una o más de las actividades enzimáticas de interés biotecnológico: lipasa “auténtica”, carboxilesterasa, celulasa, xilanasas y pectinasa.

- II. Se han seleccionado las 76 cepas hidrolíticas más activas o con una morfología celular particular, y se ha cuantificado la actividad lipasa de los 29 aislados más activos sobre lípidos.

- III. El aislado CR-179, seleccionado por su elevada actividad degradadora de lípidos y polisacáridos y por su morfología, ha sido identificado como un miembro del género *Bacillus* cercano a *B. subtilis*, y tiene un sistema lipolítico similar al de otras cepas de este género.

- IV. La cepa CR-53, seleccionada por su elevada actividad lipolítica y por su morfología, ha sido identificada como un miembro del género *Rhodococcus* muy cercano a la especie *R. erythropolis*. Esta cepa produce una lipasa no secretada de 60 kDa que es de las pocas conocidas en este género.

CAPÍTULO 3:

Activación e inhibición de lipasas de *Candida rugosa* y de *(Paeni)Bacillus* por ácidos grasos saturados, evaluadas mediante un nuevo ensayo colorimétrico

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La importancia de las lipasas en biotecnología y en algunas enfermedades hace que exista un gran interés en determinar la actividad de estas enzimas y el efecto de sus inhibidores, lo que ha llevado al desarrollo de una gran cantidad de métodos para analizar su actividad. Sin embargo, la mayoría de ellos no son apropiados para un gran número de muestras o para enzimas no purificadas debido a que son lentos y/o costosos. Por ello, sería interesante la automatización y miniaturización de estos métodos, siendo los ensayos colorimétricos y fluorimétricos los más apropiados para estos fines (Beisson *et al.*, 2000; Wahler & Reymond, 2001).

Por otro lado, el potencial biotecnológico de las lipasas de *Bacillus* y otros géneros afines hace que exista un gran interés en conocer con más detalle la actividad de estas enzimas, así como su regulación por sustancias como los ácidos grasos, que como se ha mencionado antes, son liberados por las lipasas, pueden actuar inhibidores competitivos de estas enzimas (Markweg-Hanke *et al.*, 1995; Hari Krishna & Karanth, 2001) y están implicados en la regulación de la expresión génica y del crecimiento microbiano (Ruzin & Novick, 2000; Sun *et al.*, 2003), entre otros procesos.

Por lo tanto, el presente capítulo se centra en el desarrollo de un método colorimétrico para evaluar la actividad lipolítica a gran escala, así como en el análisis del efecto de los ácidos grasos sobre lipasas de (*Paeni*)*Bacillus*, siendo los objetivos concretos los siguientes:

1. Desarrollar y validar un nuevo microensayo colorimétrico rápido, simple y apto para evaluar la actividad y la inhibición de las enzimas lipolíticas a gran escala.
2. Analizar el efecto de los ácidos grasos saturados sobre la lipasa de *Candida rugosa* (CRL), y sobre 5 lipasas de diferentes cepas de (*Paeni*)*Bacillus*.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Las lipasas a analizar: CRL, EstA de *Paenibacillus* sp. BP-23 (BP23EstA, Prim *et al.*, 2000), EstA1 de *Bacillus* sp. BP-7 (BP7EstA, Prim *et al.*, 2001), LipA de *B. subtilis* (BSLipA, Darois *et al.*, 1992), LipA de *B. megaterium* (BMLipA, Capítulo 1) y LipA de *Bacillus* sp. BP-6 (BP6LipA, Capítulo 1) se obtuvieron de Sigma (CRL), o mediante la preparación de extractos celulares (lipasas de (*Paeni*)*Bacillus*).

El nuevo método colorimétrico, desarrollado a partir de un método preexistente (Prim *et al.*, 2000), se esquematiza en la Figura R.5. Modificaciones de este método, como el uso de diferentes tampones, etc., fueron también analizadas para determinar la importancia de la composición de la mezcla de reacción. Los ensayos de validación mediante HPLC se realizaron esencialmente como está descrito (Grippa *et al.*, 1999), utilizando una mezcla de reacción similar a la del microensayo colorimétrico para una mejor comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos.

Los ensayos de inhibición por ácidos grasos saturados se realizaron mediante el nuevo microensayo colorimétrico, disolviendo los compuestos a ensayar (ácido cáprico – C_{10:0} –, ácido láurico – C_{12:0} –, y ácido mirístico – C_{14:0} –) en isopropanol antes de añadirlos a la mezcla previa (*premix*) (Figura R.5) a diferentes concentraciones.

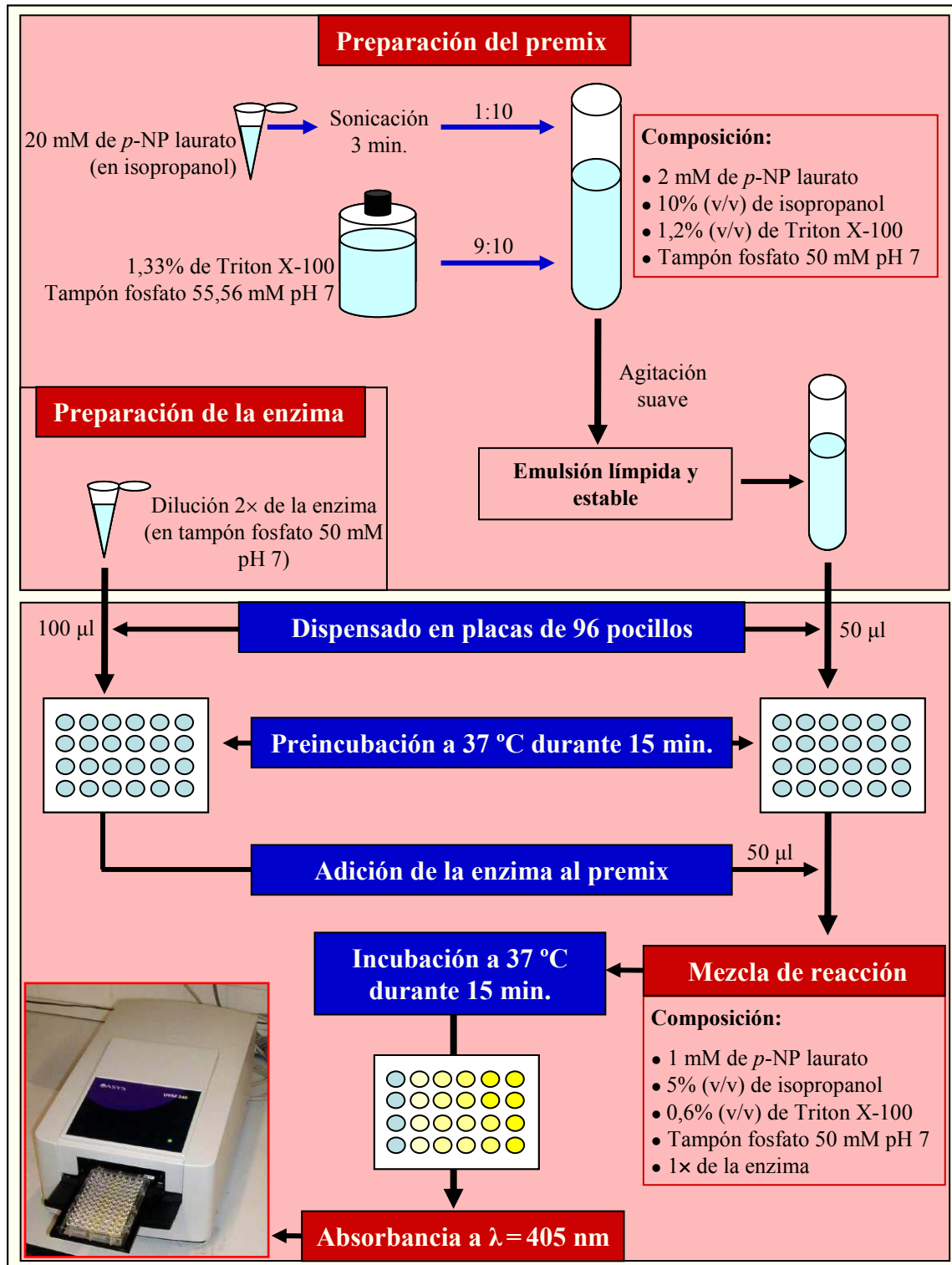


Figura R.5 Esquema del nuevo microensayo colorimétrico desarrollado en este capítulo.

El método utiliza el *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL) como sustrato, aunque también es válido para otros derivados del *p*-nitrofenol. Otros tampones, detergentes, etc. son también posibles mientras no enturbien la mezcla de reacción. Para los ensayos de inhibición, las sustancias a analizar se disuelven en un solvente apropiado y se añaden a la solución premix a la concentración deseada.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un método colorimétrico previamente descrito (Prim *et al.*, 2000) para evaluar la actividad de las lipasas y su inhibición ha sido adaptado, simplificado y miniaturizado de cara a la obtención de un nuevo microensayo colorimétrico más simple, preciso y sensible, que tiene un bajo coste y que es apropiado para el análisis a gran escala de enzimas lipolíticas purificadas o no purificadas.

Los ensayos de actividad y de inhibición por ácidos grasos saturados realizados utilizando la lipasa de *C. rugosa* (CRL), una enzima bien conocida y disponible comercialmente (Benjamin & Pandey, 1998), permitieron desarrollar y validar el método, ya que los resultados de actividad y de inhibición obtenidos fueron muy similares a los obtenidos mediante HPLC en el presente trabajo, y en trabajos anteriores (Grippa *et al.*, 1999). Los resultados obtenidos en los ensayos actividad con las lipasas de (*Paeni*)*Bacillus* previamente mencionadas en comparación con los resultados obtenidos anteriormente para estas lipasas mediante el método colorimétrico original y mediante fluorimetría (Prim *et al.*, 2000; Prim *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2002; Capítulo 1) contribuyeron también a validar el nuevo método y demostraron que el nuevo microensayo colorimétrico es más sensible que el método original.

Además, los ensayos realizados para validar el nuevo método pusieron de manifiesto la importancia de la mezcla de reacción utilizada (tipo y concentración de sustrato y detergente, fuerza iónica, etc.), cuando se compara la actividad lipolítica o la inhibición obtenida mediante métodos distintos.

El nuevo microensayo colorimétrico fue utilizado para evaluar el efecto de tres ácidos grasos saturados sobre 5 lipasas de (*Paeni*)*Bacillus*. Estas lipasas mostraron una respuesta muy diferente ante estos compuestos, lo que demostró que los resultados de activación–inhibición no pueden ser extrapolados directamente de una lipasa a otra, especialmente cuando estas pertenecen a familias distintas.

Las carboxilesterasas intracelulares BP23EstA y BP7EstA1, ambas pertenecientes a la familia VII de lipasas bacterianas (Prim *et al.*, 2000 y 2001), mostraron una inhibición moderada–alta por ácidos grasos, similar a la obtenida para

CRL, lo que sugiere una regulación mediante retroalimentación negativa por producto por parte de estos compuestos, así como un posible papel de estas enzimas en el reciclado de la membrana celular.

En cambio, las enzimas lipolíticas secretadas BSLipA, BMLipA y BP6LipA, que pertenecen a la familia I.4 de lipasas bacterianas (Arpigny & Jaeger, 1999; Capítulo 1), mostraron un comportamiento muy distinto. BSLipA fue moderadamente activada por bajas concentraciones de ácidos grasos y fue inhibida por altas concentraciones de estos lípidos, mientras que BMLipA y BP6LipA fueron fuertemente activadas por los ácidos láurico y mirístico, y fueron inhibidas sólo levemente a elevadas concentraciones de ácido cáprico. La activación de lipasas bacterianas por ácidos grasos ha sido descrita en este trabajo por primera vez, y podría estar relacionada con una unión específica o cooperativa de estos compuestos a la superficie de estas enzimas. El resultado de la competición entre esta unión activadora y la típica inhibición producida por los ácidos grasos al competir con el sustrato por el sitio activo de estas lipasas explicaría el perfil de inhibición–activación producido por estos compuestos en función de su concentración.

Las diferencias en la inhibición–activación por ácidos grasos saturados existentes entre BSLipA y las lipasas BMLipA y BP6LipA, ambas muy parecidas a *B. subtilis* LipB, podría estar relacionada con las diferencias en estructura, actividad y regulación existentes entre estas enzimas (Eggert *et al.*, 2000; 2001 y 2003; Capítulo 1), y parece indicar una función fisiológica distinta para estas lipasas.

4 CONCLUSIONES

I. Se ha desarrollado y validado un nuevo microensayo colorimétrico rápido, simple, sensible y apto para evaluar a gran escala la actividad y la inhibición de las enzimas lipolíticas.

II. Se ha analizado el efecto de varios ácidos grasos saturados sobre la actividad de 5 lipasas de (*Paeni*)*Bacillus*: EstA de *Paenibacillus* sp. BP-23 y EstA1 de *Bacillus* sp. BP-7 fueron moderadamente inhibidas por estos compuestos, mientras que LipA *B. subtilis*, LipA de *B. megaterium* y LipA de *Bacillus* sp. BP-6 fueron activadas por bajas concentraciones de estos ácidos grasos, y fueron inhibidas a altas concentraciones de estos lípidos. Estos resultados podrían estar relacionados con las características estructurales y bioquímicas de estas enzimas, así como con su función biológica.

CAPÍTULO 4:

Inhibición de la lipasa de *Candida rugosa* por saponinas, flavonoides y alcaloides

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Como se ha mencionado anteriormente, los inhibidores de lipasas tienen un gran interés debido a que podrían ayudar en el tratamiento de enfermedades relacionadas con las lipasas como la obesidad, el acné o las úlceras producidas por *H. pylori* (Grippa *et al.*, 1999; Higaki, 2003; Gupta *et al.*, 2004), así como porque pueden contribuir a mejorar el conocimiento existente sobre el mecanismo de acción de estas enzimas, lo que podría contribuir en el diseño nuevos inhibidores o en la obtención de lipasas adaptadas a nuevas aplicaciones biotecnológicas (Simons *et al.*, 1999).

Por lo tanto, existe un gran interés en la búsqueda de nuevos inhibidores de lipasas, especialmente si son de origen natural, como las saponinas, los flavonoides, y los alcaloides, tres grupos de moléculas relacionados con la inhibición de lipasas y con el tratamiento de enfermedades relacionadas con estas enzimas (Shimura *et al.*, 1992; Borrelli & Izzo, 1999; Grippa *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2002; Gatto *et al.*, 2002; Higaki, 2003). Por ello, este capítulo se dedica a evaluar del efecto de varias sustancias naturales sobre la lipasa modelo de *Candida rugosa* (CRL), siendo el objetivo exacto:

1. Evaluar el efecto inhibitor de varias saponinas, flavonoides y alcaloides sobre la lipasa modelo de *C. rugosa*.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Las sustancias analizadas, que fueron disueltas en un solvente apropiado como agua bidestilada, metanol, etc., fueron las siguientes: (1) saponinas: β -aescina, digitonina, ácido glicirrinico (GA) y saponina de *Quillaja* (\square S); (2) flavonoides: 3-hidroxi-flavona (3-HF), 5-hidroxi-flavona (5-HF), (\pm)-catequina y kaempferol; y (3) alcaloides: aspido-spermina, fisostigmina, papaverina, pilocarpina, raubasina, rescinamina, reserpina, y trigonelina.

El efecto de estas sustancias sobre CRL fue ensayado mediante HPLC como está descrito (Grippa *et al.*, 1999). Además, el efecto de las saponinas fue posteriormente confirmado mediante el nuevo microensayo colorimétrico desarrollado en el Capítulo 3.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los ensayos de inhibición de CRL por diferentes sustancias naturales, la mayoría de las cuales no habían sido analizadas sobre lipasas anteriormente, se muestran en la Tabla R.1.

En general, las saponinas fueron inhibidores muy activos, en especial la β -aescina y digitonina, que fueron las sustancias que causaron una mayor inhibición sobre CRL. La \square S produjo una inhibición menor que estas dos sustancias, mientras que el GA fue la saponina menos activa. Estos resultados fueron confirmados mediante el ensayo colorimétrico, y sugieren que el grado de inhibición sobre CRL producido por estos compuestos está relacionado con un mayor tamaño y ramificación de las cadenas glicosídicas laterales de estas saponinas.

Los flavonoides produjeron una inhibición menor que las saponinas (excepto el GA), siendo la (\pm)-catequina y el kaempferol los más activos. El mayor número y la disposición de los grupos hidroxilo de estos dos flavonoides, y en especial la existencia

del grupo hidroxilo situado en la posición 7 (anillo A), parecen ser los responsables de la mayor inhibición producida por estos dos compuestos.

Tabla R.1 Efecto de las sustancias naturales sobre CRL, evaluado mediante HPLC.

SUSTANCIA	S_{\max}^* (M□)	IC_{16}^+ (M□)	IC_{50}^\dagger (M□)
<i>I. Saponinas</i>			
β -Aescina	$4.0 \cdot 10^{-4}$	$7.5 \cdot 10^{-7}$	$8.0 \cdot 10^{-6}$
Ácido glicirrinico	$2.0 \cdot 10^{-3}$	$8.5 \cdot 10^{-4}$	$> S_{\max}$
Digitonina	$1.5 \cdot 10^{-4}$	$5.9 \cdot 10^{-6}$	$2.4 \cdot 10^{-5}$
Saponina de <i>Quillaja</i>	$1.4 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-4}$	$5.5 \cdot 10^{-4}$
<i>II. Flavonoides</i>			
3-hidroxi flavona	$1.5 \cdot 10^{-3}$	$1.1 \cdot 10^{-3}$	$> S_{\max}$
5-hidroxi flavona	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$4.5 \cdot 10^{-4}$	$> S_{\max}$
(\pm)-Catequina	$3.0 \cdot 10^{-2}$	$8.3 \cdot 10^{-4}$	$6.3 \cdot 10^{-3}$
Kaempferol	$1.4 \cdot 10^{-2}$	$2.8 \cdot 10^{-4}$	$7.5 \cdot 10^{-3}$
<i>III. Alcaloides</i>			
Aspidospermina	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$6.3 \cdot 10^{-4}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$
Fisostigmina	$3.8 \cdot 10^{-2}$		Inactiva
Papaverina	$2.0 \cdot 10^{-3}$		Inactiva
Pilocarpina	$1.0 \cdot 10^{-2}$		Inactiva
Raubasina	$1.2 \cdot 10^{-3}$		Inactiva
Rescinamina	$8.0 \cdot 10^{-4}$	$2.3 \cdot 10^{-6}$	$1.6 \cdot 10^{-4}$
Reserpina	$4.5 \cdot 10^{-4}$	$1.1 \cdot 10^{-4}$	$4.0 \cdot 10^{-4}$
Trigonellina	$5.0 \cdot 10^{-2}$	$6.8 \cdot 10^{-3}$	$2.0 \cdot 10^{-2}$

S_{\max}^* : Concentración máxima a la que se ensayó cada sustancia.

IC_{16}^+ y IC_{50}^\dagger : concentraciones (en molaridad) que produjeron una inhibición de CRL del 16% y del 50%, respectivamente. Fueron calculadas mediante regresiones con coeficientes $R^2 \geq 0,99$ obtenidas a partir de las correspondientes curvas de inhibición respecto a la concentración del compuesto ensayado.

Los alcaloides, el grupo de sustancias estructuralmente más heterogéneas, produjeron un grado de inhibición muy variable. Así, la rescinamina y la reserpina produjeron una inhibición cercana a la de las saponinas más activas, mientras que la aspidospermina y la trigonelina produjeron una inhibición menor. El resto de alcaloides analizados fueron prácticamente inactivos. La diferente inhibición producida por estos compuestos parece estar relacionada con su estructura, así como con sus características fisicoquímicas, en especial, con su hidrofobicidad.

En lo referente a la potencial aplicación clínica de estos compuestos, la β -aescina, la digitonina, la (\pm)-catequina y el kaempferol son candidatos muy prometedores para la prevención y el tratamiento de las enfermedades relacionadas con las lipasas ya que, además de ser de los inhibidores más potentes, tienen una baja toxicidad, producen otros efectos beneficiosos (Milgate & Roberts, 1995; Di Carlo *et al.*, 1999), y se encuentran presentes en plantas medicinales utilizadas actualmente en el tratamiento del acné (Higaki, 2003) y de la úlcera (Borrelli & Izzo, 2000). En cambio, la aplicabilidad de la rescinamina y la reserpina es menor debido a sus efectos secundarios (La Barre, 1960).

4 CONCLUSIONES

- I. Se ha analizado el efecto de varias saponinas, flavonoides y alcaloides sobre la lipasa *C. rugosa*.
- II. La β -aescina, la digitonina, la (\pm)-catequina y el kaempferol han sido seleccionados como los mejores candidatos para aplicaciones clínicas debido a la elevada inhibición que produjeron sobre la lipasa de *C. rugosa*, así como por sus otros efectos beneficiosos y su baja toxicidad.

CAPÍTULO 5:

Lipasas de *Propionibacterium acnes* y *Helicobacter pylori* : aislamiento, caracterización e inhibición por sustancias naturales

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Como se ha mencionado anteriormente, la lipasa de *P. acnes* está considerada como uno de los principales agentes etiológicos del acné debido a que los ácidos grasos que genera son altamente irritantes y favorecen la colonización por parte de este patógeno, entre otros efectos (Higaki, 2003). La actividad lipasa de *H. pylori* también parece ser un factor de virulencia importante para este patógeno debido a que su efecto sobre los lípidos de la mucosa gastrointestinal del huésped podría dañar la capa protectora del estómago y la membrana apical de las células subyacentes, así como generar lípidos proinflamatorios y citotóxicos (Tsang & Lam, 1999). Por ello, el presente capítulo está centrado en el estudio de estas lipasas y de su inhibición, siendo los objetivos concretos los siguientes:

1. Clonar, sobreexpresar y caracterizar la lipasa GehA de *P. acnes* P-37.
2. Aislar, clonar, purificar y caracterizar la(s) lipasa(s) de *H. pylori* 26695.
3. Analizar el efecto de los inhibidores de lipasas más potentes detectados en el Capítulo 4 sobre las lipasas GehA de *P. acnes* y HP0739 (EstV) de *H. pylori*.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

El gen *gehA* de *P. acnes* fue analizado informáticamente como se ha descrito en el Capítulo 1 para determinar las características bioquímicas y estructurales más importantes de la lipasa GehA. Posteriormente, este gen fue amplificado mediante PCR, ligado al plásmido pUC19 y transformado en *E. coli* XL1-Blue como está descrito (Sambrook *et al.*, 1989). La lipasa GehA fue finalmente obtenida mediante la preparación de extractos celulares del clon recombinante obtenido, utilizando cultivos de este clon en LB suplementado con sacarosa e IPTG, e incubados a baja temperatura, como está descrito (Miskin *et al.*, 1997).

En cambio, la obtención de la lipasa de *H. pylori* 26695 fue más compleja, ya que ninguna lipasa de *H. pylori* ha sido aislada, clonada o caracterizada previamente. Para ello se realizó un escrutinio del genoma y del hipotético proteoma de esta cepa (Tomb *et al.*, 1997) en busca de pautas abiertas de lectura similares a lipasas previamente descritas. Los candidatos seleccionados fueron posteriormente estudiados mediante análisis informático (ver Materiales y Métodos del Capítulo 1), siendo el gen *HP0739* escogido como el mejor candidato.

El gen *HP0739* fue posteriormente amplificado por PCR, ligado al plásmido pUC19 y transformado en *E. coli* DH5 α como está descrito (Sambrook *et al.*, 1989). El clon recombinante obtenido fue analizado sobre sustratos lipídicos mediante ensayos en placa y ensayos de fluorimetría (ver Capítulo 1). Una vez confirmada la actividad lipolítica de la enzima clonada, se procedió su purificación por FPLC (cromatografía líquida y rápida de proteínas). Para ello, extractos celulares del clon obtenido fueron separados en un AKTA FPLC (Amersham Biosciences) mediante 4 pasos: gel filtración, intercambio iónico, gel filtración e intercambio iónico.

Finalmente las lipasas GehA y *HP0739* fueron caracterizadas bioquímica y molecularmente como se ha descrito en el Capítulo 1, utilizando algunas modificaciones como el uso del nuevo microensayo colorimétrico (ver Capítulo 3) para los ensayos con derivados del *p*-nitrofenol. Este método también fue utilizado para analizar el efecto sobre estas lipasas de las saponinas, flavonoides y alcaloides que resultaron más activos sobre la lipasa de *C. rugosa* (ver Capítulo 4).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secuencia de aminoácidos de la lipasa GehA de *P. acnes*, una enzima perteneciente a la subfamilia I.7 de lipasas bacterianas (Jaeger & Eggert, 2002), fue analizada informáticamente, lo que reveló que se trata de una lipasa de 36 kDa y pI 6,59 con un péptido señal de 26 residuos cuyo corte genera una lipasa madura de 33 kDa, lo que concuerda con los resultados de Miskin *et al.* (1997). Además, este análisis reveló que la proteína GehA madura es una proteína globular de dominio único que muestra las características típicas de las lipasas: (1) alto contenido en residuos no polares pequeños, (2) plegamiento α/β formado en este caso por 8 láminas β y 9–11 hélices α , y (3) tríada catalítica formada por los residuos serina¹⁶⁹ (contenida dentro del pentapéptido GHS□G), ácido aspártico²⁶⁷ y histidina²⁹⁹, los tres localizados en sus posiciones prototípicas dentro del plegamiento de esta enzima.

Posteriormente, el gen *gehA* fue clonado y sobreexpresado, lo que nos permitió caracterizar la lipasa GehA. Esta enzima tuvo un comportamiento intermedio entre el de las lipasas “auténticas” y el de las carboxilesterasas, ya que mostró preferencia por sustratos de cadena media y cinéticas del tipo Michaelis-Menten, sin activación interfacial. La actividad máxima de GehA se obtuvo usando el *p*-nitrofenil caprato (C_{10:0}), aunque esta enzima fue también muy activa en un amplio rango de derivados de cadena corta y larga del *p*-nitrofenol y de la MUF, así como en aceite de oliva, tributirina y trioleína. Con respecto a las condiciones óptimas de actuación de GehA, esta produjo su máxima actividad a 37 °C y pH 7, aunque también fue muy activa a temperaturas desde los 20 °C a los 50 °C, y en un rango de pHs de 5 a 7,5. Además, la actividad de GehA se mantuvo estable durante más de un mes a 4 °C y pH 7. En general, el rango de sustratos y las condiciones óptimas de actuación de GehA están en concordancia con los descritos por otros autores (Pablo *et al.*, 1974; Ingham *et al.*, 1981), así como con la variabilidad de lípidos y las condiciones existentes en la piel humana (Downie *et al.*, 2004).

Cuando se analizó el efecto de diferentes cationes y otros agentes, GehA fue inhibida por los iones Ag⁺ (a 10 mM), Ba²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Ni²⁺ (a 10 mM) y Zn²⁺, así como por el EDTA y el SDS, mientras que los iones Ag⁺ (a 1 mM), Ca²⁺, Hg²⁺, Mg²⁺,

Ni^{2+} (a 1 mM) y Pb^{2+} activaron a esta enzima. El inhibidor de serina PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) fue inactivo sobre GehA, en concordancia con Fulton *et al.* (1974), mientras que el efecto del resto de modificadores de aminoácidos reveló la importancia de los residuos cisteína y tirosina para la actividad de esta lipasa. Por lo demás, la urea y el resto de sustancias analizadas fueron inactivas.

En lo referente *H. pylori*, el análisis del genoma y proteoma deducido de *H. pylori* 26695 reveló que la proteína hipotética HP0739, que previamente había sido asignada como una 2-hidroxi-6-oxohepta dienoato hidrolasa (Tomb *et al.*, 1997), mostraba una elevada homología con las lipasas bacterianas de la familia V (Arpigny & Jaeger, 1999). El análisis informático de su secuencia aminoacídica reveló que HP0739 es una proteína de 241 residuos sin péptido señal, que tiene un peso molecular de 27,5 kDa y un pI igual a 9. Este análisis también mostró que HP0739 tiene una estructura globular, compacta y con un solo dominio, y confirmó que esta proteína presenta las características típicas de las lipasas: (1) alto contenido en residuos no polares pequeños, (2) plegamiento α/β formado por 8 láminas β y 7 hélices α , y (3) tríada catalítica formada por los residuos serina⁹⁹ (contenida dentro del pentapéptido GHSPG), ácido aspártico¹⁹² y histidina²¹⁹, cuyas posiciones se corresponden con la localización prototípica de estos residuos dentro del plegamiento de la enzima, así como con las posiciones que presentan estos residuos en las lipasas de la familia V. Por tanto, esta proteína fue denominada EstV, y se procedió a la clonación del gen *estV* (HP0739), así como a la purificación y caracterización de la lipasa EstV.

La caracterización de EstV nos permitió confirmar el peso molecular de esta proteína, así como su actividad sobre sustratos lipídicos. EstV presentó el comportamiento típico de las carboxilesterasas, como está descrito para la mayoría de lipasas de la familia V (Arpigny & Jaeger, 1999), mostrando una preferencia muy marcada por sustratos de cadena corta y produciendo cinéticas del tipo Michaelis-Menten, sin activación interfacial. La actividad máxima de EstV se obtuvo sobre *p*-nitrofenil acetato, MUF-butirato y tributirina, mientras que esta enzima mostró una actividad muy baja sobre sustratos con longitud de cadena igual o superior a 8 átomos de carbono.

Las condiciones óptimas de actuación de EstV fueron 55 °C y pH 10, aunque la enzima también mostró una elevada actividad a temperaturas desde los 45 °C hasta los 60 °C, y a pH 6 y 9–9,5, así como una actividad moderada a 37 °C y pH 7. Además, EstV fue estable a pH 7 y a pH 10 durante más de un mes, cuando fue mantenida a 4 °C.

En general, estos resultados sugieren que EstV podría ser la responsable de la actividad carboxilesterasa de *H. pylori* detectada por Mendz *et al.* (1993), pero no la principal responsable de la actividad lipolítica descrita por Slomiany *et al.* (1989a).

El efecto de los inhibidores de aminoácidos analizados sobre EstV reveló que los residuos serina, pero no los residuos cisteína o tirosina, son importantes para la actividad de esta enzima. Además, se analizó el efecto sobre esta lipasa de diferentes cationes y agentes, lo que reveló que los iones Ag^+ , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} , así como el EDTA, el SDS y la urea inhiben a EstV, mientras que los iones Ba^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} activan a esta enzima. El resto de compuestos analizados fueron inactivos.

Finalmente, se analizó el efecto sobre GehA y EstV de las sustancias naturales seleccionadas en el Capítulo 4 por la elevada inhibición que producen sobre CRL: (1) saponinas: β -aescina, digitonina, ácido glicirrinico (GA) y saponina de *Quillaja* (\square S), (2) flavonoides: (\pm)-catequina y kaempferol, y (3) alcaloides: rescinamina y reserpina. En general, el efecto de estas sustancias sobre las tres lipasas fue bastante distinto, excepto en el caso del GA (Figura R.6), lo que probablemente está relacionado con las características de estos compuestos naturales, así como con las diferencias estructurales y bioquímicas existentes entre estas tres lipasas.

GehA fue fuertemente inhibida por la (\pm)-catequina y el kaempferol, y fue moderadamente inhibida por la digitonina y el GA, mientras que el resto de sustancias fueron prácticamente inactivas sobre esta lipasa. Esta inhibición, junto con los otros efectos antiacné (Higaki, 2003) y la baja toxicidad (Milgate & Roberts, 1995; Di Carlo *et al.*, 1999) de estas sustancias, hace de estos inhibidores candidatos muy prometedores para el tratamiento del acné y otras enfermedades relacionadas con *P. acnes*.

Por su parte, EstV resultó fuertemente inhibida por la reserpina, mientras que fue moderadamente inhibida por la β -aescina y el GA. Por contra, la (\pm)-catequina y el kaempferol produjeron una fuerte activación de esta lipasa, mientras que el resto de

sustancias naturales fueron prácticamente inactivas sobre esta enzima. No obstante, la aplicabilidad clínica de la reserpina es baja, sobretodo en el tratamiento de la úlcera, debido a sus efectos secundarios (La Barre, 1960). En cambio, la β -aescina y el GA sí que podrían resultar de interés en el tratamiento de la úlcera y otras enfermedades relacionadas con *H. pylori* debido a que, además de su actividad antilipasa, presentan un amplio rango de efectos antiúlcera (Borrelli & Izzo, 2000), así como una baja toxicidad (Milgate & Roberts, 1995; Sirtori, 2001).

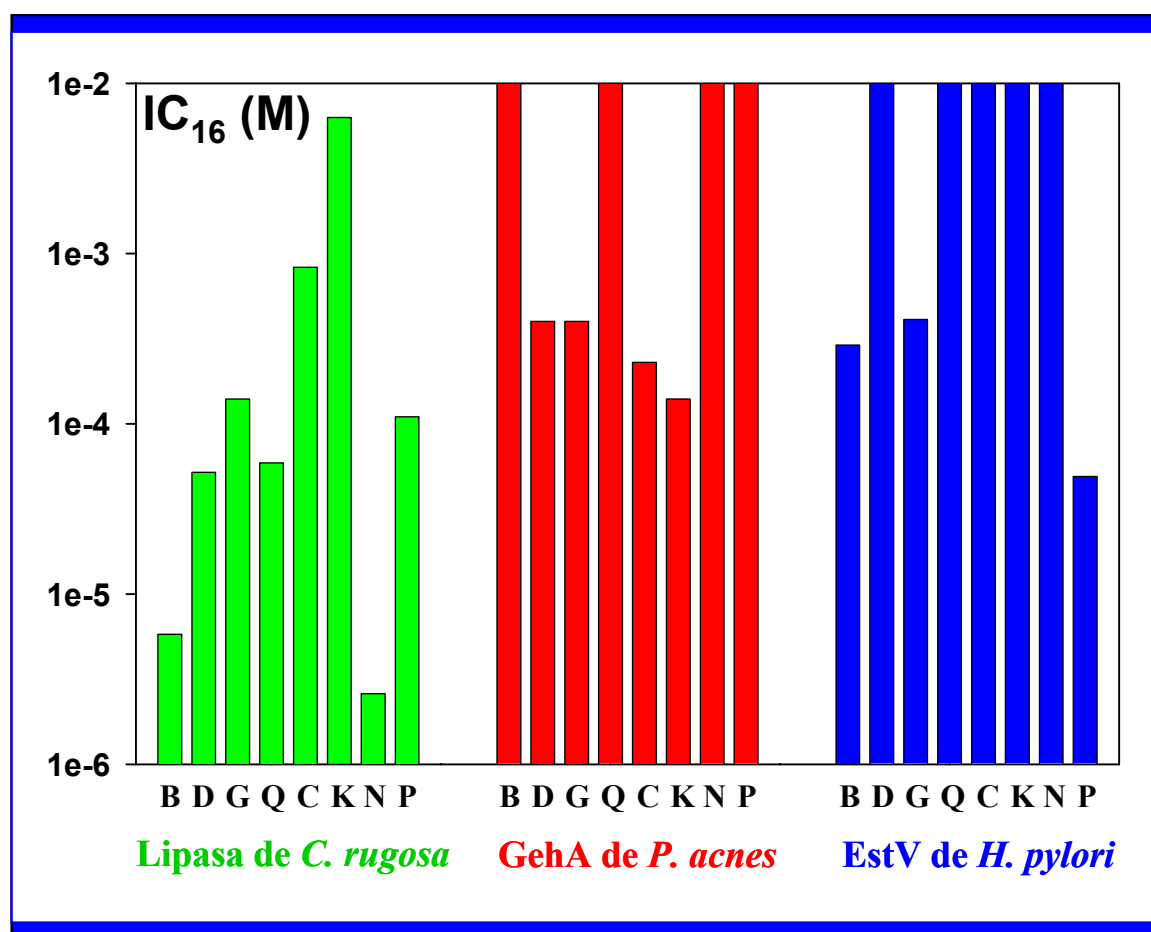


Figura R.6 Comparación de la inhibición causada por sustancias naturales sobre CRL, GehA y EstV.

Se compararon las concentraciones de diferentes sustancias naturales que producen un 16% de inhibición (IC₁₆, en molaridad) sobre CRL (verde), GehA (rojo) y EstV (azul), ya que la concentración que produce una inhibición del 50% (IC₅₀) no fue alcanzada en muchas de estas sustancias. Abreviaturas: B, β -aescina; D, digitonina, G, ácido glicirrinico; □, saponina de *Quillaja*; C, (\pm)-catequina; K, kaempferol; N, rescinamina; P, reserpina. Las sustancias inactivas se muestran como barras que alcanzan la parte superior del gráfico.

4 CONCLUSIONES

- I. Se ha clonado, sobreexpresado y caracterizado la lipasa GehA de *P. acnes* P-37.
- II. EstV (HP0739), una carboxilesterasa la familia V de lipasas bacterianas que fue identificada mediante el análisis del genoma y el proteoma de *H. pylori* 26695, es la primera lipasa de *H. pylori* que ha sido clonada, purificada y caracterizada.
- III. El análisis del efecto de diversas sustancias naturales sobre GehA y EstV ha revelado que: (1) el ácido glicirrinico, la (\pm)-catequina y el kaempferol inhiben a GehA, y (2) la β -aescina, el ácido glicirrinico y la reserpina inhiben a EstV.
- IV. Los inhibidores anteriormente mencionados son candidatos muy prometedores para el tratamiento de enfermedades como el acné y la úlcera debido a su actividad antilipasa, así como por sus otros efectos antiacné o antiúlcera y su baja toxicidad.

CONCLUSIONES GENERALES

Dos conclusiones generales se pueden extraer tras el análisis de los resultados obtenidos en los diferentes capítulos de los que consta esta tesis.

Por un lado, las similitudes entre los sistemas lipolíticos de las cepas del género *Bacillus* y otros géneros afines encontradas durante el presente trabajo y en otros trabajos anteriores, sí como las diferencias existentes en la estructura, propiedades bioquímicas y regulación de estas enzimas (Moeller *et al.*, 1991; Dartois *et al.*, 1992; Zock *et al.*, 1994; Eggert *et al.*, 2000, 2001 y 2003; Prim *et al.*, 2000 y 2001; Nthangeni *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002; Capítulos 1, 2 y 3) parecen indicar que:

- *B. subtilis* y otras cepas de *Bacillus* y de géneros afines comparten un sistema lipolítico bastante conservado que está formado por una o más carboxilesterasas intracelulares o unidas a membrana y, al menos, dos enzimas lipolíticas secretadas. Este sistema lipolítico estaría implicado en la regulación de la composición de la membrana celular, en detoxificación de biocidas y en el aprovechamiento de fuentes de carbono, por lo que sería un factor importante para la adaptación de estos microorganismos a diferentes ambientes ricos en nutrientes.

Por otro lado, las diferencias obtenidas en los ensayos de inhibición al utilizar diferentes métodos y diferentes mezclas de reacción, así como las similitudes y diferencias obtenidas al analizar el efecto de diferentes compuestos sobre una misma lipasa, y al analizar el efecto de una misma sustancia sobre diferentes lipasas, especialmente cuando estas pertenecen a familias distintas (Capítulos 1, 3, 4 y 5), nos permiten concluir que:

- Las lipasas modelo son una buena herramienta para el escrutinio de los inhibidores de lipasas, aunque los resultados obtenidos deben ser considerados con precaución ya que la inhibición de las lipasas depende del método y las condiciones de reacción utilizadas, de la estructura y las propiedades fisicoquímicas de los compuestos ensayados, así como de las características estructurales y bioquímicas de las lipasas analizadas.