



Universidad Nacional Autónoma De México
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas

*“Estudios fisicoquímicos y estructurales de la
ácido linoleico isomerasa de lactobacillus plantarum”*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. JOANA ORTEGA ANAYA

TUTOR
DRA. ALEJANDRA HERNÁNDEZ SANTOYO
Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, UNAM

México, D.F. Enero de 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIOS FISICOQUÍMICOS Y ESTRUCTURALES DE LA
ÁCIDO LINOLEICO ISOMERASA DE *Lactobacillus plantarum*

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. JOANA ORTEGA ANAYA

Dra. ALEJANDRA HERNÁNDEZ SANTOYO
Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, UNAM



México, D.F. Enero de 2016

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado la oportunidad de tener una formación profesional y académica de excelencia y por formarme no solo como profesional sino como ser humano, con el orgullo de ser mujer, mexicana y universitaria.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM por la oportunidad de llevar a cabo mis estudios de posgrado.

A mi tutora, la Dra. Alejandra Hernández Santoyo por la confianza, por apoyarme y permitirme desarrollar este proyecto a partir de una idea.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado a través del programa de becas para estudios doctorales (No. de registro CVU: 271399, No. de becario: 223477).

Este proyecto se realizó gracias al apoyo económico brindado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) mediante el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el No. de Apoyo: IN207013.

Agradezco también a los sinodales: la Dra. Amelia Farrés González-Saravia, la Dra. Marietta Tuena Sangri, el Dr. Enrique García Hernández, el Dr. Andrés Hernández Arana y la Dra. Karina Martínez Mayorga, por la revisión de esta tesis y por el tiempo invertido en las observaciones y comentarios que ayudaron a mejorar este manuscrito.

Un especial agradecimiento a la M. en C. L. del Carmen Márquez Alonso, la M. en C. Lucero M. Ríos Ruiz y a la Q. Eréndira García Ríos del Laboratorio de Cromatografía de Gases del Instituto de Química de la UNAM, por todo el trabajo y el tiempo invertido en la estandarización de las actividades enzimáticas.

A la Q.F.B. Ma. Concepción José Núñez, Técnico Académico del Laboratorio de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por su gran apoyo en el fraccionamiento de los extractos proteicos celulares.

A la Q.F.B. Ma. del Rocío Patiño Maya del Laboratorio de Espectroscopía y Polarimetría del Instituto de Química de la UNAM por permitirme usar constantemente el equipo de dicroísmo circular.

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la UNAM y los resultados se presentaron en los siguientes congresos:

- XXIX Congreso Nacional de Bioquímica de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Noviembre de 2012, Ciudad de Oaxaca, Oaxaca, México.
- 4to. Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. 3rd USA-Mexico Workshop on Biological Chemistry: Protein Folding, Dynamics and Function. Noviembre de 2013, Ciudad de Guanajuato, Guanajuato, México.
- 49° Congreso Mexicano de Química de la Sociedad Química de México. Septiembre de 2014, Ciudad de Mérida, Yucatán, México.
- Macromolecular Crystallography School – CCP4 – 2015. Abril de 2015, Ciudad de Montevideo, Uruguay.
- QuimiUNAM de 2013 y 2014

Del proyecto de investigación se desprende el siguiente artículo publicado:

Ortega-Anaya, J. and Hernández-Santoyo, A. (2015). Functional characterization of fatty acid double bond hydratase from *Lactobacillus plantarum* and its interaction with synthetic membranes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1848, 3166-3174.

[doi:10.1016/j.bbamem.2015.09.014](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.09.014)

ÍNDICE

	Página
ABSTRACT	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
1. MARCO TEÓRICO	7
1.1. Efectos fisiológicos del ácido linoleico conjugado benéficos para el humano	7
1.1.1. Efecto anticarcinógeno	8
1.1.2. Efecto en la composición corporal	8
1.1.3. Efecto en alteraciones cardiovasculares	9
1.2. Fuentes alimentarias del ácido linoleico conjugado	10
1.3. Producción industrial de ácido linoleico conjugado	12
1.3.1. Métodos químicos	13
1.3.1.1. <i>Isomerización alcalina del ácido linoleico</i>	13
1.3.1.2. <i>Hidrogenación selectiva del ácido linoleico</i>	14
1.3.1.3. <i>Deshidratación de ricinoleato de metilo</i>	16
1.3.2. Métodos biotecnológicos	17
2. ANTECEDENTES	20
2.1. Generalidades de <i>Lactobacillus plantarum</i>	20
2.2. Biohidrogenación del ácido linoleico en <i>Lactobacillus</i>	21
2.3. Ácido linoleico hidratatasas	23
2.3.1. Hidratasa de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	24
2.3.2. Hidratasa de <i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	26

Página

2.4. Ácido linoleico isomerasas	29
2.4.1. Isomerasa de <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	29
2.4.2. Isomerasa de <i>Propionibacterium acnes</i>	30
2.4.3. Isomerasa de <i>Clostridium sporogenes</i>	34
3. OBJETIVOS	35
4. METODOLOGÍA	36
4.1. Métodos generales	36
4.1.1. Crecimiento celular	36
4.1.2. Obtención de extractos proteicos	37
4.1.3. Determinación de proteína total por reacción con ácido bicinconínico (BCA)	37
4.1.4. Espectroscopía de dicroísmo circular	38
4.1.5. Fluorimetría diferencial de barrido (DSF) o ensayos de termofluorescencia	39
4.1.6. Generación de modelos estructurales y acoplamiento molecular	49
4.2. Métodos utilizados para el estudio de la hidratasa de <i>Lactobacillus plantarum</i>	41
4.2.1. Purificación de la proteína nativa	41
4.2.2. Determinación del estado oligomérico en solución	41
4.2.3. Prueba de actividad de ácido linoleico hidratasa	42
4.2.4. Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases	42
4.2.5. Purificación del ácido 10-hidroxi-12- <i>cis</i> -octadecenoico	43
4.2.6. Determinación de la concentración óptima de FAD	43
4.2.7. Reconstitución de la proteína en proteoliposomas con marcaje fluorescente dual	44
4.2.8. Microscopía confocal de fluorescencia	46

4.3. Métodos utilizados para el estudio de la deshidratasa de <i>Lactobacillus plantarum</i>	47
4.3.1. Purificación de la proteína nativa	47
4.3.2. Análisis de la secuencia de aminoácidos	47
4.3.3. Especificidad de sustrato y prueba de actividad de deshidratasa	48
4.3.4. Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases	49
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
5.1. Estudios de la ácido linoleico hidratasa de <i>Lactobacillus plantarum</i>	50
5.1.1. Purificación	50
5.1.2. Actividad enzimática y análisis del producto de reacción	53
5.1.3. Determinación de la concentración óptima de FAD	56
5.1.4. Efecto del pH en la estabilidad y actividad	57
5.1.5. Efecto de aditivos en la estabilidad	60
5.1.6. Construcción del modelo estructural	61
5.1.7. Análisis estructural del sitio de unión a FAD	65
5.1.8. Análisis estructural de los sitios de unión al sustrato	66
5.1.8.1. Sitio 1: unión a ácido linoleico	67
5.1.8.2. Sitio 2: sitio catalítico	68
5.1.9. Determinación de la interacción de la hidratasa con membranas sintéticas	71
5.2. Estudios de la ácido linoleico deshidratasa de <i>Lactobacillus plantarum</i>	76
5.2.1. Purificación	76
5.2.2. Análisis de la secuencia de aminoácidos y cálculo de la masa molecular	78
5.2.3. Actividad enzimática y determinación de especificidad de sustrato	79

5.2.4. Efecto del pH en la estabilidad y actividad	81
5.2.5. Efecto de aditivos en la estabilidad y actividad	85
5.2.6. Construcción de un modelo estructural	86
5.2.7. Análisis estructural de los sitios de unión a sustrato y producto	87
5.2.7.1. Sitio 1: unión al ácido 10-hidroxi-12-cis-octadecenoico	88
5.2.7.2. Sitio 2: unión al ácido 9-cis-11-trans-octadecadienoico	89
6. CONCLUSIONES	93
REFERENCIAS	96
ANEXOS	102
Anexo 1: Composición del kit de aditivos	102
Anexo 2: Composición del kit de pH	105
Anexo 3: “Functional characterization of a fatty acid double-bond hydratase from <i>Lactobacillus plantarum</i> and their interaction with biosynthetic membranes”.	106
Anexo 4: “Production of bioactive conjugated linoleic acid by the multifunctional enolase from <i>Lactobacillus plantarum</i>”	107

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ácido linoleico y los isómeros bioactivos del ácido linoleico conjugado	7
Figura 2. Biohidrogenación del ácido linoleico en rumen de mamíferos bovinos y vacunos	10
Figura 3. Estructura de la hidratasa de <i>L. acidophilus</i>	24
Figura 4. Estructura de la hidratasa de <i>E. meningoseptica</i>	27
Figura 5. Estructura de la isomerasa de <i>P. acnes</i>	31
Figura 6. Crecimiento celular de <i>L. plantarum</i> adaptado a un medio enriquecido con ácido linoleico	36
Figura 7. Curvas patrón utilizadas en la determinación de proteína total	38
Figura 8. Preparación de liposomas	45
Figura 9. Estructura de β -BODIPY FL C ₅ -HPC y Rodamina B	46
Figura 10. Purificación de la hidratasa de <i>L. plantarum</i> por cromatografía de exclusión molecular	51
Figura 11. Caracterización de la masa molecular de la hidratasa de <i>L. plantarum</i>	52
Figura 12. Caracterización del estado oligomérico de la hidratasa de <i>L. plantarum</i> en solución	53
Figura 13. Purificación de los productos de hidratación del ácido linoleico por cromatografía líquida en fase reversa	54
Figura 14. Identificación del ácido 10-hidroxi-12- <i>cis</i> -octadecenoico por espectrometría de masas	55
Figura 15. Cromatograma de los productos de reacción enzimática de la hidratación del ácido linoleico	55
Figura 16. Efecto de la concentración de FAD sobre la actividad de la hidratasa de <i>L. plantarum</i>	56
Figura 17. Efecto del pH en la actividad enzimática de la hidratasa de <i>L. plantarum</i>	57
Figura 18. Efecto del pH y sales amortiguadoras en la termoestabilidad de la hidratasa de <i>L. plantarum</i>	59

	Página
Figura 19. Efecto de aditivos en la termoestabilidad de la hidratasa de <i>L. plantarum</i>	61
Figura 20. Estructura propuesta de la hidratasa de <i>L. plantarum</i>	62
Figura 21. Comparación estructural de las hidratasas de <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> y <i>E. meningoseptica</i>	63
Figura 22. Alineamiento de la estructura primaria de las hidratasas de <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>M. caseoyticus</i> , <i>B. breve</i> y <i>E. meningoseptica</i>	64
Figura 23. Identificación del sitio de unión de FAD en la hidratasa de <i>L. plantarum</i>	66
Figura 24. Arquitectura propuesta de los sitios de unión y catálisis de la hidratasa de <i>L. plantarum</i> con ácido linoleico	67
Figura 25. Descripción estructural del sitio de unión 1	68
Figura 26. Descripción estructural del sitio de unión 2 o sitio catalítico	69
Figura 27. Comparación estructural de los sitios catalíticos de las hidratasas de <i>L. plantarum</i> , <i>E. meningoseptica</i> y la isomerasa de <i>P. acnés</i>	70
Figura 28. Análisis de proteoliposomas por microscopía confocal de fluorescencia	73
Figura 29. Potencial de superficie de la hidratasa de <i>L. plantarum</i>	74
Figura 30. Análisis del efecto de la reconstitución de la hidratasa de <i>L. plantarum</i> en proteoliposomas	75
Figura 31. Purificación de la deshidratasa de <i>L. plantarum</i> por cromatografía de intercambio aniónico	77
Figura 32. Análisis electroforético de la deshidratasa de <i>L. plantarum</i>	78
Figura 33. Secuencia de aminoácidos de la deshidratasa de <i>L. plantarum</i>	78
Figura 34. Cromatograma de los productos de reacción enzimática de la deshidratación e isomerización del ácido 10-hidroxi-12- <i>cis</i> -octadecenoico	79
Figura 35. Efecto del pH sobre la actividad de la deshidratasa de <i>L. plantarum</i>	82
Figura 36. Efecto del pH y sales amortiguadoras en la termoestabilidad de la deshidratasa de <i>L. plantarum</i>	84
Figura 37. Efecto de aditivos en la termoestabilidad de la deshidratasa de <i>L. plantarum</i>	85

	Página
Figura 38. Efecto de aditivos en la actividad de la deshidratasa de <i>L. plantarum</i>	86
Figura 39. Estructura propuesta de la deshidratasa de <i>L. plantarum</i>	87
Figura 40. Descripción estructural del sitio 1 o de unión al ácido 10-hidroxi-12- <i>cis</i> -octadecenoico	88
Figura 41. Descripción estructural del sitio 2 o de unión al ácido 9- <i>cis</i> -11- <i>trans</i> -octadecadienoico	89
Figura 43. Superficie del canal de la deshidratasa de <i>L. plantarum</i>	91
Figura 44. Esquematización de la producción del isómero bioactivo 9- <i>cis</i> -11- <i>trans</i> -ALC a partir de ácido linoleico catalizado por el sistema enzimático hidratasa – deshidratasa/isomerasa de <i>L. plantarum</i> .	94

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1. Isomerización alcalina del ácido linoleico	14
Esquema 2. Hidrogenación selectiva del ácido linoleico en nanopartículas de Ag/SiO ₂	15
Esquema 3. Producción de 9-cis-11-trans-ALC a partir de ácido ricinoleico	17
Esquema 4. Biohidrogenación del ácido linoleico en <i>L. plantarum</i>	22
Esquema 5. Mecanismo de reacción de la hidratación del ácido oleico catalizado por la hidratasa de <i>E. meningoseptica</i>	28
Esquema 6: Mecanismo de reacción de la isomerización del ácido linoleico catalizada por la isomerasa de <i>B. fibrisolvens</i>	30
Esquema 7. Mecanismo de reacción de la isomerización del ácido linoleico catalizada por la isomerasa de <i>P. acnes</i>	32
Esquema 8. Hidratación del ácido linoleico catalizada por la hidratasa de <i>L. plantarum</i>	54
Esquema 9. Deshidratación e isomerización concertada del ácido 10-hidroxi-12-cis-octadecenoico catalizada por la deshidratasa de <i>L. plantarum</i>	81

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Contenido de ácido linoleico conjugado en alimentos que son fuentes naturales	11
Tabla 2. Producción de ácido linoleico conjugado en diferentes microorganismos con ácido linoleico como sustrato	19
Tabla 3. Rendimientos de purificación de la hidratasa de <i>L. plantarum</i>	52
Tabla 4. Rendimientos de purificación de la deshidratasa de <i>L. plantarum</i>	77
Tabla 5. Especificidad por sustrato de la deshidratasa de <i>L. plantarum</i>	80

LISTA DE ABREVIATURAS

10-HOE: ácido 10-hidroxi-12-*cis*-octadecenoico (o ácido 10-hidroxi-oleico)

10-HSE: ácido 10-hidroxi-octadecanoico (o ácido 10-hidroxi-esteárico)

AE: ácido esteárico

AL: ácido linoleico

ALC: ácido linoleico conjugado

ALn: ácido linolénico

AO: ácido oleico

AR: ácido ricinoleico

BAL: bacterias lácticas

BBH: hidratasa de *Bifidobacterium breve*

BFI: isomerasa de *Butyrivibrio fibrisolvens*

CSI: isomerasa de *Clostridium sporogenes*

DDR: dosis diaria recomendada

DMPC: 1,2-di-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

DTT: ditiotreitol (o 1,4-disulfanil-butano-2,3-diol)

EMH: hidratasa de *Elizabethkingia meningoseptica*

FAD: di nucleótido flavin-adenina (siglas en inglés)

ICR: Región de control de impronta (siglas en inglés)

LAH: hidratasa de *Lactobacillus acidophilus*

LPD: deshidratasa / isomerasa de *Lactobacillus plantarum*

LP Eno: α -enolasa de *Lactobacillus plantarum*

LPH: hidratasa de *Lactobacillus plantarum*

MCH: hidratasa de *Macrococcus caseolyticus*

MCRA: antígeno de reacción cruzada con miosina (siglas en inglés)

MES: ácido 2-(N-morfolino)-etan-sulfónico (siglas en inglés)

MS/MS: espectrometría de masas en tándem (siglas en inglés)

OTGP: n-octil- β -D-tio-glucopiranosido

PAI: isomerasa de *Propionibacterium acnes*

PDB: banco de datos de proteínas (siglas en inglés) www.rcsb.org

PMSF: fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (siglas en inglés)

POPC: 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina

SPH: hidratasa de *Streptococcus pyogenes*

T_m: Temperatura de fusión

ABSTRACT

Biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids in *Lactobacillus* bacteria is a very intricate enzymatic process that converts multiple double-bonds into single-bonds in order to eliminate the toxic effects of fatty acids, such as linoleic acid, on the bacterial cells. However, this detoxifying metabolism in *Lactobacillus* is of human interest since some bioactive molecules are excreted and proven to have beneficial effects in human health. 10-hydroxy-12-*cis*-octadecenoic acid and isomer 9-*cis*-11-*trans* of conjugated linoleic acid were found to have industrial applications as well as a role in decreasing tumor metabolism and mediate adipocyte activity in order to reduce the accumulation of lipids.

In this work, we studied two proteins implicated in the early steps of biohydrogenation of linoleic acid in *Lactobacillus plantarum*: a hydratase that binds linoleic acid at the surface of the cell converting it to 10-hydroxy-12-*cis*-octadecenoic and a dehydratase / isomerase that takes the latter fatty acid producing bioactive 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienoic acid.

Hydratase was found to be a homotrimeric 64.7 kDa protein that was isolated from the membrane-bound fraction of cells. Thermostability assays were conducted to obtain optimal parameters (pH values, additives) for protein stability and enzymatic activity. Through reconstitution into fluorescent proteoliposomes, we determined that hydratase is an extrinsic-membrane protein interacting with the polar heads of phospholipids over electrostatic interaction; hence, the enzymatic reaction occurs at the periphery of the cell. Additionally the structural model was constructed by homology modeling in order to identify the putative binding sites with linoleic acid: site 1 was located in an external hydrophobic pocket at the C-terminus of the protein and site 2 was located at the core and in contact with a FAD molecule. Interestingly, it was found that the linoleic acid molecule arranges around a methionine residue in both sites (Met154 and Met81, respectively) that acts as a rigid pole, thus playing a key role in binding the substrate.

The protein found to exert the concerted dehydration and isomerization reaction of 10-hydroxy-12-*cis*-octadecenoic acid was surprisingly identified as the α -enolase, a multifunctional-anchorless-surface protein belonging to the conserved family of enolases with a central role in glycolytic metabolism. The identity of the protein was confirmed through mass spectrometric analysis that showed the characteristic 442 amino acid sequence with a molecular mass of 48.03 kDa. Through substrate analysis we found that the enzyme is not capable of using linoleic acid directly but instead uses the hydroxyl derivative produced by the hydratase. Biochemical

optimization studies were carried out to elucidate the conditions for maximum production of 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienoic acid and maximum stability of α -enolase when catalyzing this reaction. Furthermore, through structural analysis of the protein, we propose the binding sites of substrate and product molecules that were characterized as two hydrophobic superficial pockets located at opposite ends of the protein connected through a channel where the catalysis of dehydration and isomerization might occur. These results prove that multifunctional α -enolase also plays a role in cell detoxification from polyunsaturated fatty acids such as linoleic acid.

RESUMEN

En este trabajo se realizó por primera vez la caracterización bioquímica, fisicoquímica y estructural de dos proteínas involucradas en la formación del isómero bioactivo 9-*cis*-11-*trans* del ácido linoleico conjugado a partir de ácido linoleico. Dichas enzimas se aislaron a partir de células de *Lactobacillus plantarum* y de forma independiente, cada una cataliza una reacción diferente, sin embargo, juntas actúan como un sistema acoplado en donde el producto de una constituye el sustrato de la otra.

La hidratasa (denominada como **LPH**), es una flavoenzima aislada de la fracción proteica membranal y estabilizada en solución con el tensoactivo neutro n-octil- β -D-tioglicopiranosido. Tiene una masa molecular de 64.7 kDa y cataliza inicialmente la hidratación del ácido linoleico produciendo ácido 10-hidroxi-12-*cis*-octadecenoico. Esta proteína presentó estabilidad térmica y actividad enzimática máxima a valores de pH entre 6.5 y 7.0, así como preferencia por MgCl₂, (NH₄)₂SO₄, n-dodecil- β -D-maltósido, polietilén glicol 400 y etanol como aditivos termoestabilizantes. En este trabajo se encontró que la hidratasa se encuentra asociada a membranas sintéticas de POPC:DMPC, de forma extrínseca sin modificaciones en la estructura secundaria, así que se plantea que la actividad enzimática ocurre en la periferia de membranas plasmáticas en la célula nativa, lo cual representa una ubicación ventajosa en cuanto a la captación y unión inicial del ácido linoleico, el cual constituye un factor tóxico, evitando así que llegue a la membrana celular previniendo los efectos adversos para *Lactobacillus plantarum*. Mediante el análisis de la estructura tridimensional obtenido mediante modelado por homología, se identificaron tanto el sitio de unión ubicado en una cavidad hidrofóbica en la superficie de la proteína, como el sitio de catálisis que se localiza en el centro de la proteína en contacto con el anillo de riboflavina de la molécula de FAD, el cual guarda gran similitud con el sitio catalítico de las únicas dos estructuras de hidratatas reportadas en bacterias: *Lactobacillus acidophilus* y *Elizabethkingina meningoseptica*.

La deshidratasa (denominada como **LPD**) es la segunda proteína identificada en este trabajo y fue aislada de la fracción proteica soluble. Mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos se encontró que es una proteína de 48.0 kDa perteneciente a la familia de las α enolasas, las cuáles son conocidas de forma clásica como enzimas con un rol central en los procesos glucolíticos. En este trabajo se demostró experimentalmente que LPD cataliza la deshidratación / isomerización del hidroxiaácido producido por LPH formando finalmente el ácido 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienoico, que es el principal isómero bioactivo del ácido linoleico

conjugado. Se identificó también que esta proteína produce dicho isómero bioactivo a partir de ácido linoleico con bajos rendimientos, únicamente en presencia de LPH, mientras que cuando el sustrato es directamente el ácido 10-hidroxi-12-*cis*-octadecenoico, no requiere de ningún componente adicional para producir ácido linoleico conjugado con altos rendimientos. Esta actividad enzimática tiene valores máximos a pH desde 7.0 hasta 9.0 y en presencia de MgCl₂, n-dodecil-β-D-maltósido, glicerol y acetonitrilo como aditivos. También se encontró que la proteína presenta aumento de la termoestabilidad en amortiguadores de glicina desde pH 8.6 hasta 11.0. Mediante el análisis del modelo estructural de la proteína, se identificaron los sitios de unión a sustrato y producto los cuales se localizaron en cavidades hidrofóbicas expuestas al disolvente en extremos opuestos de la estructura conectados por un canal a través del cual probablemente ocurre la catálisis enzimática. Estos resultados plantean por primera vez la participación de una enzima glucolítica localizada en la superficie celular como una enzima accesoria con actividad multifuncional, en el proceso de biohidrogenación del ácido linoleico en bacterias del género *Lactobacillus*.

De esta forma, se aporta información acerca del mecanismo por el que *Lactobacillus plantarum*, una bacteria probiótica, metaboliza ácidos grasos polinsaturados como el ácido linoleico por medio del proceso de biohidrogenación, para así evitar los efectos adversos como el deterioro de las membranas celulares y la inhibición de ácidos grasos biosintetizados naturalmente por la célula.

La producción biotecnológica de isómeros bioactivos del ácido linoleico conjugado, posee ventajas sobre la producción industrial que utiliza métodos químicos, entre ellos la selectividad hacia la producción única de 9-*cis*-11-*trans*-ALC, mientras que por otros métodos se obtiene una mezcla isomérica con actividad biológica no evaluada, además de ser procesos generadores de residuos potencialmente tóxicos para la salud humana y el ambiente.

INTRODUCCIÓN

El ácido linoleico conjugado comprende un grupo de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico que presentan dobles enlaces conjugados a lo largo de la cadena hidrocarbonada. En total es posible la existencia de 54 isómeros, pero se han identificado y reportado diversas actividades biológicas benéficas para el humano en dos isómeros únicamente: el ácido 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienoico y el ácido 10-*trans*-12-*cis*-octadecadienoico. Entre los efectos que ejercen se encuentran el retraso de la arterosclerosis por efecto hipocolesterolémico, aumento en la capacidad de respuesta inmune, reducción de carcinogénesis (anticancerígeno y supresor del crecimiento de ciertos tumores), disminución del tejido graso por un menor almacenamiento lipídico en adipocitos, antioxidación celular y efectos favorables en la prevención y tratamiento de ciertas alergias [1-5]. De manera natural, los isómeros bioactivos del ácido linoleico conjugado se encuentran principalmente en grasa de rumiantes y sus derivados lácteos y cárnicos pero a muy bajas concentraciones, así que actualmente se buscan métodos para su obtención selectiva y aprovechar sus beneficios nutracéuticos en la dieta humana.

La bioisomerización catalizada enzimáticamente por ácido linoleico isomerasas se refiere al proceso por el cual un microorganismo produce uno o varios isómeros bioactivos del ácido linoleico conjugado a partir de ácido linoleico. Esta actividad enzimática está dada por sistemas proteicos diferentes en cada género bacteriano y se conoce poco al respecto, sin embargo se ha probado actividad de ácido linoleico isomerasa en una gran variedad de bacterias, entre los que se encuentran géneros como *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* y *Weissella* [6]. En las bacterias lácticas del género *Lactobacillus* se conoce recientemente que la formación del isómero bioactivo 9-*cis*-11-*trans* ocurre debido a la activación de un proceso de desintoxicación denominado biohidrogenación de ácidos grasos polinsaturados, el cual es un proceso complejo que ocurre en varios pasos y es catalizado por múltiples enzimas de las cuales se conoce muy poco.

En este trabajo se estudiaron dos proteínas denominadas como hidratasa (LPH), aislada de la fracción proteica membranal, y deshidratasa / isomerasa (LPD), aislada de la fracción de proteínas solubles, las cuales catalizan la hidratación y deshidratación / isomerización del ácido linoleico respectivamente, produciendo el isómero bioactivo 9-*cis*-11-*trans* del ácido linoleico conjugado con rendimientos que compiten con los obtenidos por

métodos de síntesis orgánica como la isomerización alcalina del ácido linoleico. Dichas proteínas fueron caracterizadas bioquímicamente reportando por primera vez parámetros óptimos de estabilidad y actividad enzimática, así como un análisis estructural en donde se identifican los sitios de unión de sustrato y/o catálisis de ambas proteínas. Estos resultados brindan información a nivel atómico en cuanto al modo de acción en el que ocurre la isomerización de ácidos grasos polinsaturados en *Lactobacillus plantarum*, así como la participación de dichas enzimas en el proceso de biohidrogenación.

1. MARCO TEÓRICO

El ácido linoleico conjugado (ALC) se refiere al grupo de isómeros del ácido linoleico (AL, ácido 9-*cis*-12-*cis*-octadecadienoico) cuyos pares de dobles enlaces se encuentran conjugados. Estos pares de dobles enlaces pueden posicionarse a lo largo de la cadena hidrocarbonada y geoméricamente pueden tener configuración *cis* o *trans* [7] haciendo posible la existencia de 54 isómeros de ALC. El interés en el estudio de ALC se centra en dos isómeros: el ácido 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienoico (o ácido ruménico) y el ácido 10-*trans*-12-*cis*-octadecadienoico (Fig. 1) debido a que se han asociado a una gran variedad de efectos promotores de la salud humana.

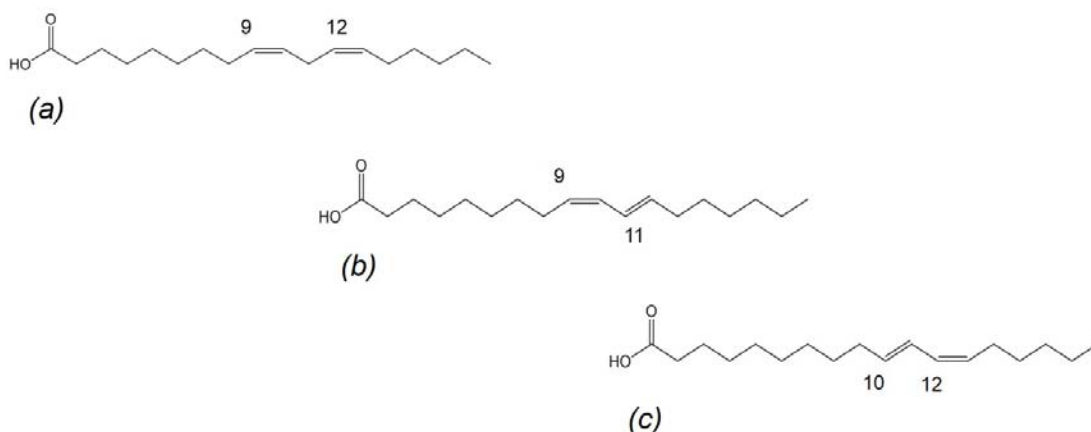


Figura 1. Ácido linoleico (a) y los isómeros bioactivos del ácido linoleico conjugado: ácido 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienoico o ácido ruménico (b) y ácido 10-*trans*-12-*cis*-octadecadienoico (c).

1.1 EFECTOS FISIOLÓGICOS BENÉFICOS DEL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO PARA EL HUMANO

A lo largo de varias décadas, se ha establecido que los isómeros bioactivos de ALC se asocian directamente con la inhibición de carcinogénesis en varios modelos animales y en células humanas, decremento en la severidad de la arterosclerosis, reducción de efectos adversos de la estimulación al sistema inmune, promoción del crecimiento en ratas jóvenes y reducción de la grasa corporal junto con un aumento de masa corporal magra en varias especies animales [8]. Los mecanismos por los cuales ejercen estos efectos no han sido completamente establecidos a la fecha, o si se trata del efecto de un solo isómero bioactivo o de la interacción sinérgica o aditiva de ambos [1-3].

1.1.1 Efecto anticarcinogénico

El ácido 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienoico y el ácido 10-*trans*-12-*cis*-octadecadienoico han demostrado ser atenuantes de la carcinogénesis en varios estudios *in vivo* utilizando varias cepas de ratones e *in vitro* utilizando células mamarias, del estómago, de colon y de próstata. El mecanismo por el cual actúa se ha sugerido como una pro-apoptosis o reducción en la iniciación, proliferación y progresión de células tumorales, además de una reducción en la metástasis de células sanas [2, 4, 9]. Sin embargo, se ha descubierto que cada isómero bioactivo actúa a través de diferentes vías metabólicas y el papel específico que desempeñan en ellas aún no se conoce [2].

En general, se puede decir que el ALC (principalmente el isómero 10-*trans*-12-*cis*) actúa inhibiendo el crecimiento tumoral por medio de tres mecanismos que a su vez están relacionados con otros: producción reducida de eicosanoides (moléculas pro-inflamatorias segregadas durante un estímulo al sistema inmune), interferencia con vías de señalización celular de células necróticas e inhibición de síntesis de DNA de las mismas [4].

La mayoría de estudios *in vivo* concuerdan que para obtener el efecto anticarcinogénico, la ingesta de ALC total (50% del isómero 9-*cis*-11-*trans* y 50% del isómero 10-*trans*-12-*cis*) debe representar el 1% de la ingesta total calórica [2]. Esto representaría un consumo de 3.3 g de ALC al día con base en una dieta de 2000 Kcal, lo que es prácticamente imposible en una dieta normal, ya que los alimentos que son fuente natural de ALC, como lácteos y cárnicos, tienen una concentración muy baja de ALC total (Tabla 1).

1.1.2 Efecto en la composición corporal

Park, *et al* demostró por primera vez que la ingesta de 0.5% de la ingesta total calórica de una mezcla equimolar de los isómeros bioactivos de ALC (en ratones ICR hembras y machos) produce una disminución de la masa corporal lipídica y aumento de la masa corporal magra [10]. Los mecanismos involucrados en ejercer este efecto, comprobados experimentalmente, son: aumento en la lipólisis, apoptosis, oxidación de ácidos grasos y reducción del almacenamiento de estos en adipocitos [11-13], aumento en el gasto energético, modulación de adipocinas y citocinas como la leptina, el FNT- α , la adiponectina y la interleucina; y finalmente el aumento de β -oxidación en el músculo esquelético [9].

Cabe mencionar que la inducción de cambios en la composición corporal es el efecto más estudiado del ALC en la actualidad y se le atribuye principalmente a la mezcla equimolar

de ambos isómeros bioactivos [2], aunque también existen estudios en los que varía la relación molar. La evidencia experimental acumulada a través de los años indica que los isómeros bioactivos *9-cis-11-trans*-ALC y en especial *10-trans-12-cis*-ALC tienen un potente efecto reductor de la masa corporal lipídica en humanos ya que actúan directamente en la regulación del comportamiento de adipocitos [13]. Sin embargo, es imperativo elucidar los detalles de los mecanismos moleculares de acción, así como posibles efectos adversos dado que se ha encontrado que en personas diabéticas pueden provocar un aumento en la resistencia a la insulina [2].

1.1.3 Efecto en alteraciones cardiovasculares

Se ha propuesto que los isómeros bioactivos de ALC pueden reducir lesiones arterioscleróticas en conejos y hámsters [2, 9]. Este efecto ha sido atribuido principalmente al isómero *9-cis-11-trans*, que actúa como agente inhibidor de la aterogénesis, además de mejorar los niveles lipídicos y glucósidos en sangre [14]. El ALC reduce los niveles de colesterol total, triglicéridos totales y LDL-colesterol circulantes en plasma, al mismo tiempo que aumenta el nivel de HDL-colesterol en varios modelos animales. El mecanismo por el cual modifica estos parámetros se sugiere como un decremento en los siguientes sistemas: el receptor de la activación de la proliferación del peroxisoma (o PPAR, el cual juega un papel clave en la lipogénesis); la proteína de unión del elemento regulador de esteroides (o SREBP, que actúa en la síntesis y elongación de ácidos grasos) y en la esteroil-CoA-desaturasa (SCD que actúa en la formación de triglicéridos y colesterol) [9].

Por otro lado, los estudios en humanos son muy escasos y no arrojan resultados concluyentes: por un lado se ha visto que el isómero *9-cis-11-trans* no ha presentado efecto en marcadores de riesgo de enfermedades cardiovasculares como el nivel de lípidos en plasma, marcadores de inflamación y moléculas de adhesión endotelial. Y por otro lado se reporta disminución en la sensibilidad a la insulina [14]. Así que debido a la variación de los resultados, los efectos de una suplementación de la dieta con ALC en diferentes dosis permanecen sin ser revelados.

1.2 FUENTES ALIMENTARIAS DE ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO

La biosíntesis de ALC ocurre de forma natural por fermentación anaerobia de una de las bacterias del rumen de mamíferos vacunos y bovinos llamada *Butyrivibrio fibrisolvens* [15]. Este microorganismo participa en el primer paso del proceso llamado biohidrogenación del AL, el cual consiste en la reducción de los dobles enlaces para obtener ácido esteárico (AE, ácido octadecanoico) [16, 17] (Fig. 2).

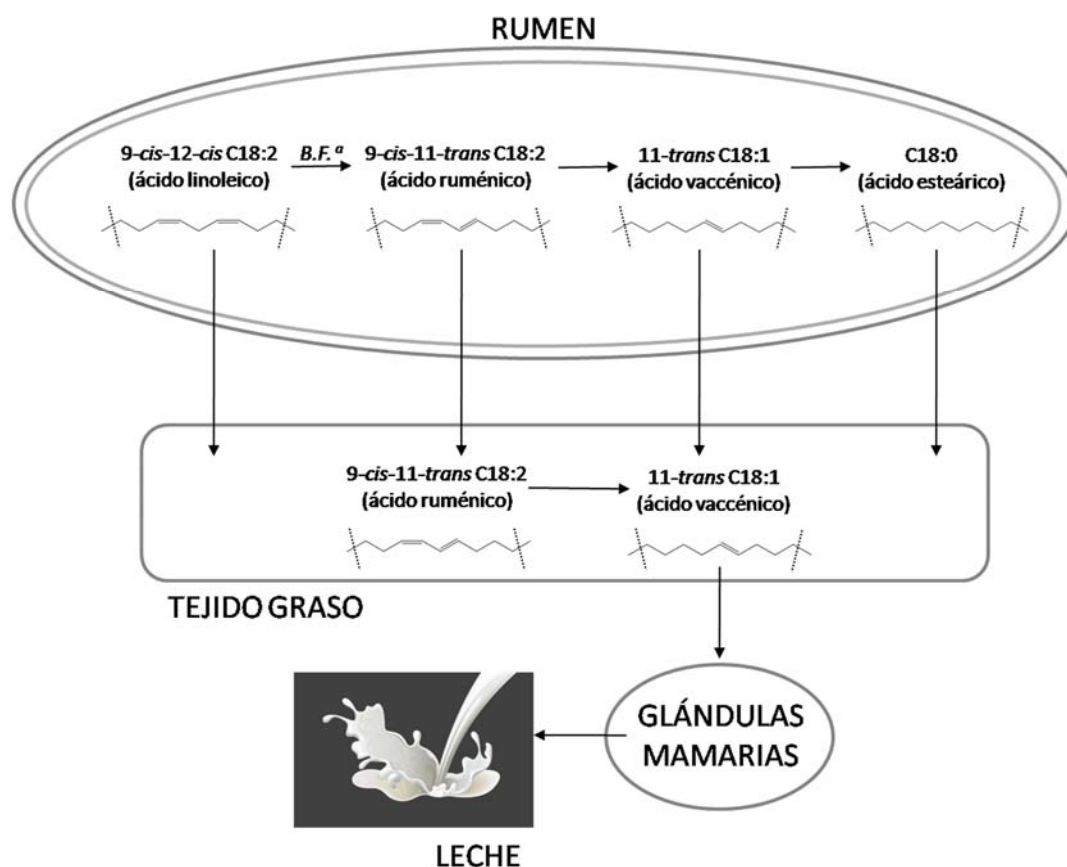


Figura 2. Biohidrogenación del ácido linoleico en el rumen de mamíferos bovinos y vacunos.

^a B.F.: *Butyrivibrio fibrisolvens*

El isómero 9-cis-11-trans-ALC se produce como un intermediario de la biohidrogenación, el cual se transporta y acumula tanto en el tejido graso como en las glándulas mamarias del rumiante en donde se excreta hacia la leche cuando ocurre lactación[16, 17]. Debido a esto, las fuentes naturales de ALC son productos cárnicos y lácteos derivados de estos mamíferos, sin embargo la cantidad que poseen es constitutivamente baja

(entre 2 y 5 mg de ALC por g de lípidos totales), así que no representan fuentes significativas de ALC (las dosis recomendadas de ALC se encuentran alrededor de 3 g diarios). En la tabla 1 se muestra el contenido de ALC en algunos alimentos.

Tabla 1. Contenido de ácido linoleico conjugado en alimentos [17, 18]

Alimento	ALC total (mg/g de lípidos totales)	9- <i>cis</i> -11- <i>trans</i> -ALC (% de ALC total)
Cárnicos y productos marinos		
Carne de cordero	5.6	92
Carne de res	4.3	85
Carne de ternera	2.7	84
Carne de cerdo	0.6	82
Carne de pollo	0.9	84
Yema de huevo	0.6	ND
Carne de salmón	0.3	ND
Productos lácteos		
Leche condensada	7.0	ND
Leche entera	5.5	92
Crema de leche	5.4	ND
Yogurt	4.8	84
Mantequilla	4.7	88
Crema agria	4.6	ND
Queso crema	3.8	88
Helado de leche	3.6	86
Queso Cheddar	3.6	93
Queso Parmesano	3.0	90
Aceites y grasas		
Grasa de res	2.6	84
Canola	0.5	44
Maíz	0.2	39
Girasol	0.7	44
Oliva	0.2	47

ND: dato no disponible

Existen muchos factores que influyen en el contenido natural de ALC total en un alimento por ejemplo:

- Dieta del animal: tipo y régimen de alimento, cantidad, etc. Edad, raza, actividad física e incluso la época del año en la que se sacrifica al rumiante.
- Temperatura en la que se almacene el alimento, ya que a menor temperatura (refrigeración alrededor de 4°C) se conservarán los componentes originales; entre ellos, el ALC disminuyendo así su reactividad química.
- Periodo de maduración en el caso de algunos quesos, ya que a mayor tiempo se incrementa la reactividad del ALC.
- Factores del cocinado de los alimentos como el proceso de freído, horneado o hidrogenación de aceites.

Debido a esto, es escaso el contenido de ALC total biodisponible en la dieta, de manera que no se cubre el requerimiento diario recomendado para obtener los beneficios fisiológicos. Esta DDR ha sido establecida por varios autores como 3.4 g de ALC total al día o el equivalente al 1.5% del valor calórico total en un día [2, 9, 18].

1.3 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO

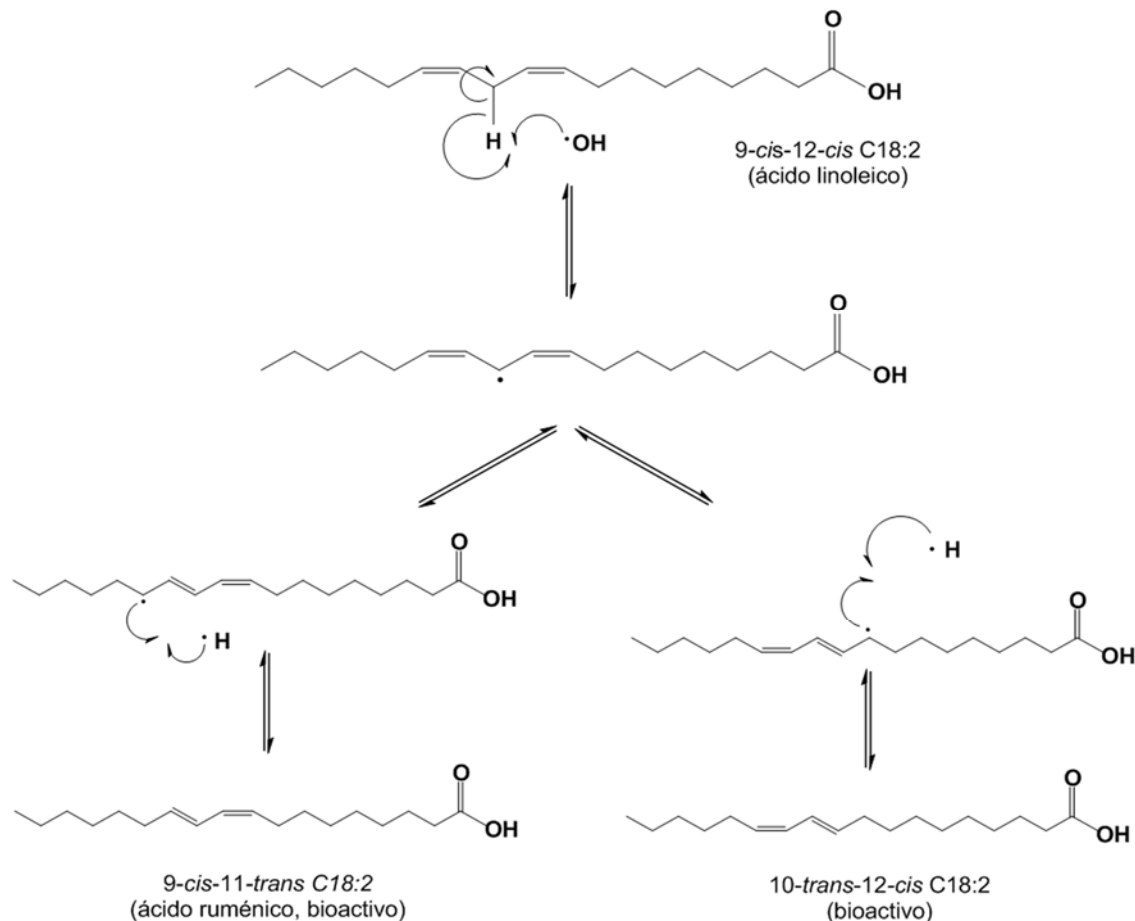
Se pueden obtener isómeros bioactivos del ALC por métodos de síntesis química, con los que se obtienen rendimientos variados; sin embargo existen ciertas desventajas en estos métodos como la baja selectividad hacia los isómeros bioactivos (es decir, se obtienen mezclas complejas de otros isómeros) y la generación de residuos potencialmente contaminantes o peligrosos. Los **métodos químicos** incluyen la isomerización alcalina de AL, la catálisis heterogénea de la hidratación / deshidratación del AL y la deshidratación de ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxi-9-*cis*-octadecenoico), mientras que los **métodos biotecnológicos** se involucra la actividad enzimática de un microorganismo y son una alternativa muy efectiva debido a la selectividad del producto y a que se llevan a cabo bajo condiciones ambientales de presión y temperatura y no generan residuos contaminantes.

1.3.1 Métodos químicos

1.3.1.1 Isomerización alcalina del ácido linoleico

Este método consiste en la isomerización del AL libre utilizando un catalizador alcalino en exceso (NaOH o KOH) y propilenglicol o etilenglicol como medio de reacción en un ambiente no oxidante propiciado por un flujo de N₂. Las temperaturas preferentes de reacción se encuentran entre 130 – 200°C durante periodos que van de 2 hasta 24 h [19, 20]. Como resultado se obtienen principalmente los isómeros bioactivos del ALC en relación aproximada de 1:1 (9-*cis*-11-*trans* ALC y 10-*trans*-12-*cis* ALC) en altos rendimientos. Debido a que es un método fácil y económico, actualmente constituye el método más utilizado para producir ALC con fines comerciales [19].

Al ocurrir la isomerización alcalina, teóricamente es posible la formación de 8 isómeros: cuatro de ellos con el dieno conjugado en 9-11 (*cis/trans*) y los otros cuatro en 10-12 (*cis/trans*). Sin embargo, se sabe que únicamente se forman cuatro: los isómeros 9-*cis*-11-*trans* y el 10-*tran*-12-*cis* son los productos predominantes mientras que los isómeros *cis-cis* (9-11 y 10-12) se producen en concentraciones tan bajas que se consideran contribuyentes menores [19, 21]. Por otro lado, se ha planteado que los isómeros 10-13-(*cis/trans*) se forman adicionalmente durante el proceso alcalino, pero únicamente a partir del isómero 9-*cis*-11-*cis* y en concentraciones despreciables [21]. Hasta la fecha, no se ha reportado un mecanismo de isomerización de AL, sin embargo, se puede plantear un esquema general (Esq. 1) en donde la isomerización alcalina puede ocurrir por abstracción de un radical H• del C 11, debido a la baja energía de disociación (65 Kcal/mol) que presentan estos átomos en metilenos intermedios en el dieno.



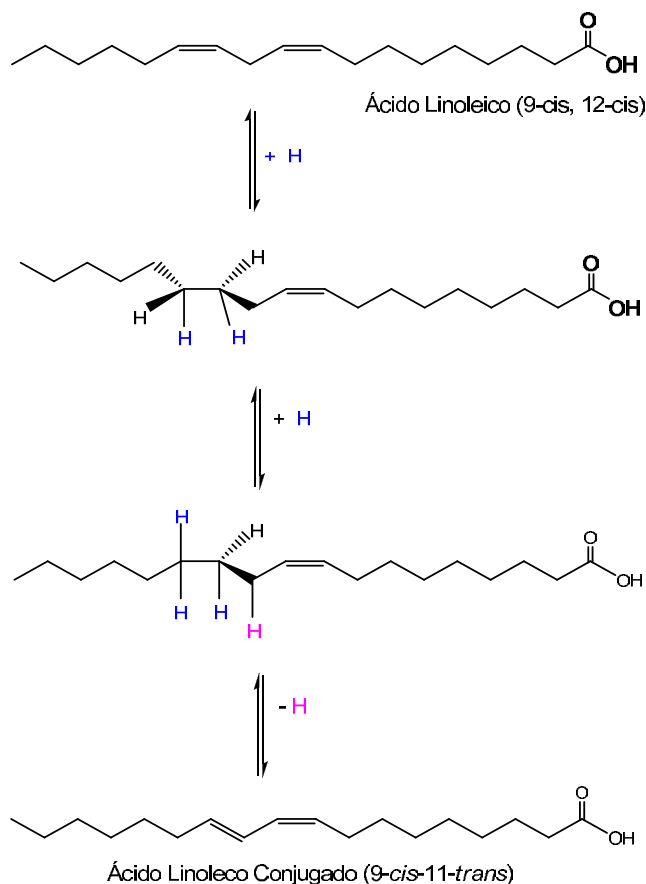
Esquema 1. Isomerización alcalina de ácido linoleico y el posible mecanismo de reacción mediado por radicales.

Los rendimientos de obtención de isómeros bioactivos de ALC total se encuentran entre 42 y 45%; sin embargo, cuando se realizan purificaciones posteriores de los ácidos grasos, los productos comerciales llegan a contener entre 90 y 97% de ALC bioactivo total.

1.3.1.2 Hidrogenación selectiva del ácido linoleico

Este método directo y relativamente simple se basa en la hidrogenación selectiva de uno de los dobles enlaces del AL, bajo condiciones de catálisis heterogénea con el ión Ag^+ [22]. El proceso consta en hacer reaccionar AL disuelto en n-decano, con nanopartículas de Ag^+ (Ag/SiO_2) que contienen H_2 adsorbido. Las condiciones de tiempo y temperatura se establecen alrededor de 165°C durante 90 minutos en donde ocurre una hidrogenación selectiva de uno de los dobles enlaces del AL debido a que Ag es el metal que presenta la más baja energía de unión con H_2 (en comparación con Ru o Ni), lo que implica una actividad muy baja de

hidrogenación de enlaces C=C, evitando así la hidrogenación completa con la producción predominante de ácido oleico (AO, ácido 12-*cis*-octadecenoico) y esteárico (AE, ácido octadecanoico). Después de la hidrogenación parcial, se propone que ocurre una reacción de adición/eliminación tipo Horiuti-Polanyi, obteniéndose finalmente los isómeros de ALC como producto principal y AO en menor concentración [22]. En el esquema 2 se ejemplifica la formación del isómero 9-*cis*-11-*trans*-ALC en el cuál se adicionan dos átomos de H ionizados (^+H producidos por la adsorción de H_2 en Ag) en C 12 y 13 primero y posteriormente se elimina otro H de C 11. Para formar el isómero 10-*trans*-12-*cis*-ALC se adicionan primero iones H^+ en C 9 y 10 con la posterior eliminación en C 11. Este método resulta muy eficiente, ya que se obtienen ambos isómeros bioactivos (9-*cis*-11-*trans*-ALC, 15% y 10-*trans*-12-*cis*-ALC, 13%); sin embargo es costoso y la mezcla de productos presenta un alto contenido (32%) del isómero no bioactivo 9-*trans*-11-*trans*-ALC así como AO y AE en menor proporción.

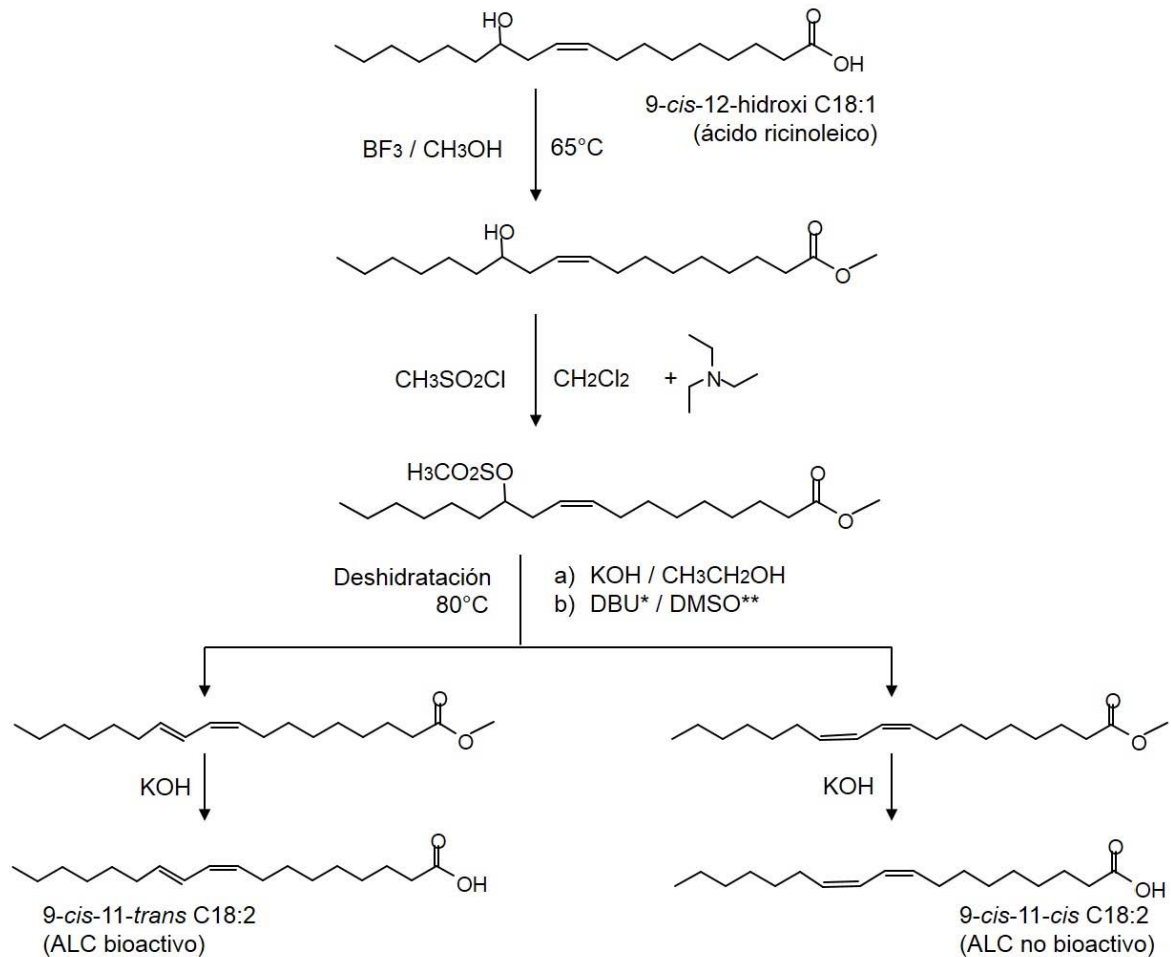


Esquema 2: Hidrogenación selectiva del ácido linoleico debido a moléculas de H_2 adsorbidas en nanopartículas de Ag/SiO₂. Mecanismo Horiuti-Polanyi de adición y eliminación.

1.3.1.3 Deshidratación de ricinoleato de metilo

El ácido ricinoleico (AR, ácido 9-*cis*-12-hidroxi-octadecenoico) es un ácido graso hidroxienoico que constituye el principal componente (80-90%) del aceite de ricino (*Ricinus communis*). Tiene una polaridad característica e inusual en ácidos grasos debido al grupo hidroxilo en C 9. Tiene aplicaciones industriales diversas como aditivo en pigmentos, cosméticos, tintas de impresión y acabados textiles. También es materia prima en la producción de tensoactivos anfotéricos como las betaínas e imidazolinas [23, 24]. Químicamente, el AR es una molécula muy versátil ya que puede sufrir varios tipos de reacciones produciendo una amplia gama de derivados como el alcohol ricinoleico, el metil-ricinoleato, el ácido azeláico y el ácido ricinénico que se utilizan como plastificantes y emulsificantes [25].

Gracias a esta versatilidad química, el AR es precursor del isómero bioactivo 9-*cis*-11-*trans* ALC que se obtiene con trazas del isómero no bioactivo 9-*cis*-11-*cis* ALC mediante una deshidratación del metil-ricinoleato (Esq. 3) [26]. Esta deshidratación es independiente del agente deshidratante (DBU o KOH) pero dependiente de la temperatura, ya que a partir de 80°C se obtienen mezclas más complejas de isómeros no bioactivos del ALC, por lo que el rendimiento del 9-*cis*-11-*trans* ALC tiende a disminuir en función del aumento de temperatura [26].



Esquema 3. Producción de 9-*cis*-11-*trans*-ALC a partir de ácido ricinoleico.

* DBU: 1,8-diazobicyclo-(5.4.0)-7-undeceno

** DMSO: dimetil-sulfóxido

1.3.2 Métodos biotecnológicos

Durante los últimos 12 años aproximadamente, ha crecido significativamente el número de investigaciones acerca del ALC en relación a las actividades biológicas y su obtención por métodos biotecnológicos variados que utilizan diferentes materias primas y microorganismos. La ventaja de estos métodos es la utilización de tecnologías limpias sin residuos peligrosos, a diferencia de la obtención por síntesis química.

La capacidad de cualquier microorganismo de isomerizar AL y producir uno o varios isómeros de ALC se denomina **actividad de ácido linoleico isomerasa** (AL isomerasa). Esta actividad enzimática se detectó inicialmente en extractos celulares de diferentes cepas de

microorganismos y se ha encontrado que la isomerización en cada género bacteriano se lleva a cabo por diferentes proteínas que actúan por diferentes mecanismos. A continuación se muestra una tabla indicativa con algunos microorganismos con actividad de AL isomerasa [27] en donde se observa que la mayoría de microorganismos que presentan actividad de AL isomerasa, pertenecen al género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* que son pertenecientes a la familia de las bacterias lácticas (BAL), que en general son microorganismos Gram (+) no esporulados, anaerobios y aerobios facultativos, que producen ácido láctico a partir de hexosas (principalmente glucosa) [28, 29]. Las BAL del género *Lactobacillus* tienen gran importancia y aplicación en el universo de los alimentos ya que se encuentran asociados con plantas y vegetales procesados (pepinillos, col agria, etc), productos cárnicos (salchichas, jamones curados, etc), en la industria láctea como cultivos iniciadores de yogurt, quesos (Cheddar, Provolone, Romano, Cottage, Brie, Camembert, etc) y cremas ácidas, además de que también se utilizan en la producción de bebidas alcohólicas (vinos, cerveza, etc).

Tabla 2: Producción de ácido linoleico conjugado en diferentes microorganismos utilizando ácido linoleico como sustrato.

Cepa	Condición	Isómeros ALC			Productividad (mg/L) ^a
		9- <i>cis</i> -11- <i>trans</i>	10- <i>trans</i> -12- <i>cis</i>	9- <i>trans</i> -11- <i>trans</i>	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	CC	46%	34%	20%	3.5
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CC	100%	-	-	1.0
<i>Bifidobacterium breve</i>	CC	91%	-	9%	398
<i>Bifidobacterium dentium</i>	CC	78%	1%	9%	160
<i>Bifidobacterium infantis</i>	CC	74%	7%	19%	24.6
<i>Bifidobacterium lactis</i>	CC	90%	2%	8%	170
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	CL	95%	-	-	220
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CL	67%	-	33%	4900
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CC	85%	10%	5%	131
<i>Lactobacillus casei</i>	CC	85%	12%	3%	111
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CL	59%	-	41%	300
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CL	62%	-	38%	4000
<i>Megasphaera elsdenii</i>	CL	15%	85%	-	7 ^b
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	CC	93%	-	-	265

CC: Crecimiento celular en el medio de cultivo específico

CL: Células lavadas cosechadas en la fase de crecimiento

^a: mg de células por L de cultivo

^b: $\mu\text{g/ml}$ de proteína

2 ANTECEDENTES

2.1 GENERALIDADES DE *Lactobacillus plantarum*

Las bacterias de la familia *Lactobacillus* pertenecen al grupo de bacterias lácticas (*Firmicutes*) debido a que producen primordialmente ácido láctico a partir de hexosas (principalmente glucosa) en metabolismos homofermentativos (>50%) o heterofermentativos (50%). Son microorganismos Gram (+) no esporulados cuya taxonomía puede ser de cocos, cocobacilos o bacilos [30] que son incapaces de realizar la biosíntesis del grupo hemo, por lo que son catalasa (-) [28, 29]. Tienen una gran versatilidad de adaptación metabólica hacia diversas condiciones de pH, temperatura y presencia de O₂ ya que pueden crecer en medios con pH desde 4.6 hasta 9.0 [28, 31], temperaturas entre 15 y 40°C y ambientes preferentemente anaerobios, aunque también tienen crecimiento adecuado bajo condiciones aerobias y microaerobias [30]. Debido a esta versatilidad, se les puede encontrar en diversas fuentes como la boca y tracto gastrointestinal de mamíferos bovinos, porcinos, humanos, etc; así como en varios alimentos fermentados como productos lácteos y vegetales [30]. En específico, varias subespecies de *Lactobacillus plantarum* se encuentran en alimentos fermentados como carnes (salchichas y salami), vegetales (kimchii y sauerkraut o chucrut) y masas anaeróticamente fermentadas como el pozol [28, 31].

Otra característica sumamente importante de prácticamente todas las especies de *Lactobacillus*, es su papel como probióticos, que se definen como microorganismos que se administran por vía oral, o bien que naturalmente se encuentran en el tracto gastrointestinal de un huésped animal, y que al llevar a cabo su habitual fermentación anaerobia, asistida o no por prebióticos o sustratos, confieren un beneficio palpable a la salud de dicho huésped [32] mediante varios mecanismos como [32, 33]:

- a) Producción de nutrientes de especial importancia para la mucosa intestinal, tales como ácidos grasos, particularmente los de cadena corta y aminoácidos como Arg, Gln y Cys.
- b) Producción de micronutrientes como vitaminas (algunas del complejo B), antioxidantes y aminas (histamina, 5-HT, piperidina, tiramina, cadaverina, pirrolidina, agmatina, espermidina y putrescina) que son aprovechados en general por el organismo hospedero.

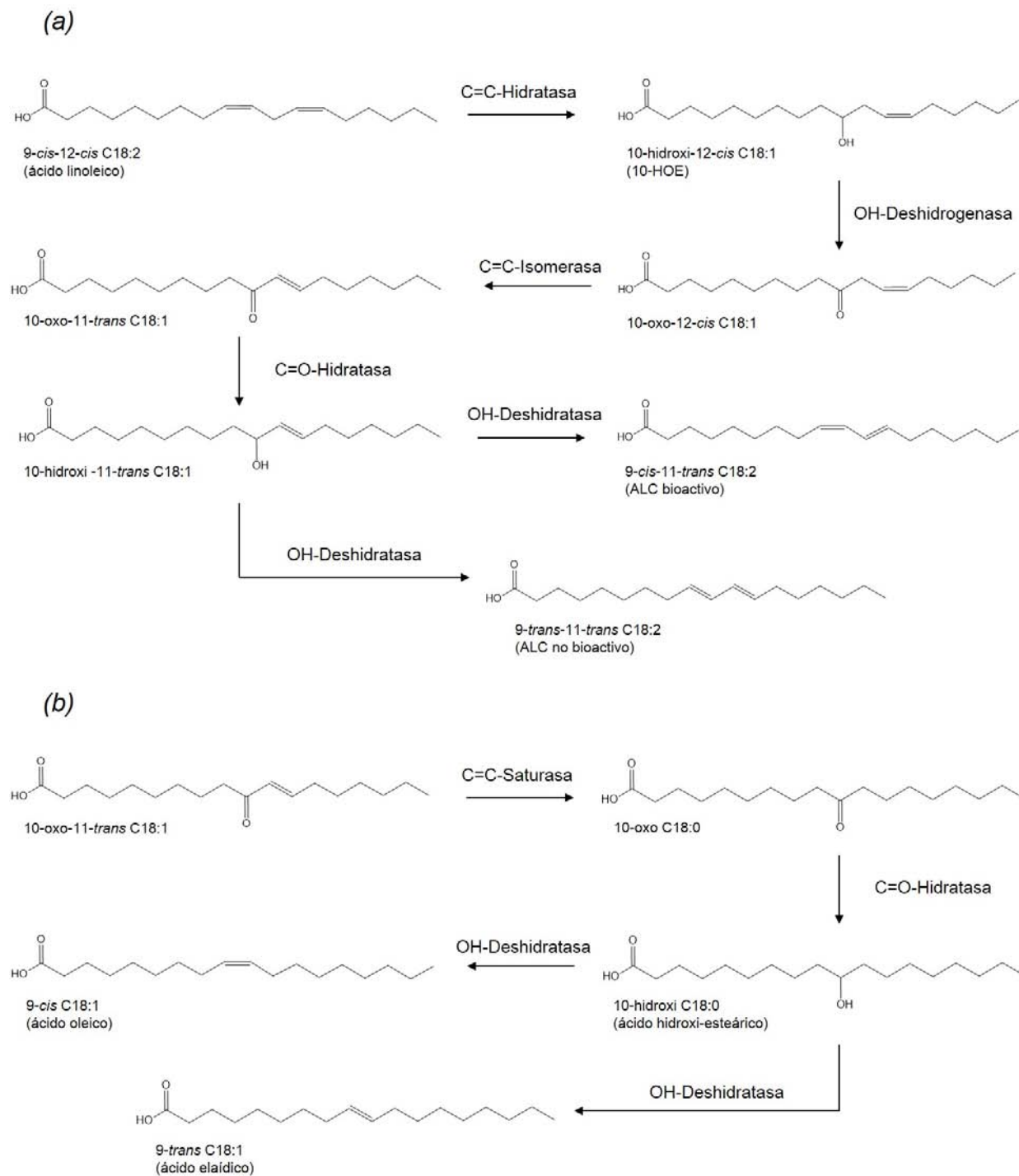
- c) Prevención y disminución de la proliferación de microorganismos patógenos mediante adhesión competitiva a células intestinales y colónicas e incluso produciendo bacteriocinas (péptidos con efecto antimicrobiano sintetizadas por bacterias).
- d) Estimulación del sistema de defensa inmunointestinal.
- e) Eliminación de toxinas y sustancias innecesarias del lumen intestinal. Por ejemplo, los lactobacilos producen esteroides a partir del colesterol en el colon y esto ayuda a reducir los niveles circulantes de colesterol.

Las características de las bacterias del género *Lactobacillus* hacen que constituyan un modelo de estudio sumamente interesante ya que la versatilidad metabólica permite la adaptación celular a distintos medios ya sea de estrés o tóxicos, como es el caso del metabolismo de ácidos grasos insaturados.

2.2 BIOHIDROGENACIÓN DE ÁCIDO LINOLEICO EN *Lactobacillus*

Las moléculas de AL son tóxicas para todas las bacterias del género *Lactobacillus*, ya que inhiben el crecimiento celular bloqueando la biosíntesis de ácidos grasos nativos por inhibición de la enoil-ACP reductasa; o bien causan el rompimiento de membranas celulares debido a que la inserción de las moléculas éste ácido graso insaturado causan tensión lateral de la bicapa lipídica debido a la geometría curva de los enlaces *cis/cis* [34-38]. Se sabe que para evitar éste efecto tóxico, las bacterias lácticas también llevan a cabo un proceso de biohidrogenación similar al que llevan a cabo las bacterias del rumen de mamíferos, en donde los dobles enlaces de los ácidos grasos polinsaturados son enzimáticamente hidrogenados produciendo derivados monoinsaturados cuya toxicidad es menor [16, 36, 39, 40].

Desde hace muchos años se sabe que las bacterias del género *Lactobacillus* producen predominantemente el isómero bioactivo 9-*cis*-11-*trans*-ALC a partir de AL, y en menor proporción, el isómero no bioactivo 9-*trans*-11-*trans*-ALC bajo diversas condiciones celulares (Tabla 2). Sin embargo, es hasta ahora cuando se conoce que la biohidrogenación del AL y la concomitante formación de ALC, en el género *Lactobacillus* y en específico en *Lactobacillus plantarum*, ocurre a través de un complejo metabolismo en el que participan muchas proteínas que generan varios ácidos grasos como intermediarios (Esq. 4) [41-43].



Esquema 4. Biohidrogenación del ácido linoleico en *L. plantarum*. (a) Producción de isómeros de ALC y (b) formación de derivados monoenoicos y saturados.

Inicialmente, (Esq. 4A) el ácido linoleico es hidratado en C 9 y 10 produciendo un ácido hidroxi-enoico (10-HOE; ácido 10-hidroxi-12-*cis*-octadecenoico). Esta reacción es catalizada

por una hidratasa (C=C-hidratasa en el Esq. 4), cuya secuencia de aminoácidos fue reportada recientemente (GenBank: CBY45494.1) y que fue identificada como una flavo-proteína de ≈64 kDa asociada a la membrana plasmática de la bacteria ([41, 42, 44]. Adicionalmente, esta hidratasa guarda una moderada identidad de secuencia con las ácido graso hidratasas de *Lactobacillus acidophilus* (32%) [45], *Elizabethkingia meningoseptica* (31%) [46], *Sterptococcus pyogenes* (31%) [47], *Bifidobacterium breve* (30%) [48] y *Macrococcus caseolyticus* (30%) [49] que han sido clasificadas como flavo-proteínas pertenecientes a la familia de antígenos de reacción cruzada con miosina (MCRA; myosin-cross-reactive antigens) [44]. Sin embargo, no hay más estudios en cuanto a la caracterización bioquímica y estructural de esta proteína. En este trabajo, uno de los objetos de estudio fue precisamente esta hidratasa.

Una vez producido el 10-HOE, se ha propuesto recientemente que sufre una serie de reacciones (Esq. 4A) [43] como la oxidación del grupo hidroxilo catalizado por una OH-deshidrogenasa de 32 kDa [50], isomerización geométrica de un doble enlace catalizada por una C=C-isomerasa, reducción del grupo oxo catalizada por una C=O-hidratasa y deshidratación del grupo hidroxilo catalizada por una OH-deshidratasa. Este proceso es catalizado por el complejo enzimático denominado linoleato isomerasa y produce finalmente el isómero bioactivo 9-*cis*-11-*trans*-ALC (84%) junto con trazas del isómero no bioactivo 9-*trans*-11-*trans*-ALC (15%) [41]. Por otro lado, una vez formado el ácido 10-oxo-11-*trans*-octadecenoico (Esq. 4B), ocurre la saturación del doble enlace catalizado por una C=C-saturasa de 24.4 kDa [51], seguido de la reducción del grupo oxo catalizada por la C=O-hidratasa y finalmente el grupo hidroxilo es deshidratado por la OH-deshidratasa para producir una mezcla de derivados monoinsaturados: el AO y su isómero *trans*, el ácido elaídico [43].

La identidad de las proteínas involucradas en la biohidrogenación del AL en *Lactobacillus plantarum* ha sido muy poco estudiada y no ha sido sino hasta recientemente, que ha iniciado el análisis de esta compleja batería enzimática; así que no se ha descartado la participación de más proteínas que reportadas a la fecha, dado que el metabolismo de este ácido graso ocurre como un proceso de desintoxicación.

2.3 ACIDO LINOLEICO HIDRATASAS

En años recientes, algunas proteínas pertenecientes a la familia de MCRA han sido identificadas como flavoenzimas con actividad de hidratasa que actúan sobre los dobles enlaces en C 9 y/o C 12 en conformación *cis* de ácidos grasos no esterificados de 16 y/o 18

átomos de C, produciendo ácidos 10-hidroxilados o bien ácidos 10,13-di-hidroxilados en una gran variedad de bacterias [44-49, 52]. Estas proteínas se han denominado como hidratasa clasificadas como flavo-proteínas pertenecientes a la familia de antígenos de reacción cruzada con miosina (MCRA; myosin-cross-reactive antigens) y que tienen actividad hacia varios ácidos grasos como el AO, AL y ácido α y γ -linolénico (ALn; C18:3), entre otros. Hasta la fecha se han estudiado las hidratasa de *Lactobacillus acidophilus*, *Elizabethkingia meningoseptica*, *Sterptococcus pyogenes*, *Bifidobacterium breve* y *Macrococcus caseolyticus*; sin embargo, estructuralmente se conocen únicamente las hidratasa de *Lactobacillus acidophilus* (LAH) y *Elizabethkingia meningoseptica* (EMH) [44-49, 52].

2.3.1 Hidratasa de *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus es, igual que *Lactobacillus plantarum*, una bacteria láctica probiótica. Naturalmente se encuentra en el tracto gastrointestinal de humanos, incluyendo la boca y es ampliamente utilizada como iniciador de la fermentación de productos lácteos, siendo más utilizada en la elaboración de yogurt [30, 31] [30, 31].

La hidratasa de *Lactobacillus acidophilus* (LAH) fue la primer hidratasa caracterizada estructuralmente. Es una flavoproteína de 591 aminoácidos que reconoce sustratos de 16 y 18 átomos de C y que cataliza selectivamente la hidratación de un doble enlace *cis* en C 9 produciendo el derivado hidroxilado en posición C10 [45]. Sin embargo, el sustrato preferencial de LAH es AL el cuál es metabolizado exclusivamente en 10-HOE (>90%). De esta enzima, se conoce la estructura tridimensional, y se ha propuesto un mecanismo por el cual realiza la hidratación del AL (Fig. 3).

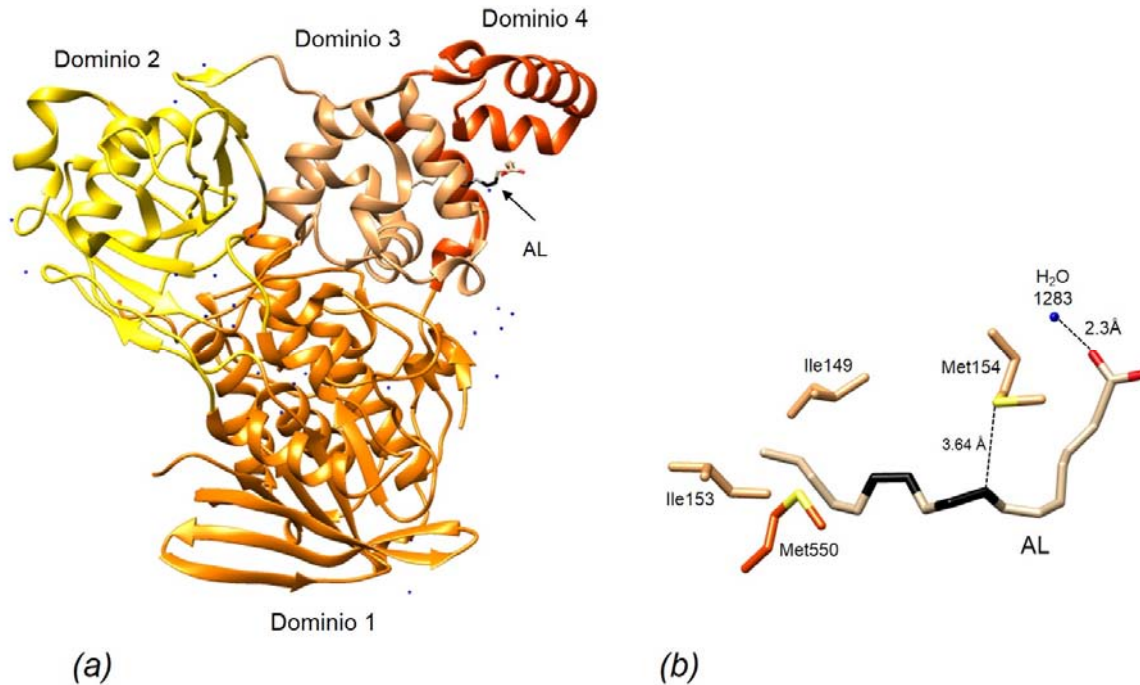


Figura 3. (a) Estructura de la hidratasa de *L. acidophilus* (LAH) unida a ácido linoleico (AL) (código PDB: 4IA6). (b) Descripción del sitio de unión. El dieno no conjugado del sustrato se muestra en color negro.

Su estructura tridimensional fue resuelta por cristalografía de rayos X utilizando el método de dispersión anómala simple y las coordenadas obtenidas a diferente resolución están depositadas en el banco de datos de proteínas (PDB) con los códigos 4IA5 y 4IA6. Estructuralmente, LAH consta de 4 dominios: el dominio 1 de color naranja en la figura 3a (residuos 1-119, 218-291, 312-335 y 471-534) tiene un plegamiento α/β tipo Rossmann ya que consta de cinco hebras β paralelas localizadas entre dos hélices α por un lado y tres hebras β antiparalelas por el otro lado. El dominio 2 de color amarillo (residuos 120-134, 292-311 y 336-470) consiste en dos hebras β antiparalelas flanqueadas por tres hélices α . Estos dominios se caracterizan por contener la secuencia de unión a FAD. El dominio 3 de color durazno (residuos 135-217) consta únicamente de hélices mientras que el dominio 4 de color naranja oscuro (residuos 535-591) está compuesto de 3 hélices α [45].

El sitio catalítico se ha propuesto en una cavidad hidrofóbica en el interior de la proteína y en contacto con la molécula de FAD, aunque esto no ha sido comprobado experimentalmente. Sin embargo, se establece que el AL se une inicialmente en el dominio 4 (Fig. 3b) en donde el carboxilato del sustrato establece un puente de H con una molécula de agua (H₂O1283). El resto de la cadena hidrocarbonada se ordena alrededor de una Met154,

que actúa como un polo rígido asegurando la posición mientras que el extremo ω establece interacciones hidrofóbicas con Ile149 e Ile153 (Fig. 3b). Una vez que el AL se ha unido a este sitio, se propone la formación de un túnel desde el exterior de la proteína hasta el interior a través del cual, se transporta el sustrato hasta llegar al sitio catalítico que está en contacto cercano con el cofactor. En cuanto al mecanismo de hidratación, únicamente se sabe que se adiciona una molécula de agua del medio al doble enlace en los C 9-10 [45].

2.3.2 Hidratasa de *Elizabethkingia meningoseptica*

Elizabethkingia meningoseptica es una bacteria Gram (-) perteneciente a la familia de las flavobacterias (*Flavobacteriaceae*); es aerobia, catalasa y oxidasa (+) y ha cobrado importancia últimamente debido a que se considera un patógeno emergente y oportunista en humanos inmunocomprometidos, participando de forma secundaria en infecciones como meningitis, neumonía, endocarditis, bacteriemia y sepsis entre otras. Naturalmente se encuentra en suelos, plantas, agua dulce y salada; sobrevive ambientes clorados lo que hace que colonice fácilmente grifos de agua en instalaciones hospitalarias [53]

En cuanto al metabolismo lipídico de la bacteria se conoce muy poco, sin embargo, recientemente se caracterizó estructuralmente la hidratasa de este microorganismo (EMH) como una flavoproteína de 646 aminoácidos que reconoce preferencialmente AO el cuál es metabolizado exclusivamente ($\geq 98\%$) en ácido 10-hidroxi-esteárico (10-HSE; C18:0) [46]. De esta enzima, se conoce la estructura tridimensional, y se ha propuesto un mecanismo completo por el cual realiza la hidratación del sustrato catalizada por FAD (Fig. 4) (Esq. 5).

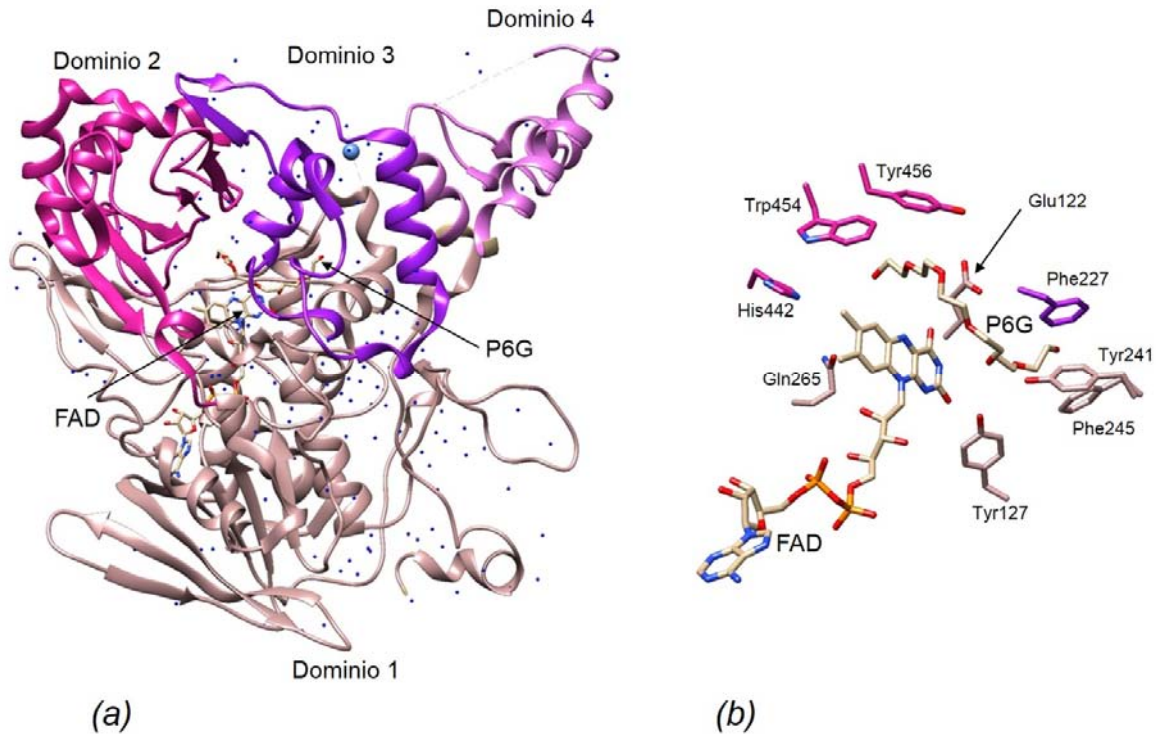
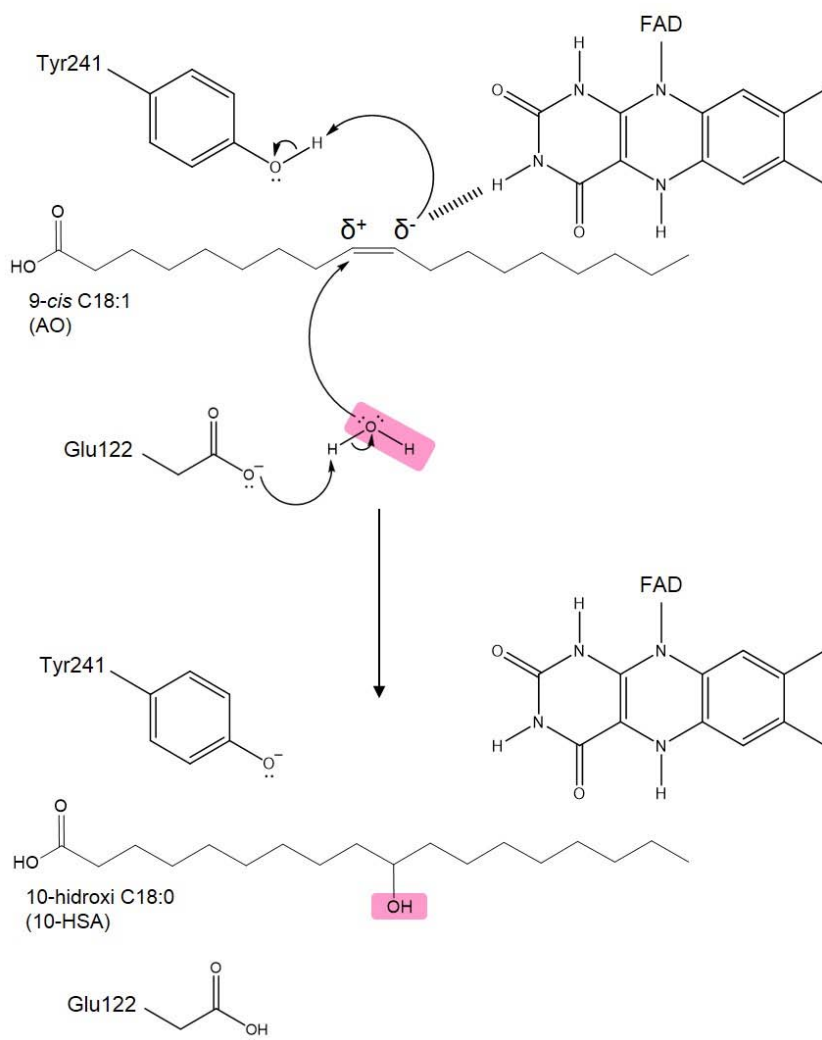


Figura 4. (a) Estructura de la hidratasa de *E. meningoseptica* (EMH) unida una molécula de hexaetilen glicol (P6G) en el sitio catalítico (código PDB: 4UIR). (b) Descripción del sitio catalítico asistido por una molécula de FAD unida no covalentemente a la proteína.

La estructura tridimensional de EMH fue resuelta por cristalografía de rayos X utilizando reemplazo molecular. En el banco de datos de proteínas se encuentra depositada únicamente una estructura (2B9W a 2.75Å). EMH consta de 4 dominios: el dominio 1 de color morado claro en la figura 4 (residuos 3-158, 235-380 y 508-581) tiene un plegamiento α/β tipo Rossmann ya que consta de cinco hebras β paralelas que ese encuentran entre tres hélices α por un lado y tres hebras β antiparalelas por el otro lado. Este dominio posee un motivo tipo $GxGxxG(x)_{21}E/D$, que une no covalentemente al β -fosfato y a la ribosa del FAD, junto con los dominios 2 y 3, dejando libre la parte de riboflavina. El dominio 2 de color violeta (residuos 381-507) posee cinco hebras β antiparalelas que están rodeadas por cuatro hélices α . El dominio 3 de color morado oscuro (residuos 159-234) consta principalmente de hélices α . Finalmente, el dominio 4 de color púrpura (residuos 582-646) se encuentra en el extremo C-terminal de la proteína y está compuesto de cuatro hélices α conectadas por tres asas.

El sitio catalítico está descrito por una cavidad hidrofóbica (Fig. 4b) en forma de V que se encuentra muy cerca a la molécula de FAD, la cual tiene un papel catalítico y estructural. Se ha propuesto que el extremo carboxílico del sustrato establece interacciones hidrofílicas con los

residuos Gln265 e His442, mientras que Glu122, Tyr241 y Tyr456 se encuentran muy cercanos al doble enlace de C 9. En cuanto al mecanismo de hidratación (Esq. 5), se propone que concertadamente, el Glu122 activa una molécula de agua cercana, la cual produce una carga parcial positiva (δ^+) adicionándose nucleofílicamente en C 10. En contraste, la carga parcial negativa (δ^-) formada en C 9 toma el H⁺ de la Tyr241 completándose la reacción. El FAD juega un papel muy importante, ya que el anillo de riboflavina, en su forma reducida es capaz de estabilizar las cargas parciales formadas [46].



Esquema 5. Mecanismo de reacción de la hidratación del ácido oleico catalizado por la hidratasa de *E. meningoseptica*.

2.4 ÁCIDO LINOLEICO ISOMERASAS

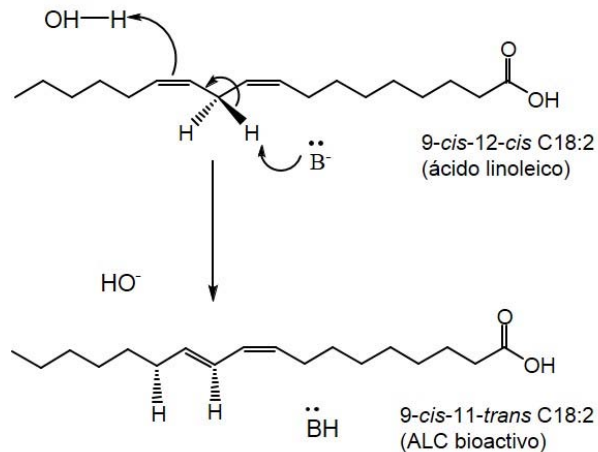
Existen algunas proteínas que han sido denominadas como ácido linoleico isomerasas y que producen, de forma concertada, algún isómero bioactivo del ALC sin necesidad de pertenecer a ningún sistema enzimático y sin la producción de moléculas intermediarias, a diferencia de lo que ocurre en *Lactobacillus plantarum*.

2.4.1 Isomerasa de *Butyrivibrio fibrisolvens*

Esta bacteria anaerobia es una de las pobladoras del rumen de mamíferos vacunos y bovinos. Es un microorganismo Gram (-) que produce ácido butírico principalmente. Tiene un metabolismo muy versátil debido a que está implicado en varios procesos que ayudan al metabolismo del alimento de rumiantes entre los que destacan la proteólisis, degradación de fibra como la celulosa y hemicelulosa, degradación de carbohidratos como almidón, quitina y arabinosa y finalmente en biohidrogenación de ácidos grasos polinsaturados [54].

La AL isomerasa de *Butyrivibrio fibrisolvens* (BFI) fue la primera proteína identificada como productora de isómeros bioactivos de ALC. La actividad enzimática se encontró en la fracción proteica asociada a la membrana plasmática y debido a eso, no se ha logrado aislarla y caracterizarla [55]. Sin embargo, se sabe que esta proteína produce el isómero bioactivo 9-*cis*-11-*trans*-ALC (95%) con trazas de isómeros *trans/trans* (Tabla 2) y que la actividad se basa en el reconocimiento del grupo carboxilo del ácido graso, así como también en un sistema dieno *cis/cis* ubicado en C 9 y C 12 en cadenas de 18 átomos de C únicamente [56].

Por otro lado, se ha propuesto un mecanismo concertado que involucra la remoción de un protón (H^+) en C 9 con el concomitante movimiento electrónico en donde se forma el doble enlace *trans* en C 11 y finalmente la captación de otro H^+ (en configuración *R*) en C 13 (Esq. 6) [57].



Esquema 6: Mecanismo de reacción de la isomerización del ácido linoleico catalizada por la isomerasa de *B. fibrisolvens*.

Termodinámicamente se favorece el movimiento electrónico para obtener un dieno conjugado, que es más estable. Finalmente, se ha demostrado que el H⁺ adicionado a C 13 proviene una molécula de agua del medio incorporándose así a la molécula de 9-*cis*-11-*trans*-ALC.

2.4.2 Isomerasa de *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes es un bacilo Gram (+) anaerobio y aerotolerante que se clasifica como relacionada a la familia de bacterias lácticas debido a que produce principalmente ácido propiónico. Posee un metabolismo singular frente a ácidos grasos ya que tiene la capacidad de utilizar diferentes sustratos provenientes de triglicéridos para llevar a cabo distintas funciones celulares como la colonización de células epiteliales asistida por AO [58]. Esta bacteria se ha encontrado en el rumen de mamíferos y en el tracto gastrointestinal de humanos [39], sin embargo es la residente principal de la piel humana localizándose en el lumen interno de los folículos pilosebáceos (ricos en triglicéridos) y debido al metabolismo lipídico que posee, está relacionada con el desarrollo del acné, así que se considera un patógeno de la piel humana [58].

La AL isomerasa de *Propionibacterium acnes* (PAI) participa en este metabolismo lipídico ya que actúa sobre ácidos grasos polinsaturados de cadenas con 18, 20 y 22 átomos de carbono que posean dienos no conjugados en diversas posiciones [59]. Se ha demostrado que la isomerización de estos ácidos grasos es un mecanismo de defensa, ya que mientras más insaturaciones tenga la molécula, más tóxica resulta para las células de esta bacteria [58].

Sin embargo, el sustrato preferencial de PAI es AL, que es metabolizado exclusivamente en el isómero bioactivo 10-*trans*-12-*cis*-ALC (>90%) [60]. De esta enzima, se conoce tanto la estructura tridimensional, como el mecanismo por el cual realiza la isomerización del AL (Fig. 5) (Esquema 7).

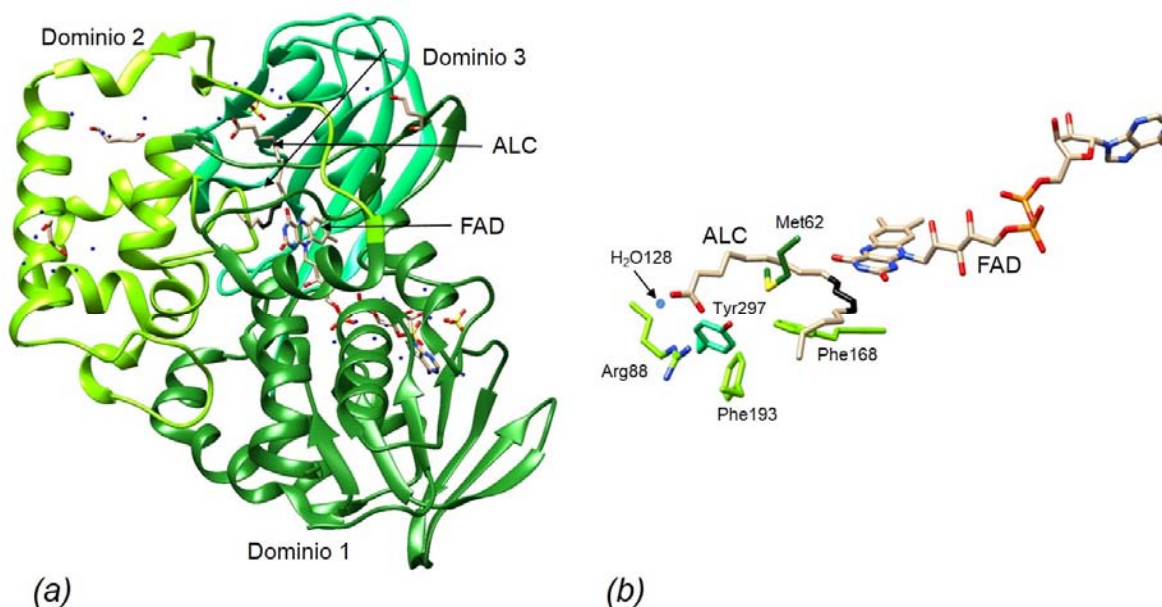
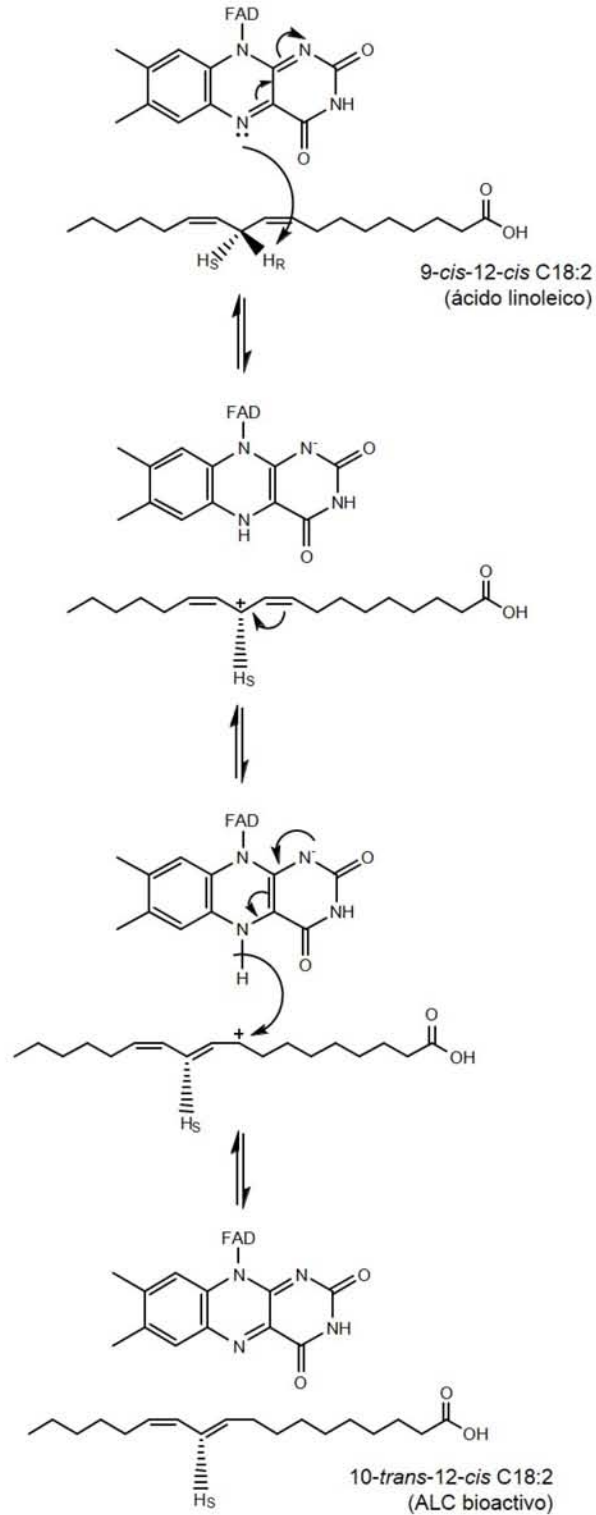


Figura 5. (a) Estructura de la isomerasa de *P. acnes* (PAI) unida al isómero bioactivo 10-*trans*-12-*cis*-ALC (ALC) (código PDB: 2BAB). (b) Descripción del sitio catalítico asistido por una molécula de FAD unida no covalentemente a la proteína. El dieno conjugado del producto se muestra en color negro.

PAI es una flavoenzima monomérica que consta de 424 aminoácidos. Su estructura tridimensional ha sido resuelta por cristalografía de rayos X utilizando diferentes métodos; en el banco de datos de proteínas se encuentran depositadas siete estructuras de PAI bajo distintas condiciones y resoluciones (códigos PDB: 2B9W, 2B9X, 2B9Y, 2BA9, 2BAB y 2BAC). Estructuralmente, PAI consta de 3 dominios: el dominio 1 de color verde oscuro en la figura 5a (residuos 1-77, 196-275 y 371-424) tiene un plegamiento α/β tipo Rossmann ya que consta de cuatro hebras β paralelas flanqueadas en un frente por dos hélices en la parte interna. Este dominio posee un motivo tipo GxGxxG(x)₁₈E, en los primeros 37 aminoácidos, que une no covalentemente al β -fosfato y a la ribosa del FAD dejando libre la parte de riboflavina. El dominio 2 de color verde lima (residuos 78-195) posee un plegamiento predominantemente helicoidal mientras que el dominio 3 de color verde agua (residuos 276-370) consta de cuatro

hebras β antiparalelas con dos hélices. El sitio catalítico se encuentra en una cavidad hidrofóbica sin moléculas de agua, entre los tres dominios (Fig. 5a).

El carboxilato del AL establece puentes de H con un átomo de N de Arg88 y con una molécula de agua (H₂O128) (Fig. 5b); esto hace que PAI tenga selectividad hacia ácidos grasos libres y no admita como sustratos ésteres metílicos ni triglicéridos [61]. Una vez iniciado el reconocimiento del carboxilato, el sustrato se ordena en el sitio activo alrededor del residuo Met62 el cuál actúa como un polo rígido asegurando la posición. Por otro lado, el C 11 del AL se encuentra a una distancia inicial de 3.2 Å alineado con el orbital molecular de menor energía (LUMO) del N 5 de la molécula de FAD permitiendo la transferencia de un hidruro (H⁻) de dicho C 11 (Esq. 7). El carbocatión intermediario es momentáneamente estabilizado por apilamiento con Phe168 y el sistema aromático de la flavina, causando un desplazamiento alílico de $\Delta 9$. Al mismo tiempo, ocurre un cambio conformacional en la proteína que acerca el N 5 hidratado al C 9 al cuál le es transferido el H⁻ en configuración pro-R (Esq. 7) completando así el ciclo catalítico [56, 60, 61].



Esquema 7. Mecanismo de reacción de la isomerización del ácido linoleico catalizada por la isomerasa de *P. acnes*.

2.4.3 Isomerasa de *Clostridium sporogenes*

Clostridium sporogenes es una bacteria Gram (+) anaerobia y esporulada con morfología de cocos que se encuentra ampliamente distribuida en sedimentos de agua dulce y salada, en productos alimenticios como cárnicos y lácteos en conserva, así como en el tracto gastrointestinal de humanos y animales domésticos (como gatos y perros). Esta bacteria no se considera patógena para el humano pero sí está involucrada en la descomposición de alimentos ricos en proteínas debido a su desarrollado metabolismo proteolítico con producción de H₂S y NH₄⁺ a partir de la degradación de aminoácidos, que producen olores característicos de putrefacción [62].

Los ácidos grasos, especialmente los mono y polinsaturados, constituyen un factor de estrés con efectos negativos tanto en el crecimiento celular de la bacteria, como en la resistencia de esporas inducidas por temperatura así que se ha planteado la modificación enzimática de estos ácidos grasos como un mecanismo de defensa [63]. La AL isomerasa de *Clostridium sporogenes* (CSI) produce exclusivamente el isómero bioactivo 9-*cis*-11-*trans*-ALC y ha sido la única isomerasa asociada a la membrana plasmática, que ha podido ser aislada y caracterizada a la fecha con el uso de tensoactivos, aunque con muy baja estabilidad. Es una proteína de 45 kDa que se encuentra en solución como un homotetrámero y que no necesita ningún cofactor para llevar a cabo la reacción concertada de isomerización. En cuanto al mecanismo de isomerización y a la estructura de la proteína se sabe muy poco; únicamente se reporta que la enzima reconoce únicamente el grupo carboxilo del ácido graso, así como el sistema dieno *cis/cis* ubicado en C 9 y C 12 y en cadenas de 18 átomos de C [64].

3 OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue identificar, aislar y caracterizar fisicoquímica y estructuralmente, a las proteínas que participan en el sistema de ácido linoleico isomerasa de *Lactobacillus plantarum*, las cuales producen el isómero bioactivo 9-*cis*-11-*trans* del ácido linoleico conjugado.

De manera particular, se plantearon los siguientes objetivos:

- Determinar el proceso de purificación de cada una de las proteínas involucradas, dado que una de ellas se encuentra en la fracción proteica membranal y la otra en la fracción proteica soluble
- Determinar el sustrato y el producto de cada una de las enzimas
- Determinar las condiciones óptimas de estabilidad y de actividad de cada una de las proteínas, por medio de ensayos de fluorimetría diferencial de barrido, dicroísmo circular y seguimiento de la actividad enzimática
- Proponer un modelo estructural de cada una de las proteínas con base en la secuencia de aminoácidos y realizar análisis de acoplamiento molecular con los sustratos y/o productos para identificar los sitios de unión y/o de catálisis, proponiendo así un esquema de producción de ácido 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienoico catalizado por el sistema enzimático
- Determinar la interacción de la proteína membranal con membranas sintéticas mediante su reconstitución en proteoliposomas fluorescentes y su posterior análisis por microscopía confocal para determinar si dicha interacción es membranal periférica (extrínseca) o membranal integral (intrínseca).

4 METODOLOGÍA

4.4. MÉTODOS GENERALES

4.4.1. Crecimiento celular

Lactobacillus plantarum CFQ-100, un subcultivo de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, fue adquirida de la colección WDCM 100 (*World Federation for Culture Collections*) perteneciente al cepario de la Facultad de Química, UNAM. Debido a que el ácido linoleico (AL; C18:2) es un factor tóxico para el crecimiento celular, las células se adaptaron primero a un medio enriquecido con este ácido graso, preparando un pre cultivo de 20 mL de caldo MRS suplementado con 180 µg/mL de AL emulsificado con Tween 80 al 0.3% (p/v). Se incubó a 30°C con agitación orbital (120 rpm) durante 17.5 h de modo que las células alcanzaron el final de la fase log de crecimiento sin alcanzar la fase estacionaria (Fig. 6).

Posteriormente se tomaron 19 mL de este precultivo y se inocularon en 1 L de caldo MRS suplementado con AL y se incubó bajo las mismas condiciones. Finalmente, las células se cosecharon por centrifugación (10,000 xg, 30 min, 4°C) y se lavaron con 30 mL de solución estéril de NaCl al 0.85%. El rendimiento de biomasa fue de 8.5 a 13 g/L (base húmeda).

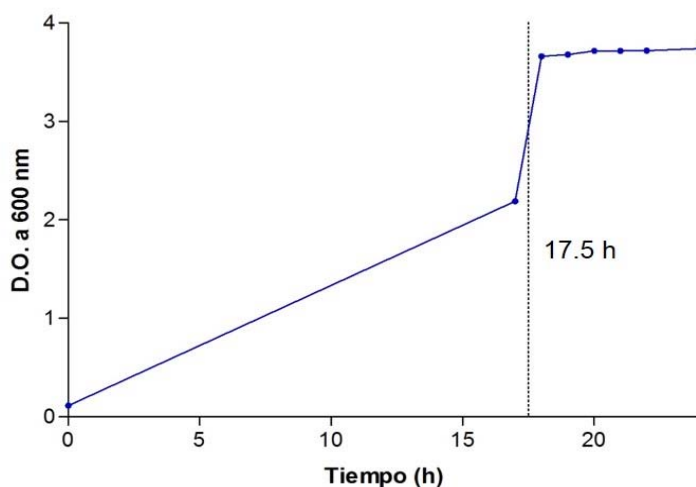


Figura 6. Crecimiento celular de *L. plantarum* adaptado a un medio enriquecido con 180 µg/mL de ácido linoleico.

4.1.2 Obtención de extractos proteicos

Se obtuvieron los extractos de proteínas asociadas a membrana y de proteínas solubles por ultracentrifugación, resuspendiendo primero el botón celular en amortiguador de lisis que consistió en fosfatos de potasio 20 mM, pH 6.5, 50 mM de NaCl, 1 mM de DTT y 1 mM de PMSF como inhibidor de proteasas. Esta suspensión fue sonicada en un sonicador Misonix 3000 (*Qsonica LLT, USA*) utilizando dos ciclos a 45 W de potencia por 5 min manteniendo la temperatura a 4°C. Posteriormente las células lisadas fueron centrifugadas (10,000xg, 15 min) para separar los desechos celulares y células sin lisar (precipitado) del extracto de proteínas totales (sobrenadante). Este extracto crudo fue ultracentrifugado (200,000xg, 60 min, 4°C) obteniendo finalmente la fracción de proteínas asociadas a la membrana como un precipitado con apariencia de gel y la fracción de proteínas solubles en el sobrenadante.

4.1.3 Determinación de proteína total por reacción con ácido bicinonónico (BCA)

Este método se basa en el desarrollo de una reacción colorimétrica que ocurre entre un complejo de ácido bicinonónico-Cu⁺ y el enlace peptídico de las proteínas, particularmente cuando se encuentran los aminoácidos Cys, Trp y Tyr [65]. En este trabajo, se utilizó el kit Pierce BCA Protein Assay (*Pierce Biotechnology, USA*), incubando a 60°C durante 30 min. Se preparó una curva patrón utilizando albúmina de suero bovino disuelta en amortiguador de fosfatos de potasio 20 mM, pH 6.5 (para la determinación de hidratasa de *Lactobacillus plantarum*) (Fig. 7a) y otra curva utilizando la misma proteína estándar, pero disuelta en amortiguador bis-tris 33 mM, pH 7.0 (para la determinación de deshidratasa de *Lactobacillus plantarum*) (Fig. 7b).

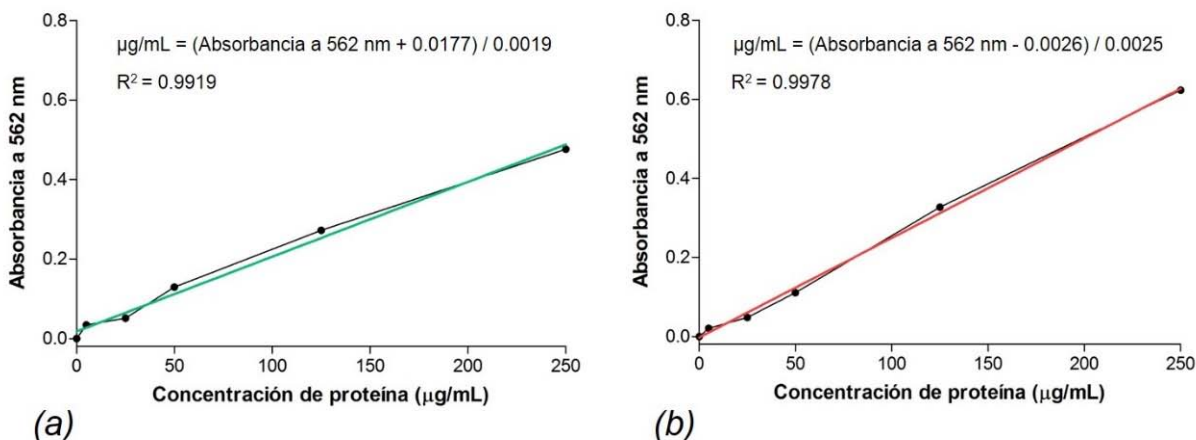


Figura 7. Curvas patrón utilizadas en la determinación de proteína total. Como estándar se usó albúmina de suero bovino en (a) amortiguador de fosfatos de potasio 20 mM pH 6.5 y (b) amortiguador bis-tris 33 mM pH 7.0. En la gráfica se muestra el promedio de cada medición y la desviación estándar.

4.1.4 Espectroscopía de dicroísmo circular

Este método de absorción electrónica provee información acerca de la estructura secundaria de las proteínas frente a los distintos cambios en el ambiente, cuando el experimento se lleva a cabo en un intervalo de 260 a 185 nm (UV lejano) [66]. En este trabajo, el análisis por dicroísmo circular se llevaron a cabo en un espectropolarímetro J-720 (*Jasco Inc., USA*) con el cual se colectó la señal en el espectro UV-lejano desde 185 hasta 260 nm a 20°C utilizando una velocidad de barrido de 20 nm/min en una celda de cuarzo con 0.1 cm de longitud de paso de luz. La concentración de proteína se encontraba entre 0.2 y 0.4 mg/mL, dependiendo de cada experimento. Los valores obtenidos en grados (°) fueron normalizados mediante la sustracción de la señal del amortiguador correspondiente (blanco). Los espectros fueron expresados como dicroísmo circular molar ($\Delta\epsilon$) en $M^{-1}cm^{-1}$, utilizando la siguiente fórmula basada en la masa molar de cada proteína [67]:

$$\Delta\epsilon = \theta_{\lambda} \times 0.1 \times MRW / L \times C \times 3298$$

Donde:

- $\Delta\epsilon$ = Dicroísmo circular molar ($M^{-1}cm^{-1}$)
- θ_{λ} = Elipticidad en miligrados (mili°) a la longitud de onda correspondiente
- MRW = Masa media por residuo (Da) que se calcula: masa molecular de la proteína (Da)/(número de aminoácidos-1)

- L = paso de luz (cm)
- C = concentración de la proteína (g/ml)

4.1.5 Fluorimetría diferencial de barrido (DSF) o ensayos de termofluorescencia

Este método se basa en el análisis y comparación de la estabilidad térmica de una proteína que se encuentre en distintos ambientes (pH, sales, metales, amortiguadores, etc) por medio de la determinación del valor de T_m o temperatura de fusión (°C). Se utilizó una sonda solvatocrómica denominada SYPRO Orange que al unirse a zonas hidrofóbicas de la proteína, que se van exponiendo debido a la desnaturalización térmica, emite señal de fluorescencia que se incrementa junto con la desnaturalización de dicha proteína [68].

En este trabajo se evaluó el efecto de diferentes valores de pH, amortiguadores y aditivos en la estabilidad de las proteínas estudiadas por fluorimetría diferencial de barrido. Inicialmente se mezcló la solución de proteína con SYPRO Orange en relación 1000:1 (v/v) y se incubó con agitación suave durante 30 min. Cada ensayo se realizó colocando 10 µL de la solución de proteína + 10 µL de solución de cada condición evaluada en una microplaca con 96 pozos sellada con un film ópticamente inerte. La placa fue centrifugada a 500xg durante 2 min para eliminar las burbujas. La señal de fluorescencia emitida por la sonda ($\lambda_{\text{excitación}} = 490 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 575 \text{ nm}$) [69] fue registrada en un instrumento de RT-PCR (*Life Technologies, USA*) en el que se programó un barrido de temperatura desde 25-95°C de forma continua. Después de obtener el fluorograma de la señal de fluorescencia cruda en función de la temperatura para cada condición, se determinó el intervalo de temperatura en el que ocurre la transición del estado nativo al desnaturalizado, el cual se caracteriza por tener una forma sigmoidal. Esto se hizo utilizando el programa StepOne v2.3 (*Life Technologies, USA*) y posteriormente los datos de la transición fueron normalizados. Finalmente se ajustaron al modelo sigmoidal de Boltzmann utilizando el programa GraphPad 5.0 (*GraphPad Software Inc., USA*) con el cual se obtuvo el punto de inflexión que corresponde al valor de T_m (°C) [68].

Para el análisis de diferentes valores de pH y amortiguadores se utilizó el kit Wizard pH buffer con 96 condiciones (*Rigaku Reagents Inc., USA*) que consiste en varios sets de sales amortiguadoras a diversos valores de pH mientras que para el análisis del efecto de aditivos se utilizó el kit Additive screen HT con 96 condiciones (*Hampton Research Corp., USA*) que consiste en varios sets con diversos reactivos como iones multivalentes, detergentes, etc. La composición de cada kit se detalla en el anexo 1, junto con la concentración final después de la dilución con la proteína.

4.1.6 Generación de modelos estructurales y acoplamientos moleculares

El modelo estructural tridimensional de las proteínas fue generado con base en la secuencia de aminoácidos de cada una y se produjo utilizando el servidor Robetta (www.rosetta.bakerlab.org) [70, 71] el cual utiliza un método *ab initio* combinado con la estructura cristalográfica de una referencia, seleccionada automáticamente por homología (>20%) entre secuencias. Una vez que las estructuras fueron generadas se utilizó el programa Coot v0.8 [72] para corregir cualquier error de parámetros geométricos (rotámeros y ángulos de torsión) o bien de conectividad de la cadena polipeptídica. Finalmente, la calidad estereoquímica del modelo estructural fue evaluada utilizando el programa PROCHECK [73] dentro del ambiente SWISS MODEL [74].

El acoplamiento molecular entre cada una de las proteínas y uno o más ligandos, se llevó a cabo con el programa AUTODOCK 4.0 [75]. Los átomos de H y las cargas Kollman fueron asignadas al receptor y por otro lado átomos de H no polares y cargas Gasteiger fueron asignadas a los ligandos utilizando AutoDockTools 1.5.7. Las simulaciones de acoplamiento se llevaron a cabo con el algoritmo genético Lamarckiano, el cual se conoce como el método más eficiente y confiable cuando se utiliza AUTODOCK 4.0. Los mapas de red se calcularon usando la función AutoGrid. Inicialmente, se detectaron los sitios potenciales de unión con base en un docking ciego en el que la celda fuera suficientemente grande para cubrir toda la proteína (90 x 90 x 90 Å) y estuviera centrada en el centro de la proteína; posteriormente se realizaron acoplamientos (200 corridas independientes) con celdas más pequeñas (40 x 40 x 40 Å) enfocados en los mejores resultados energéticos obtenidos durante el acoplamiento ciego. Finalmente se evaluaron los acoplamientos obtenidos mediante un análisis de clusters con una tolerancia de 0.5 Å (RMSD) en comparación con las coordenadas iniciales del ligando, las cuáles se usaron como referencia. Las representaciones gráficas estructurales se realizaron con el programa Chimera v.1.9. UCSF.

4.2 MÉTODOS UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LA HIDRATASA DE *Lactobacillus plantarum*

4.2.1 Purificación de la proteína nativa

Las proteínas asociadas a la membrana obtenidas previamente como un precipitado fueron con apariencia de gel fueron resuspendidas un amortiguador solubilizante con la siguiente composición: fosfatos de potasio 20 mM a pH 6.5, 50 mM NaCl, glicerol al 10% (v/v), 1 mM DTT y 1 mM PMSF. La extracción y solubilización de proteínas asociadas a la membrana se logró mediante la adición gradual del tensoactivo n-octil- β -D-tio-glucopiranosido (OTGP) inicialmente a una concentración de 4 mM, seguida del incremento hasta 6 mM y finalmente hasta 9 mM, alcanzando la concentración micelar crítica. Este proceso de solubilización es fundamental para alcanzar la extracción de proteínas de membrana manteniendo su estabilidad en solución [76].

Una vez en solución, las proteínas de membrana fueron fraccionadas por precipitación selectiva con 1.5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ encontrándose actividad enzimática de hidratasa en el sobrenadante así que fue dializado (20x) contra amortiguador solubilizante adicionado con 9 mM OTGP, 0.1 mM FAD y 1 mM de AL. Posteriormente esta fracción se fue sometida a exclusión molecular utilizando una columna Bio SEC-5 (4.6 mm x 150 mm x 5 μm , *Agilent Technologies, Germany*) en sistema HPLC (*HP Agilent 1100 series, Agilent Technologies, Germany*) equilibrado con amortiguador de fosfatos de potasio 20 mM a pH 6.5 y 50 mM de NaCl. Las fracciones fueron eluidas con el mismo amortiguador, flujo de 1 mL/min, colectadas y analizadas enzimáticamente mediante actividad de ácido linoleico hidratasa.

4.2.2 Determinación del estado oligomérico en solución

Para determinar el estado oligomérico de la hidratasa en solución, se realizó una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Bio SEC-5 (4.6 mm x 150 mm x 5 μm , *Agilent Technologies, Germany*) en sistema HPLC (*HP Agilent 1100 series, Agilent Technologies, Germany*) equilibrado con amortiguador de fosfatos de potasio 20 mM a pH 6.5 y 50 mM de NaCl. Las fracciones fueron eluidas con el mismo amortiguador a un flujo de 1 mL/min. Las proteínas de referencia utilizadas fueron miosina (200 kDa), glucosa isomerasa tetramérica (172 kDa), β -galactosidasa (116.2 kDa), fosforilasa b (97.4 kDa) y albúmina de suero bovino (66 kDa), eluidas bajo las mismas condiciones de la muestra.

4.2.3 Prueba de actividad de ácido linoleico hidratasa

Cada reacción de hidratación de AL se llevó a cabo por triplicado y consistió en colocar en un tubo con tapa de rosca 5 mL de amortiguador de fosfatos de potasio 20 mM a pH 6.5, 19.8 mg de AL como sustrato emulsificado con Tween 80 al 0.25% (p/v). A esta mezcla se le adicionaron 100 μ L de extracto proteico (0.5 mg/mL) o de proteína pura (0.1 mg/mL), según el caso. La reacción se inició incubando los tubos a 30°C durante 24 h y agitación orbital a 200 rpm. De igual forma, se llevaron a cabo dos experimentos control que consistieron en a) un tubo con todos los componentes descritos excepto el sustrato (AL) y b) todos los componentes descritos excepto el extracto proteico. Después de la incubación, los ácidos grasos se extrajeron de la mezcla de reacción adicionando 4 mL de hexano-acetato de etilo (70%-30%) y posteriormente realizando dos ciclos de congelamiento-descongelamiento (-20°C y 6°C respectivamente) seguido de centrifugación (3,500xg, 40 min, 4°C) para así, mejorar el rompimiento de la emulsión de ácidos grasos y obtener mayor rendimiento de lípidos extraídos en la fase orgánica [77]. Esta fase fue separada de la fase acuosa y lavada primero con 1 mL de solución saturada de NaCl y posteriormente con 2 mL x 2 de H₂O desionizada (18 m Ω *cm). Finalmente se secó durante una noche mediante la adición de Na₂SO₄ anhidro y después se filtró a través de papel Whatman 2. Los ácidos grasos fueron metilados y analizados por cromatografía de gases (sección 4.2.4) para determinar cuantitativamente la producción de 10-HOE a partir de AL.

4.2.4 Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases

La mezcla de hexano-acetato de etilo de la fase orgánica fue evaporada utilizando un baño de agua a 40°C bajo condiciones no oxidantes utilizando una corriente de N₂. Posteriormente, los ácidos grasos secos fueron metilados agregando 2 mL de H₂SO₄ al 1% (v/v) en metanol e incubando a 35°C durante 30 min con agitación orbital a 200 rpm [78, 79]. Los derivados metilados fueron extraídos con hexano, neutralizados con 1 mL de solución saturada de NaHCO₃ y dos lavados con 2 mL de H₂O desionizada (18 m Ω *cm). Por último, se agregó Na₂SO₄ anhidro para secar la fase orgánica y se evaporó nuevamente el disolvente.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron separados, identificados y cuantificados utilizando una columna capilar polar Heliflex™ Aqua Wax-DA (30 m x 0.25 mm x 0.25 m d_f) (*Alltech GmbH, Germany*) utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 6890 (*Agilent Technologies, USA*) acoplado a un detector FID (240°C). El volumen de inyección fue de 1 μ L con un split 1:60 y se utilizó un programa de temperatura de vaporización de la siguiente

manera: 180°C durante 0.5 min y posteriormente hubo incrementos a una velocidad de 0.5°C/min hasta 230°C durante 13 min. La elución se llevó a cabo con H₂ a un flujo constante de 1.8 mL/min.

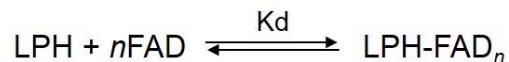
La identificación de AL y 10-HOE se realizó por comparación de tiempos de retención de un estándar de AL y 10-HOE previamente purificado (sección 4.2.5). La cuantificación de 10-HOE formado enzimáticamente fue calculada a partir de la integración y normalización de áreas de los picos cromatográficos, en µg.

4.2.5 Purificación del ácido 10-hidroxi-12-*cis*-octadecenoico

Los ácidos hidroxienoicos derivados de los ácidos grasos como el 10-HOE, no se encuentran disponibles de forma comercial; así que para identificar a la molécula de 10-HOE como el producto de reacción de la hidratación de AL catalizado por una hidratasa, se realizó la purificación de los lípidos producidos después de la reacción. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron separados en una columna preparativa Luna 5u C18(2) (50 mm x 21.20 mm x 5µ di) (*Phenomenex, Inc., USA*) en un sistema HPLC (*Waters 1525 binary pump, Waters Corp., USA*) acoplado a un detector de arreglo de diodos (*Waters 2996, Waters Corp., USA*). Los ésteres fueron eluidos con acetonitrilo-agua (60%-40%) a un flujo de 12 mL/min. El volumen de inyección fue de 200 µL y la detección se hizo a 205 nm. Se colectaron las fracciones y finalmente el derivado metilado de 10-HOE fue identificado con base en el patrón de fragmentación por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (*GCMate II, Jeol, USA*) utilizando impacto electrónico a 70 eV como fuente de ionización.

4.2.6 Determinación de la concentración óptima de FAD

Una alícuota de 100 µL de la hidratasa purificada, a una concentración de 0.5 mg/mL se incubó con agitación a 4°C durante 16 horas adicionado FAD a distintas concentraciones desde 0 hasta 0.1 mM. Posteriormente se determinó la actividad de hidratasa y se calculó la concentración necesaria de FAD para obtener actividad óptima mediante el ajuste de los datos a un comportamiento no lineal utilizando la ecuación de Hill en el programa GraphPad 5.0 (*GraphPad Software Inc., USA*). Esta ecuación se utiliza comúnmente para describir el modo en el que se unen las moléculas de ligando a un receptor o enzima para producir un efecto funcional [80]. Se consideró que la unión FAD-LPH ocurre en un solo paso siguiendo el esquema:



Debido a esto la unión está descrita por la ecuación:

$$v / V_{\text{máx}} = [\text{S}]^n / (K_d + [\text{S}]^n)$$

Donde:

- n = número de sitios aparentes de unión al sustrato por molécula
- K_d = constante de disociación aparente al equilibrio
- v = velocidad o actividad enzimática (μmol 10-HOE/min/mg)
- $V_{\text{máx}}$ = velocidad o actividad enzimática máxima (μmol 10-HOE/min/mg)
- $[\text{S}]$ = concentración (μM) de FAD total adicionado a la reacción

Se obtuvo entonces el valor de K_d , la concentración de FAD necesaria para producir la actividad máxima ($V_{\text{máx}}$) y si la unión es en general cooperativa ($n > 1$) o no cooperativa ($n < 1$).

4.2.7 Reconstitución de la proteína en proteoliposomas con marcaje fluorescente dual

Se prepararon proteoliposomas unilamelares de 200 nm de diámetro por el método de hidratación y extrusión de vesículas, asistido por OTGP, el cual se basa en el método inicialmente reportado por Bangham *et al* [81, 82]. En este trabajo se sintetizaron liposomas de 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) y 1,2-di-miristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) en relación molar 1:1 (1 mM) y se mezclaron con la sonda lipofílica β -BODIPY FL C₅-HPC a una fracción molar de 0.1%. Esta mezcla fosfolipídica fue disuelta en cloroformo-metanol (50%-50%) y posteriormente depositada como una película delgada en un matraz de fondo redondo mediante la evaporación rotatoria del disolvente a presión reducida en un baño de agua a 25°C. La película seca obtenida en este punto consistía en un conjunto de bicapas multilamelares depositadas de forma plana en la superficie del matraz (Fig. 8) que fue posteriormente hidratada con 3 mL de amortiguador de fosfatos de potasio 20 mM, pH 6.5 para obtener una suspensión de vesículas multilamelares, las cuales fueron extruidas 13 veces a través de una membrana de policarbonato con tamaño de poro de 200 nm usando el set Mini-Extruder (*Avanti Polar Lipids, Inc., USA*) a 25°C. El diámetro de los liposomas fue seleccionado debido a que representa un tamaño medio en el que la presión lateral ejercida por los

fosfolípidos es lo suficientemente alta ($\approx 50 \text{ mN/m}^2$) para soportar la inserción de varias moléculas proteicas sin sufrir transiciones de fase o bien escisión de la bicapa [83] .obteniendo liposomas unilamelares que fueron incubados a 4°C durante una noche. Finalmente los liposomas se lavaron por medio de ultracentrifugación ($200,000\times g$, 60 min, 4°C) obteniéndose un gel precipitado y descartando el sobrenadante. Los proteoliposomas se produjeron al resuspender los liposomas precipitados en 3 mL de solución de proteína recién purificada a una concentración de 0.2 mg/mL en amortiguador de fosfatos de potasio 20 mM a $\text{pH } 6.5$, 0.1 mM de FAD, 10% de glicerol, 15 mM de OTGP y $5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ de la sonda hidrofílica Rodamina B. El exceso de tensoactivo, FAD y glicerol se descartaron mediante una diálisis lenta ($20\times$) contra amortiguador de fosfatos de potasio 20 mM a $\text{pH } 6.5$ con una membrana de tamaño de corte de 14 kDa .

Se llevaron a cabo dos experimentos control preparando de la misma forma descrita: a) liposomas fluorescentes sin la adición de proteína y b) proteoliposomas fluorescentes con adición de citocromo C oxidasa (proteína integral a membranas).

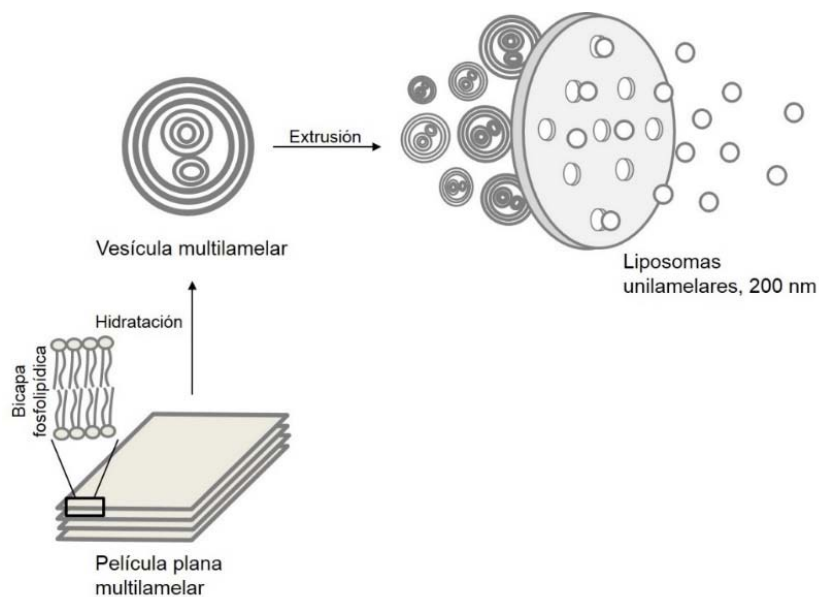


Figura 8. Preparación de liposomas de 200 nm de diámetro por el método de hidratación y extrusión de vesículas multilamelares.

La molécula lipofílica β -BODIPY FL C_5 -HPC (Fig. 9a) es un análogo de un fosfolípido que contiene una cadena hidrocarbonada de 16 átomos de C y otra cadena de 5 átomos de C al final de la cual se encuentra un núcleo fluoróforo de BODIPY que tiene emisión máxima en el rango del verde ($500\text{-}550 \text{ nm}$). Debido a estas características, se integra a las membranas

sintéticas de forma espontánea emitiendo fluorescencia desde la bicapa lipídica. La molécula hidrofílica de Rodamina B (Fig. 9b) es un fluoróforo que tiene emisión máxima en el intervalo del rojo (580-650 nm) y que es ampliamente utilizado debido a su alta solubilidad en agua y otros disolventes polares. En este trabajo se utilizó debido a su habilidad para unirse a zonas cargadas negativamente de la proteína a través de interacciones electrostáticas y gracias a ello, poder identificar la localización de dicha proteína.

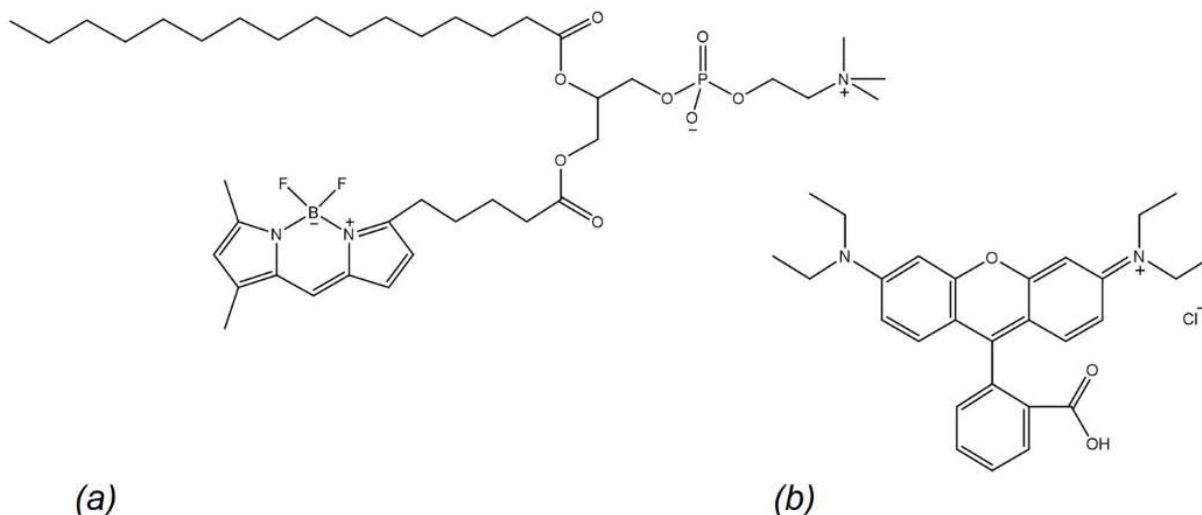


Figura 9. Estructura de las sondas fluorescentes (a) β -BODIPY FL C₅-HPC y (b) Rodamina B, utilizadas en el marcaje fluorescente dual de proteoliposomas.

4.2.8 Microscopía confocal de fluorescencia

Una alícuota de 5 μ L de liposomas o proteoliposomas recién preparados se colocó en un portaobjetos de vidrio (100 x 300 mm) y se cubrió con un cubreobjetos (102 x 76 mm) sellando con barniz de uñas común. Las muestras fueron analizadas por microscopía de barrido confocal de fluorescencia en un microscopio Leica TCS SP5 X (*Leica Microsystems, Germany*) [84] utilizando un láser de excitación ajustado a 494 nm y un intervalo de 501-543 nm de emisión para la detección de la señal verde de la sonda lipofílica (BODIPY FL C₅-HPC) y un láser de excitación ajustado a 554 nm con un intervalo de 588-648 nm de emisión para la detección de la señal roja de la sonda hidrofílica (Rodamina B). Para obtener la imagen reconstituida de las vesículas en tres dimensiones, se tomaron micrografías a lo largo de la mitad de una vesícula (z-scans) en incrementos de 0.3-0.49 μ M (de zoom electrónico acumulado). Las micrografías fueron combinadas utilizando el programa LAS AF lite v4.3 (*Leica Microsystems, Germany*).

4.3 MÉTODOS ESPECÍFICOS PARA EL ESTUDIO DE LA DESHIDRATASA DE *Lactobacillus plantarum*

4.3.1 Purificación de la proteína nativa

Las proteínas solubles obtenidas previamente en el sobrenadante después de la ultracentrifugación fueron fraccionadas por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ encontrándose actividad de deshidratasa en la fracción de 75-100% de saturación. El precipitado fue colectado por centrifugación (15,000xg, 25 min, 4°C) y dializado contra amortiguador bis-tris 100 mM a pH 6.0, 50 mM NaCl, 1 mM DTT 1 mM PMSF con una membrana de tamaño de corte de 14 kDa. Posteriormente, la fracción se sometió a cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna POROS HQ/H (4.6 mm x 100 mm, *Life Technologies, USA*) en sistema HPLC (*HP Agilent 1100 series, Agilent Technologies, Germany*) equilibrado con amortiguador bis-tris 100 mM a pH 6.0 y 50 mM de NaCl. El volumen de inyección fue de 1 mL y la elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de 0.05–1.0 M de NaCl a un flujo de 1.6 mL/min. Todas las fracciones se colectaron y se evaluó la actividad de deshidratasa. Una vez identificada, dicha fracción activa fue sometida a una segunda cromatografía de intercambio aniónico en una columna BIO IEX/WAX (5µm, 4.6 mm x 250 mm, *Agilent Technologies, USA*), en el mismo sistema HPLC. La columna fue equilibrada con amortiguador bis-tris 100 mM a pH 6.0 con 0.3 M de NaCl. El volumen de inyección fue de 1 mL y la elución se llevó a cabo con un gradiente escalonado de 0.30–0.70 M NaCl y 0.70–1.0 M NaCl. Las fracciones fueron eluidas con el mismo amortiguador, a flujo de 1.6 mL/min, colectadas y analizadas enzimáticamente en cuanto a la formación de 9-cis-11-trans-ALC. Finalmente, una vez obteniendo la proteína pura, se dializó en amortiguador bis-tris 100 mM a pH 6.0 y 500 mM NaCl para realizar la caracterización bioquímica.

4.3.2 Análisis de la secuencia de aminoácidos

Después de obtener la proteína pura, se determinó la secuencia de aminoácidos mediante la identificación de los péptidos resultantes de la proteólisis con tripsina. Dicho análisis fue realizado por el *Proteomics Consortium* de la Universidad de Arizona. A continuación se describe la metodología completa.

La proteína inicialmente, fue sometida a una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de

Coomassie R-250. Se cortó una de las bandas la cual fue digerida en gel con tripsina (10 µg/mL) e incubada a 37°C durante una noche. Los péptidos obtenidos fueron analizados por nano-cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) [85] utilizando un espectrómetro de masas modelo LTQ Orbitrap Velos (*Thermo Fisher Scientific, USA*) equipado con un nano-electrospray (ESI) como fuente de ionización (*Advion, USA*). Posteriormente, los péptidos fueron montados en una precolumna C18 (2 cm x 100 µm) y eluidos en una columna analítica C18 (10 cm x 75 µm) con un flujo de 400 nL/min con un gradiente escalonado de 5–10% de acetonitrilo adicionado con 0.1% ácido fórmico (5 min), 10–35% (30 min), 35–50% (20 min), 50–95% (5min) y 95% durante los últimos 5 min. Se realizó la espectrometría de masas en tándem de los péptidos cuyos iones fueron suficientemente intensos. Posteriormente se realizó una búsqueda de todos los espectros MS/MS de los péptidos dentro de la base de datos de proteínas pertenecientes a *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 usando el software Thermo Proteome Discoverer v1.3 (*Thermo Fisher Scientific, USA*). Adicionalmente se agregaron a la base de datos, las proteínas contaminantes más comunes como la queratina, resultando en una base de datos compuesta de 12,502 secuencias. De igual forma se consideraron las modificaciones variables que pueden tener las proteínas como la oxidación de metioninas (15.995 Da) y la carbamido-metilación de cisteínas (57.021 Da).

Las proteínas y péptidos fueron identificadas con un 99% de confianza [86] y visualizados utilizando el software Scaffold v 3.6.1 (*Proteome Software Inc., USA*), el cual está basado realiza búsquedas en varios servidores (Sequest, X!Tandem y MASCOT) y utiliza estadística Bayesianas para identificar la relación m/z de los péptidos de forma fidedigna [87]. La identidad de la proteína fue aceptada como correcta una vez que se identificó al menos el 95% de la secuencia de cada uno de los péptidos (al menos dos) con una confianza del 99%.

4.3.3 Especificidad de sustrato y prueba de actividad de deshidratasa

Cada reacción se llevó a cabo por triplicado y consistió en colocar en un tubo con tapa de rosca, 5 mL de amortiguador de fosfatos de potasio 20 mM a pH 6.5 y 5.0 mg de 10-HOE (sección 4.2.5) o bien 19.8 mg de AL como sustratos emulsificados con Tween 80 al 0.25% (p/v). A esta mezcla se le adicionaron 500 µL de extracto proteico soluble o bien de deshidratasa pura (0.5 mg/mL) y 100 µL de extracto proteico membranal o bien de hidratasa pura (0.1 mg/mL). La reacción se inició incubando los tubos a 30°C durante 24 h y agitación orbital a 200 rpm. De igual forma, se llevaron a cabo dos experimentos control que consistieron

en a) un tubo con todos los componentes descritos excepto el sustrato (AL o 10-HOE) y b) todos los componentes descritos excepto el extracto proteico. Después de la incubación, los ácidos grasos se extrajeron de la mezcla de reacción adicionando 4 mL de hexano y posteriormente realizando dos ciclos de congelamiento-descongelamiento (-20°C y 6°C respectivamente) seguido de centrifugación (3,500xg, 40 min, 4°C) para así, mejorar el rompimiento de la emulsión de ácidos grasos y obtener mayor rendimiento de lípidos extraídos en la fase orgánica [77]. Esta fase fue separada de la fase acuosa y lavada primero con 1 mL de solución saturada de NaCl y posteriormente con 2 mL x 2 de H₂O desionizada (18 mΩ*cm). Finalmente se secó durante una noche mediante la adición de Na₂SO₄ anhidro y después se filtró a través de papel Whatman 2. Los ácidos grasos se metilaron y analizaron por cromatografía de gases (sección 4.3.4) para determinar cuantitativamente la producción de 9-*cis*-11-*trans*-ALC a partir de los diferentes sustratos.

4.3.4 Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases

El hexano se evaporó utilizando un baño de agua a 40°C bajo condiciones no oxidantes utilizando una corriente de N₂. Posteriormente, los ácidos grasos secos se metilaron agregando 2 mL de H₂SO₄ al 1% (v/v) en metanol e incubando a 35°C durante 30 min con agitación orbital a 200 rpm [78, 79]. Los derivados metilados fueron extraídos con hexano, neutralizados con 1 mL de solución saturada de NaHCO₃ y dos lavados con 2 mL de H₂O desionizada (18 mΩ*cm). Por último, se agregó Na₂SO₄ anhidro para secar la fase orgánica y se evaporó nuevamente el disolvente.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron separados, identificados y cuantificados utilizando una columna capilar de polaridad intermedia SP-2560 (75 m x 0.18 mm x 0.14 m d_i) (SUPELCO, Sigma-Aldrich, USA) utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 6890 (Agilent Technologies, USA) acoplado a un detector FID (240°C). El volumen de inyección fue de 1 µL con un split 1:50 y se utilizó un programa a 180°C durante 35 min. La elución se llevó a cabo con H₂ a un flujo constante de 1.8 mL/min. La identificación de AL y 9-*cis*-11-*trans*-ALC se realizó por comparación de tiempos de retención de un estándar comercial de cada compuesto. La cuantificación de 9-*cis*-11-*trans*-ALC formado enzimáticamente se calculó a partir de la integración y normalización de áreas de los picos cromatográficos, en µg.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La biohidrogenación de ácidos grasos polinsaturados, como el ácido linoleico (AL), es un mecanismo desintoxicante de bacterias del género *Lactobacillus* en donde los dobles enlaces son hidrogenados enzimáticamente y producen derivados monoinsaturados cuya toxicidad es menor [16, 36, 39, 40] y así evitar la inhibición de la enoil-ACP reductasa y el rompimiento de membranas celulares [34, 35, 37, 38]. Este proceso permite la adaptación y supervivencia celular en ambientes enriquecidos con estos ácidos grasos.

Los primeros pasos de la biohidrogenación del AL en *Lactobacillus plantarum* involucran la hidratación de este ácido graso y su posterior deshidratación e isomerización (Esq. 4a) formando el isómero 9-*cis*-11-*trans* de ácido linoleico conjugado (ALC) (Fig. 1b) el cual es una molécula bioactiva y benéfica para el humano ya que inhiben la carcinogénesis, disminuyen la severidad de la arterosclerosis, reducen efectos adversos de la estimulación al sistema inmune y reducen la grasa corporal en varias especies animales [1-3, 8, 79].

Recientemente se ha propuesto que la formación de ALC en el género *Lactobacillus* y en específico, en *Lactobacillus plantarum*, ocurre a través de un complejo metabolismo en el que participan muchas proteínas que generan varios ácidos grasos como intermediarios (Esq. 4a) [41-43]. Las proteínas implicadas en este metabolismo no han sido estudiadas ni caracterizadas en su totalidad, así que la participación de otras proteínas que catalicen reacciones similares o equivalentes no puede ser descartada.

En este trabajo se estudiaron dos proteínas que en conjunto catalizan la formación del isómero bioactivo 9-*cis*-11-*trans*-ALC en dos pasos siendo el primero la hidratación del AL formando el ácido hidroxí-enoico 10-HOE el cual sufre una posterior deshidratación e isomerización concertada produciendo finalmente ALC.

5.1 ESTUDIOS DE LA ÁCIDO LINOLEICO HIDRATASA DE *Lactobacillus plantarum*

5.1.1 Purificación

La hidratasa (denominada en este trabajo como LPH) se purificó de forma nativa a partir de las membranas plasmáticas de *Lactobacillus plantarum* que contenían todas las proteínas

asociadas, tanto integrales como periféricas. Esto se realizó debido a que la actividad enzimática de AL hidratasa fue detectada únicamente en esta fracción y no en la fracción soluble. Posteriormente las proteínas membranales fueron extraídas y solubilizadas utilizando OTGP (sección 4.2.1), un tensoactivo neutro, que a concentraciones incrementadas gradualmente (4 mM y 6 mM) hasta alcanzar la concentración micelar crítica (9 mM) logró inducir la solubilización gradual y selectiva de los componentes membranales en un ambiente biomimético manteniendo la estabilidad de las proteínas en solución [76, 88]. El uso de un tensoactivo para solubilizar proteínas de membrana depende de muchos factores tanto de la proteína como de la membrana y de la molécula de tensoactivo; el uso de otros tensoactivos como el Triton-114 y CHAPS inhibieron la actividad enzimática o bien, la disminuyeron como en el caso del n-octil- β -D-glucopiranosido.

Posteriormente, la purificación de LPH se logró mediante la eliminación de proteínas que precipitan al adicionar 1.5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seguida de una cromatografía de exclusión molecular (sección 4.2.1) en donde LPH tuvo un tiempo de retención de 2.46 min (Fig. 10).

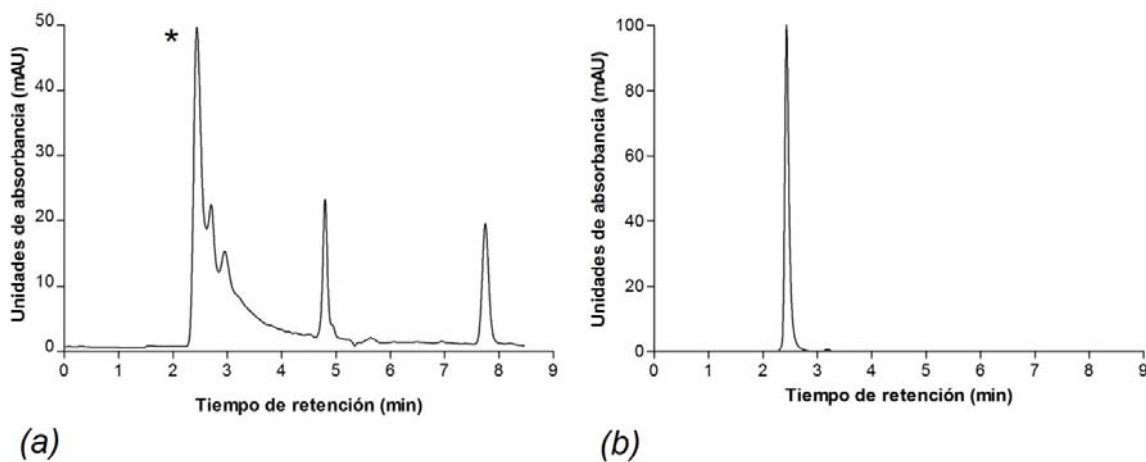


Figura 10. Purificación de la hidratasa de *L. plantarum* por cromatografía de exclusión molecular. (a) Extracto proteico resultante de la separación con 1.5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La primer fracción cromatográfica con tiempo de retención de 2.46 min (*), fue la única fracción con actividad enzimática. (b) Proteína purificada.

Mediante la construcción de la tabla de rendimiento de purificación (Tabla 3), se determinó que LPH fue purificada a partir de las membranas plasmáticas en tres pasos obteniendo un rendimiento del 8.5% y una actividad específica de 7.73×10^{-3} U/mg.

Tabla 3. Rendimientos de purificación de la hidratasa de *L. plantarum*.

Paso	Proteína (mg)	Actividad (U*)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Veces de purificación
Extracto membranal	7.07 x10 ³	0.645	9.12 x10 ⁻⁵	100	1
Precipitación diferencial con (NH ₄) ₂ SO ₄	3.11 X10 ³	3.64	1.17 x10 ⁻³	44	13
Cromatografía de exclusión molecular	603	4.67	7.73 x10 ⁻³	8.5	85

* Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de total de 10-HOE (μmol) producido por minuto, determinado por cromatografía de gases.

Se corroboró la pureza de LPH mediante electroforesis desnaturante en donde se observó una sola banda con una masa menor a 66 kDa (Fig. 11a); y mediante espectrometría de masas en donde se observó una sola especie con un ion molecular M⁺ = 64,748.86 m/z mientras que el ion M⁺² no fue detectado (Fig. 11b).

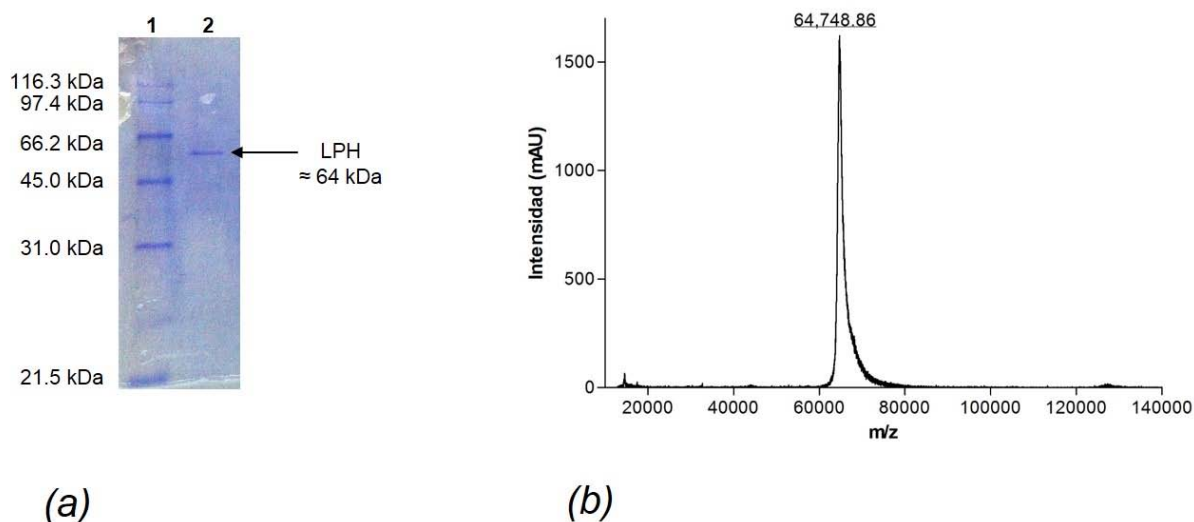


Figura 11. Caracterización de la masa molecular de la hidratasa de *L. plantarum* (LPH) (a) Electroforesis en condiciones desnaturantes en gel de poliacrilamida al 8% (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie R-250. Carril 1: marcadores de masa molecular y carril 2: proteína purificada. (b) Espectrometría de masas MALDI-TOF (*Microfelx LT, Bruker Daltonics Corp., Germany*).

A partir de este experimento se determinó que la masa molecular exacta de la proteína es de 64.7 kDa (Fig. 11b), lo cual concuerda con el valor calculado que se basa en la secuencia de 569 aminoácidos (GenBank: CBY45494.1) reportada previamente por Yang et al (Yang, 2013). Por otro lado, se observó que la proteína presenta oligomerización en solución y por medio de un experimento de cromatografía de exclusión molecular (sección 4.2.2), se determinó que LPH existe como un homotrímero con masa molecular de 215 kDa (Fig. 12). Este resultado es diferente a los reportados sobre las hidratasas recombinantes de *Lactobacillus acidophilus* (LAH) y *Macrococcus caseolyticus* (MCH) que fueron caracterizadas como homodímeros [45, 49].

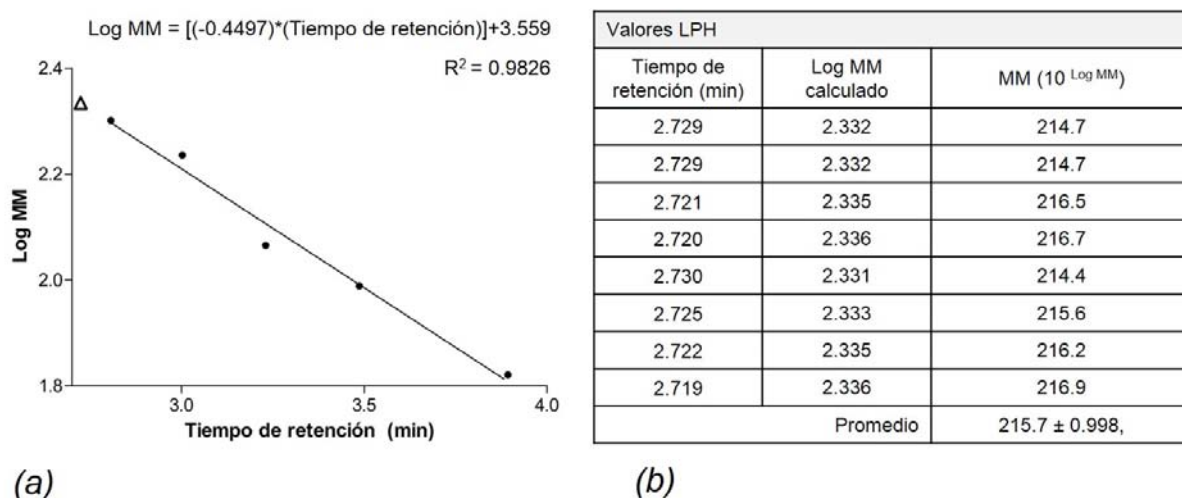
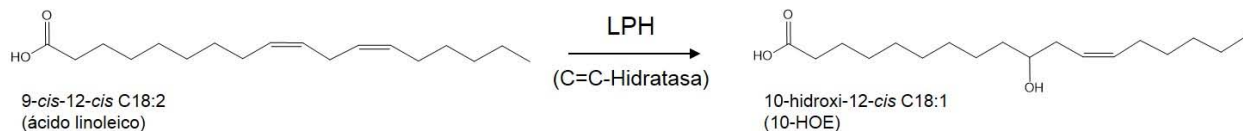


Figura 12. Determinación del estado oligomérico de la hidratasa de *L. plantarum* en solución. MM se refiere a la masa molecular (kDa). (a) Las proteínas de referencia se indican como círculos negros, mientras que la extrapolación de la proteína (LPH) se indica como un triángulo. (b) Tiempos de retención obtenidos experimentalmente y cálculo de la MM del trímero. En la gráfica se muestra el promedio de cada medición y la desviación estándar.

5.1.2 Actividad enzimática y análisis del producto de reacción

La actividad enzimática catalizada por la ácido linoleico hidratasa de *Lactobacillus plantarum* (LPH), está descrita por la siguiente reacción en la que se produce el ácido hidroxienoico 10-HOE:



Esquema 8. Hidratación del ácido linoleico catalizada por la hidratasa de *L. plantarum*.

Debido a que este ácido no se encuentra disponible comercialmente como estándar, se tuvo que aislar y caracterizar esta molécula a partir de una mezcla de reacción previamente catalizada por un extracto de LPH, y así poder determinar su tiempo de retención en el análisis por cromatografía de gases. Inicialmente, los ácidos grasos formados se aislaron y derivatizaron (sección 4.2.4) obteniendo los ésteres metílicos los cuáles posteriormente se purificaron por cromatografía líquida (Fig. 13) (sección 4.2.5) colectando las dos fracciones desconocidas que eluyeron a 9.67 y 14.68 min.

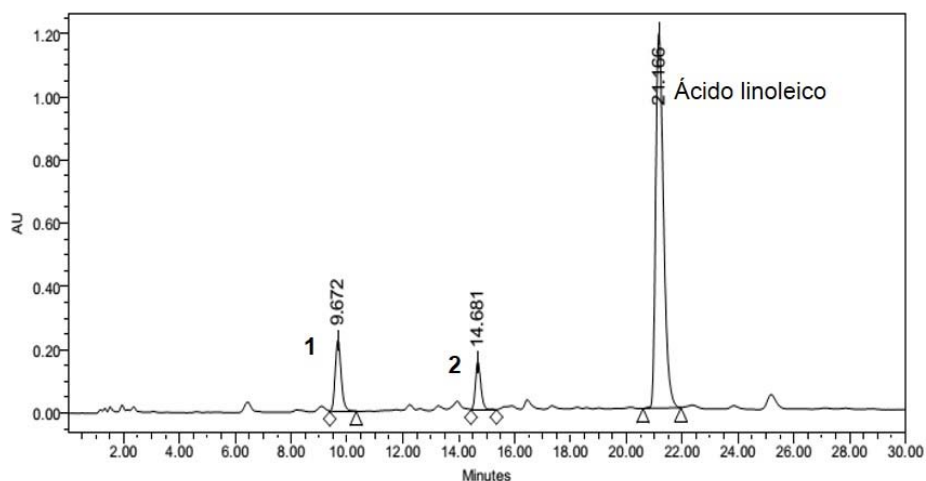


Figura 13. Purificación de los productos de hidratación del ácido linoleico por cromatografía líquida en fase reversa. Las fracciones desconocidas 1 y 2 se colectaron para su posterior análisis por espectrometría de masas, mientras que el tiempo de retención del ácido linoleico (21.16 min) se identificó mediante el análisis de un estándar bajo las mismas condiciones.

Después del análisis por espectrometría de masas (sección 4.2.5), se obtuvo que la fracción 1 correspondía a la molécula de 10-HOE, la cual se identificó mediante el patrón de fragmentación (Fig. 14) en donde se observa el pico base a 169 m/z (Fig. 14a) debido a la fragmentación en C 12-13 que pertenece al doble enlace (fragmentación característica de ácidos grasos Δ^9) (Fig. 14b); también se observan los picos a 201 y 98 m/z que indican el rompimiento debido al grupo hidroxilo en C 10 [44, 45].

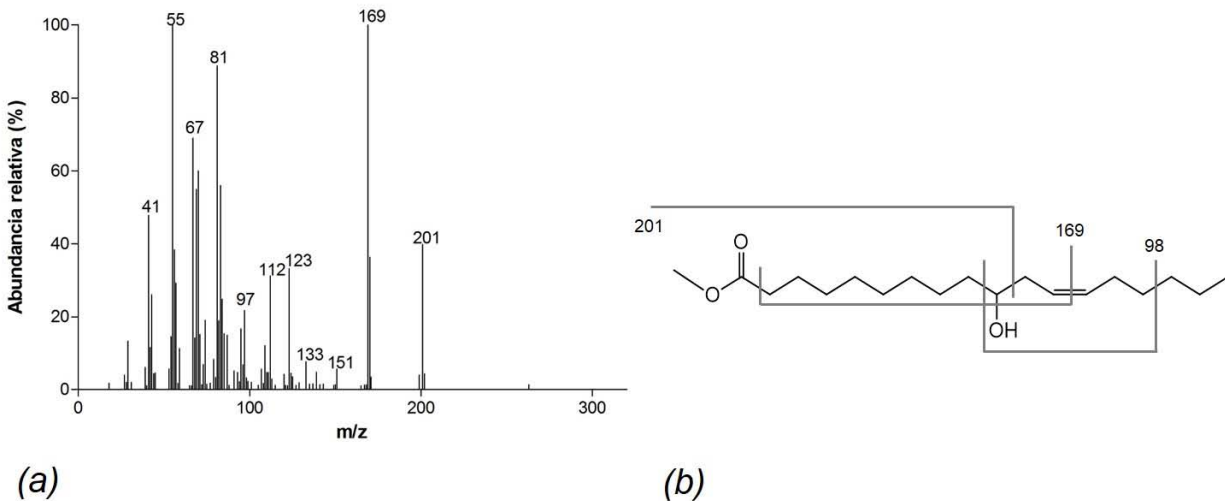


Figura 14. Identificación del ácido 10-hidroxi-12-*cis*-octadecenoico por espectrometría de masas. (a) Espectro de masas del ácido graso purificado y (b) representación de su patrón de fragmentación.

Estos resultados confirman la identidad de la molécula de 10-HOE como el producto de reacción y permiten identificar inequívocamente a la proteína purificada como una AL hidratasa. Finalmente, se analizó la molécula de 10-HOE purificada por cromatografía de gases (sección 4.2.4) en donde se determinó que tiene un tiempo de retención de 15.5 min (Fig. 15). De esta forma, se logró establecer la prueba de actividad de AL hidratasa por medio de la identificación y cuantificación de 10-HOE formado, utilizando el análisis por cromatografía de gases.

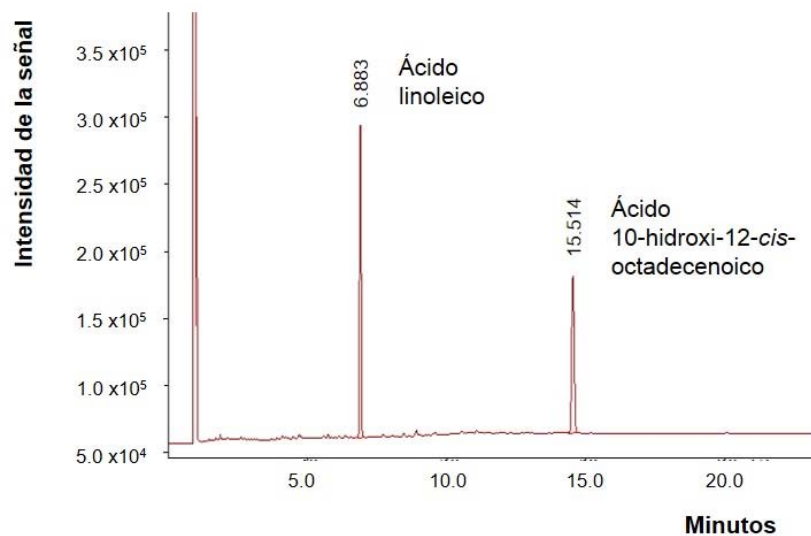


Figura 15. Cromatograma del producto de reacción enzimática de la hidratación del ácido linoleico.

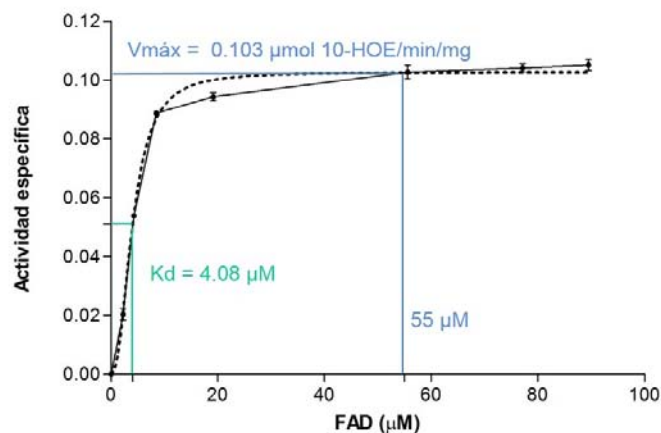
5.1.3 Determinación de la concentración óptima de FAD

Las hidratasas que pertenecen a la familia de las MCRA son conocidas por ser proteínas FAD-dependientes, así que en este trabajo se analizó la dependencia de LPH hacia este cofactor incubando 100 μL de la proteína recién purificada con este cofactor a diferentes concentraciones (sección 4.2.6). Se determinó que la actividad aumenta inicialmente al aumentar la concentración de FAD hasta llegar a una meseta (Fig. 16b). Mediante el ajuste no lineal de datos con la ecuación de Hill (sección 4.2.6.) se calculó que la actividad máxima (0.10 μmol 10-HOE/min/mg) se alcanzó a una concentración de 55 μM del cofactor.

De acuerdo al análisis, también se determinó que la molécula de FAD se une a LPH de un modo cooperativo ($n = 2.3$) y que tiene una constante de disociación aparente (K_d) de 4.1 μM ; un valor muy similar a lo observado en las hidratasas de *Macrococcus caseolitycus* (MCH) y *Elizabethkingia meninoseptica* (EMH) de las cuales se reportan valores de K_d alrededor de 10 y 70 μM respectivamente [46, 49]. Finalmente se identificó que LPH es una hidratasa FAD-dependiente ya que la ausencia de este cofactor causó la inhibición de la actividad enzimática (Fig.16). El papel que tiene este cofactor tanto en la actividad enzimática como en la estabilidad estructural de la proteína se discute más adelante en la sección 5.1.7.

Concentración de FAD (μM)	Actividad específica de LPH
0.00	$0.0 \pm 0.1 \times 10^{-3}$
2.25	$20.3 \pm 1.9 \times 10^{-3}$
4.28	$53.08 \pm 0.4 \times 10^{-3}$
8.44	$88.7 \pm 0.8 \times 10^{-3}$
19.17	$94.3 \pm 1.3 \times 10^{-3}$
55.58	$102.7 \pm 2.3 \times 10^{-3}$
77.13	$104.1 \pm 1.3 \times 10^{-3}$
89.50	$105.1 \pm 1.8 \times 10^{-3}$

(a)



(b)

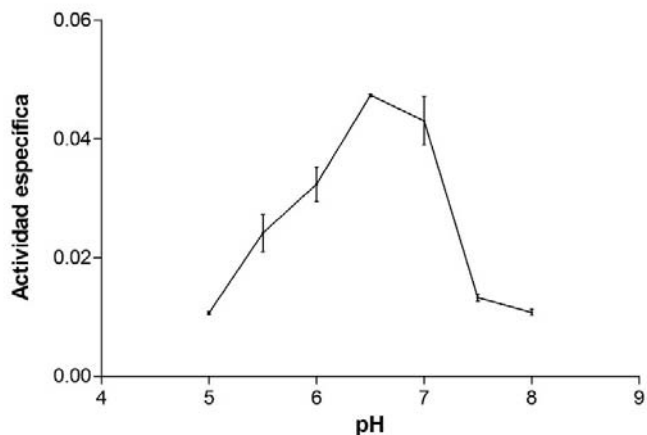
Figura 16. Efecto de la concentración de FAD sobre la actividad de la hidratasa de *L. plantarum*. (a) Valores experimentales de la actividad específica (μmol 10-HOE/min/mg) \pm la desviación estándar y (b) ajuste no lineal con la ecuación de Hill.

5.1.4 Efecto del pH en la actividad y estabilidad

Se evaluó el efecto de la variación del pH en la actividad de AL hidratasa obteniéndose que la máxima producción de 10-HOE ocurre a pH 6.5 y 7.0 (Fig. 17). El pH fue modificado desde 5.0 hasta 8.0 utilizando amortiguador de acetato de sodio 50 mM (pH 5.0 y 5.5), amortiguador bis-tris 50 mM (pH 6.0, 6.5 y 7.0) y amortiguador tris 50 mM (pH 7.5 y 8.0).

pH	Actividad específica de LPH
5.0	$10.7 \pm 0.2 \times 10^{-3}$
5.5	$24.1 \pm 3.2 \times 10^{-3}$
6.0	$32.3 \pm 2.9 \times 10^{-3}$
6.5	$47.3 \pm 0.2 \times 10^{-3}$
7.0	$43.0 \pm 4.1 \times 10^{-3}$
7.5	$13.2 \pm 0.5 \times 10^{-3}$
8.0	$10.8 \pm 0.5 \times 10^{-3}$

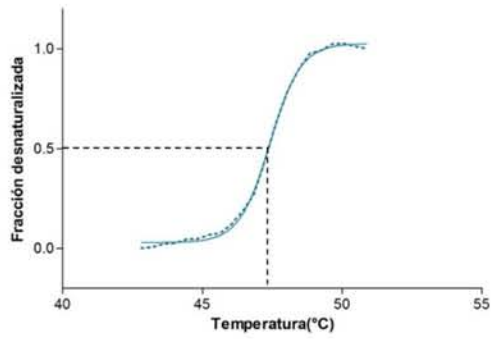
(a)



(b)

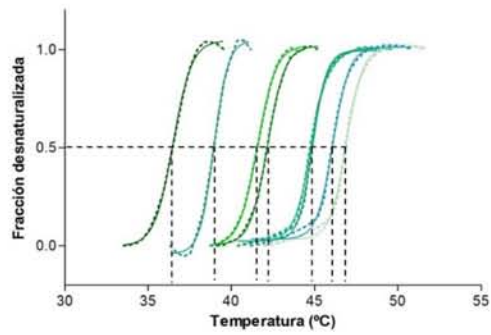
Figura 17. Efecto del pH en la actividad de la hidratasa de *L. plantarum* (LPH) (a) Valores experimentales de la actividad específica (μmol 10-HOE/min/mg) \pm la desviación estándar y (b) representación gráfica.

Por otro lado se analizó, mediante ensayos de termofluorescencia, el efecto de la variación tanto de los valores de pH, como de las sales amortiguadoras utilizando lactato de sodio-HCl, acetato de sodio-ácido acético, MES-NaOH, bis-tris-HCl, imidazol-HCl, fosfatos de sodio y potasio, HEPES-NaOH, tris-HCl, bicina-HCl, CHES-NaOH, glicina-NaOH y CAPS-NaOH (Anexo 1). Se encontró que la estabilidad térmica de LPH es dependiente tanto de la sal amortiguadora como del valor de pH. (Fig. 18).



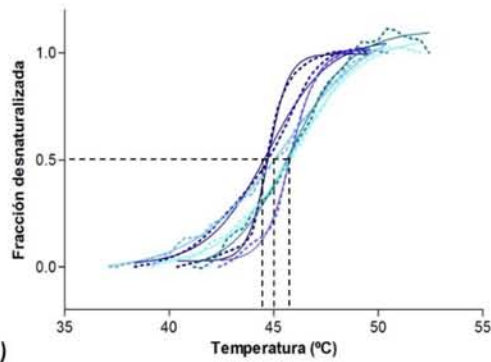
	Tm (°C)	R ²
LPH purificada (pH 6.5)	47.4	0.9989

(a)



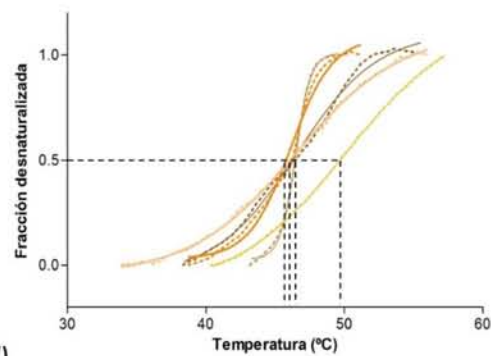
LACTATO DE SODIO / HCl (0.5 M)			
	pH	Tm (°C)	R ²
	2.4	36.5	0.9986
	2.8	38.9	0.9972
	3.2	41.6	0.9995
	3.6	42.2	0.9996
	4.0	44.8	0.9987
	4.4	44.9	0.9986
	4.8	46.91	0.9981
	5.2	46.11	0.9982

(b)



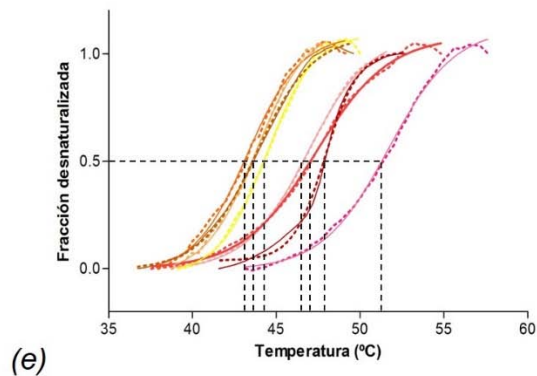
ACETATO DE SODIO / ÁC. ACÉTICO (0.5 M)			
	pH	Tm (°C)	R ²
	4.2	44.7	0.9982
	4.6	44.7	0.9962
	5.0	45.8	0.9982
	5.4	45.5	0.9982
	5.8	45.8	0.9943
	6.2	45.9	0.9980

(c)



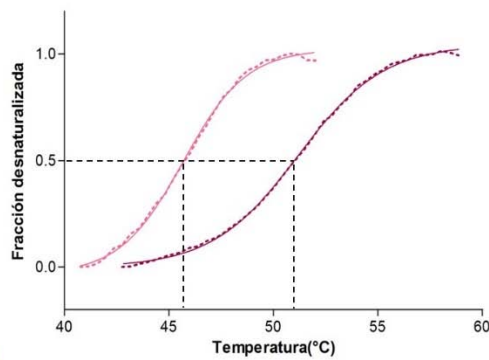
MES / NaOH (0.5 M)			
	pH	Tm (°C)	R ²
	4.6	46.6	0.9952
	5.0	46.5	0.999
	5.4	46.1	0.9919
	5.8	46.5	0.9993
	7.0	50.2	0.9998

(d)



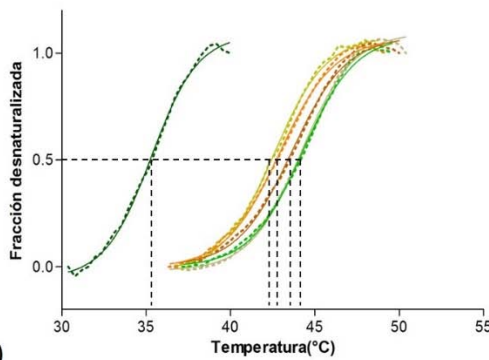
FOSFATOS (K_2HPO_4 / NaH_2PO_4) (0.5 M)			
	pH	Tm (°C)	R ²
	5.8	46.9	0.9998
	6.2	47.4	0.9986
	6.6	47.9	0.9967
	7.0	51.7	0.9975
	7.4	43.3	0.9959
	7.8	43.8	0.9973
	8.2	44.4	0.9975
	8.6	43.8	0.9983

(e)



BICINA / NaOH (0.5 M)			
	pH	Tm (°C)	R ²
	7.0	51.2	0.9994
	9.8	45.7	0.9983

(f)



GLICINA / NaOH (0.5 M)			
	pH	Tm (°C)	R ²
	8.2	44.2	0.9975
	9.0	35.3	0.9974
	9.4	42.6	0.9977
	9.8	43.6	0.9975
	10.2	44.3	0.9981
	11	42.9	0.9983

(g)

Figura 18. Efecto del pH y sales amortiguadoras en la termoestabilidad de la hidratasa de *L. plantarum*. Los diferentes valores de Tm (°C) se calcularon en el punto de inflexión (línea negra de guiones) del intervalo de transición térmica de la proteína (líneas punteadas), utilizando el ajuste sigmoideal de Boltzmann (línea continua). Se indica el valor correspondiente del coeficiente de determinación (R²) del ajuste. Desnaturalización térmica de la proteína (LPH) en distintos amortiguadores: (a) LPH control (b) lactato de sodio (c) acetato de sodio, (d) MES (e) fosfatos de Na y K (f) bicina (g) glicina.

En general, las soluciones amortiguadas con lactatos, acetatos, MES, fosfatos y glicina, en un rango amplio de pH, tienden a evitar la agregación de LPH, lo cual se traduce en trazas

bien definidas. En contraste, los amortiguadores de bis-tris, imidazol, HEPES, tris, CHES y CAPS no resultaron en traza alguna, lo que indica agregación de la proteína y por lo tanto no son condiciones consideradas para aumentar la estabilidad de la proteína. Por otro lado, el valor de T_m de LPH recién purificada en amortiguador de fosfatos de potasio 10 mM a pH 6.5, es de 47.4°C (Fig. 17a), así que se identificaron las condiciones que aumentaron este valor de temperatura y se consideraron como estabilizantes de la proteína. Se encontró que el valor de T_m aumenta entre pH 6.2 y 7.0, obteniendo máxima termoestabilidad a pH 7.0 donde la T_m aumenta hasta 50.2°C en amortiguador de fosfatos (Fig. 17e) y 51.2°C en amortiguador de bicina (Fig. 17f). A valores por debajo de 6.0 y 5.0, la T_m disminuye entre 1 y 2°C aproximadamente, mientras que a valores por debajo de 5.0, la variación es mayor disminuyendo hasta 10°C. De igual forma, la termoestabilidad disminuye hasta 43°C a valores de pH por encima de 7.0. Finalmente, se pudo identificar que el amortiguador de fosfatos de sodio y potasio, arrojó los mejores datos de termoestabilidad en un intervalo de pH de 5.8 a 8.6 debido a que la variación de los valores de T_m fue la menor (7°C).

En conclusión, la estabilidad térmica y la actividad de LPH son óptimas a pH 7.0. Valores de pH ácidos por debajo de 6.5 permiten que haya actividad enzimática pero con rendimientos menores pero disminuyen bastante la estabilidad térmica de la proteína mientras que las condiciones de menor actividad y estabilidad se presentan a valores básicos de pH por encima de 7.5.

5.1.5 Efecto de aditivos en la estabilidad

También se analizó la estabilidad de LPH en presencia de diferentes aditivos (Anexo 1) por medio de termofluorescencia (sección 4.1.5). Se encontró que $MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, n-dodecil- β -D-maltósido, polietilen glicol 400 y etanol fueron los únicos aditivos que incrementaron la estabilidad de la hidratasa (Fig. 19).

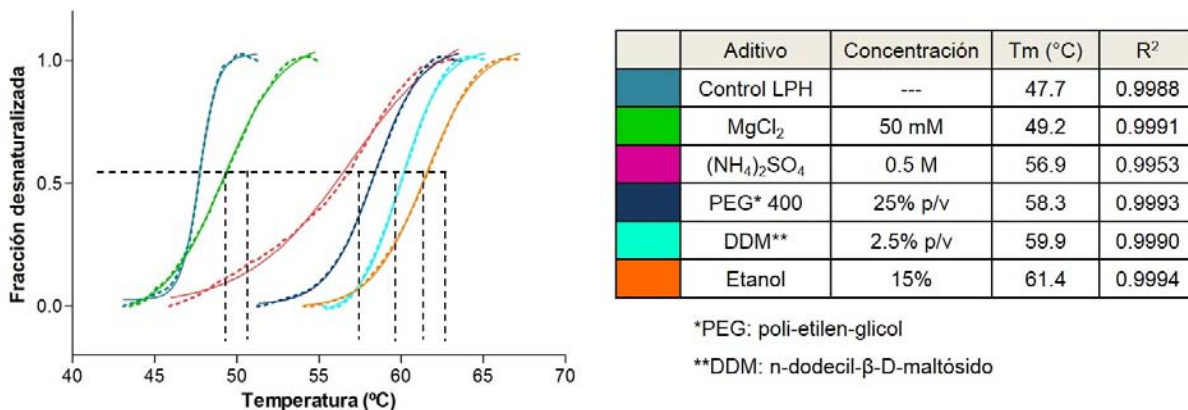


Figura 19. Efecto de aditivos en la termoestabilidad de la hidratasa de *L. plantarum*. Los diferentes valores de Tm (°C) se calcularon en el punto de inflexión (línea negra de guiones) del intervalo de transición térmica de la proteína (líneas punteadas), utilizando el ajuste sigmoide de Boltzmann (línea continua). Se indica el valor correspondiente del coeficiente de determinación (R²) del ajuste.

El papel estabilizante del MgCl₂ puede deberse a que el ión Mg²⁺ establece coordinaciones con aminoácidos como Glu, Asp o His que se encuentren en zonas desestructuradas de LPH como asas, aumentando la rigidez estructural y en consecuencia la estabilidad térmica. Por otro lado el efecto estabilizante del (NH₄)₂SO₄ puede deberse al papel del anión SO₄²⁻ dentro del fenómeno Hofmeister, en donde es sabido que la unión directa ión-proteína (sobre todo a concentraciones por encima de 100 mM) tiene consecuencias estabilizantes por aumento de la tensión superficial y la inducción de agregación soluble y reversible [89, 90]. Este incremento de estabilidad se verificó indirectamente durante el proceso de purificación ya que al agregar (NH₄)₂SO₄ hasta una concentración final de 1.5 M, LPH permaneció soluble, lo que permitió separarla de las proteínas que precipitan a esta concentración de sal. Finalmente el efecto del tensoactivo n-dodecil-β-D-maltósido, el polietileno glicol 400 y etanol es muy similar en cuanto a que los tres compuestos seguramente se alojan en regiones hidrofóbicas de la membrana, evitando así la interacción proteína-proteína y aumentando la estabilidad térmica de LPH.

5.1.6 Construcción del modelo estructural

La estructura tridimensional de la hidratasa de *Lactobacillus plantarum* (LPH) no ha sido reportada hasta la fecha por ningún método experimental. En este trabajo, se propone una estructura tridimensional calculada y construida a través de modelado por homología (sección 4.1.6) basado en la secuencia de aminoácidos (código GenBank: CBY45494.1) en combinación

con la estructura cristalográfica de la hidratasa de *Lactobacillus acidophilus* (LAH; código PDB: 4IA5) debido a que comparten 32% de identidad en la secuencia de aminoácidos.

Una vez generado y validado el modelo estructural de LPH (Fig. 20), se analizó utilizando el servidor DIAL [91] por el cual se identificaron 3 dominios conectados de manera compleja: el dominio 1 de color azul medio en la figura 20 (residuos 1-50, 229-352 y 482-549), presenta un plegamiento mezclado α/β compuesto de cinco hojas β paralelas que se encuentran entre tres hélices α en la parte interna y tres hojas β antiparalelas en la parte externa de la proteína. Este arreglo tridimensional es característico del plegamiento tipo Rossmann y es consistente con proteínas que unen dinucleótidos como FAD y NAD(P) [92], entre ellas LAH, EMH y PAI (códigos PDB: 4IA5, 4UIR y 2BAB respectivamente). El dominio 2 de color azul oscuro en la figura 20 (residuos 51-132, 209-228 y 353-481), también tiene un plegamiento mezclado α/β y consta principalmente de cinco hojas β antiparalelas rodeadas de varias hélices que se encuentran cercanas y tres hélices un poco más lejanas. Finalmente, el dominio 3 de color azul claro en la figura 20 (residuos 133-208 y 550-569) presenta únicamente plegamiento tipo α y corresponde al extremo carboxílico de la proteína.

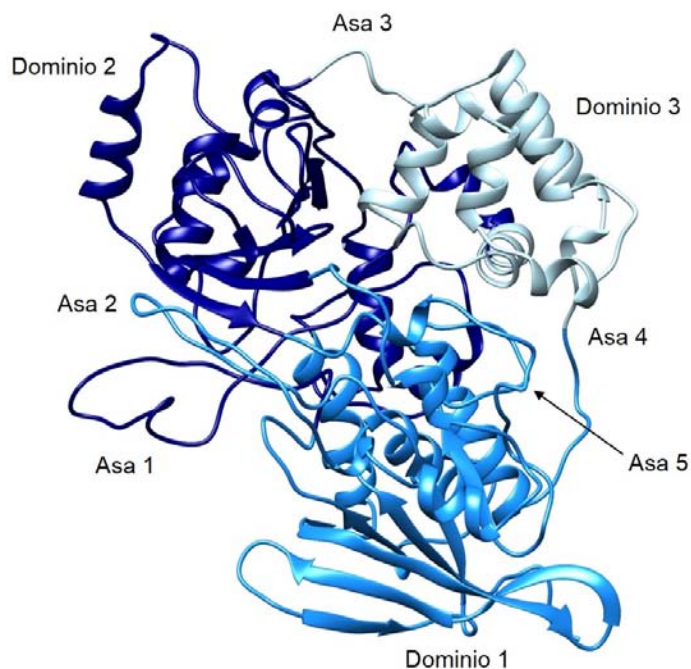


Figura 20. Estructura propuesta de la hidratasa de *L. plantarum*. Dominio 1 de color azul medio, dominio 2 de color azul oscuro y el dominio 3 de color azul claro. El asa 1 es la más grande y está compuesta de los residuos 42-87 localizándose a lo largo de la proteína desde el extremo izquierdo hasta el derecho. El asa 2 consta de los residuos 298-325, el asa 3 de los residuos 119-141, el asa 4 de los residuos 541-552 y finalmente el asa 5 consiste en los residuos 490-507.

Estructuralmente, LPH tiene mucha similitud con el plegamiento que poseen las hidratasas LAH y EMH (Fig. 21a) en cuanto a la disposición tridimensional y organización de los tres dominios, a excepción de zonas desestructuradas como las asas grandes, que mostraron una alta diferencia en términos de RMSD (Fig. 21b); sin embargo, la mayor diferencia radica en que LAH y EMH poseen dos hélices α adicionales que constituyen un cuarto dominio, el cual se encuentra ausente en la estructura de LPH.

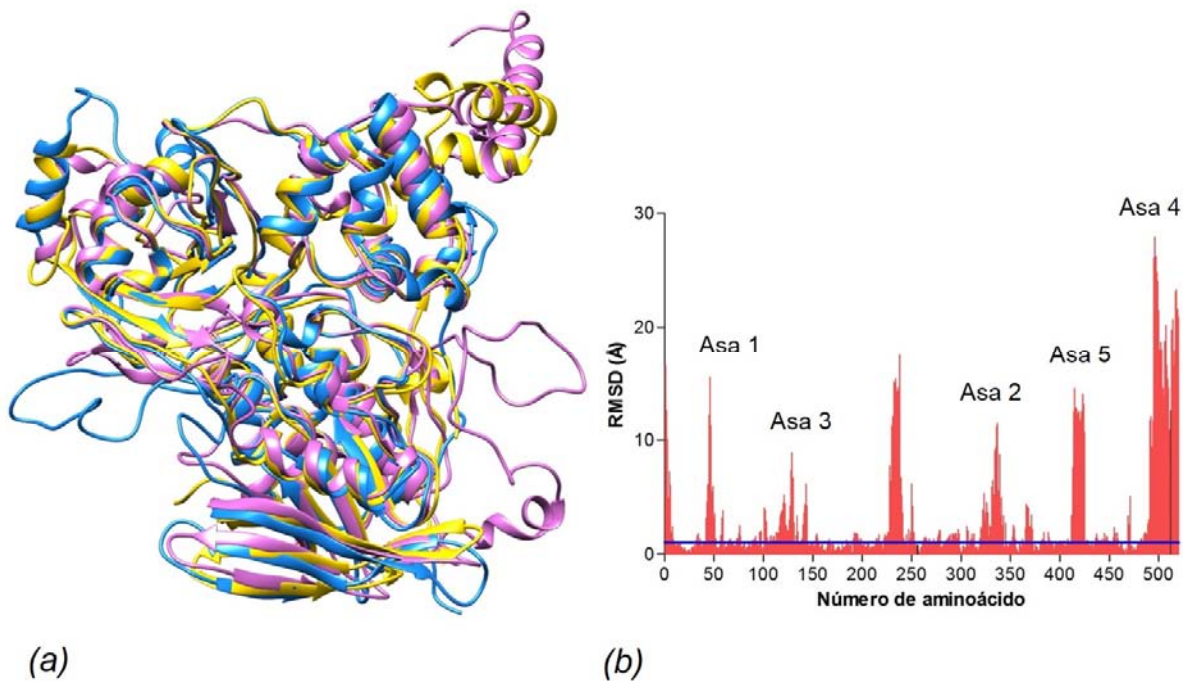


Figura 21. (a) Comparación estructural de las hidratasas de *L. plantarum* (azul), *L. acidophilus* (amarillo) y *E. meningoseptica* (morado) utilizando el programa UCSF Chimera v.1.9. (b) Distancia media en Å entre aminoácidos. El valor de RMSD se refiere a la desviación de la media cuadrática.

Mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos de LPH utilizando los servidores BLAST y Clustal W [93, 94] (Fig. 22) se determinó que LPH posee una identidad moderada con otras ácido graso hidratasas: 32% con *Lactobacillus acidophilus* (LAH), 31% con *Streptococcus pyogenes* (SPH) y *Elizabethkingia meningoseptica* (EMH), mientras que guarda un 30% de identidad con *Bifidobacterium breve* (BBH) y *Macrococcus caseolyticus* (MCH). Debido a esto, es muy probable que todas estas enzimas tengan un sitio de unión y/o catalítico muy parecido, así como un plegamiento conservado, tal y como se demostró en el caso de LPH, LAH y EMH.

```

LPH -----MGALFM 6
LAH -----MYYSNGNYEAFAD-----PKK-----PAGV 20
SPH --MISLCLTIQGGLEMYYSNGNYEAFAT-----PRK-----PEGV 33
MCH -----MYYSNGNYEAFAR-----PKK-----PEGV 20
BBH -----MYYSNGNYEAFAR-----PKK-----PAGV 20
EMH MNPITSKFDKVLNASSEYGHVNHPEPSSKEQQRNTPKSMPFSDQIGNYQRNKGIPVQSY 60

```

```

LPH VKSKAIMI GAGLSNMAAVYLIQDGHWDGKDI TFYG-VDMHGANDGGATTDFNEYWNKN 65
LAH DKKSAYI IGSGLAGLSTAVFLVRDAQMGKENTI HILEELPVAGGSLDGADRPNA----- 73
SPH DQKSAYIVGTGLAGLAAVFLIRDGHMAGERI HLFEEELPLAGGSLDGIKPHL----- 86
MCH DNKSAYLVGSGLASLAAASFLIRDGQMGKENTI HILEELDPLGGSLDGI LNPER----- 73
BBH DSKHAYI IGTGLAALSSACYLVRDQMPGDHIT HILEKDPVPGGACDGLDIPGL----- 73
EMH DNSKIYI IIGSGIAGMSAAYYFIRDGHVPAKNI TFLEQLHIDGGSLDGAGNPTD----- 113
. . . : * * * : : : * : * : * . . * : : * . *

```

```

LPH HPMANTTGYVARGGRMLNRYTYVDLMDLLDRIPSVTEPG-MTAAEDTRDFDAKHRTYDIA 124
LAH -----GFVVRRGGREMEN-HFECLWDMYRSPSLEVPG-ASYLDEYYWLDKEDPNSSNC 124
SPH -----GFVTRGGREMEN-HFECLWDMYRSPSLEIPG-ASYLDEFYWLDDKEDPNSSNC 137
MCH -----GYIMRRGGREMEN-HFECLWDLFRSVPSEVED-ASVLDEFYWLNKEDPNYSKC 124
BBH -----GYVMRRGGREMDN-HFEVMWDLFRSIPSIETEG-VSVLDEYYWLNKEDPNYSLC 124
EMH -----GYIIRGGREMDM-TYENLWDMFQDIPALEMPAPYSVLDEYRLLINDNSNYSKA 165
* : * * * * : : : * : * : : : : :

```

```

LPH RLM-QGGKGIINAGKLGFNKDRLLTKLIMPDSEETKLDNVSI AEFKDDPHMFQTNF 183
LAH RLIYNRGDRLPDGOYGLGKCA-NEIVKLIMTPEKE---IEGQTIEFFFSDE--FFKTNF 178
SPH RLIHKRGNRVDDGOYTLGKQS-KELIHLIMKTEES---LGDQTEIEFFFSDE--FFKSNF 191
MCH RVIENTRGQRLESOGKMTLTKKANKEIIQLCLMKEEQ---LNDVKISDVFSKD--FLDSNF 179
BBH RATKDLGKDAGLKGFGLSDKASMEIMKLFFTPDED---LYDKPI TDFFDDE--VLNSNF 179
EMH RLINNKEG-IKDFSKFGLNKMDQLAIRL LLLKNEE---LDDLTI EDYFSES--FLKSNF 219
* . * . . : : . : : * : . . . : . * : * . . . : * *

```

```

LPH WYMWETTFAFRQTSSAQELRRYMQMIYEFTQIEHLVGNRTRYNQFESMILPLIKYLQG 243
LAH WTYWSTMF AFEKWHSLAEMRRYAMRFIHHIDGLPDFTALKFNKYNQYESMVKPLLAYLKD 238
SPH WVYWATMFAFEKWHSAVEMRRYAMRFIHHIDGLPDFTS LKFNKYNQYDSMVKPIIAYLES 251
MCH WIYWKTMF AFEPWHSA MEMRRYLMRFIHHIGGLADFSALKFTKFNQFESLVMPLIEHLKA 239
BBH WLYWRTMF AFENWHSAL EMLKYIKRYIHHIGGLPDFSALRFTRYNQYESMILPMVKYLES 239
EMH WTFWRTMF AFENWHS LLEL KLYMHRFLHAIDGLNLDLSSLVFPKYNQYDFTVTPLRKFLQE 279
* * * * * . * * : * : : : : : . : . : : * * : * : . * :

```

```

LPH QGVT FIDNKIVKDWFQKDT P M Q D-----EITVTGL 273
LAH HGVT FEYDCHVKNVEVDHEGD-----SKI AK 264
SPH HDVDIQFDTKVT DI QVEQTAG-----KVKAK 277
MCH KNVTFEYGVTVKNIQVECSGE-----SKVAK 265
BBH HGVEFRYNTKVENVEFAIGGGDGPKREHTGVGQDTIQIKIATSGFFKRNPASTPTKKLAV 299
EMH KGVNIHLNLT LVKDLDIHINTEG-----KVVE 305
. : * : . * : : .

```

```

LPH VIEDAQTGETEEVEVEDEETAVIF TNGSIT DSA TMGDYNT P AP-----ENMDYGV SAS LWK 328
LAH KIVMTQNGKDKEIDLTHNDIVFVTNGSITESSTYGDQNT P AP-----ITNAKGDSWKLWE 319
SPH TIHMTVSGEAKAIELT PDDL VFVTNGSITESSTY GSHHEVAK-----PTKALGGSWNLWE 332
MCH AIDIVRRGNEESIPLTENDLVFVTNGSITESSTYGDNDTPAP-----PTSKPGGAWQLWE 320
BBH RIDV SQEGEKSSIDL TENDLVFITNGGCVENSTMG SQNSPAAW---NPDLPKGGGWD MWR 356
EMH GIITEQDQGEVKIPVGKNDYVIVITGSMTEDTFYGNKNTAPIIGIDNSTSGQSAGWKLWK 365
* * : : : : * : * . . . : * . . . . : * :

```

```

LPH KATERFYNLGT PDKFFND-RNASE VVSFTLTTKNHLFLNEIVRIT TQEPGNALNSFLSTT 387
LAH NLAKQDPAFGHPDVFENCLPERSWVSATATLENKKLAPYFERLTKRSL---YDGK VNTG 376
SPH NLAAQSDDFGHKPVFYQDLPAESWFSATATIKHPAIEPYIERLTHRDL---HDGK VNTG 389
MCH NLSTQCEEFNGPAKFKDLPEKSWFSATATTNKEVIDYIQKICKRDP---LSGRVTG 377
BBH RIAEQDPSFGHP EKFCSD- PNATKWSATVTTLDDEIPPYIQKICKRDP---FSGK VNTG 412
EMH NLAAKSEIFGKPEKFCSN-IEKSAWESATLTKPSALIDKLKEYSVNDP---YSGK VNTG 421
. : : : * * * . : : : * * * . : . . . . *

```

```

LPH      PITPLNQKDVNMSIVVHHQPHFTTQQPNETVLWGYFLYPRRQGEFVNKPYIKMTGKEMAQ 447
LAH      GIITIVDSNWELSFTHRQPHFKSQNPQIVVWIYALYSDTEGNYIKKRIVDCTGKEIAE 436
SPH      GIITITDSNWMSFAIHRQPHFKEQKENETTUVWIYGLYSNSEGNYVHKKIEECTGQEITE 449
MCH      GIVTVDDSNWQLSFTLNRQQQFKNQDDQVSVWIYALYSDERGERTNKTIVECSGKEICE 437
BBH      GIVTVQDSNWLMSWTLNRQQQFRDQPKDQLCVWVYGLFPDKPGNYVKKPMTTECTGEEICE 472
EMH      GIITITDSNWLMSFTCNRQPHFPEQDDVVLVWVYALFMDKEGNYIKKTMLECTGDEILA 481
          * . : : : * . : : * * * : : * * * : * : * . : * . * :
LPH      ELIGQLSKVDPGPGNIKDKKEKILDSIVNNIPVYMPYASALFNNRAKSDRPEVLPKHSTN 507
LAH      ELLYHLGVPESQISELASEE-----NMNTVPVYMPYITSYFMPRRDGDPRDVPVPEGSIN 490
SPH      EWLYHLGVPVDKIKDLASQE-----YINTVPVYMPYITSYFMPRVKGDPRKVIPDGSVN 503
MCH      EWLYHMGVPEEKISALAAE-----CNTIPSYMPYITAYFMPRKEGDRPLVVPHGSKN 489
BBH      EWLYHMGVPTDKIESLAKH-----HANTVPVMMPYITAFFMPRAAGDRPDVVPDGAVN 525
EMH      ELCYHLGI-EDQLENVQKN-----TIVRTAFMPYITSMFMPRAKGDPRVVPPEGCKN 532
          * : : . : . : . * * * : : * * . * * * * : . *
LPH      LAFTGEFAEQ-PYQMIFFTEQSAVRSGEIAAYHFAGVPMNDNLVKTPRYDKDKPDKTLLKATKK 566
LAH      LAFIGNFAESPTRDTVFTTEYSVRTAMEAVYLLNVDRG-VPEVFDSIYDIRQLLRAMY 549
SPH      LAFIGNFAESPSRDTVFTTEYSVRTAMEAVYSFLNGERG-IPQGFNSAYDIRELLKAFY 562
MCH      IAFIGNFAET-ERDTVFTTEYSVRTAMEAVYKLELVDRG-VPEVFASVYDVRILLHALSV 547
BBH      FAFLLQFAET-PRDTIFTTEYSMRTGMEAVYLLGVDRG-VPEVWGSVYDVRNLLNATVK 583
EMH      LGLVQGFVET-NNDVVFTMESSVRTARIAVYKLLNLNKQ-VPDINPLQYDIRHLLKAAT 590
          : : * : * . * : : * * : : * : . * . * : : * : * * *
LPH      MFD----- 569
LAH      MSDKKKLADQDMP-----LPEKLAVKTGMRKIKKTWVEELLKEANLV----- 591
SPH      LNDKKAIKDMDLP-----IPA-LIEKIGHKKIKDTFIEELLKCANLM----- 603
MCH      LNDGKKLDEIDMP-----FYERLVEKRLKASGTFIEELLEANLI----- 589
BBH      LRDGAPVTDMKLN-----FIEKAVVKKVLKLDGTDIATLLREYHVI----- 625
EMH      LNDDKPFVGEGLLRKVLKGTYFEHVLPAAGAAEEEEHESFIAEHVNFREWVKGIRG 646
          : *

```

Figura 22. Alineamiento de la estructura primaria de las hidratasas de *L. plantarum* (LPH; código GenBank: CBY45494.1), *L. acidophilus* (LAH; código GenBank: AJP46084.1), *S. pyogenes* (SPH; código GenBank: ACI60731.1), *M. caseoyticus* (MCH; código GenBank: BAH16783.1), *B. breve* (BBH; código GenBank: ADY18551.1) y *E. meningoseptica* (EMH; código GenBank: 859066224). El dominio de unión a FAD de LPH se encuentra resaltado en color amarillo mientras que los residuos conservados en dicho dominio para todas las hidratasas, están resaltados en verde.

5.1.7 Análisis estructural del sitio de unión a FAD

Experimentalmente, se demostró que LPH es una proteína FAD-dependiente y que este cofactor de forma cooperativa, al igual que las demás ácido graso hidratasas pertenecientes a la familia de las MCRA [45, 46]. El dominio de unión a FAD había sido previamente denominado únicamente como un grupo de 47 residuos desde la Met6 hasta la Gly52 [44], sin embargo, en este trabajo se propuso el sitio de unión a FAD mediante ensayos de acoplamiento molecular (Fig. 23) utilizando el modelo estructural de LPH previamente generado y encontrando el sitio de interacción más favorable de acuerdo a diferentes factores energéticos (sección 4.1.6).

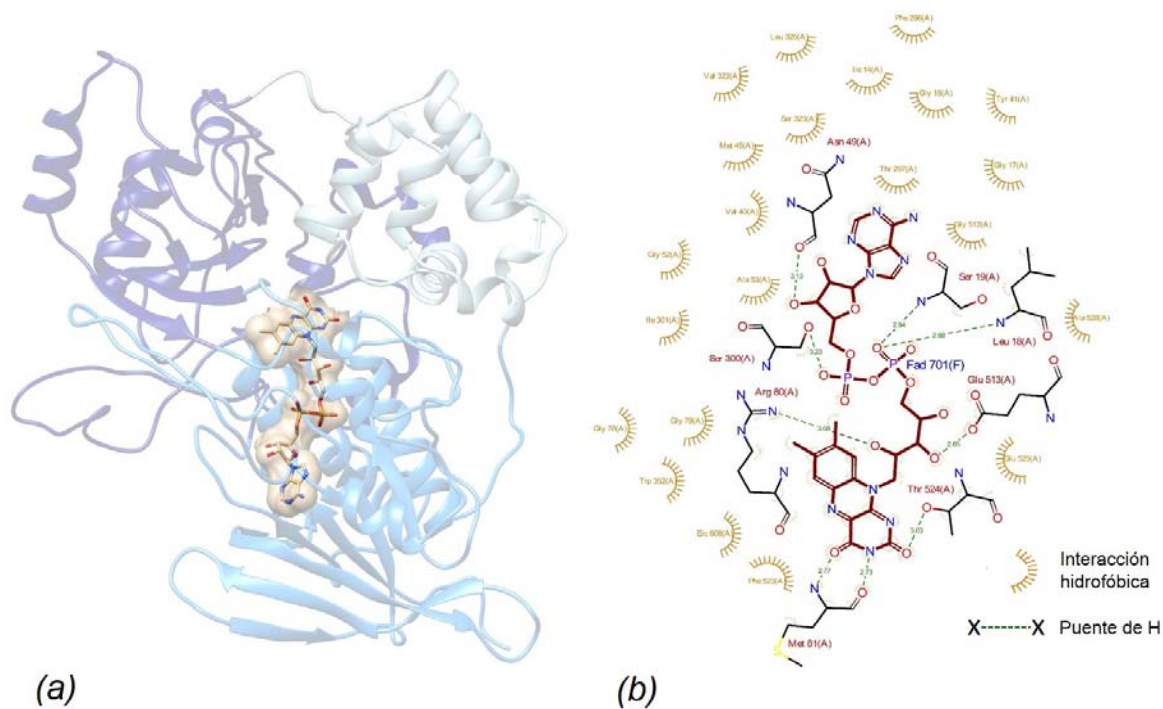


Figura 23. (a) Identificación del sitio de unión de FAD en la hidratasa de *L. plantarum*. Dicho sitio se encuentra entre los dominios 1, 2 y 3. (b) Análisis de aminoácidos que establecen contacto directo con la molécula de FAD utilizando el programa LigPlot+.

Se identificó que el FAD se localiza en una cavidad entre los dominios 1, 2 y 3 (Fig. 23a) estableciendo puentes de hidrógeno con la cadena principal de los residuos Leu18, Ser19, Asn49, Arg80, Met81, Ser300, Glu513 y Thr524, mientras que el resto de los residuos establecen interacciones hidrofóbicas (Fig. 23b). Mediante este análisis estructural, junto con el alineamiento de la secuencia de aminoácidos (Fig. 22), dieciocho aminoácidos fueron añadidos al dominio de unión a FAD (65 residuos en total), de los cuales Gly15, Gly17, Gly52, Gly78, Gly79, Arg80, Met81, Thr297, Gly512, Phe523 y Thr524 están conservados en el dominio de unión a FAD de todas las hidratatas (Fig. 22). Adicionalmente, se identificó que dicho dominio en LPH tiene el motivo característico GxG(x)₉L(x)₁₇₋₂₃G a partir de Gly15, que es consistente con plegamientos tipo Rossmann que unen FAD y NAD(P) como cofactores [92].

5.1.8 Análisis estructural de los sitios de unión al sustrato

Experimentalmente, se demostró que LPH tiene como sustrato una molécula de ácido linoleico (AL) sobre la cual cataliza la hidratación de los C 9-10, produciendo un ácido hidroxi-enoico (sección 4.2.3). El modelado estructural de LPH acoplado con la molécula de sustrato es de mucha utilidad para comprender aspectos de unión y catálisis de la reacción de

hidratación en LPH en las ácido graso hidratasas. En este trabajo se identificaron los sitios de unión de AL mediante ensayos de acoplamiento molecular (sección 4.1.6) encontrando dos sitios de interacción con los valores más altos de energía de acoplamiento (Kcal/mol) y que además tienen importancia funcional (Fig. 24).

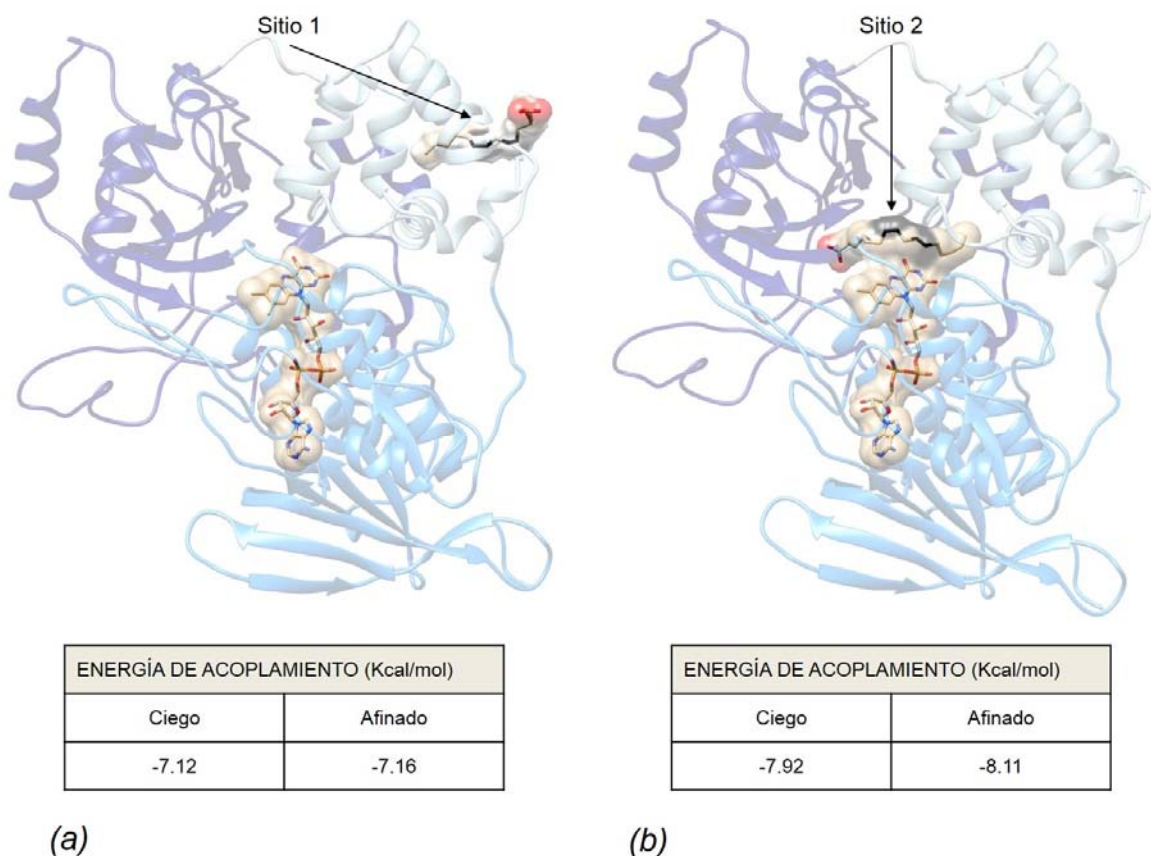


Figura 24. Arquitectura propuesta de los sitios de unión y catálisis de la hidratasa de *L. plantarum* con ácido linoleico. (a) Localización del sitio 1 en la superficie de la proteína y su energía de unión determinada durante el acoplamiento molecular. (b) Localización del sitio 2 o catalítico en el interior de la proteína y energía de unión determinada durante el acoplamiento molecular. El dieno no conjugado del sustrato se muestra en color negro.

5.1.8.1 *Sitio 1: unión al ácido linoleico*

Este sitio (Fig. 24a) se localizó en el dominio 3 de LPH (Fig. 20) en una cavidad hidrofóbica sobre la superficie de la proteína. Los residuos identificados que establecen contacto directo con el AL son Leu149, Ile153, Met154, Pro156, Met206, Ile210 y Phe213 (Fig. 25a). Notablemente, la molécula de ácido graso se coloca alrededor de Met154, la cual actúa

como un polo rígido que interactúa con la cadena hidrocarbonada mientras que el extremo ω del sustrato se encuentra embebida en una zona hidrofóbica entre los residuos Leu149, Ile210, Phe213 y Leu560. Por otro lado, el grupo carboxilato del AL se encuentra expuesto al disolvente estableciendo interacción hidrofóbica con Pro156 de acuerdo al análisis utilizando el programa LigPlot+ (Fig. 25b) [95]; en solución, este grupo posiblemente establezca puentes de H adicionales con moléculas de H₂O tal y como se encontró experimentalmente en el sitio de unión de la hidratasa de *Lactobacillus acidophilus* (LAH) (Fig. 3).

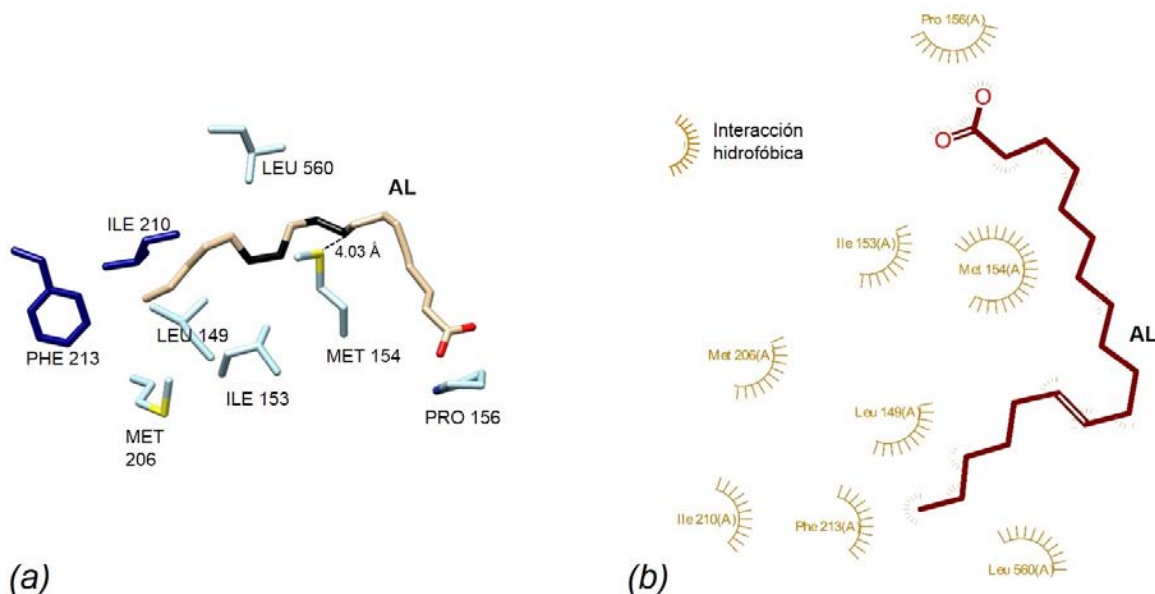


Figura 25. Descripción estructural del sitio de unión 1. (a) Aminoácidos que forman el sitio. El dieno no conjugado del sustrato se muestra en color negro. (b) Análisis de las interacciones residuo-sustrato utilizando el programa LigPlot+ [95].

Finalmente, se hace notar que el sitio de unión 1 de LPH es prácticamente igual al reportado para LAH (Fig. 3). El aspecto más importante es que en ambos sitios identificados, la molécula de AL se posiciona alrededor de un residuo de metionina (Met154 en las dos proteínas), lo cual sugiere una participación importante en el reconocimiento del sustrato y en la selectividad hacia ácidos grasos con doble enlace *cis* en C 9, el cual se localiza en la vecindad del átomo de S de la metionina (4.03 y 3.64 Å de distancia en LPH y LAH respectivamente).

5.1.8.2 Sitio 2: sitio catalítico

Este sitio se localizó en el interior de LPH en una cavidad hidrofóbica en la interfase de los dominios 1, 2 y 3 (Fig. 24b) y en contacto con el anillo de riboflavina de la molécula de FAD (Fig. 27). Los residuos que establecen contacto directo con AL son Gly70, Arg80, Met81, Tyr87,

Thr190, Phe191, Met209, Ile389, Val402, His404, His408 y Trp420. De igual forma que en el sitio1, la molécula de ácido graso se coloca alrededor de un residuo de metionina (Met81), el cual también podría actuar como un polo rígido que interactúa con la cadena hidrocarbonada del AL, lo cual es consistente con lo reportado experimentalmente en el sitio catalítico de PAI. Todos los aminoácidos de este sitio y la molécula de FAD establecen interacciones hidrofóbicas de acuerdo al análisis utilizando el programa LigPlot+ (Fig. 26b) [95].

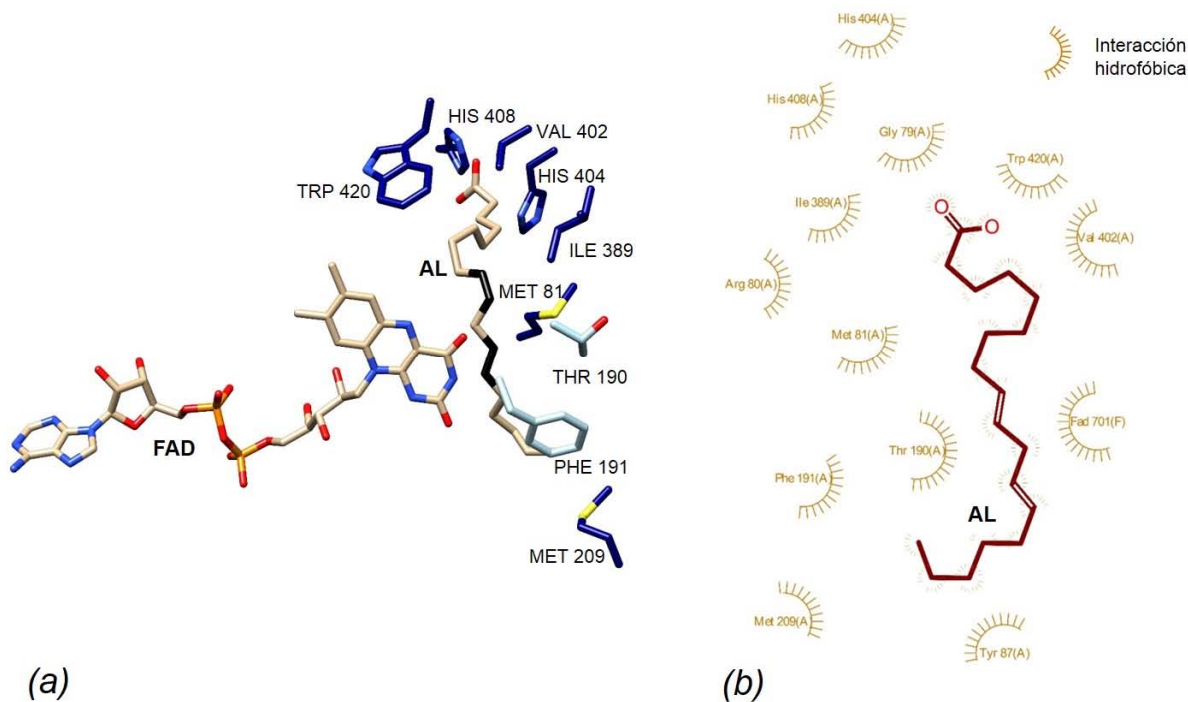


Figura 26. Descripción estructural del sitio de unión 2 o catalítico. (a) Aminoácidos que forman el sitio. El dieno no conjugado del sustrato se muestra en color negro. (b) Análisis de las interacciones residuo-sustrato utilizando el programa LigPlot+ [95].

El sitio de unión 2 de LPH tiene mucha similitud con los sitios catalíticos encontrados experimentalmente en la hidratasa de *Elizabethkingia meningoseptica* (EMH) y en la isomerasa de *Propionibacterium acnes* (PAI) (Fig. 27) [46, 60]. La molécula de FAD conserva prácticamente la misma ubicación así como la misma conformación en las tres enzimas (Fig. 27a). Adicionalmente, se reportó que la molécula de FAD participa en la catálisis tanto de la hidratación del ácido oleico (AO) en EMH, como en la isomerización del AL en PAI, así que debido a las similitudes encontradas el sitio de unión 2 de LPH, posiblemente en este sitio ocurre la catálisis de la hidratación del AL, ya que en este trabajo, se demostró que LPH es una proteína FAD dependiente, al igual que EMH y PAI.

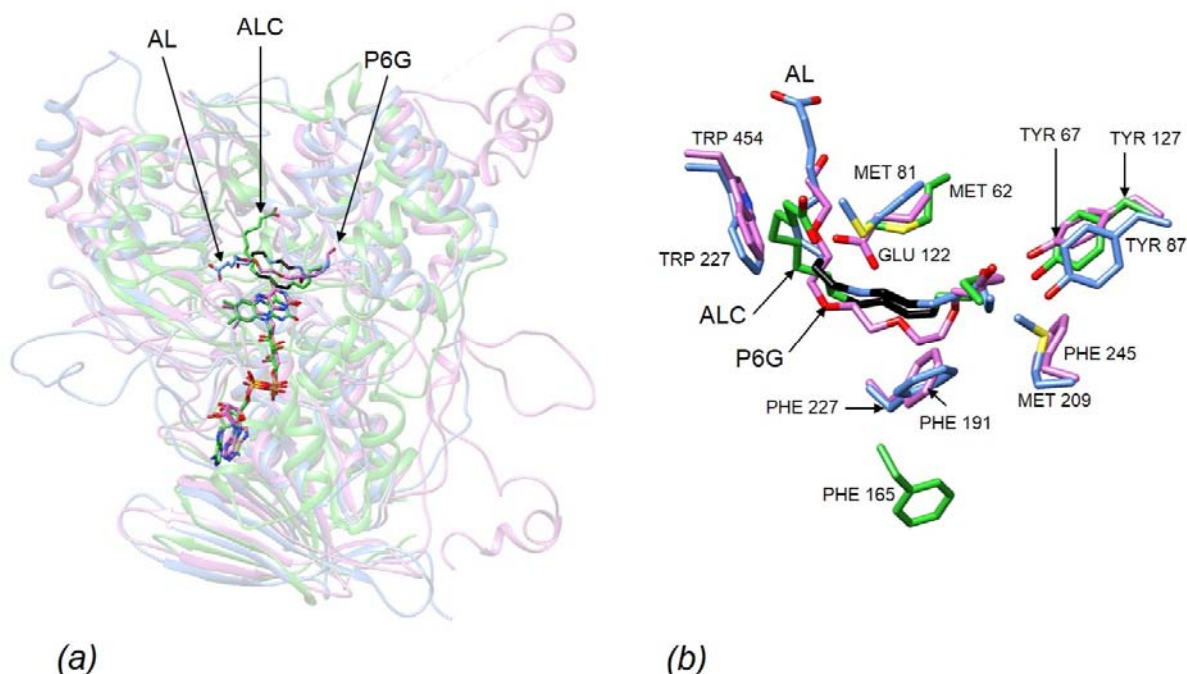


Figura 27. Comparación estructural de los sitios catalíticos de las hidratasas de *L. plantarum* (LPH, en azul), *E. meningoseptica* (EMH, en morado) y la isomerasa de *P. acnes* (PAI, en verde). (a) Localización de las moléculas de FAD en contacto con los sitios catalíticos de las tres enzimas. (b) Identificación de residuos conservados involucrados en el sitio catalítico. La molécula identificada experimentalmente en el sitio catalítico de EMH fue identificada como poli-etilen glicol de 6 átomos de C (P6G), mientras que el sustrato de PAI es el isómero bioactivo 10-*trans*-12-*cis*-ALC (ALC). El sustrato modelado en LPH es ácido linoleico (AL).

Mediante la comparación de residuos que tienen interacción directa con los sustratos en los sitios catalíticos de LPH, EMH y PAI, se identificaron los aminoácidos conservados en las tres proteínas (Fig. 27b) encontrándose una tirosina con conformación conservada (Tyr87 en LPH, 127 en EMH y 67 en PAI) que interactúa en el extremo ω del ácido graso, así como una fenilalanina en contacto con la cadena hidrocarbonada (Phe191 en LPH, 227 en EMH y 165 en PAI). Por otro lado, se encontró un triptófano conservado en LPH y EMH (Trp227 y 454 respectivamente) que también tiene contacto hidrofóbico con la cadena hidrocarbonada. Finalmente, se encontró que existe un residuo de metionina conservada en LPH y PAI (Met81 y 62 respectivamente) alrededor de la cual, la molécula de AL se ordena, ubicando al sustrato en la posición adecuada para la catálisis asistida por FAD [56, 60, 61].

La identificación de estos dos sitios de unión a AL en LPH permite proponer que el sustrato se une inicialmente al sitio 1 en la superficie de la proteína, después de lo cual, sufre algún cambio conformacional a través de las asas grandes encontradas en la estructura,

formando un canal que lleva al AL desde la superficie de la proteína al interior hasta poner al ácido graso en contacto con el anillo de riboflavina de la molécula de FAD en donde ocurre la hidratación del AL produciendo finalmente el ácido hidroxi-enoico (10-HOE). Estos resultados contribuyen a proponer por primera vez, el modo de unión y catálisis de las hidratatas del género *Lactobacillus* involucradas en la conversión de AL como un mecanismo de desintoxicación en ambientes enriquecidos con ácidos grasos polinsaturados.

5.1.9 Determinación de la interacción de la hidratasa con membranas sintéticas

La hidratación y la isomerización del AL en *Lactobacillus plantarum* habían sido reportadas como procesos que ocurren en la membrana plasmática celular [41], sin embargo hasta la fecha no se habían conducido estudios para caracterizar la naturaleza de la interacción proteína-membrana, es decir, si la asociación con la membrana es integral (proteína embebida en la bicapa lipídica) o periférica (proteína asociada de forma externa con la bicapa lipídica).

En este trabajo, LPH fue reconstituida en proteoliposomas de POPC:DMPC de 200 nm (sección 4.2.7) para investigar, mediante estudios de microscopía de barrido confocal de fluorescencia, la naturaleza de la interacción de LPH con membranas sintéticas que recreen un ambiente biomimético celular. Una vez preparados, se confirmó el tamaño y el estado monodisperso de los proteoliposomas (Fig. 28) mediante estudios de dispersión dinámica de luz (los cuales fueron realizados por Carmen Santamaría Basurto, *Facultad de Química, Tesis de Licenciatura: Uso de liposomas para el análisis de la interacción de proteínas con membranas plasmáticas*. En progreso).

Los proteoliposomas fueron marcados con dos sondas fluorescentes: el β -BODIPY® FL C₅-HPC que, debido a que es un análogo de fosfolípidos, permitió observar la forma y topología de la bicapa lipídica, mientras que la Rodamina B permitió localizar a la proteína, ya que se une a ella en regiones hidrofílicas cargadas negativamente por medio de interacciones electrostáticas (secciones 4.2.7). El marcaje dual permitió visualizar simultáneamente a LPH y a la bicapa fosfolipídica de las membranas sintéticas mediante microscopía confocal de fluorescencia (4.2.8) (Fig. 28a). Los resultados muestran que LPH (marcada en rojo) se localiza sobre la superficie de los liposomas (marcados en verde) formando una envoltura alrededor sin que se identifique una interacción directa o intrínseca con la membrana, a diferencia del control positivo (Fig. 28c) en donde se observa que la señal fluorescente de la Citocromo c Oxidasa (código PDB: 1OCO), una proteína integral de membrana modelo (marcada en rojo), se

sobrepone a la señal verde de los liposomas indicando una clara interacción directa o intrínseca con la membrana.

Debido a que la interacción de LPH se identifica claramente sobre la superficie de los liposomas, se determinó que la proteína establece asociaciones periféricas con membranas sintéticas. En contraste, el control negativo que consistió en preparar liposomas sin proteína, mostró la ausencia de cualquier asociación alrededor de la superficie de la bicapa lipídica (Fig. 28b).

Con estos resultados, se establece que LPH es una proteína periférica o extrínseca a la membrana, es decir, que no posee fragmentos transmembranales en su estructura y que la interacción con la bicapa lipídica es más bien superficial; también se plantea que la adición de surfactante (OTGP) posiblemente permitió la extracción y separación de LPH de las membranas plasmáticas conservándola en estado soluble (Tabla 3).

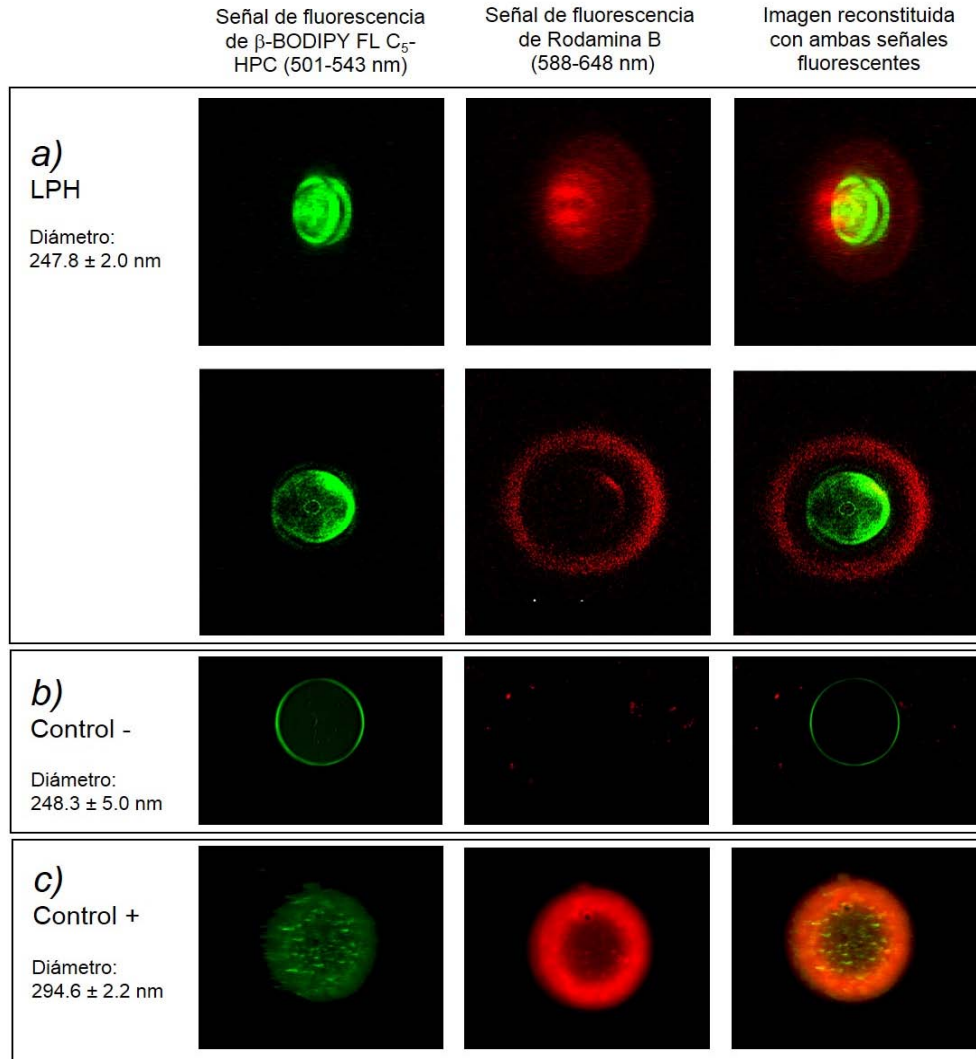


Figura 28. Análisis de proteoliposomas por microscopía confocal de fluorescencia. La primera columna de imágenes muestra la señal en verde de la sonda hidrofóbica atribuible a la bicapa lipídica mientras que la segunda columna muestra la señal en rojo de la sonda hidrofílica atribuible a la proteína. La tercera columna de imágenes muestra la integración de ambas señales (a) Micrografías de proteoliposomas de la hidratasa (LPH) desde una vista lateral (arriba) y frontal (abajo). (b) Control negativo de liposomas sin la adición de proteína. (c) Control positivo de proteoliposomas de Citocromo c oxidasa.

En este trabajo se sugiere que el anclaje superficial de las hidratasas del género *Lactobacillus* en las membranas (ya sean plasmáticas o sintéticas) puede estar mediado por interacciones electrostáticas entre las varias zonas catiónicas encontradas en la proteína (Fig. 29) y las cabezas polares de los lípidos membranales, ya que se ha probado que en solución coloidal los fosfolípidos de fosfatidilcolina presentan carga superficial negativa disponible para la unión con varias moléculas entre ellas, proteínas y otras macromoléculas [96, 97].

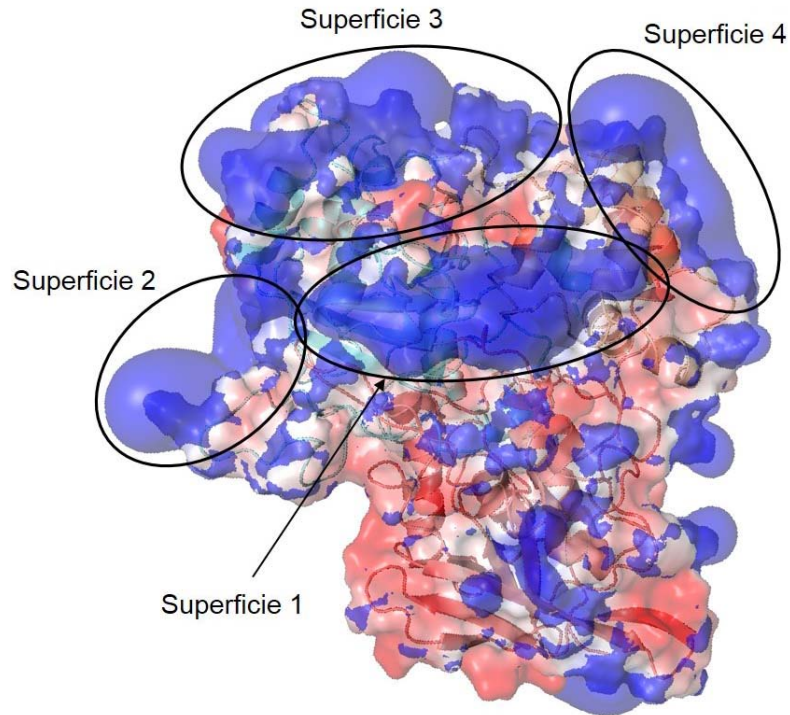
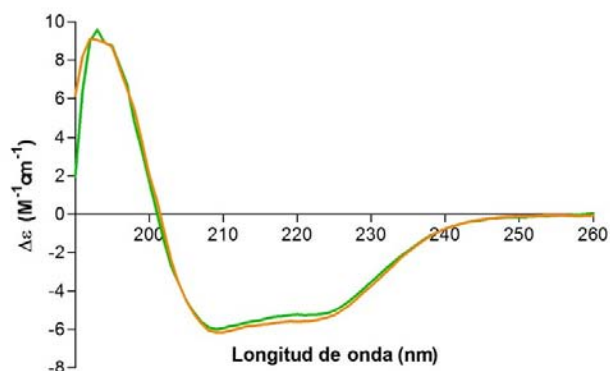


Figura 29. Potencial de superficie de la hidratasa de *L. plantarum*. Las zonas con carga superficial catiónica de la proteína (azul) fueron calculadas utilizando el programa ABPS [98].

Se propone que la asociación periférica de LPH con membranas puede ocurrir a través de la superficie 1, 2 o 3; a diferencia de la superficie 4 que se encuentra comprometida en la vecindad del sitio de unión 1 a AL. Para confirmar esto, se determinó la actividad de AL hidratasa en los proteoliposomas de LPH y se comparó con la actividad enzimática de la proteína en solución. Adicionalmente, se realizó un análisis por dicroísmo circular (sección 4.1.4) para determinar si la interacción periférica con membranas sintéticas induce algún cambio conformacional importante en la estructura secundaria de la proteína.



(a)

Actividad específica de LPH	
LPH en solución	0.081 ± 0.011
LPH en proteoliposomas	0.085 ± 0.026

(b)

Figura 30. Análisis del efecto de la reconstitución de la hidratasa de *L. plantarum* en proteoliposomas. (a) Determinación de cambios conformacionales por dicroísmo circular en la región del UV lejano. Dicroísmo circular molar ($\Delta\epsilon$) en función de la longitud de onda (nm) (b) Determinación de la actividad específica de AL hidratasa \pm la desviación estándar ($\mu\text{mol } 10\text{-HOE}/\text{min}/\text{mg}$).

De acuerdo a los resultados, se determinó que la reconstitución de la proteína proteoliposomas de POPC:DMPC y su consecuente unión periférica membranal no inducen cambios conformacionales perceptibles en la estructura secundaria ya que los espectros de dicroísmo circular son prácticamente iguales (Fig. 30a). Adicionalmente se encontró que tampoco hay cambios significativos en la actividad específica (Fig. 30b) de AL hidratasa después de la reconstitución ya que los valores permanecen iguales lo que esto implica que efectivamente, la superficie 4 de LPH, localizada en la vecindad del sitio de unión 1 a AL (Fig. 29) no establece contacto con las membranas tal y como se había propuesto, ya que de lo contrario, se hubiera observado una disminución en la actividad enzimática.

Estos resultados tienen una significancia funcional, ya que la localización periférica de LPH constituye una ventaja debido a que las ácido graso hidratasa que pertenecen a la familia de las MCRA en bacterias lácticas participan en el paso inicial de desintoxicación de ambientes enriquecidos con ácidos grasos polinsaturados como el ácido linoleico; así que para ejercer una función de receptor inicial, LPH necesita unirse a la molécula tóxica (AL) y catalizar su hidratación antes de que alcance las membranas plasmáticas celulares y de esta forma, prevenir la disrupción de la bicapa lipídica nativa debido a la geometría irregular y torcida de los ácidos grasos *cis* y adicionalmente evitar la inhibición de la actividad de enoil-ACP reductasa.

5.2 ESTUDIOS DE LA ÁCIDO LINOLEICO DESHIDRATASA DE *Lactobacillus plantarum*

Con base en la actividad enzimática (sección 4.3.3), se encontró una proteína en la fracción de proteínas solubles, que junto con la fracción de proteínas membranales o bien con LPH previamente purificada, produce el isómero bioactivo 9-*cis*-11-*trans* del ácido linoleico conjugado (ALC). A dicha proteína se le denomina en este trabajo como deshidratasa de *Lactobacillus plantarum* (LPD). Durante la caracterización de la estructura primaria se encontró que la secuencia de aminoácidos corresponde con la α enolasa de este microorganismo (LP Eno), una enzima glucolítica clásica (fosfo-glicerato deshidratasa) la cual se encuentra normalmente expresada en el citoplasma, sin embargo ha sido sorpresivamente identificada en superficie de la pared celular de esta bacteria [99, 100] donde exhibe funciones totalmente diferentes y aparentemente no relacionadas, como la adhesión a células epiteliales y proteínas de la matriz extracelular a través de unión a plasminógeno y fibronectina humanos [101, 102].

Debido a estas funciones nuevas y diversas características, LP Eno ha sido reclasificada como una proteína superficial, sin anclaje y multifuncional [103, 104], la cual también está implicada en respuestas de estrés celular frente a ambientes hostiles [105, 106] y adicionalmente, la α enolasa de *Lactobacillus reuteri* ha demostrado tener unión a glóbulos de grasa en emulsiones lipídicas lácteas [107]; es decir, que las α enolasas de bacterias del género *Lactobacillus* tienen antecedentes de unir ácidos grasos contenidos en lácteos.

En este trabajo se identificó y demostró la participación de LP Eno o LPD en la deshidratación de la molécula de ácido 10-hidroxi-12-*cis*-octadecenoico (10-HOE) produciendo el isómero bioactivo 9-*cis*-11-*trans*-ALC. A continuación se describe la caracterización de dicha enzima y el papel que juega en la poco estudiada biohidrogenación del ácido linoleico (AL) como mecanismo desintoxicante celular (sección 2.2).

5.2.1 Purificación

LPD se purificó de forma nativa a partir de la fracción de proteínas solubles de *Lactobacillus plantarum* (sección 4.1.2). Dicha purificación (sección 4.3.1) se logró removiendo inicialmente a las proteínas que precipitan de 0 a 75% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y con dos cromatografías de intercambio aniónico (Fig. 31).

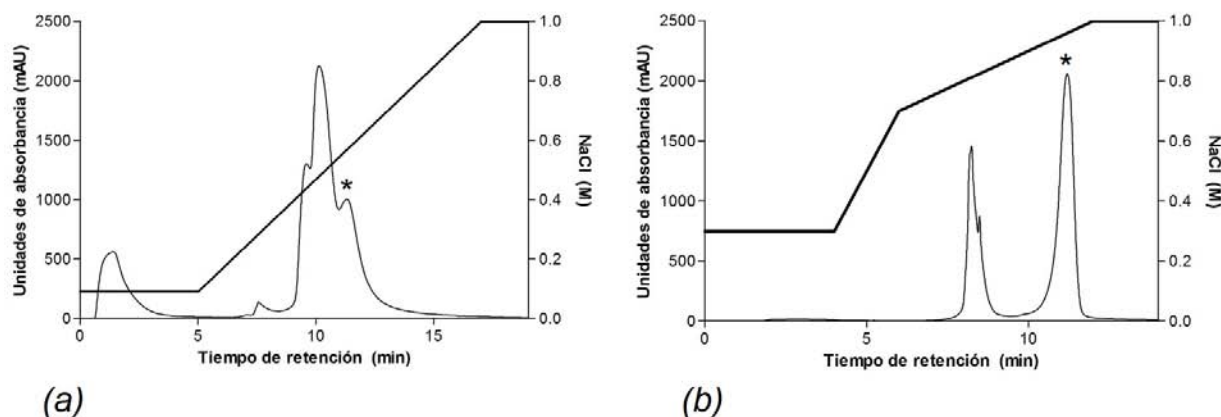


Figura 31. Purificación de la deshidratasa de *L. plantarum* por cromatografía de intercambio aniónico. (a) Extracto proteico precipitante de 75-100% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La cuarta fracción cromatográfica (*) con tiempo de retención de 11.3 min (eluída a 0.6 M de NaCl), fue la fracción con máxima actividad enzimática. (b) Fracción activa separada en una columna Bio IEX/WAX. La última fracción (*) con tiempo de retención de 11.2 min (eluída a 0.95 M NaCl) corresponde a la proteína purificada.

Mediante la construcción de la tabla de rendimiento de purificación (Tabla 4), se determinó que LPD fue purificada a partir de un extracto de proteínas solubles en cuatro pasos obteniendo un rendimiento del 0.3% y una actividad específica de 1.38×10^{-3} U/mg.

Tabla 4. Rendimientos de purificación de la deshidratasa de *L. plantarum*.

Paso	Proteína (mg)	Actividad (U*)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Veces de purificación
Extracto soluble	1.84×10^3	3.18×10^{-3}	1.73×10^{-6}	100	1
Precipitación diferencial con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.06×10^3	4.76×10^{-3}	1.55×10^{-6}	1.6	461
Cromatografía de intercambio aniónico (columna POROS HQ/H)	6.07	8.45×10^{-3}	1.38×10^{-3}	0.3	821
Cromatografía de intercambio aniónico	4.15	16.5×10^{-3}	3.97×10^{-3}	0.2	2363

* Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de total de CLA (μmol) producido por minuto, determinado por cromatografía de gases.

Se corroboró la pureza mediante electroforesis desnaturizante en donde se observó una sola banda con una masa alrededor de 50 kDa (Fig. 32).

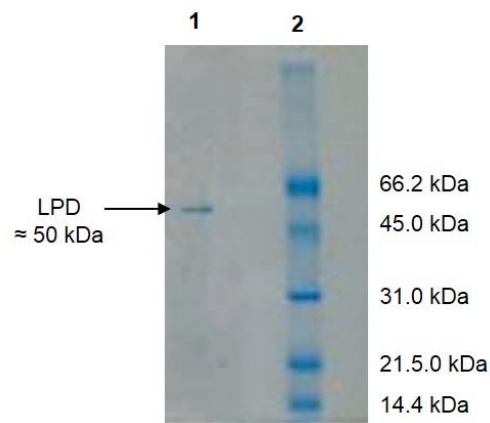


Figura 32. Análisis electroforético de la deshidratasa de *L. plantarum* (LPD). Gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie R-250. Carril 1: proteína purificada y carril 2: marcadores de masa molecular.

5.2.2 Análisis de la secuencia de aminoácidos y cálculo de la masa molecular

Para conocer la identidad de la estructura primaria de la proteína purificada, se realizó un análisis de secuencia de la proteína purificada (sección 4.3.2) el cuál reveló que la cadena polipeptídica consta de 442 aminoácidos con una masa calculada de 48,031.1 Da (Fig. 33), lo cual es consistente con lo obtenido en la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Fig. 32).

10	20	30	40	50	60
MSIITDIYAR	EVLDSRGNPT	VEVELYTESG	AFGRGIVPSG	ASTGEHEAVE	LRDGDKSRFM
70	80	90	100	110	120
GKGVTKAVDN	VNKLIAKEIV	GYDVTDQRAI	DQAMIKLDGT	PNKAKLGANA	ILGVSIAAAR
130	140	150	160	170	180
AAADELEMP	YNYLGGFNAH	VLPTPMMNVI	NGGAHANNDV	DFQEFMIMPV	GASSVKEAIR
190	200	210	220	230	240
MGSETFHNLK	AILNERGYST	AVGDEGGFAP	DLKNNEEPFE	ILVEAIERAG	YKPGKDIAIA
250	260	270	280	290	300
FDCAASEFYN	EETGKYDLKG	EGENGQSFTA	EEFVDLLDSI	VDKYPIVSIE	DPLDENNWED
310	320	330	340	350	360
WQMATTKLGK	KVQIVGDDL	VTNTDYLAKG	IKMGVANSIL	IKVNQIGTLT	ETVEAIEMAK
370	380	390	400	410	420
EAGYTAIVSH	RSGETEDTTI	ADLVVAMNAG	QIKTGMSMRT	ERIAKYNQLM	RIEDQLESTS
430	440				
EYKGIHGFYN	LDEAARNTIT	SK			

Figura 33. Secuencia de aminoácidos de la deshidratasa de *L. pantarum* obtenida experimentalmente.

La secuencia encontrada, corresponde a la α enolasa de *Lactobacillus plantarum* (código GenBank: KOE73401.1) con una identidad del 100%, lo que implica que en este trabajo se encontró que esta proteína multifuncional, también participa en la producción de 9-*cis*-11-*trans*-ALC. Esto concuerda con el hecho de que esta proteína exhibe funciones diversas a la glucolítica cuando se localiza en la superficie celular.

5.2.3 Actividad enzimática y determinación de especificidad de sustrato

La actividad enzimática catalizada por la proteína soluble purificada, está descrita por la producción del ácido 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienoico, es decir el isómero bioactivo 9-*cis*-11-*trans*-ALC, así que la determinación de la actividad se siguió por la identificación y cuantificación de esta molécula por cromatografía de gases (sección 4.3.4), en donde se encontró que tiene un tiempo de retención de 19.3 min, a diferencia del AL, cuyo tiempo de retención es de 14.9 min (Fig. 34).

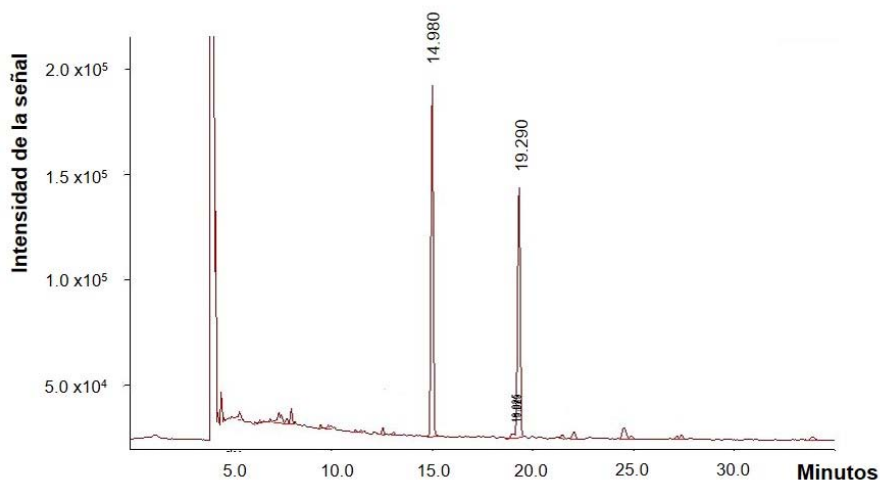


Figura 34. Cromatograma del ácido linoleico estándar (tiempo de retención = 14.9 min) y 9-*cis*-11-*trans*-ALC estándar (tiempo de retención = 19.3 min) para determinar la actividad enzimática de la deshidratasa de *Lb. plantarum*.

Para determinar el papel que juega LPD en la producción de 9-*cis*-11-*trans*-ALC, se realizó un estudio probando AL (70.8 μ moles, 19.8 mg) o 10-HOE (16.8 μ moles, 5 mg) como sustrato. Adicionalmente se probó la actividad en presencia y ausencia tanto de extracto de proteínas membranales, como de LPH purificada y LPH reconstituida en proteoliposomas. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Especificidad por sustrato de la deshidratasa de *L. plantarum*.

Ácidos grasos producidos a partir de AL (70.8 μ moles)				
Muestra	AL (μ moles)	9- <i>cis</i> -11- <i>trans</i> -ALC (μ moles)	10-HOE (μ moles)	Total** (μ moles)
LPD	67.9 \pm 1.6	n/d*	n/d*	\approx 0
LPD + extracto proteico membranal	60.8 \pm 1.2	6.0 \pm 0.9	1.7 \pm 0.08	7.7
LPD + LPH	38.2 \pm 1.6	4.1 \pm 0.5	17.5 \pm 0.4	21.6
LPD + proteoliposomas de LPH	31.2 \pm 1.5	3.6 \pm 0.3	26.5 \pm 3.0	30.1
Ácidos grasos producidos a partir de 10-HOE (16.8 μ moles)				
Muestra	AL (μ moles)	9- <i>cis</i> -11- <i>trans</i> -ALC (μ moles)	10-HOE (μ moles)	Total** (μ moles)
LPD	n/d	14.5 \pm 0.9	1.7 \pm 0.2	14.5
LPD + extracto proteico membranal	n/d	14.2 \pm 0.4	2.2 \pm 0.4	14.2
LPD + LPH	n/d	12.0 \pm 0.3	2.6 \pm 0.2	12.0
LPD + proteoliposomas de LPH	n/d	13.6 \pm 0.2	2.0 \pm 0.2	13.6

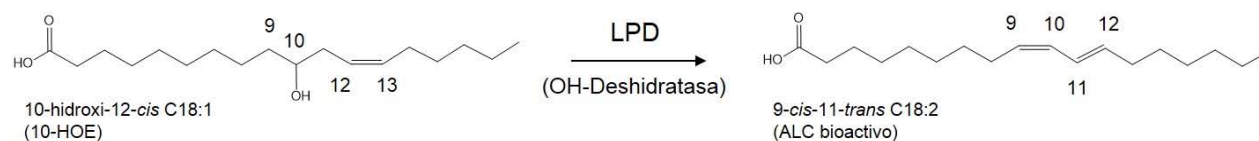
*n/d: no detectado

**total de productos en μ moles

La tendencia de los resultados muestra que el sustrato de LPD es 10-HOE y no AL, ya que se produce 9-*cis*-11-*trans*-ALC a partir de AL únicamente en presencia ya sea del extracto proteico membranal o bien de LPH en solución o reconstituida en proteoliposomas. LPD por sí sola no exhibió actividad enzimática hacia este ácido graso. La formación del isómero bioactivo a partir de AL ocurrió con muy bajos rendimientos (\approx 6.5%) y con una importante producción de 10-HOE, dependiendo de la naturaleza de la LPH complementaria (es decir si se encuentra en el extracto membranal o purificada). Esto es lógico ya que el AL es el sustrato directo de la hidratasa, así que posiblemente la actividad enzimática predominante es la hidratación de este ácido graso catalizada por LPH con la consecuente producción de 10-HOE.

Por el contrario, cuando 10-HOE es adicionado como sustrato, LPD exhibió actividad enzimática catalizando la deshidratación del ácido hidroxi-enoico y formando 9-*cis*-11-*trans*-ALC (\approx 86% de conversión) sin la necesidad de la adición de otro componente proteico probando así que el sustrato de LPD es 10-HOE y que la reacción que cataliza es la deshidratación del grupo hidroxilo en C 9-10 formando un doble enlace en C 9 en configuración

geométrica *cis* mientras que el doble enlace en C 12-13 es isomerizado a C 11-12 cambiando la configuración de *cis* a *trans* (Esq. 9). Finalmente de la tabla 5 se observa que la adición de extracto proteico membranaral o de LPH en solución o en proteoliposomas, no tuvo efecto en la conversión de 10-HOE a 9-*cis*-11-*trans*-ALC.



Esquema 9. Deshidratación e isomerización concertada del ácido 10-hidroxi-12-*cis*-octadecenoico catalizada por la deshidratasa de *L. plantarum*.

El análisis permitió determinar que la α enolasa de *Lactobacillus plantarum* (LP Eno) está implicada en la formación del isómero bioactivo 9-*cis*-11-*trans* del ALC ejerciendo actividad enzimática de 10-HOE deshidratasa / isomerasa (denominada en este trabajo como LPD), por lo cual participa en la desintoxicación celular de ambientes enriquecidos con ácido linoleico. Estos hallazgos contribuyen a afirmar que cuando LP Eno se localiza en la superficie celular donde exhibe funciones distintas y aparentemente no relacionadas a la clásica actividad glucolítica [99-102].

De acuerdo a lo reportado recientemente por Kishino *et al* [43], la producción de 9-*cis*-11-*trans*-ALC a partir de 10-HOE ocurre en cuatro pasos que incluyen una deshidrogenación, una isomerización, una hidrogenación y una deshidratación, catalizados por tres enzimas diferentes (Esq. 4a) que no han sido completamente estudiadas hasta el momento. En este trabajo se encontró, con base al seguimiento de la actividad enzimática, que la proteína multifuncional, LP Eno, realiza la deshidratación e isomerización de 10-HOE en un paso concertado, sin embargo, el rendimiento de esta reacción es bajo ($\approx 6.5\%$, Tabla 4) cuando el sustrato es AL, tal y como ocurriría en la célula expuesta a este ácido graso, lo que sugiere que la actividad de deshidratasa / isomerasa podría ser un mecanismo secundario o accesorio en LP Eno, que ocurre de forma paralela a la batería de reacciones y proteínas identificadas en participar en la biohidrogenación del AL (Esq. 4).

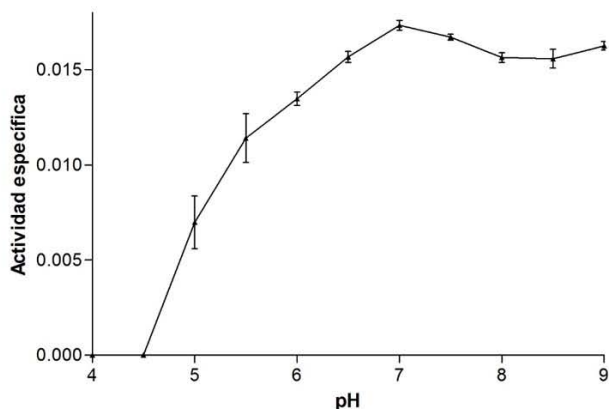
5.2.4 Efecto del pH en la estabilidad y actividad

Mediante estudios de termofluorescencia (sección 4.1.5), se analizó el efecto de la variación del pH en la actividad enzimática de formación de 9-*cis*-11-*trans*-ALC obteniéndose que la máxima producción ocurre a partir de pH 7.0 (Fig. 35) y se mantiene en valores máximos

hasta pH 9.0; es decir que en pH básicos, la producción de ALC se mantiene constante en valores máximos. El pH fue modificado desde 4.0 hasta 9.0 utilizando amortiguador de acetato de sodio 50 mM (pH 4.0 a 5.5), amortiguador bis-tris 50 mM (pH 6.0 a 7.0) y amortiguador tris 50 mM (pH 7.5 a 9.0).

pH	Actividad específica de LPD
4.0	0.0 ± 0
4.5	0.0 ± 0
5.0	7.0 ± 1.4 x10 ⁻³
5.5	11.4 ± 1.3 x10 ⁻³
6.0	13.5 ± 0.3 x10 ⁻³
6.5	15.7 ± 0.3 x10 ⁻³
7.0	17.3 ± 0.3 x10 ⁻³
7.5	16.7 ± 0.2 x10 ⁻³
8.0	15.6 ± 0.3 x10 ⁻³
8.5	15.6 ± 0.5 x10 ⁻³
9.0	16.2 ± 0.2 x10 ⁻³

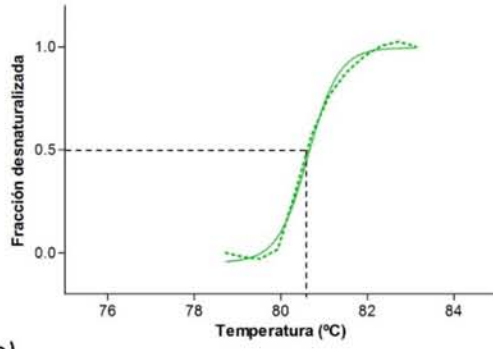
(a)



(b)

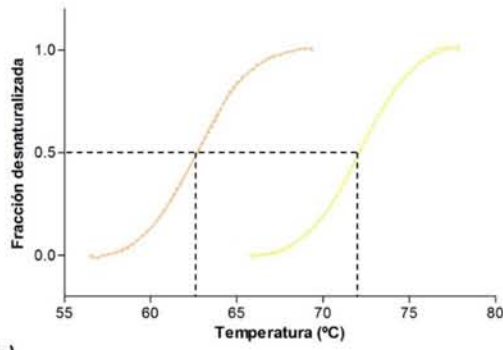
Figura 35. Efecto del pH sobre la actividad de la deshidratasa de *L. plantarum* (LPD). (a) Valores experimentales de la actividad específica ($\mu\text{mol ALC}/\text{min}/\text{mg}$) \pm la desviación estándar y (b) representación gráfica.

En cuanto al efecto de la variación tanto de los valores de pH, como de las sales amortiguadoras utilizando lactato de sodio-HCl, acetato de sodio-ácido acético, MES-NaOH, bis-tris-HCl, imidazol-HCl, fosfatos de sodio y potasio, HEPES-NaOH, tris-HCl, bicina-HCl, CHES-NaOH, glicina-NaOH y CAPS-NaOH (Anexo 1). Se encontró que la estabilidad térmica de LPD (cuyo valor inicial es de 80.5°C) es dependiente no solo del valor de pH sino también de la sal amortiguadora (Fig. 36). Las soluciones amortiguadas con lactatos, acetatos, MES, bis-tris y bicina, en un rango amplio de pH, tienden a evitar la agregación de la proteína, lo cual se traduce en trazas bien definidas (Figs. 36b-f). En contraste, los amortiguadores de fosfatos, imidazol, HEPES, tris, CHES y CAPS no resultaron en traza alguna, lo que indica agregación de la proteína y por lo tanto no son condiciones consideradas para aumentar la estabilidad de la proteína (datos no mostrados).



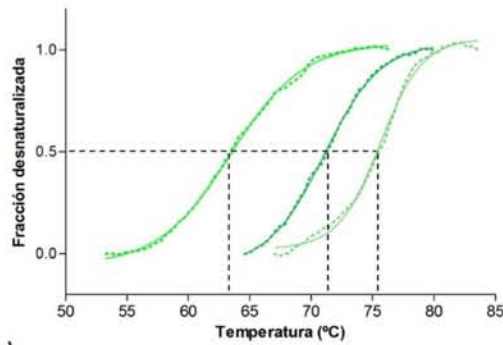
	T _m (°C)	R ²
LPD purificada (pH 6.0)	80.6	0.9963

(a)



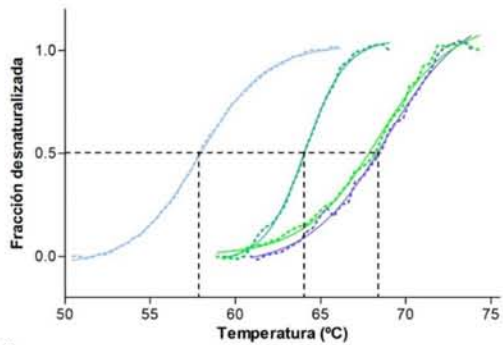
LACTATO DE SODIO / HCl (0.5 M)			
	pH	T _m (°C)	R ²
	4.8	62.7	0.9996
	5.2	72.2	0.9997

(b)



ACETATO DE SODIO / AC. ACÉTICO (0.5 M)			
	pH	T _m (°C)	R ²
	4.6	63.5	0.9990
	5.4	71.1	0.9991
	5.8	75.6	0.9966

(c)



MES / NaOH (0.5 M)			
	pH	T _m (°C)	R ²
	5.0	57.9	0.9996
	5.4	64.1	0.9981
	5.8	68.9	0.995
	6.2	68.4	0.9949

(d)

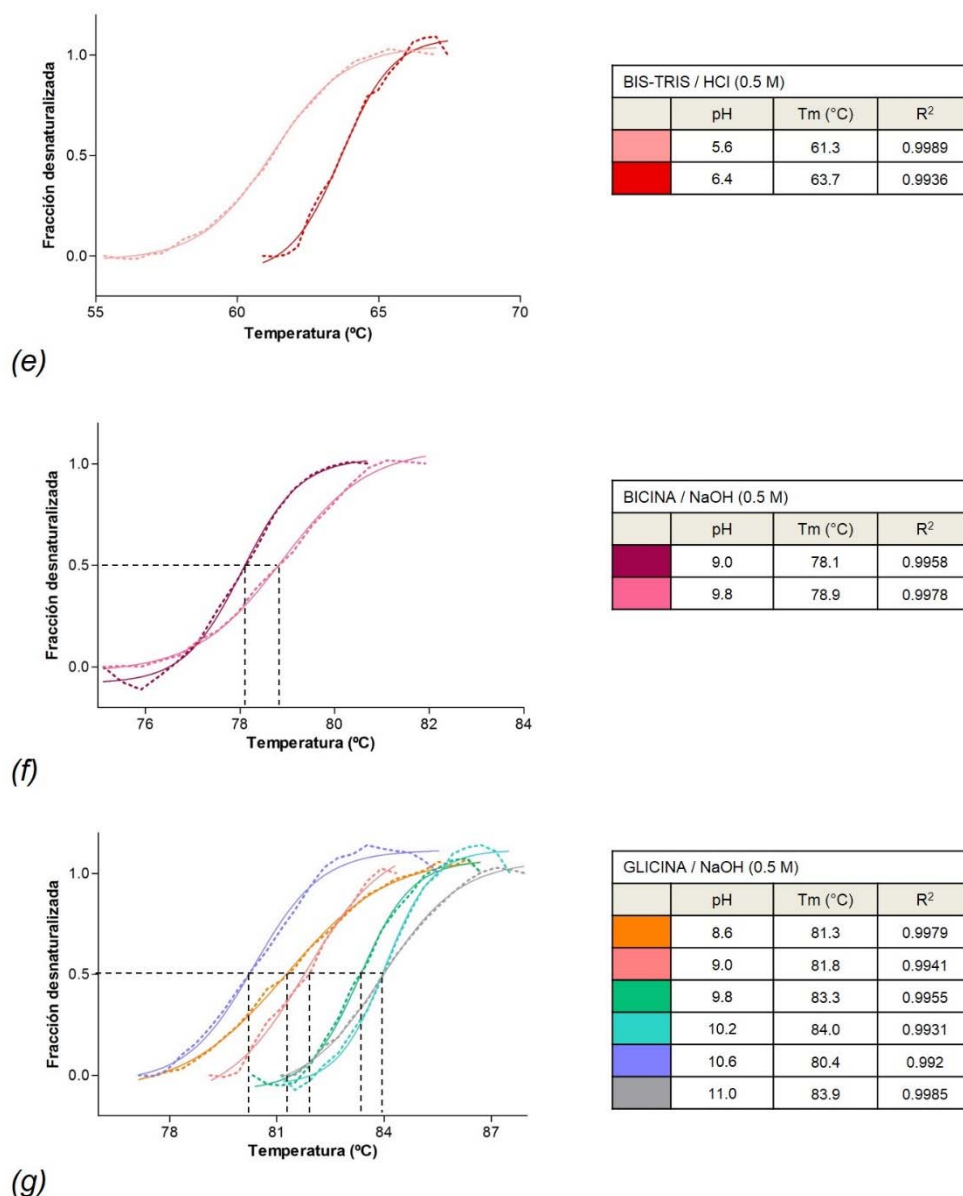


Figura 36. Efecto del pH y sales amortiguadoras en la termoestabilidad de la deshidratasa de *L. plantarum*. Los diferentes valores de Tm (°C) se calcularon en el punto de inflexión (línea negra de guiones) del intervalo de transición térmica de la proteína (líneas punteadas), utilizando el ajuste sigmoideal de Boltzmann (línea continua). Se indica el valor correspondiente del coeficiente de determinación (R²) del ajuste. Desnaturalización térmica de la proteína (LPD) en distintos amortiguadores: (a) LPD control (b) lactato de sodio (c) acetato de sodio, (d) MES (e) bis-tris (f) bicina (g) glicina.

Por otro lado, se encontró que LPD tiene una fuerte preferencia por valores de pH básicos amortiguados con glicina (Fig. 36g) ya que se encontró que el valor de Tm aumenta a partir de pH 8.6 hasta 11.0 presentando máxima termoestabilidad a pH 10.2 y 11.0 donde la Tm

aumenta hasta 84°C. Este efecto únicamente se observó en con el amortiguador de glicina, lo cual indica preferencia por esta sal a pH básico independientemente del valor puntual de dicho pH a diferencia de soluciones amortiguadas con bicina (Fig. 36f) en donde, a pesar que el pH es también básico, las Tm disminuyeron alrededor de 2°C.

5.2.5 Efecto de aditivos en la estabilidad y actividad

También se analizó la estabilidad de LPD en presencia de diferentes aditivos (Anexo 1) por medio de termofluorescencia (sección 4.1.5). Se encontró que glicerol y MgCl₂ fueron los únicos aditivos que incrementaron la estabilidad de LPD llevando el valor de la Tm a 84.3 y 88.2°C respectivamente (Fig. 37).

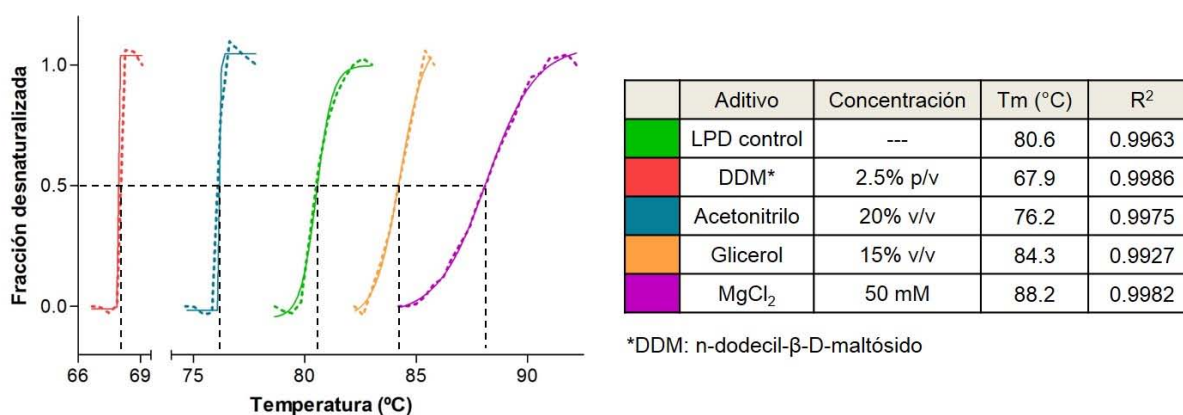


Figura 37. Efecto de aditivos en la termoestabilidad de la deshidratasa de *L. plantarum* (LPD). Los diferentes valores de Tm (°C) se calcularon en el punto de inflexión (línea negra de guiones) del intervalo de transición térmica de la proteína (líneas punteadas), utilizando el ajuste sigmoideal de Boltzmann (línea continua). Se indica el valor correspondiente del coeficiente de determinación (R²) del ajuste.

Por otro lado, la adición de acetonitrilo y n-dodecil-β-D-maltósido causó el decremento de los valores de Tm hasta 76.2 y 67.9°C respectivamente, sin embargo, la transición de la desnaturalización ocurrió en un intervalo muy corto de temperatura cuya forma fue aguda y bien definida (Fig. 37), por lo que puede ser indicativo de estabilización de la proteína hacia otras condiciones diferentes a la temperatura. Para confirmar esta hipótesis, se determinó la actividad enzimática encontrándose que todos los aditivos aumentaron considerablemente la actividad enzimática de LPD, en comparación con el control sin aditivos (Fig. 38), sin embargo la máxima actividad resultó de la adición tanto de acetonitrilo como de n-dodecil-β-D-maltósido que aumentaron la actividad alrededor de 6 veces.

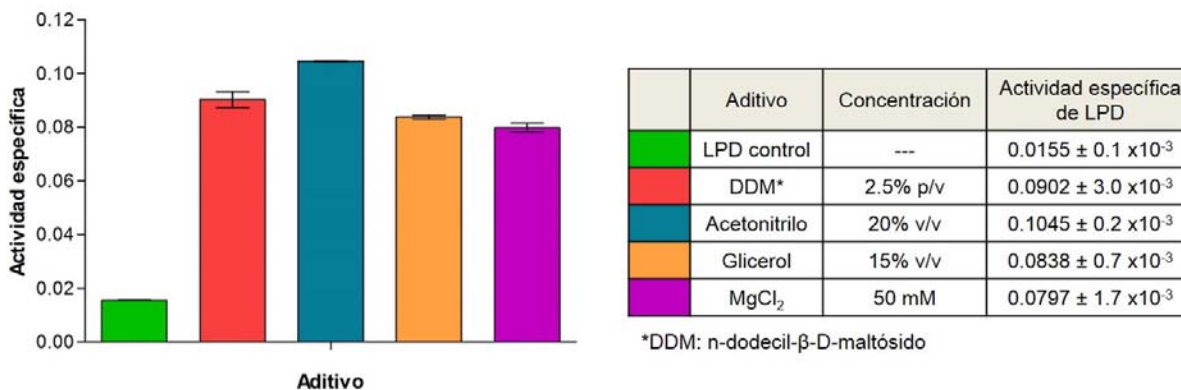


Figura 38. Efecto aditivos estabilizantes sobre la actividad de la deshidratasa de *L. plantarum* (LPD). Los valores experimentales de la actividad específica se expresan en $\mu\text{mol ALC}/\text{min}/\text{mg}$ \pm la desviación estándar.

El aumento de la actividad enzimática al adicionar MgCl_2 probablemente ocurra debido a la coordinación del Mg^{2+} con Asp242, Glu290 y Asp317 lo cual tiene un efecto estabilizante en la estructura de LPD; a diferencia del papel catalítico que tiene este átomo en la actividad glucolítica, donde es bien sabido que participa en la conversión de 2-fosfo-D-glicerol a fosfoenolpiruvato [99, 102].

5.2.6 Construcción del modelo estructural

La estructura tridimensional de las proteínas pertenecientes a la familia de las enolasas es ampliamente conocida y entre ellas mantienen alta identidad tanto en secuencia como en el plegamiento ($\geq 70\%$). En el banco de datos de proteínas (PDB) se encuentran reportadas 29 enolasas de organismos procariontes dentro de los cuáles se encuentra *Lactobacillus gasseri* cuya estructura fue añadida recientemente (código PDB: 4MKS). En este trabajo, se construyó el modelo estructural de la α enolasa de *Lactobacillus plantarum*, caracterizada aquí por su actividad de deshidratasa / isomerasa de 10-HOE (denominada como LPD), para identificar posteriormente los sitios de unión y catálisis de la formación del isómero bioactivo 9-*cis*-11-*trans*-ALC. Cabe mencionar que dicha estructura tridimensional no ha sido reportada por métodos experimentales por lo que fue calculada y construida a través de modelado por homología utilizando un método *ab initio* (sección 4.1.6) en combinación con la estructura cristalográfica de la hidratasa de *Enterococcus hirae* (código PDB: 1IYX) debido a que comparten 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos.

Una vez generado y validado el modelo estructural de LPD (Fig. 39), se analizó utilizando el servidor DIAL [91] por el cual se identificaron los 2 dominios clásicos presentes en la familia de las enolasas: el dominio 1 de color cian en la figura 39 (residuos 1-126), presenta plegamiento de clase α/β . Está constituido por tres hojas β antiparalelas seguidas de tres hélices α . El dominio 2 de color cian oscuro (residuos 147-442) también presenta plegamiento de clase α/β . Está constituido por 8 hojas β (7 paralelas y 1 antiparalela) al centro del dominio, el cual está rodeado por 8 hélices α . Existe un pequeño dominio conector (residuos 127-146) entre los dominios 1 y 2 que consta de una pequeña hélice y un asa que llega hasta el interior de la proteína en el dominio 2.

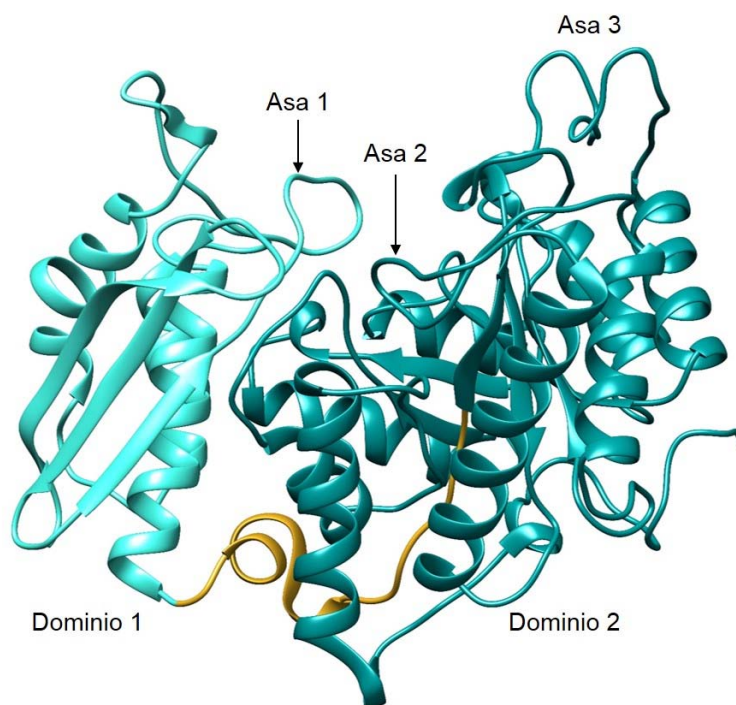


Figura 39. Estructura tridimensional propuesta de la deshidratasa de *L. plantarum*. El dominio 1 se representa de color cian mientras que el dominio 2 de color cian oscuro. El dominio conector se encuentra en la parte inferior de la proteína de color amarillo. El asa 1 es la más grande y está compuesta de los residuos 37-64 localizándose en la parte superior del dominio 1. El asa 2 consta de los residuos 196-215 y el asa 3 de los residuos 249-269.

5.2.7 Análisis estructural de los sitios de unión a sustrato y producto

Experimentalmente, se demostró que LPD tiene como sustrato una molécula de ácido 10-hidroxi-12-*cis*-octadecenoico (10-HOE) sobre la cual cataliza la deshidratación en C 9-10 produciendo un doble enlace *cis* y la isomerización del doble enlace 12-*cis* en 11-*trans* (Esq. 9).

Debido a que hasta el momento no hay estudios estructurales acerca de la interacción de LPD con ácidos grasos, en este trabajo se identificaron los sitios de unión tanto del sustrato (10-HOE) como del producto (9-*cis*-11-*trans*-ALC) mediante ensayos de acoplamiento molecular utilizando el modelo estructural de LPD previamente generado (sección 5.2.6). Inicialmente, fue posible identificar estos sitios (Fig. 40), para los cuales se obtuvo la energía de acoplamiento (Kcal/mol), así como los residuos que establecen interacción directa con el sustrato (Fig. 40a) y con el producto (Fig. 40b).

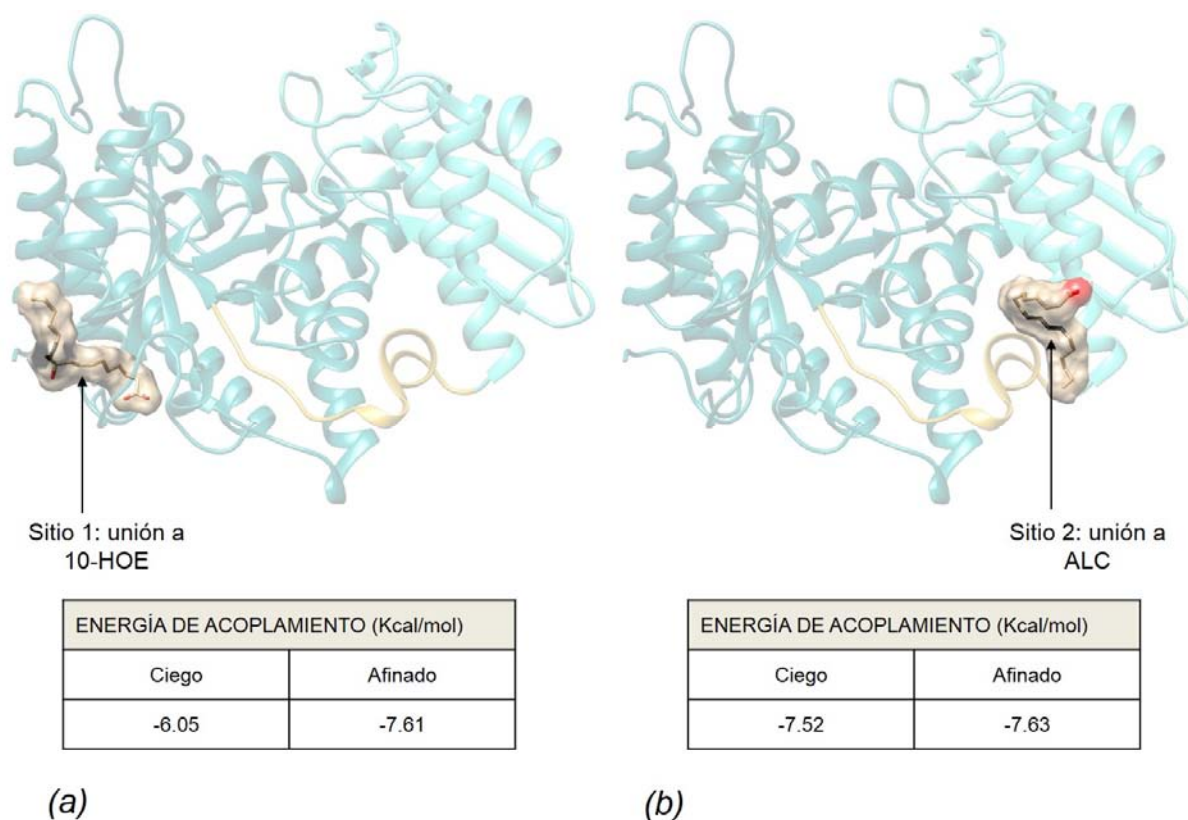


Figura 40. Arquitectura propuesta de los sitios de unión a sustrato y producto de la deshidratasa de *L. plantarum*. (a) Localización del sitio 1 en donde se une la molécula de 10-hidroxi-12-*cis*-octadecenoico (10-HOE) y su energía de unión determinada durante el acoplamiento molecular. (b) Localización del sitio 2 en donde se identificó la unión del producto 9-*cis*-11-*trans*-ALC (ALC) y su energía de unión determinada durante el acoplamiento molecular. Los dobles enlaces en los ácidos grasos se muestran en color negro.

5.2.7.1 Sitio 1: unión al ácido 10-hidroxi-12-*cis*-octadecenoico

La unión de LPD con el sustrato (10-HOE) se identificó en una cavidad hidrofóbica superficial en la parte inferior del dominio 2 de la proteína en una zona desestructurada dada

por dos asas (309-313 y 428-442) (Fig. 41a). Un residuo de ácido glutámico (Glu433) establece un puente de H con el grupo carboxilato del ácido graso mientras que los residuos Lys307, Lys310, Lys311, Ile425, Leu431, Asp432, Ala434, Arg436, Ile439 establecen contactos hidrofóbicos de acuerdo al análisis utilizando el programa LigPlot+ (Fig. 41b) [95]. El grupo hidroxilo del C 10 queda expuesto por un lado al disolvente, lo que sugiere que podría establecer puentes de H con moléculas de agua que puedan encontrarse alrededor; y por otro lado, tiene una cercanía importante con un N de la Arg436 (Fig. 41a). El doble enlace en el C 12 queda rodeado por aminoácidos cargados positivamente (Lys310, Lys311, Arg436, y Lys442).

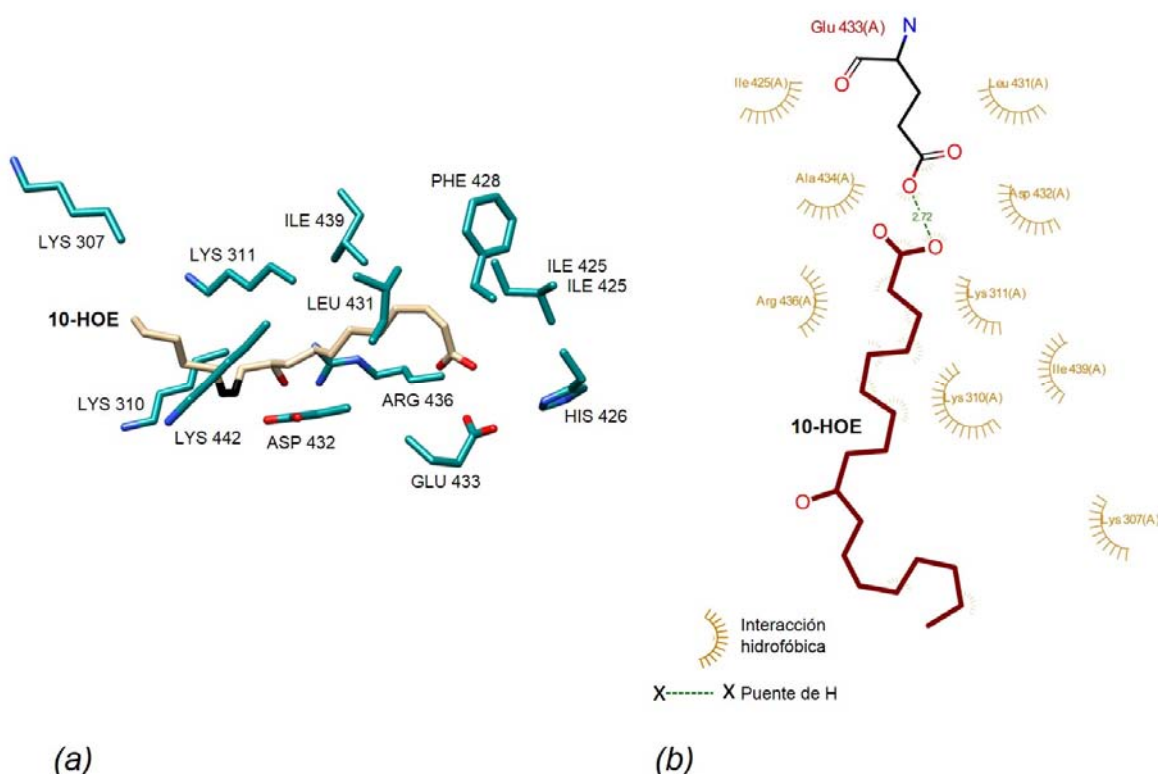


Figura 41. Descripción estructural del sitio 1 o de unión al ácido 10-hidroxi-12-*cis*-octadecenoico (10-HOE). (a) Aminoácidos que forman el sitio. El doble enlace del ácido graso se muestra en color negro. (b) Análisis de las interacciones residuo-sustrato utilizando el programa LigPlot+[95].

5.2.7.2 Sitio 2: unión al ácido 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienoico

El sitio de unión de LPD con el producto (9-*cis*-11-*trans*-ALC) se identificó también en una cavidad hidrofóbica superficial en la parte inferior del dominio 1 (Fig. 42a), en el extremo

opuesto de la proteína, en comparación con el sitio 1 (Fig. 40). Los residuos Gln87 y Arg88 establecen puentes de H con el carboxilato del ácido graso mientras que Thr85, Asp86, Leu126, Tyr133, Leu134 y Val353 establecen contacto directo con la molécula de ALC mediante interacciones hidrofóbicas, de acuerdo al análisis utilizando el programa LigPlot+ (Fig. 42b) [95]. Un residuo de tirosina (Tyr133) se encuentra en la cercanía del dieno conjugado, probablemente interactuando con la nube electrónica de los dobles enlaces del sistema insaturado (interacción π - π).

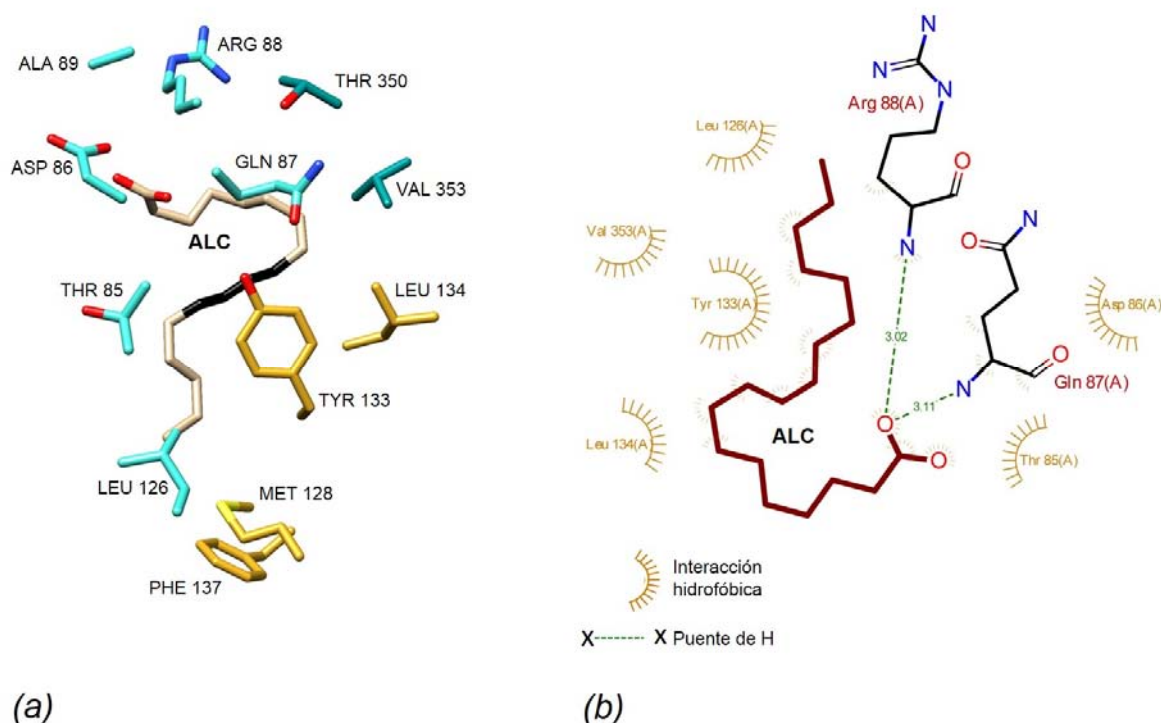
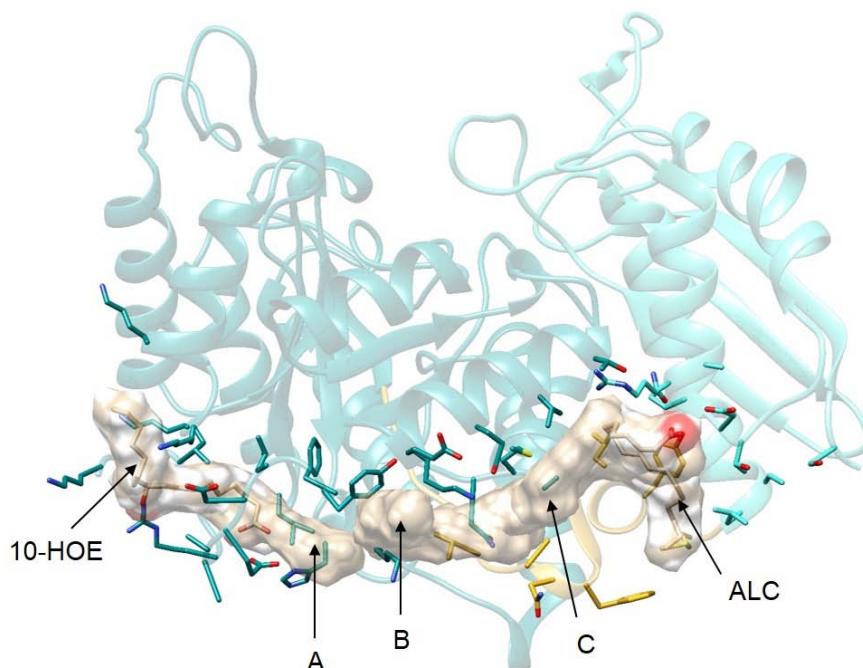


Figura 41. Descripción estructural del sitio 2 o de unión al ácido 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienoico (ALC). (a) Aminoácidos que forman el sitio. El dieno conjugado del ácido graso se muestra en color negro. (b) Análisis de las interacciones residuo-producto utilizando el programa LigPlot+ [95].

La ubicación de los sitios de unión a sustrato y producto se encuentran claramente en posiciones opuestas en la proteína: la molécula de 10-HOE se une en un extremo del dominio 2 de LPD mientras que el 9-*cis*-11-*trans*-ALC se identificó en el extremo opuesto del dominio 1 (Fig. 40). Dichas posiciones resultaron las más favorecidas en cuanto a la energía de acoplamiento; sin embargo, se identificaron tres posiciones adicionales, también favorecidas energéticamente, que permitieron proponer una trayectoria que posiblemente sigue el sustrato desde el sitio inicial de unión al sitio donde se encuentra el producto (Fig. 43). Dicha trayectoria

se identifica como un canal superficial constituido por aminoácidos hidrofóbicos (Phe, Ile y Leu), iónicos (Asp, His, Lys y Arg) y polares (Tyr, Ser, Met, Asn y Gln), que podrían conducir al 10-HOE desde el sitio de unión 1, en el dominio 2 de LPD hasta el sitio de unión 2, donde se localiza la molécula de 9-*cis*-11-*trans*-ALC, en el dominio 1.



	ENERGÍA DE ACOPLAMIENTO (Kcal/mol)		
SUPERFICE	A	B	C
Ciego	-7.61	-6.30	-6.28
Afinado	-7.84	-6.72	-6.99

Figura 43. Superficie del canal de la deshidratasa de *L. plantarum* que plantea la trayectoria de la deshidratación e isomerización del sustrato (10-HOE) produciendo 9-*cis*-11-*trans*-ALC (ALC).

Debido a la complejidad de la interacción de LPD con el sustrato y el producto, y al hecho de que es la primera vez que se reporta esta actividad enzimática en proteínas pertenecientes de la familia de las α enolasas de *Lactobacillus*, no fue posible identificar puntualmente un sitio catalítico por medio de los estudios de acoplamiento molecular de este trabajo. Sin embargo podría sugerirse que la catálisis de la deshidratación e isomerización del 10-HOE ocurre en alguna parte del canal identificado.

Finalmente cabe destacar que la ruta enzimática planteada aquí no se encuentra comprometida con el sitio glucolítico clásico de LP Eno, en el cual están involucrados los residuos catalíticos His155, Glu164, Glu205, Lys342, Asp242, Glu290, Asp217 y Lys392 que están localizados en una cavidad en la parte superior del dominio 2.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo, se realizó por primera vez la caracterización bioquímica, fisicoquímica y estructural de dos proteínas involucradas en la formación del isómero bioactivo 9-*cis*-11-*trans* del ácido linoleico conjugado a partir de ácido linoleico. Dichas enzimas se aislaron a partir de células de *Lactobacillus plantarum* y se encontró que por separado catalizan distintas reacciones; sin embargo, juntas actúan como un sistema acoplado en donde el producto de una (la hidratasa) constituye el sustrato de la otra (la deshidratasa / isomerasa) (Fig. 44).

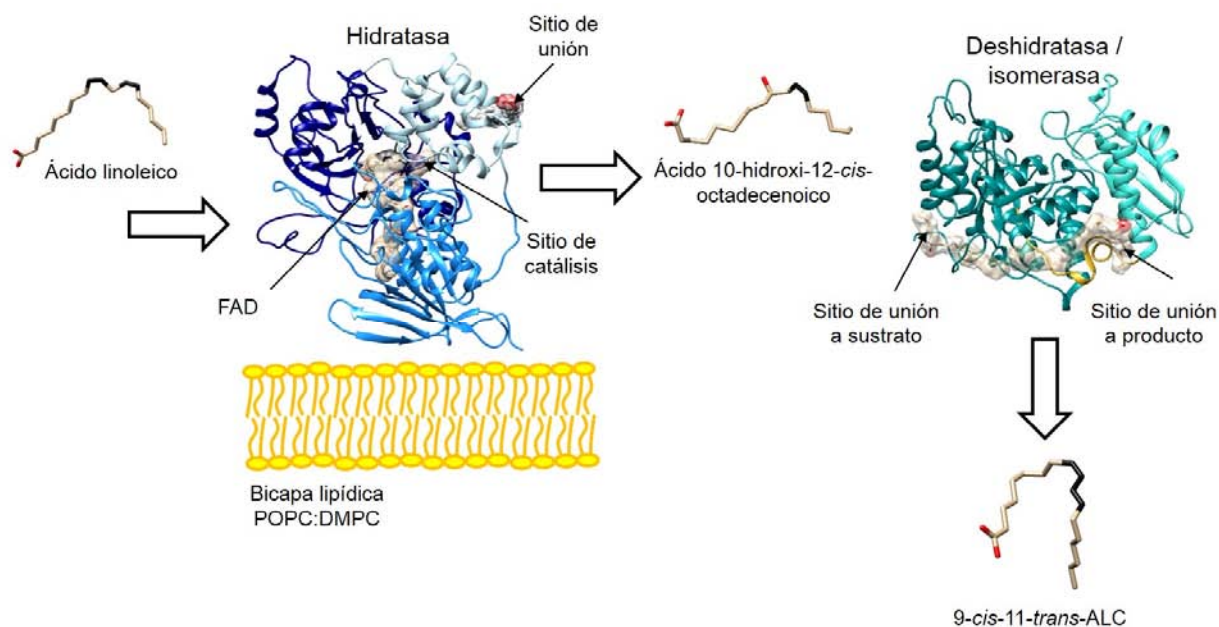


Figura 44. Esquemización de la producción del isómero bioactivo 9-*cis*-11-*trans*-ALC a partir de ácido linoleico catalizado por el sistema enzimático hidratasa – deshidratasa/isomerasa de *L. plantarum*. El proceso inicial de hidratación ocurre en la periferia de la membrana junto con la acumulación de ácido 10-hidroxi-12-*cis*-octadecenoico, mientras que la deshidratación e isomerización concertada ocurre en la superficie celular.

La hidratasa (denominada como **LPH**), es una flavoenzima aislada de la fracción proteica membranal utilizando el tensoactivo neutro OTGP para mantener la estabilidad en solución. Su masa molecular es de 64.7 kDa y cataliza inicialmente la hidratación del ácido linoleico produciendo ácido 10-hidroxi-12-*cis*-octadecenoico. Esta proteína presentó estabilidad térmica y actividad enzimática máxima a valores de pH entre 6.5 y 7.0, así como preferencia por MgCl₂, (NH₄)₂SO₄, n-dodecil-β-D-maltósido, polietilen glicol 400 y etanol como aditivos termoestabilizantes. En este trabajo se encontró que la hidratasa se encuentra asociada a

membranas sintéticas de POPC:DMPC, de forma extrínseca sin modificaciones en la estructura secundaria, así que se plantea que la actividad enzimática ocurre en la periferia de membranas plasmáticas en la célula nativa, lo cual representa una ubicación ventajosa en cuanto a la captación y unión inicial del ácido linoleico evitando así que llegue a la membrana celular y previniendo los efectos adversos para *Lactobacillus plantarum*. Mediante el análisis de la estructura tridimensional utilizando un modelo basado en la secuencia de aminoácidos, se identificaron tanto el sitio de unión, ubicado en una cavidad hidrofóbica en la superficie de la proteína, como el sitio de catálisis, que se localiza en el centro de la proteína en contacto con el anillo de riboflavina de la molécula de FAD. Estos resultados ilustran por primera vez el modo en que ocurre la hidratación del ácido linoleico en bacterias del género *Lactobacillus*.

La deshidratasa (denominada como **LPD**) es la segunda proteína identificada en este trabajo. Fue aislada de la fracción proteica soluble por lo que tiene una naturaleza diferente a la hidratasa. Mediante el análisis de su secuencia de aminoácidos se encontró que es una proteína de 48.0 kDa perteneciente a la familia de las α enolasas. En este trabajo se demostró experimentalmente que LPD cataliza la deshidratación / isomerización del hidroxiácido producido por LPH formando finalmente el ácido 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienoico, que es el principal isómero bioactivo del ácido linoleico conjugado. Esta actividad enzimática tiene valores máximos a pH desde 7.0 hasta 9.0, en presencia de MgCl₂, n-dodecil- β -D-maltósido, glicerol y acetonitrilo como aditivos. También se encontró que la proteína presenta aumento de la termoestabilidad en amortiguadores de glicina desde pH 8.6 hasta 11.0. Mediante el análisis del modelo estructural de la proteína, se identificaron los sitios de unión a sustrato y producto los cuales se localizaron en cavidades hidrofóbicas expuestas al disolvente dos extremos opuestos de la estructura que se encuentran conectados por un canal a través del cual probablemente ocurre la catálisis enzimática. Estos resultados plantean por primera vez la participación de una enzima glucolítica localizada en la superficie celular como una enzima accesoria en el proceso de biohidrogenación del ácido linoleico en bacterias del género *Lactobacillus*, del cual actualmente se conoce muy poco.

De esta forma, se aporta información acerca del mecanismo por el cual el microorganismo probiótico *Lactobacillus plantarum*, metaboliza ácidos grasos polinsaturados como el ácido linoleico a través de la biohidrogenación del ácido linoleico como un proceso desintoxicante del medio evitando los efectos adversos como el deterioro de las membranas celulares y la inhibición de ácidos grasos biosintetizados naturalmente por la célula.

Finalmente, se concluye que la producción biotecnológica de isómeros bioactivos del ácido linoleico conjugado, utilizando el sistema enzimático hidratasa – deshidratasa / isomerasa, tiene varias ventajas sobre la producción industrial utilizando métodos químicos, siendo la mayor, la selectividad ya que el único producto formado es el isómero 9-*cis*-11-*trans*-ALC, mientras que por otros métodos se obtienen otros isómeros como contaminantes con actividad biológica desconocida, además de ser procesos generadores de desechos potencialmente tóxicos.

REFERENCIAS

- [1] S. Benjamin, F. Spener, Conjugated linoleic acids as functional food: An insight into their health benefits, *Nutrition & Metabolism* 6 (2009) 36.
- [2] A. Bhattacharya, J. Banu, M. Rahman, J. Causey, G. Fernandes, Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease, *Journal of Nutritional Biochemistry* 17 (2006) 789-810.
- [3] I. Churrua, A. Fernandez-Quintela, M.P. Portillo, Conjugated linoleic acid isomers: Differences in metabolism and biological effects, *Biofactors* 35 (2009) 105-111.
- [4] N.S. Kelley, N.E. Hubbard, K.L. Erickson, Conjugated linoleic acid isomers and cancer, *Journal of Nutrition* 137 (2007) 2599-2607.
- [5] N.M. Racine, A.C. Watras, A.L. Carrel, D.B. Allen, J.J. McVean, R.R. Clark, A.R. O'Brien, M. O'Shea, C.E. Scott, D.A. Schoeller, Effect of conjugated linoleic acid on body fat accretion in overweight or obese children, *American Journal of Clinical Nutrition* 91 (2010) 1157-1164.
- [6] J.C. Andrade, K. Ascencao, P. Gullon, S.M.S. Henriques, J.M.S. Pinto, T.A.P. Rocha-Santos, A.C. Freitas, A.M. Gomes, Production of conjugated linoleic acid by food-grade bacteria: A review, *International Journal of Dairy Technology* 65 (2012) 467-481.
- [7] Y.L. Ha, N.K. Grimm, M.W. Pariza, Anticarcinogens from fried ground beef: Heat-altered derivatives of linoleic acid, *Carcinogenesis* 8 (1987) 1881-1887.
- [8] M.W. Pariza, Y. Park, M.E. Cook, The biologically active isomers of conjugated linoleic acid, *Progress in Lipid Research* 40 (2001) 283-298.
- [9] Y. Park, M.W. Pariza, Bioactivities and potential mechanisms of action for conjugated fatty acids, *Food Science and Biotechnology* 18 (2009) 586-593.
- [10] Y. Park, K.J. Albright, W. Liu, J.M. Storkson, M.E. Cook, M.W. Pariza, Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice, *Lipids* 32 (1997) 853-858.
- [11] J.P. DeLany, D.B. West, Changes in body composition with conjugated linoleic acid, *The Journal of the American College of Nutrition* 19 (2000) 487S-493S.
- [12] D.B. West, J.P. Delany, P.M. Camet, F. Blohm, A.A. Truett, J. Scimeca, Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse, *American Journal of Physiology* 275 (1998) R667-672.
- [13] M. Yamasaki, T. Yanagita, Adipocyte response to conjugated linoleic acid, *Obesity Research and Clinical Practice* 7 (2013) e235-242.
- [14] I. Sluijs, Y. Plantinga, B. de Roos, L.I. Mennen, M.L. Bots, Dietary supplementation with *cis*-9,*trans*-11 conjugated linoleic acid and aortic stiffness in overweight and obese adults, *American Journal of Clinical Nutrition* 91 (2010) 175-183.
- [15] S.H. Chung, I.H. Kim, H.G. Park, H.S. Kang, C.S. Yoon, H.Y. Jeong, N.J. Choi, E.G. Kwon, Y.J. Kim, Synthesis of conjugated linoleic acid by human-derived *Bifidobacterium breve* Imc 017: Utilization as a functional starter culture for milk fermentation, *Journal of Agricultural Food Chemistry* 56 (2008) 3311-3316.
- [16] A. Buccioni, M. Decandia, S. Minieri, G. Molle, A. Cabiddu, Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors, *Animal Feed Science and Technology* 174 (2012) 1-25.
- [17] K. Koba, T. Yanagita, Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA), *Obesity Research and Clinical Practice* 8 (2014) e525-532.
- [18] L. Rainer, C.J. Heiss, Conjugated linoleic acid: Health implications and effects on body composition, *Journal of the American Dietetic Association* 104 (2004) 963-968, quiz 1032.

- [19] A. Rocha-Urbe, E. Hernandez, Solvent-free enzymatic synthesis of structured lipids containing CLA from coconut oil and tricaprylin, *Journal of the American Oil Chemists Society* 81 (2004) 685-689.
- [20] M.P. Yurawecz, Kramer, J. K., Pariza, M. W., Gudmundsen, O. and Banni, S., Advances in conjugated linoleic acid research, American Oil Chemist's Society, 2006.
- [21] M.P. Yurawecz, Advances in conjugated linoleic acid research, AOCS Press, Champaign, Ill., 1999.
- [22] M. Kreich, P. Claus, Direct conversion of linoleic acid over silver catalysts in the presence of H₂: An unusual way towards conjugated linoleic acids, *Angewandte Chemie* 44 (2005) 7800-7804.
- [23] P. Amador, E. Martinez, O. Sanchez-Daza, H. Flores, Energies of combustion and standard molar enthalpies of formation of ricinoleic acid and methyl ricinoleate, *Journal of Chemical Thermodynamics* 50 (2012) 15-18.
- [24] D. Goswami, R. Sen, J.K. Basu, S. De, Maximization of bioconversion of castor oil into ricinoleic acid by response surface methodology, *Bioresource Technology* 100 (2009) 4067-4073.
- [25] M.S. Puthli, V.K. Rathod, A.B. Pandit, Enzymatic hydrolysis of castor oil: Process intensification studies, *Biochemical Engineering Journal* 31 (2006) 31-41.
- [26] L. Yang, Y. Huang, H.Q. Wang, Z.Y. Chen, Production of conjugated linoleic acids through KOH-catalyzed dehydration of ricinoleic acid, *Chemistry and Physics of Lipids* 119 (2002) 23-31.
- [27] J. Ogawa, S. Kishino, A. Ando, S. Sugimoto, K. Mihara, S. Shimizu, Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100 (2005) 355-364.
- [28] F.J. Carr, D. Chill, N. Maida, The lactic acid bacteria: A literature survey, *Critical Reviews in Microbiology* 28 (2002) 281-370.
- [29] J.M. Jay, M.J. Löessner, D.A. Golden, Modern food microbiology, 7th ed., Springer, New York, 2005.
- [30] Å. Ljungh, T. Wadström, *Lactobacillus* molecular biology: From genomics to probiotics, Caister Academic, S.I., 2009.
- [31] A. Escalante, C. Wachter, A. Farres, Lactic acid bacterial diversity in the traditional mexican fermented dough pozol as determined by 16s rDNA sequence analysis, *International Journal of Food Microbiology* 64 (2001) 21-31.
- [32] H. Hardy, J. Harris, E. Lyon, J. Beal, A.D. Foey, Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: Homeostasis and immunopathology, *Nutrients* 5 (2013) 1869-1912.
- [33] R. Fuller, Probiotics: The scientific basis, Chapman & Hall, London, 1992.
- [34] D.L. Greenway, K.G. Dyke, Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*, *Journal of General Microbiology* 115 (1979) 233-245.
- [35] H. Keweloh, H.J. Heipieper, *Trans* unsaturated fatty acids in bacteria, *Lipids* 31 (1996) 129-137.
- [36] M.R. Maia, L.C. Chaudhary, L. Figueres, R.J. Wallace, Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen, *Antonie Van Leeuwenhoek* 91 (2007) 303-314.
- [37] M.K. Raychowdhury, R. Goswami, P. Chakrabarti, Effect of unsaturated fatty acids in growth inhibition of some penicillin-resistant and sensitive bacteria, *Journal of Applied Bacteriology* 59 (1985) 183-188.
- [38] C.J. Zheng, J.S. Yoo, T.G. Lee, H.Y. Cho, Y.H. Kim, W.G. Kim, Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids, *FEBS Letters* 579 (2005) 5157-5162.
- [39] N. McKain, K.J. Shingfield, R.J. Wallace, Metabolism of conjugated linoleic acids and 18:1 fatty acids by ruminal bacteria: Products and mechanisms, *Microbiology* 156 (2010) 579-588.
- [40] I.S. Nam, P.C. Garnsworthy, Biohydrogenation of linoleic acid by rumen fungi compared with rumen bacteria, *Journal of Applied Microbiology* 103 (2007) 551-556.

- [41] S. Kishino, J. Ogawa, K. Yokozeki, S. Shimizu, Linoleic acid isomerase in *Lactobacillus plantarum* AKU1009a proved to be a multi-component enzyme system requiring oxidoreduction cofactors, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 75 (2011) 318-322.
- [42] S. Kishino, S.B. Park, M. Takeuchi, K. Yokozeki, S. Shimizu, J. Ogawa, Novel multi-component enzyme machinery in lactic acid bacteria catalyzing C=C double bond migration useful for conjugated fatty acid synthesis, *Biochemistry and Biophysics Research Communication* 416 (2011) 188-193.
- [43] S. Kishino, M. Takeuchi, S.B. Park, A. Hirata, N. Kitamura, J. Kunisawa, H. Kiyono, R. Iwamoto, Y. Isobe, M. Arita, H. Arai, K. Ueda, J. Shima, S. Takahashi, K. Yokozeki, S. Shimizu, J. Ogawa, Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 110 (2013) 17808-17813.
- [44] B. Yang, H. Chen, Y. Song, Y.Q. Chen, H. Zhang, W. Chen, Myosin-cross-reactive antigens from four different lactic acid bacteria are fatty acid hydratases, *Biotechnology Letters* 35 (2013) 75-81.
- [45] A. Volkov, S. Khoshnevis, P. Neumann, C. Herrfurth, D. Wohlwend, R. Ficner, I. Feussner, Crystal structure analysis of a fatty acid double-bond hydratase from *Lactobacillus acidophilus*, *Acta Crystallographica Section D* 69 (2013) 648-657.
- [46] M. Engleder, T. Pavkov-Keller, A. Emmerstorfer, A. Hromic, S. Schrempf, G. Steinkellner, T. Wriessnegger, E. Leitner, G.A. Strohmeier, I. Kaluzna, D. Mink, M. Schurmann, S. Wallner, P. Macheroux, K. Gruber, H. Pichler, Structure-based mechanism of oleate hydratase from *Elizabethkingia meningoseptica*, *ChemBioChem* 16 (2015) 1730-1734.
- [47] A. Volkov, A. Liavonchanka, O. Kamneva, T. Fiedler, C. Goebel, B. Kreikemeyer, I. Feussner, Myosin cross-reactive antigen of *Streptococcus pyogenes* M49 encodes a fatty acid double bond hydratase that plays a role in oleic acid detoxification and bacterial virulence, *Journal of Biological Chemistry* 285 (2010) 10353-10361.
- [48] E. Rosberg-Cody, A. Liavonchanka, C. Gobel, R.P. Ross, O. O'Sullivan, G.F. Fitzgerald, I. Feussner, C. Stanton, Myosin-cross-reactive antigen (MCRA) protein from *Bifidobacterium breve* is a FAD-dependent fatty acid hydratase which has a function in stress protection, *BMC Biochemistry* 12 (2011) 9.
- [49] Y.C. Joo, K.W. Jeong, S.J. Yeom, Y.S. Kim, Y. Kim, D.K. Oh, Biochemical characterization and FAD-binding analysis of oleate hydratase from *Macrococcus caseolyticus*, *Biochimie* 94 (2012) 907-915.
- [50] M. Takeuchi, S. Kishino, A. Hirata, S.B. Park, N. Kitamura, J. Ogawa, Characterization of the linoleic acid delta9 hydratase catalyzing the first step of polyunsaturated fatty acid saturation metabolism in *Lactobacillus plantarum* AKU1009a, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 119 (2015) 636-641.
- [51] F. Hou, T. Miyakawa, N. Kitamura, M. Takeuchi, S.B. Park, S. Kishino, J. Ogawa, M. Tanokura, Structure and reaction mechanism of a novel enone reductase, *FEBS Journal* 282 (2015) 1526-1537.
- [52] L.E. Bevers, M.W. Pinkse, P.D. Verhaert, W.R. Hagen, Oleate hydratase catalyzes the hydration of a nonactivated carbon-carbon bond, *Journal of Bacteriology* 191 (2009) 5010-5012.
- [53] S.S. Jean, W.S. Lee, F.L. Chen, T.Y. Ou, P.R. Hsueh, *Elizabethkingia meningoseptica*: An important emerging pathogen causing healthcare-associated infections, *Journal of Hospital Infection* 86 (2014) 244-249.
- [54] C.R. Kepler, K.P. Hirons, J.J. McNeill, S.B. Tove, Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Journal of Biological Chemistry* 241 (1966) 1350-1354.
- [55] C.R. Kepler, S.B. Tove, Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. III. Purification and properties of a linoleate delta-12-cis, delta-11-trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Journal of Biological Chemistry* 242 (1967) 5686-5692.
- [56] A. Liavonchanka, I. Feussner, Biochemistry of PUFA double-bond isomerases producing conjugated linoleic acid, *ChemBioChem* 9 (2008) 1867-1872.
- [57] C.R. Kepler, W.P. Tucker, S.B. Tove, Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. V. Stereospecificity of proton addition and mechanism of action of linoleic acid delta 12-cis, delta 11-trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Journal of Biological Chemistry* 246 (1971) 2765-2771.

- [58] E.M. Gribbon, W.J. Cunliffe, K.T. Holland, Interaction of *Propionibacterium acnes* with skin lipids *in vitro*, *Journal of General Microbiology* 139 (1993) 1745-1751.
- [59] E. Hornung, C. Krueger, C. Pernstich, M. Gipmans, A. Porzel, I. Feussner, Production of (10E,12Z)-conjugated linoleic acid in yeast and tobacco seeds, *Biochimica et Biophysica Acta* 1738 (2005) 105-114.
- [60] A. Liavonchanka, E. Hornung, I. Feussner, M.G. Rudolph, Structure and mechanism of the *Propionibacterium acnes* polyunsaturated fatty acid isomerase, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 103 (2006) 2576-2581.
- [61] A. Liavonchanka, M.G. Rudolph, K. Tittmann, M. Hamberg, I. Feussner, On the mechanism of a polyunsaturated fatty acid double bond isomerase from *Propionibacterium acnes*, *Journal of Biological Chemistry* 284 (2009) 8005-8012.
- [62] D.R. Boone, R.W. Castenholz, G.M. Garrity, *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., Springer, New York, 2001.
- [63] B.M. Lekogo, L. Coroller, A.G. Mathot, P. Mafart, I. Leguerinel, Modelling the influence of palmitic, palmitoleic, stearic and oleic acids on apparent heat resistance of spores of *Bacillus cereus* NTCC 11145 and *Clostridium sporogenes* Pasteur 79.3, *International Journal of Food Microbiology* 141 (2010) 242-247.
- [64] S.S. Peng, M.D. Deng, A.D. Grund, R.A. Rosson, Purification and characterization of a membrane-bound linoleic acid isomerase from *Clostridium sporogenes*, *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2007) 831-839.
- [65] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry* 150 (1985) 76-85.
- [66] N.J. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nature Protocols* 1 (2006) 2876-2890.
- [67] S.M. Kelly, N.C. Price, The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding, *Biochimica et Biophysica Acta* 1338 (1997) 161-185.
- [68] S. Boivin, S. Kozak, R. Meijers, Optimization of protein purification and characterization using thermofluor screens, *Protein Expression and Purification* 91 (2013) 192-206.
- [69] U.B. Ericsson, B.M. Hallberg, G.T. Detitta, N. Dekker, P. Nordlund, Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies, *Analytical Biochemistry* 357 (2006) 289-298.
- [70] S. Raman, R. Vernon, J. Thompson, M. Tyka, R. Sadreyev, J.M. Pei, D. Kim, E. Kellogg, F. DiMaio, O. Lange, L. Kinch, W. Sheffler, B.H. Kim, R. Das, N.V. Grishin, D. Baker, Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta, *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 77 (2009) 89-99.
- [71] Y.F. Song, F. DiMaio, R.Y.R. Wang, D. Kim, C. Miles, T.J. Brunette, J. Thompson, D. Baker, High-resolution comparative modeling with RosettaCM, *Structure* 21 (2013) 1735-1742.
- [72] P. Emsley, B. Lohkamp, W.G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot, *Acta Crystallographica Section D* 66 (2010) 486-501.
- [73] R.A. Laskowski, M.W. Macarthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, Procheck - a program to check the stereochemical quality of protein structures, *Journal of Applied Crystallography* 26 (1993) 283-291.
- [74] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, The Swiss-Model workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics* 22 (2006) 195-201.
- [75] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, Autodock4 and AutodockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *Journal of Computational Chemistry* 30 (2009) 2785-2791.

- [76] M. le Maire, P. Champeil, J.V. Moller, Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents, *Biochimica et Biophysica Acta* 1508 (2000) 86-111.
- [77] S. Ariyaprakai, K. Tananuwong, Freeze-thaw stability of edible oil-in-water emulsions stabilized by sucrose esters and Tweens, *Journal of Food Engineering* 152 (2015) 57-64.
- [78] P. Luna, M. Juarez, M.A. de la Fuente, Gas chromatography and silver-ion high-performance liquid chromatography analysis of conjugated linoleic acid isomers in free fatty acid form using sulphuric acid in methanol as catalyst, *Journal of Chromatography A* 1204 (2008) 110-113.
- [79] Y. Park, K.J. Albright, Z.Y. Cai, M.W. Pariza, Comparison of methylation procedures for conjugated linoleic acid and artifact formation by commercial (trimethylsilyl)diazomethane, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001) 1158-1164.
- [80] J.N. Weiss, The Hill equation revisited: Uses and misuses, *FASEB Journal* 11 (1997) 835-841.
- [81] A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids, *Journal of Molecular Biology* 13 (1965) 238-252.
- [82] J.L. Rigaud, D. Levy, Reconstitution of membrane proteins into liposomes, *Liposomes B* 372 (2003) 65-86.
- [83] T.C. Anglin, J.C. Conboy, Lateral pressure dependence of the phospholipid transmembrane diffusion rate in planar-supported lipid bilayers, *Biophysics Journal* 95 (2008) 186-193.
- [84] S. Bibi, R. Kaur, M. Henriksen-Lacey, S.E. McNeil, J. Wilkhu, E. Lattmann, D. Christensen, A.R. Mohammed, Y. Perrie, Microscopy imaging of liposomes: From coverslips to environmental SEM, *International Journal of Pharmaceutics* 417 (2011) 138-150.
- [85] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 850-858.
- [86] W.J. Qian, T. Liu, M.E. Monroe, E.F. Strittmatter, J.M. Jacobs, L.J. Kangas, K. Petritis, D.G. Camp, 2nd, R.D. Smith, Probability-based evaluation of peptide and protein identifications from tandem mass spectrometry and Sequest analysis: The human proteome, *Journal of Proteome Research* 4 (2005) 53-62.
- [87] A. Keller, A.I. Nesvizhskii, E. Kolker, R. Aebersold, Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 5383-5392.
- [88] D.V. Tulumello, C.M. Deber, Efficiency of detergents at maintaining membrane protein structures in their biologically relevant forms, *Biochimica Biophysica Acta* 1818 (2012) 1351-1358.
- [89] Y. Zhang, P.S. Cremer, Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series, *Current Opinion in Chemical Biology* 10 (2006) 658-663.
- [90] Y. Zhang, S. Furyk, D.E. Bergbreiter, P.S. Cremer, Specific ion effects on the water solubility of macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister series, *Journal of the American Chemical Society* 127 (2005) 14505-14510.
- [91] G. Pugalenti, G. Archunan, R. Sowdhamini, DIAL: A web-based server for the automatic identification of structural domains in proteins, *Nucleic Acids Research* 33 (2005) W130-132.
- [92] G. Kleiger, D. Eisenberg, GxxxG and GxxxA motifs stabilize FAD and NAD(P)-binding Rossmann folds through C^α-H···O hydrogen bonds and Van der Waals interactions, *Journal of Molecular Biology* 323 (2002) 69-76.
- [93] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, BLAST: Basic local alignment search tool, *Journal of Molecular Biology* 215 (1990) 403-410.
- [94] M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins, Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics* 23 (2007) 2947-2948.

- [95] R.A. Laskowski, M.B. Swindells, Ligplot+: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery, *Journal of Chemical Information and Modeling* 51 (2011) 2778-2786.
- [96] A. Mashaghi, P. Partovi-Azar, T. Jadidi, N. Nafari, P. Maass, M.R. Tabar, M. Bonn, H.J. Bakker, Hydration strongly affects the molecular and electronic structure of membrane phospholipids, *Journal of Chemical Physics* 136 (2012) 114709.
- [97] C.G. Sinn, M. Antonietti, R. Dimova, Binding of calcium to phosphatidylcholine-phosphatidylserine membranes, *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects* 282 (2006) 410-419.
- [98] N.A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M.J. Holst, J.A. McCammon, Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 98 (2001) 10037-10041.
- [99] C. Castaldo, V. Vastano, R.A. Siciliano, M. Candela, M. Vici, L. Muscariello, R. Marasco, M. Sacco, Surface displaced alpha-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein, *Microbial Cell Factories* 8 (2009) 14.
- [100] K. Ramiah, C.A. van Reenen, L.M. Dicks, Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*, *Research in Microbiology* 159 (2008) 470-475.
- [101] J. Glenting, H.C. Beck, A. Vrang, H. Riemann, P. Ravn, A.M. Hansen, M. Antonsson, S. Ahrne, H. Israelsen, S. Madsen, Anchorless surface associated glycolytic enzymes from *Lactobacillus plantarum* 299v bind to epithelial cells and extracellular matrix proteins, *Microbiological Research* 168 (2013) 245-253.
- [102] V. Vastano, U. Capri, M. Candela, R.A. Siciliano, L. Russo, M. Renda, M. Sacco, Identification of binding sites of *Lactobacillus plantarum* enolase involved in the interaction with human plasminogen, *Microbiological Research* 168 (2013) 65-72.
- [103] J. Burgain, J. Scher, G. Francius, F. Borges, M. Corgneau, A.M. Revol-Junelles, C. Cailliez-Grimal, C. Gaiani, Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components, *Advanced Colloid Interface Science* 213 (2014) 21-35.
- [104] V. Pancholi, Multifunctional alpha-enolase: Its role in diseases, *Cellular and Molecular Life Sciences* 58 (2001) 902-920.
- [105] P. Bove, P. Russo, V. Capozzi, A. Gallone, G. Spano, D. Fiocco, *Lactobacillus plantarum* passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: Carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis, *Microbiological Research* 168 (2013) 351-359.
- [106] D.I. Serrazanetti, M.E. Guerzoni, A. Corsetti, R. Vogel, Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in *Lactobacilli*, *Food Microbiology* 26 (2009) 700-711.
- [107] G. Brisson, H.F. Payken, J.P. Sharpe, R. Jiménez-Flores, Characterization of *Lactobacillus reuteri* interaction with milk fat globule membrane components in dairy products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2010) 5612-5619.

ANEXOS

ANEXO 1: COMPOSICIÓN DEL KIT DE ADITIVOS

(Additive screen HT, *Hampton Research Corp., USA*)

Condición	Composición	Clasificación	Concentración en la muestra
1	BaCl ₂ dihidratado	Metal multivalente	0.05 M
2	CaCl ₂ hidratado		0.05 M
3	CaCl ₂ dihidratado		0.05 M
4	CoCl ₂ hexahidratado		0.05 M
5	CuCl ₂ dihidratado		0.05 M
6	MgCl ₂ hexahidratado		0.05 M
7	MnCl ₂ tetrahidratado		0.05 M
8	SrCl ₂ hexahidratado		0.05 M
9	YCl ₃ hexahidratado		0.05 M
10	ZnCl ₂ hexahidratado		0.05 M
11	FeCl ₃ hexahidratado		0.05 M
12	NiCl ₂ hexahidratado		0.05 M
13	CrCl ₃ hexahidratado		0.05 M
14	Pr(COO) ₃ hidratado		0.05 M
15	(NH ₄) ₂ SO ₄	Sal	0.5 M
16	KCl		0.5 M
17	LiCl		0.5 M
18	NaCl		1.0 M
19	NaF		0.25 M
20	NaI		0.5 M
21	NaCN		1.0 M
22	Tartrato de Na-K tetrahidratado		0.5 M
23	Citrato de Na tribásico dihidratado		0.5 M
24	CsCl		0.5 M
25	Malonato de Na (pH 7.0)	0.5 M	
26	L-Prolina	Aminoácido	0.05 M
27	Fenol	Agente disociante	0.05 M
28	Dimetil sulfóxido (DMSO)		15% v/v
29	NaBr		0.05 M
30	Ácido 6-aminohexanóico	Linker	15% v/v
31	Dihidrocloruro de 1,5-diamino-pentano		15% v/v
32	1,6-diamino-hexano		15% v/v
33	1,8-diamino-octano		15% v/v
34	Glicina		0.5 M
35	Glicil-gicil-glicina		0.15 M
36	Taurina		0.05 M
37	Hidrocloruro de betaína		0.05 M
38	Epermidina	Poliamina	0.05 M
39	Tetra-hidrocloruro de espermina		0.05 M
40	Cloruro de hexa-amin-Co (III)		0.05 M
41	Sarcosina		0.05 M

Condición	Composición	Clasificación	Concentración en la muestra
42	Hidrocloruro de trimetilamina	Agente caotrópico	0.05 M
43	Hidrocloruro de guanidina		0.5 M
44	Urea		0.05 M
45	NAD hidratado	Cofactor	0.05 M
46	ATP sal disódica hidratada		0.05 M
47	Hidrocloruro de TCEP	Agente reductor	0.05 M
48	GSH/GSSG		0.005 M
49	EDTA sal disódica dihidratada	Agente quelante	0.05 M
50	Polivinil-pirrolidona K15	Polímero	2.5% p/v
51	Dextran-sulfato de Na		15% p/v
52	Etoxilato de pentaeritritol		20% v/v
53	Polietilen-glicol 3,350		5% p/v
54	D-(+)-glucosa monohidratada	Carbohidrato	15% p/v
55	Sucrosa		15% p/v
56	Xilitol		15% p/v
57	D-sorbitol		15% p/v
58	Mio-inositol		6% p/v
59	D-(+)-trealosa dihidratada		15% p/v
60	D-(+)-galactosa		15% p/v
61	Etilen glicol		Polyol
62	Glicerol	Polyol	15% v/v
63	NDSB-195	Sulfobetaina	1.5 M
64	NDSB-201		1.0 M
65	NDSB-211		1.0 M
66	NDSB-221		1.0 M
67	NDSB-256		0.5 M
68	CYMAL-7	Amfilo	0.07 M
69	Hidrocloruro de benzamidina		10% p/v
70	Óxido de n-dodecil-N,N-dimetilamina	Tensoactivo	2.5% p/v
71	n-Octil-β-D-glucosido		2.5% p/v
72	n-Dodecil-β-D-maltósido		2.5% p/v
73	Óxido de N-trimetilamina dihidratada	Osmolito	15% p/v
74	1,6-hexanediol	Molécula orgánica, no volátil	15% p/v
75	(+/-)-2-Metil-2,4-pentanediol		15% v/v
76	Polietilen-glicol 400		15% v/v
77	Jeffamina M-600, pH 7.0		25% v/v
78	2,5-hexanediol		20% v/v
79	(±)-1,3-butanediol		20% v/v
80	Polipropilen-glicol P 400		20% v/v
81	1,4-dioxano		15% v/v
82	Etanol	Disolvente orgánico, volátil	15% v/v
83	2-propanol		15% v/v
84	Metanol		15% v/v
85	1,2-butanediol		5% v/v
86	tert-butanol		20% v/v
87	1,3-propanediol		20% v/v
88	Acetonitrilo		20% v/v
89	Formamida		20% v/v
90	1-propanol		20% v/v
91	Acetato de etilo		2.5% v/v

Condición	Composición	Clasificación	Concentración en la muestra
92	Acetona	Disolvente orgánico, volátil	20% v/v
93	Dicloro-metano		0.12% v/v
94	1-butanol		3.5% v/v
95	2,2,2-trifluoro-etanol		20% v/v
96	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol		20% v/v

ANEXO 2: COMPOSICIÓN DEL KIT DE pH
 (Wizard pH buffer screen, Rigaku Reagents Inc., USA)

Condición	Valores de pH							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Lactato de Na / HCl	2.4	2.8	3.2	3.6	4.0	4.4	4.8	5.2
Acetato de Na / Ác. acético	3.4	3.8	4.2	4.6	5.0	5.4	5.8	6.2
MES / NaOH	4.6	5.0	5.4	5.8	6.2	6.6	7.0	7.4
Bis-tris / HCl	5.2	5.6	6.0	6.4	6.8	7.2	7.6	8.0
Imidazol / HCl	5.4	5.8	6.2	6.6	7.0	7.4	7.8	8.2
K ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄	5.8	6.2	6.6	7.0	7.4	7.8	8.2	8.6
HEPES / NaOH	6.0	6.4	6.8	7.2	7.6	8.0	8.4	8.8
Tris / HCl	6.6	7.0	7.4	7.8	8.2	8.6	9.0	9.4
Bicina / NaOH	7.0	7.4	7.8	8.2	8.6	9.0	9.4	9.8
CHES / NaOH	8.0	8.4	8.8	9.2	9.6	10.0	10.4	10.8
Glicina / NaOH	8.2	8.6	9.0	9.4	9.8	10.2	10.6	11.0
CAPS / NaOH	8.8	9.2	9.6	10.0	10.4	10.8	11.2	11.6

ANEXO 3:

**Functional characterization of a fatty acid double-bond hydratase
from *Lactobacillus plantarum* and their interaction with biosynthetic
membranes**

Joana Ortega-Anaya and Alejandra Hernández-Santoyo

(2015)

Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes 1848, 3166 – 3174.



Functional characterization of a fatty acid double-bond hydratase from *Lactobacillus plantarum* and its interaction with biosynthetic membranes



Joana Ortega-Anaya, Alejandra Hernández-Santoyo *

Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, DF C.P. 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2015

Received in revised form 18 August 2015

Accepted 14 September 2015

Available online 21 September 2015

Keywords:

Linoleic acid

10-Hydroxy-12-*cis*-octadecenoic acid

Lactobacillus plantarum

Fatty acid hydratase

Flavoenzyme

Fluorescent proteoliposomes

ABSTRACT

Hydrogenation of linoleic acid and other polyunsaturated fatty acids is a detoxification mechanism that is present in the *Lactobacillus* genus of lactic bacteria. The first stage in this multi-step process is hydration of the substrate with formation of 10-hydroxy-9-*cis*-octadecenoic acid due to fatty-acid hydratase activity that has been detected only in the membrane-associated cell fraction; however, its interaction with the cell membrane is unknown. To provide information in this respect we characterized the homotrimeric 64.7 kDa-native protein from *Lactobacillus plantarum*; afterwards, it was reconstituted in proteoliposomes and analyzed by confocal fluorescence microscopy. The results showed that hydratase is an extrinsic-membrane protein and hence, the enzymatic reaction occurs at the periphery of the cell. This location may be advantageous in the detoxifying process since the toxic linoleic acid molecule can be bound to hydratase and converted to non-toxic 10-hydroxy-9-*cis*-octadecenoic acid before it reaches cell membrane. Additionally, we propose that the interaction with membrane periphery occurs through electrostatic contacts. Finally, the structural model of *L. plantarum* hydratase was constructed based on the amino acid sequence and hence, the putative binding sites with linoleic acid were identified: site 1, located in an external hydrophobic pocket at the C-terminus of the protein and site 2, located at the core and in contact with a FAD molecule. Interestingly, it was found that the linoleic acid molecule arranges around a methionine residue in both sites (Met154 and Met81, respectively) that acts as a rigid pole, thus playing a key role in binding unsaturated fatty acids.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Linoleic acid (LA; 18:2 $\Delta^{9Z,12Z}$), along with other polyunsaturated fatty acids, are toxic to many bacteria causing the inhibition of cell growth. Moreover, they may deteriorate cellular membranes and block native fatty acid biosynthesis via the inhibition of enoyl-ACP reductase [1–4]. In order to prevent this toxicity, polyunsaturated fatty acids are enzymatically hydrogenated by a mechanism called biohydrogenation which is the complete reduction of double bonds on the carbon chain, producing non-toxic saturated fatty acids as the final product [5]. This process involves various steps and has been best described for LA and oleic acid (OA; 18:1 Δ^{9Z}) which are converted to non-toxic saturated stearic acid (SA; 18:0) by rumen microbiota [5–8].

Lactic bacteria belonging to *Lactobacillus* genus, such as *Lactobacillus plantarum*, are also known to biohydrogenate LA and other

polyunsaturated fatty acids through a newly discovered and intricate metabolism consisting of multiple reactions catalyzed by multiple proteins (CLA-HY, CLA-DH, CLA-DC and CLA-ER) that generate characteristic fatty acid species (such as hydroxy fatty acids, oxo fatty acids, conjugated fatty acids and partially saturated *trans* fatty acids) as the intermediates to finally produce saturated monoenes (OA and *trans*-vaccenic acid) [9–11]. The first step in biohydrogenation occurring in *L. plantarum* is hydration of the Δ^{9Z} double bond of LA which is mediated by a 64 kDa membrane-associated protein producing 10-hydroxy-12-*cis*-octadecenoic acid (10-HOE; 18:1 Δ^{12Z}) as the only product (Fig. 1) [9,12].

Once 10-HOE is produced, it can suffer various reactions (oxidation of hydroxyl group, reduction of oxo group, dehydration and isomerization) catalyzed by the linoleate isomerase complex (CLA-DH, CLA-DC, CLA-DH and CLA-ER), which has been partially characterized recently, to finally produce monoenoic acids and conjugated linoleic acid isomers (CLA; 18:2 $\Delta^{x,x,yY}$) [9–11,13]. Bioactive conjugated isomer 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienoic acid (9-*cis*-11-*trans* CLA; 18:2 $\Delta^{9Z,11E}$) produced by the multi-component enzymatic system in *L. plantarum* has been associated with a variety of health promoting effects [14,15] such as anti-obesity and antiadipogenic activities [16], anticarcinogenic activity [17] and modulation of immune functions [18].

There are fatty acid isomerases which concertedly convert LA into a bioactive isomer of CLA (i.e. without formation of hydroxyenoic fatty

Abbreviations: 10-HOE, 10-hydroxy-12-*cis*-octadecenoic acid; CLA, conjugated linoleic acid; DMPC, 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; FAD, flavin-adenine dinucleotide; LA, linoleic acid; LAH, *Lactobacillus acidophilus* hydratase; LPH, *Lactobacillus plantarum* hydratase; MCRA, myosin-cross-reactive antigen; OTGP, octyl- β -D-glucopyranoside; POPC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine.

* Corresponding author.

E-mail addresses: joanna@comunidad.unam.mx (J. Ortega-Anaya), hersan@unam.mx (A. Hernández-Santoyo).

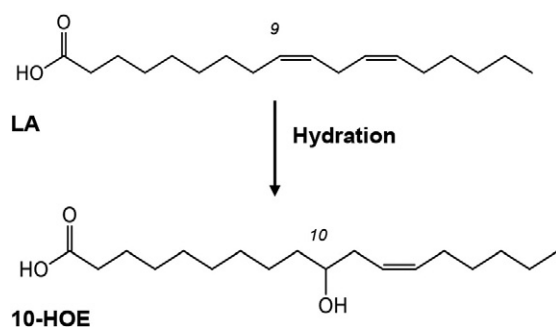


Fig. 1. Hydration of LA in *Lactobacillus plantarum*.

acids); however, to date, only three bacterial linoleate isomerases derived from *Butyrivibrio fibrisolvens*, [19], *Clostridium sporogenes* [20] and *Propionibacterium acnes* [21] have been biochemically characterized. Out of the three proteins, only *P. acnes* isomerase (PAI) has been structurally characterized as a FAD-dependent protein that produces 10-*trans*-12-*cis*-CLA [21,22].

In recent years, some proteins belonging to the myosin-cross-reactive antigen (MCRA) family have been identified as FAD-containing hydratases that act on the $\Delta 9Z$ and $\Delta 12Z$ double bonds of C16 and C18 non-esterified fatty acids with the formation of 10-hydroxy and 10,13-dihydroxy fatty acids in several bacteria [12,23–26]. Hydratase from *Lactobacillus acidophilus* (LAH; PDB code: 4ia5 and 4ia6) has been the only MCRA (591 residues and 67.7 kDa) from the *Lactobacillus* genus to provide structural and mechanistic information about the hydration reaction [27]. It showed that the only product from hydration of LA was 10-HOE and that hydroxyl group added to $\Delta 9Z$ comes from a water molecule located at the hydrophobic substrate channel or binding site. LAH also binds one FAD molecule through a FAD-binding motif that has a structural and stabilizing role on the protein rather than participating in the catalytic reaction and is easily lost during purification of the homodimeric hydratase [27].

In this study, we investigated the biochemical properties of native MCRA from *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 which has only been described as a fatty acid double-bond hydratase and a FAD-containing protein by means of sequence analysis [12]. Here, the protein is denoted as LPH (*L. plantarum* hydratase) and was isolated in its native form. Furthermore, we propose a three-dimensional arrangement of the protein and performed a molecular docking with a LA molecule in order to comprehend the binding sites of the substrate which were identified and characterized as two hydrophobic pockets with amino acid residues identical to those from the fatty acid-hydratases from *L. acidophilus* (LAH) and *Elizabethkingia meningoseptica* (EMH) and those from LA-isomerase from *Propionibacterium acnes* (PAI).

Previous reports have shown that MCRA from *L. plantarum* AKU 1009a is present in the cell membrane fraction [9], however, no further experiments have been carried out to establish the nature of this membrane association, so in order to determine the interaction of native LPH with biomimetic membranes, we reconstituted the protein in DPPC:POPC proteoliposomes which were fluorescently labeled and further characterized by confocal fluorescence microscopy. These results shed light into the putative location of the hydration reaction of LA in *L. plantarum* cells and its role in the detoxifying process from polyunsaturated fatty acids.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strain and growth conditions

L. plantarum CFQ-100, a subculture of *L. plantarum* ATCC 8014 strain, was purchased from the WDCM 100 Culture Collection (World Federation for Culture Collections) of Faculty of Chemistry, UNAM, Mexico and

subsequently cultured throughout all the experiments to obtain fresh cells. The strain was grown in 20 mL of MRS broth (CONDA Lab, Spain) supplemented with 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LA (99% purity, Sigma Chemical Co., USA) emulsified with 0.30% (w/v) of Tween 80 and incubated at 30 °C with shaking (120 strokes/min) for 17.5 h so the cell growth has reached the end of the log phase without reaching the stationary phase. 10 mL of this seed culture was transferred into 1000 mL of fresh MRS/LA broth and incubated under the same conditions. The cell pellet was harvested by centrifugation (10,000 $\times g$, 30 min, 4 °C) and washed with 30 mL of sterile 0.85% NaCl. The biomass yield production was between 8.5–13 g/L (wet weight).

2.2. Enzyme purification

The harvested cell pellet was suspended in lysis buffer, which consisted of 100 mM potassium phosphate buffer pH 6.5 with 50 mM NaCl, 1 mM DTT and 1 mM PMSF. The suspension was then sonicated in a Misonix 3000 sonicator (Qsonica LLT, USA) using two cycles of 45 W for 5 min each. After that, the cell debris and unbroken cells were separated with centrifugation (10,000 $\times g$, 30 min, 4 °C) and the clear supernatant was used. This crude extract was ultracentrifuged (200,000 $\times g$, 60 min, 4 °C) to obtain the membrane-associated protein fraction observed as a gel-precipitate.

The membrane precipitate was solubilized with solubilizing buffer, which contained 20 mM potassium phosphate pH 6.5 with 50 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM DTT and 1 mM PMSF. The extraction and solubilization of membrane proteins was achieved through the addition of increasing concentrations of octyl- β -D-glucopyranoside (OTGP, Sigma Chemical Co., USA) starting from 4 mM, followed by 6 mM and finally 9 mM where the critical micelle concentration (CMC) was reached. This gradual procedure is pivotal for achieving the extraction of membrane proteins while maintaining their stability in solution [28].

Solubilized membrane proteins were first fractionated by selective precipitation with 1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (High Purity Reactivos Analíticos, Mexico) and LPH was found only in the supernatant fraction which was further dialyzed (20 \times) using a membrane with a molecular weight cutoff between 12 and 14 kDa against solubilizing buffer supplemented with 9 mM OTGP and 0.1 mM FAD (Sigma Chemical Co., USA). Afterwards, this fraction was subjected to gel filtration chromatography in a Bio SEC-5 column (4.6 mm \times 150 mm \times 5 μm , Agilent Technologies, Germany) using a HPLC system (HP Agilent 1100 series, Agilent Technologies, Germany) equilibrated with 20 mM phosphate buffer pH 6.5 containing 50 mM NaCl. Protein fractions were eluted with the same buffer at a flow rate of 1 mL/min, collected and analyzed for hydratase activity.

2.3. Hydratase activity assay

Unless otherwise stated, each hydration reaction was performed in triplicate and consisted on 5 mL of 20 mM potassium phosphate buffer pH 6.5, 100 μL of protein extract and 20 μg of LA as the substrate, emulsified with 0.25% (w/v) of Tween 80. The reaction was carried out for 24 h at 30 °C and 200 strokes/min. Two negative controls were used consisting in all the components except LA and all the components except the protein extract.

After incubation, the lipids were extracted with 4 mL of a chilled mix of hexane–ethyl acetate (70%–30%) and then subjected to two cycles of freeze–thawing, followed by centrifugation (3,500 $\times g$, 40 min, 4 °C) to break the emulsion previously formed. Afterwards, the organic phase was separated from the aqueous phase and washed with 1 mL of saturated NaCl. Finally, it was washed with 2 mL \times 2 of deionized H_2O , dried overnight with anhydrous Na_2SO_4 and then filtered through Whatman 2 paper. The fatty acids in the organic phase were methylated and then analyzed by GC to determine 10-HOE production (see Section 2.4).

2.4. Analysis of fatty acids

Fatty acids in hexane–ethyl acetate, were dried using a water bath at 40 °C under non-oxidizing conditions with a stream of N₂. After that, they were methylated by incubation with 2 mL of 1% H₂SO₄ in methanol (v/v) at 35 °C for 30 min [29]. The organic phase was extracted with hexane, neutralized with 1 mL of saturated NaHCO₃ and washed with 2 mL × 2 of deionized H₂O, dried with anhydrous Na₂SO₄ and finally evaporated for GC analysis.

Fatty acid methyl ester derivatives (FAMES) were separated, identified and quantified by a polar Heliflex™ Aqua Wax-DA capillary column (30 m length, 0.25 mm diameter and 0.25 m d_i) (Alltech GmbH, Germany) using an Agilent 6890 gas chromatographer (Agilent Technologies, USA) coupled to a FID detector at 240 °C. The injection volume was 1 µL and a programmed temperature vaporizer (PTV) was used in a split ratio of 1:60. Injection temperature was 240 °C. The temperature program was as follows: the initial oven temperature at 180 °C was held for 0.5 min and increased at 0.5 °C/min to reach 230 °C for 13 min. Hydrogen was used as the carrier gas with a constant flow rate of 1.8 mL/min.

Standard LA and previously purified 10-HOE (see Section 2.5) were used to identify the hydration products by comparison of retention times. The amount of 10-HOE produced was calculated from the integrated area of each peak, as total 10-HOE obtained in mg.

2.5. Purification of 10-HOE

Hydroxylated enoic acids derived from fatty acids, such as 10-HOE are not commercially available, so in order to identify 10-HOE as the reaction product of LPH, fatty acids produced from the hydration of LA were separated by high performance liquid chromatography [20] in a Luna 5u C18(2) preparative column (50 mm × 21.20 mm × 5µ d_i) (Phenomenex, Inc., USA) using a HPLC system (Waters 1525 binary pump, Waters Corp., USA) coupled to a photodiode-array detector (Waters 2996, Waters Corp., USA). The elution was performed with acetonitrile–water (60%–40%) at a flow rate of 12 mL/min. The injection volume was 200 µL and detection was set at 205 nm. Finally, 10-HOE was identified by GC–MS (GCMate II, Jeol, USA) with electron impact ionization source.

2.6. FAD assay

Purified native LPH (100 µL at a concentration of 0.5 mg/mL) was incubated at 4 °C for 16 h with different concentrations of FAD ranging from 0 to 0.1 mM. After that, hydratase activity was measured in triplicates in order to calculate the amount of bound FAD for optimal activity.

2.7. Effect of reaction conditions on hydratase activity and stability

Using fluorescence-based thermal shift assays of native LPH, we studied the effects of various pH values and additives on the stability of the protein [30]. Assays were performed with 10 µL of purified LPH (in 20 mM potassium phosphate buffer pH 6.5 with 50 mM NaCl, 10% glycerol, 9 mM OTGP and 1 mM FAD) mixed with 10 µL of each condition and added with a 1:1000 dilution of SYPRO Orange dye (Invitrogen, Life Technologies, USA) whose λ_{excitation} = 490 nm and λ_{emission} = 575 nm [22]. Fluorescence was recorded with a RT-PCR instrument (Life Technologies, USA) while the temperature was increased in a continuous step from 25–95°C. For the analysis of different additives we used the Additive screen HT kit with 96 different conditions (Hampton Research Corp., USA) which in general, consisted on various sets of reagents included multivalent ions, salts, dissociating agents, linkers, polyamines, chaotropes, reducing and chelating agents, polymers, carbohydrates, polyols, amphiphiles, detergents, sulfobetaines and organic solvents (volatile and non-volatile) at various concentrations. For the analysis of pH values, we used the Wizard pH buffer kit

with 96 different conditions (Rigaku Reagents Inc., USA) which consisted on sets of buffering salts at different pH values including sodium lactate–HCl (pH 2.4–5.2), sodium acetate–acetic acid (pH 3.4–6.2), MES–NaOH (pH 4.6–7.4), bis/tris–HCl (pH 5.2–8.0), imidazole–HCl (pH 5.4–8.2), sodium and potassium phosphate (pH 5.8–8.6), HEPES–NaOH (pH 6.0–8.8), tris–HCl (pH 6.6–9.4), bicine–NaOH (pH 7.0–9.8), CHES–NaOH (pH 8.0–10.8), glycine–NaOH (pH 8.2–11.0) and CAPS–NaOH (pH 8.8–11.6). Final concentration of each condition tested was half of the initial value since it was diluted 1:1 with the protein.

2.8. Structural modeling of LPH and molecular docking with LA

3D-Structure of LPH was produced using Robetta Server (automated protein structure prediction service for *ab initio* and comparative modeling) [31,32]. The amino acid sequence of LPH protein was retrieved from GenBank (accession number CBY45494.1). The server used the *ab initio* method combined with the crystallographic structure of LAH (PDB code: 4ia5) chosen automatically by its 32% sequence homology. Once the structure was built, we used Coot program version 0.8 [33] to correct geometrical parameters. Finally the overall stereo chemical quality of the model was assessed using PROCHECK program [34] on the Swiss MODEL Workspace [35]. Docking studies were carried out by using the program AUTODOCK 4.0 [36]. Hydrogens and Kollman charges were assigned to the receptor and the ligands were assigned with Gasteiger charges and nonpolar hydrogens using AutoDockTools 1.5.7. Docking simulations were run using Lamarckian Genetic algorithm that is known to be the most efficient and reliable method of Auto Dock. The grid maps were calculated using AutoGrid. Initially, potential binding sites were detected, based on the blind docking in which the box was sufficiently large to cover the whole protein 90 Å × 90 Å × 90 Å centered at the center of protein. The next step was a focused docking with a smaller box (40 Å × 40 Å × 40 Å), centered on the best energy result obtained in the blind docking. For all docking parameters, standard values were used as described before, except the amount of independent docking runs performed for each docking simulation, which was set to 200. Cluster analysis was performed on the docked results using a root mean square (RMS) tolerance of 0.5 Å, and the initial coordinates of the ligand were used as the reference structure.

2.9. Reconstitution of LPH into liposomes and confocal fluorescent microscopy (CFM)

Unilamellar proteoliposomes were prepared by the extrusion method mediated by OTGP, which is based on that first outlined by Bangham et al. [37,38]. Briefly, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) and 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) (Sigma Chemical Co., USA) at a molar ratio of 1:1 were mixed with 0.1% (molar fraction) of β-BODIPY® FL C₅-HPC (Life Technologies, USA) as the hydrophobic fluorescent probe which is a phospholipid analog. The mix was dissolved in chloroform–methanol (1:1) and then deposited as a thin film on a round flask by rotary evaporation under reduced pressure. The dry lipid film was hydrated with 20 mM potassium phosphate buffer pH 6.5 in order to obtain a suspension of multilamellar vesicles which were further extruded through polycarbonate membranes (pore size of 200 nm; Avanti Polar Lipids, Inc., USA) 13 times using the Mini-Extruder set (Avanti Polar Lipids, Inc., USA) at 25 °C to form unilamellar liposomes that were left overnight at 4 °C.

Proteoliposomes were produced by adding freshly purified LPH (0.2 mg/mL final concentration) in 20 mM potassium phosphate pH 6.5, 0.1 mM FAD, 10% glycerol, 15 mM OTGP and Rhodamine B (5 µg/mL final concentration) (Sigma Chemical Co., USA) as the hydrophilic fluorescent probe. The excess of detergent, FAD and glycerol was removed by slow dialysis against 20 mM potassium phosphate buffer pH 6.5 with a molecular weight cut-off membrane of 14 kDa.

A 5 μL aliquot of LPH proteoliposomes was placed on a glass slide (1×3 in approx. 1.0 cm) with a cover slip (102×76 mm) and sealed with nail polish. Afterwards, it was analyzed by confocal laser scanning microscopy (Leica TCS SP5 X, Leica Microsystems, Germany) [39] using a 494 nm excitation laser and an emission range of 501–543 nm for BODIPY FL C₅-HPC. A detection and 554 nm excitation laser and an emission range of 588–648 nm for Rhodamine B. All micrographs were captured with the same settings. For three-dimensional image projection of vesicles, z-scans in 0.3–0.49 μm increments were taken through the upper half of a proteoliposome. These scans were then combined and color-merged using the LAS AF lite software Version 4.3 (Leica Microsystems, Germany).

Control experiments were carried out preparing fluorescent liposomes exactly as stated before except without the addition of LPH.

3. Results

3.1. Purification of native LPH

Native LPH purification was achieved by pelleting plasmatic membranes and membrane components by ultracentrifugation as a first step. LA hydratase activity was detected only in this membrane-associated protein fraction and not on the soluble protein fraction. LPH was extracted and solubilized using neutral detergent OTGP at a high concentration (9 mM), which provides a membrane-mimetic environment suitable for maintaining protein stability and solubility outside its membrane [28,40]. The use of other detergents such as Triton-114 or CHAPS resulted in loss of activity (data not shown).

After removal of proteins precipitating with 1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a gel filtration chromatography was used (Fig. S1) and LPH was purified with an 85-fold, a yield of 8.5% and a specific activity of 7.73×10^{-3} , as shown in Table S1.

The purified native LPH showed a molecular mass of 64,748 Da as determined by MALDI-TOF mass spectrometry (Fig. S2A) that is consistent with the calculated value based on the 569 amino acid sequence (GenBank code: CBY45494.1) reported previously by Yang et al. [12]. However, it was found that in solution, the protein existed as a homotrimer with a molecular mass of 215 kDa as observed by gel filtration chromatography (Fig. S2B). This result is different from that observed with linoleic acid hydratase from *L. acidophilus* (LAH) and from *Macrococcus caseolyticus* (MCH) which were found in solution as homodimers [24,27].

3.2. Hydratase activity assay and identification of 10-HOE as the reaction product of LPH

The reaction of LPH with LA led to the formation of 10-hydroxy-12-cis-octadecenoic acid (10-HOE; 18:1 Δ^{12Z}) which according to GC, was the only reaction product (Fig. 2A) besides LA which was not fully converted. The mass spectrum of the isolated product (Fig. 2B and C) shows the characteristic peak at 169 m/z owing to fragmentation at the C12–13 double bond and peaks at 201 and 98 m/z, indicating cleavage of the hydroxyl group at the C10 position. These results, confirm the identity of the 10-HOE molecule as the reaction product.

3.3. FAD uptake

Hydratases that belong to the MCRA's family are known to be FAD-binding proteins, so this cofactor was added to LPH in increasing concentrations and it resulted in increasing hydratase activity as well until reaching a plateau at 55 μM where maximum activity (0.10 μmol 10-HOE/min/mg) is observed (Fig. 3). These findings are very similar with those obtained with *Macrococcus caseolyticus* hydratase [24]. According to Hill's equation fit, FAD binds to LPH in a cooperatively way ($N = 2.3$) and has a K_d value of 4.1 μM . The absence of FAD produces abolishment of enzymatic activity.

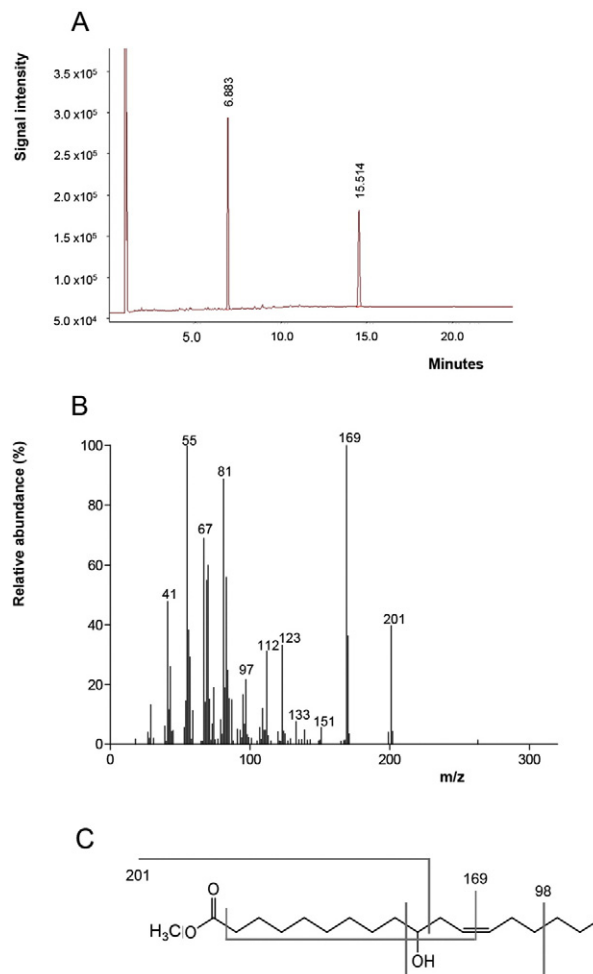


Fig. 2. Characterization of 10-HOE. (A) Total ion gas chromatogram of the conversion of LA (RT = 6.894 min) into 10-HOE (RT = 14.519 min). (B) Mass spectrum of 10-HOE after purification from the reaction mixture using RP-HPLC (Fig. S3) and (C) its fragmentation pattern.

3.4. Effect of reaction conditions on hydratase activity and stability

The variation of pH values on enzymatic activity of LPH reveals that optimal production of 10-HOE occurs at pH 6.5 and 7.0 (Fig. 4A). The pH was varied from 5.0 to 9.0 using 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0

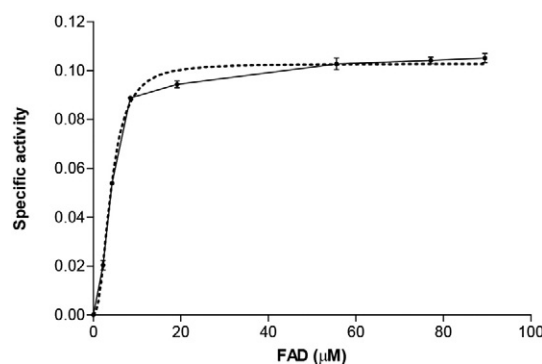


Fig. 3. Effect of FAD concentration in hydratase activity of LPH. The specific activity was calculated as μmol of 10-HOE/min/mg of protein (see Section 2.3).

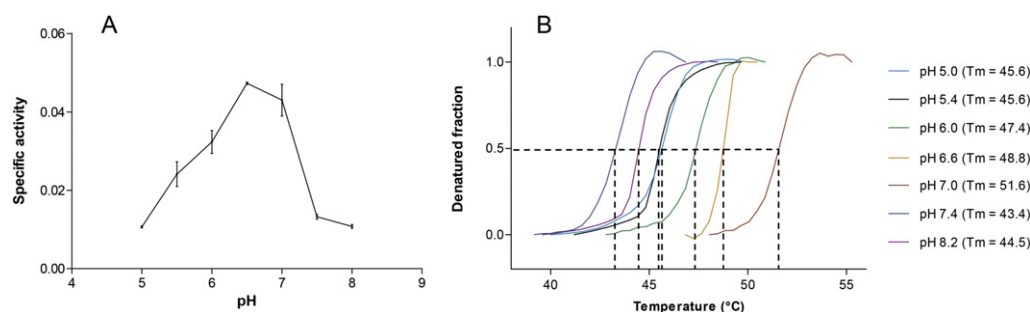


Fig. 4. Effect of pH on LPH. (A) Specific activity, calculated as μmol of 10-HOE/min/mg of protein (see Section 2.3). (B) Thermal stability at different pH values. The different melting point values (T_m) were calculated at the inflection point (dotted black lines) of the transition temperatures using Boltzmann's sigmoidal fit.

and 5.5), 50 mM bis-tris buffer (pH 6.0, 6.5 and 7.0) and 50 mM tris buffer (pH 7.5, 8.0).

Notably, the thermal stability of the protein is higher at pH 7.0 than at pH 6.4–6.6 (Fig. 4B) where the T_m value is increased from 48.7 °C to 51.6 °C at pH 7.0. Acid pH values, below pH 6.5, still allow the enzymatic activity with reduced yields but decrease the thermal stability of the protein whereas the lowest activity and stability of LPH was found in pH values above 7.0. The effect of pH value on thermal stability of LPH was not independent of the salt type used to buffer the different solutions since the protein showed a preference for sodium lactate and acetate salts in pH values below 7.0 and for glycine salt in pH above 8.0 (according to the composition of Wizard pH buffer kit with 96 different conditions).

In addition, MgCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dodecyl- β -maltoside, polyethylene glycol 400 and ethanol were the only additives, out of the 96 tested (see Section 2.7), that also increased the thermal stability of LPH (Fig. 5).

3.5. Structural modeling of LPH and its interaction with LA

A three-dimensional structure of LPH was calculated (Fig. 6A) (with a confidence of 0.8752) by homology modeling using an *ab initio* method based on the amino acid sequence of the protein (GenBank code: CBY45494.1) combined with the crystallographic structure of LAH (PDB code: 4ia5) due to their moderate sequence identity. Further analysis using DIAL server [41] resulted in the identification of 3 intricately connected domains: Domain 1 (colored in light blue in Fig. 6A) (residues 1–50, 229–352 and 482–549) has a mixed α/β fold composed of five parallel β -sheets between three helices on the inner part and three antiparallel β -sheets on the outer part of the protein. This particular arrangement is denoted as Rossmann-like fold found in many FAD and NAD(P)-binding proteins which is also found on LAH, EMH (PDB code: 4uir) [42] and PAI (PDB code: 2bab) [21]. Domain 2 (colored in bubblegum pink in Fig. 6A) (residues 51–132, 209–228 and 353–481) has also a mixed α/β fold and consists of five antiparallel β -sheets surrounded closely by four helices and furtherly by three more helices

that are in contact with the other two domains. Domain 3 (colored in wheat in Fig. 6A) (residues 133–208 and 550–569) is practically an all α fold and corresponds to the C-terminus of the protein.

Overall, LPH holds practically the same tertiary structure as LAH (Fig. 6B), with the exception of loops which showed high difference in terms of RMSD (Fig. S4) however, the biggest difference is that LAH holds two extra helices that account for additional fourth domain.

Molecular docking assays resulted in the identification of two putative LA sites (Fig. 7): Site 1 was found to be a hydrophobic pocket located in domain 3 and the amino acid residues that have a direct interaction with LA are Leu149, Ile153, Met154, Pro156, Met206, Ile210 and Phe213 (Fig. 7C). Interestingly, the fatty acid molecule is arranged around Met154 which acts as a rigid pole for the hydrocarbon chain at the mid part whereas at the ω -end of LA, the molecule is packed between Leu149, Ile210, Phe213 and Leu560. Finally, the carboxylate of LA appears to be solvent-exposed as it was found on the outer surface of the protein and interacting with Pro156 through hydrophobic interaction (Fig. 7C) according to LigPlot analysis (Fig. S5A) [43].

An additional active site (site 2) was found at the core of the protein along with the putative FAD-binding site (Fig. 7B). Site 2 was found to be a hydrophobic cavity located at the interface of domains 1, 2 and 3. A schematic representation of the amino acid residues that are considered to have a direct interaction with LA are depicted in Fig. 7C. From there, it can be highlighted that the fatty acid molecule is also arranged around a methionine residue (Met81) acting as a rigid pole for the hydrocarbon chain at the mid part. All of the amino acid residues and the FAD molecule as well, are forming hydrophobic contacts with the ligand according to LigPlot analysis (Fig. S5B) [43].

Site 2 was found to be in contact with the putative FAD-binding site through hydrophobic contacts. A schematic representation of the amino acid residues interacting with the FAD molecule is depicted in Figure S5C. According to LigPlot analysis [43], FAD establishes hydrogen bonds with the main chain of residues Leu18, Ser19, Asn49, Arg80, Met81, Ser300, Glu513 and Thr524 whereas the rest of the residues interact through hydrophobic interactions.

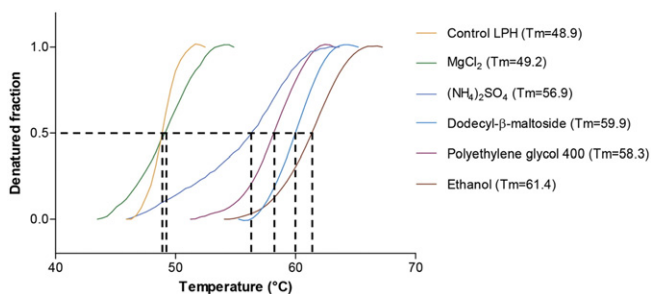


Fig. 5. Effect of additives on LPH thermal stability. The different melting point values (T_m) were calculated at the inflection point (dotted black lines) of the transition temperatures using Boltzmann's sigmoidal fit.

3.6. Analysis of the interaction of LPH with POPC:DMPC liposomes

Native LPH was reconstituted in POPC:DMPC proteoliposomes as stated before. The system was dual-labeled so that both, phospholipid bilayer and LPH were visualized simultaneously by confocal fluorescence microscopy (Fig. 8).

The results show that the Rhodamine B-labeled LPH is arranged around the surface of β -BODIPY@ FL C₅-HPC-labeled liposomes. This interaction is clearly observed only on the surface of the lipid bilayer suggesting that LPH establishes a peripheral association with biomimetic membranes (Fig. 8, C2).

Control experiments of liposomes without the protein showed the absence of any association around the surface of the liposome (Fig. S6).

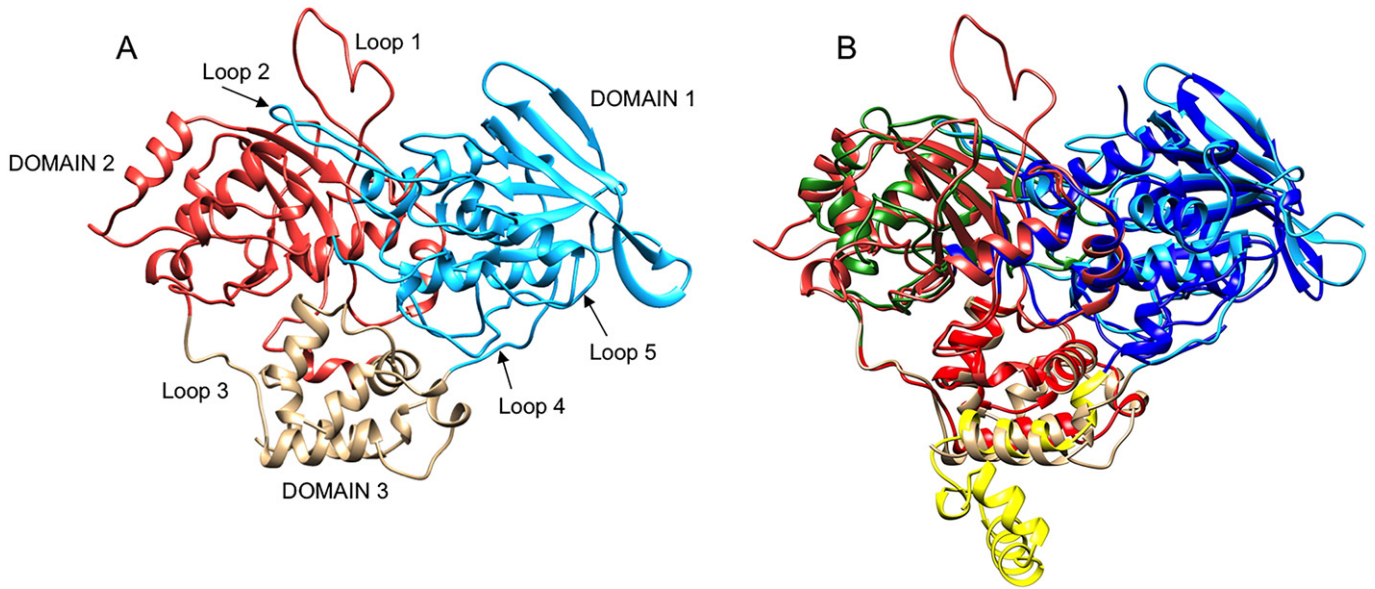


Fig. 6. Three-dimensional structure of LPH. (A) Depiction of domain 1 (light blue) which possess a Rossmann-like folding, domain 2 (bubblegum pink) that consist of α/β fold and domain 3 (wheat) which is all α -helix fold. Highly disordered regions were found as large loops: loop 1 (residues 42–78), loop 2 (residues 298–322), loop 3 (residues 119–141), loop 4 (residues 490–508) and loop 5 (541–552). (B) Structural comparison of LPH and LAH. Colors of LAH are the same as the original reference [27] (domain 1 in blue, domain 2 in green, domain 3 in red and domain 4 in yellow).

4. Discussion

Hydratase activity towards polyunsaturated fatty acids like linoleic and oleic acid poses a detoxification mechanism in bacteria since these lipids inhibit the development of plasmatic membranes and enoyl-ACP reductase activity [4,26]. MCRA protein family in a various intestinal bacteria has been found to possess this enzymatic activity in order to survive

and adapt their growth in fatty acid-rich environments [7]. Hence, it is essential for cell defense in hostile environments. Additionally, the hydration of linoleic acid in lactic bacteria such as *L. plantarum*, has been proved to be the first step in the production of bioactive conjugated linoleic acid [6] which has many beneficial properties. In this study, 64.7 kDa linoleic acid hydratase from *L. plantarum* (LPH) was isolated in its native form from the plasmatic membrane fraction using OTGP as

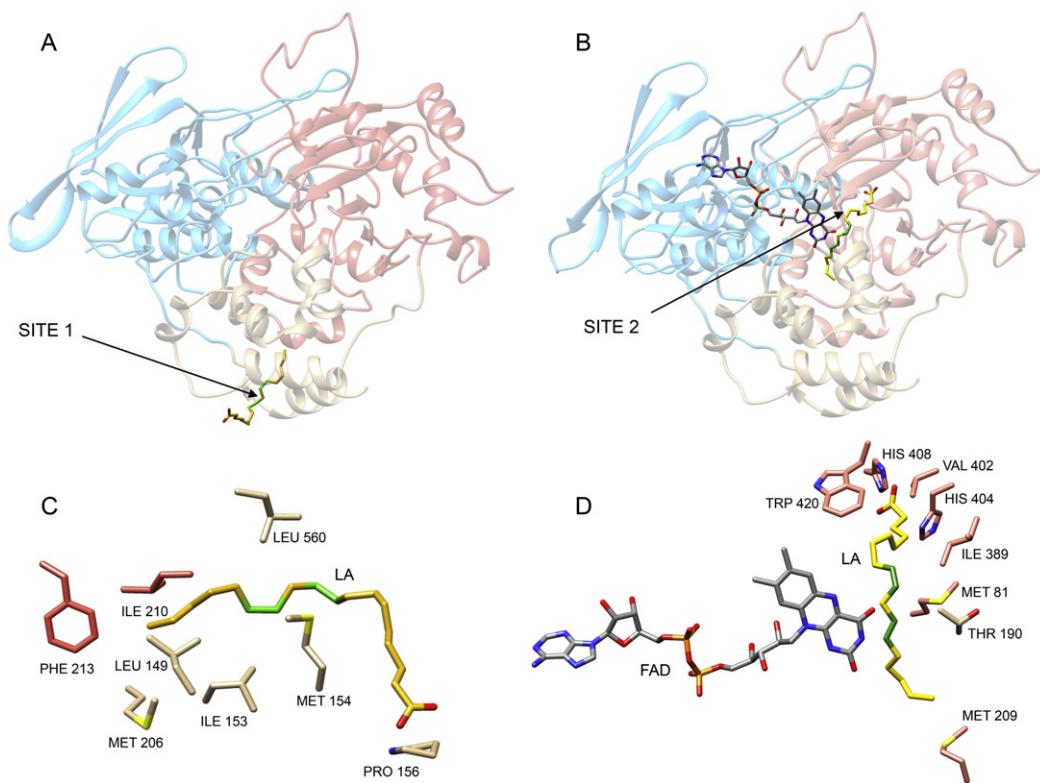


Fig. 7. Architecture of the binding sites of LPH with LA. (A) Overall location of LA in site 1 at the hydrophobic pocket in domain 3 and (B) in FAD-binding site 2 at the hydrophobic cavity between the three domains. (C) Depiction of residues that account for active site 1 and (D) for active site 2. LA molecule is colored in yellow whereas double bonds (carbons 9–10 and 12–13) are colored in green.

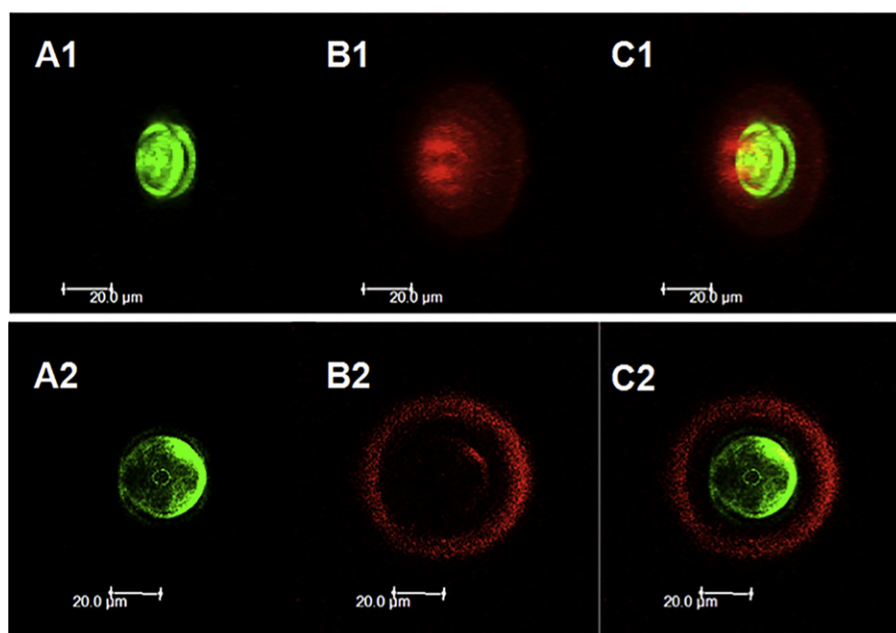


Fig. 8. CFM of LPH proteoliposomes. Assembly and association of the protein with biomimetic membranes. (A) Green fluorescence belongs to hydrophobic β -BODIPY® FL C₅-HPC signal. It shows the phospholipid bilayer shape and topology while (B) red fluorescence belongs to hydrophilic Rhodamine B signal found to the protein. (C) Combined and color-merged images of both signals. Images in row 1 show a convex cross section of one proteoliposome whereas images in row 2 show a front view.

the disrupting detergent of the membranes. It was found that the protein undergoes oligomerization in solution resulting in the formation of an active homotrimer, in contrast with recombinant LAH and MCH which were characterized as homodimers [24,27]. Oligomerization might occur due to interaction between the highly disorder regions that can be found on each monomer such as large loops (Fig. 6A).

Biochemical characterization of the native protein showed that optimal stability occurs on an environment set at a pH between 6.5 and 7.0 and with the addition of either MgCl₂ (50 mM), (NH₄)₂SO₄ (500 mM), dodecyl- β -maltoside (2.5%), polyethylene glycol 400 (25%) or ethanol (15%). The maximum production of 10-HOE from LA occurs also between pH 6.5 and 7.0.

The amino acid sequence analysis of LPH using BLAST server and Clustal W server [44,45] (Fig. S7) showed a moderate identity with

other fatty acid hydratases: 32% with LAH, 30% with BBH and MCH and 31% with SPH and EMH. Additionally, all these hydratases that also belong to the MCRA's family are known to be FAD-binding proteins. Experimentally it was demonstrated that LPH binds this cofactor cooperatively with a K_d value of 4.1 μ M (Fig. 3). The FAD-binding domain of LPH has been previously defined as a 47 residue cluster (from Met6 to Gly52) [12]; however, from the sequence alignment analysis (Fig. S7), eighteen extra residues were added to this domain (65 amino acids in total) and from them, Gly15, Gly17, Gly52, Gly78, Gly79, Arg80, Met81, Thr297, Gly512, Phe523 and Thr524 are highly conserved among FAD-binding domain in hydratases. Additionally, the domain presents the characteristic GxG(x)₉L(x)₁₇₋₂₃G motif consistent with FAD- and NAD(P)-binding Rossmann folds [46] and structurally, is located at the core of LPH, directly in contact with LA binding-site 2

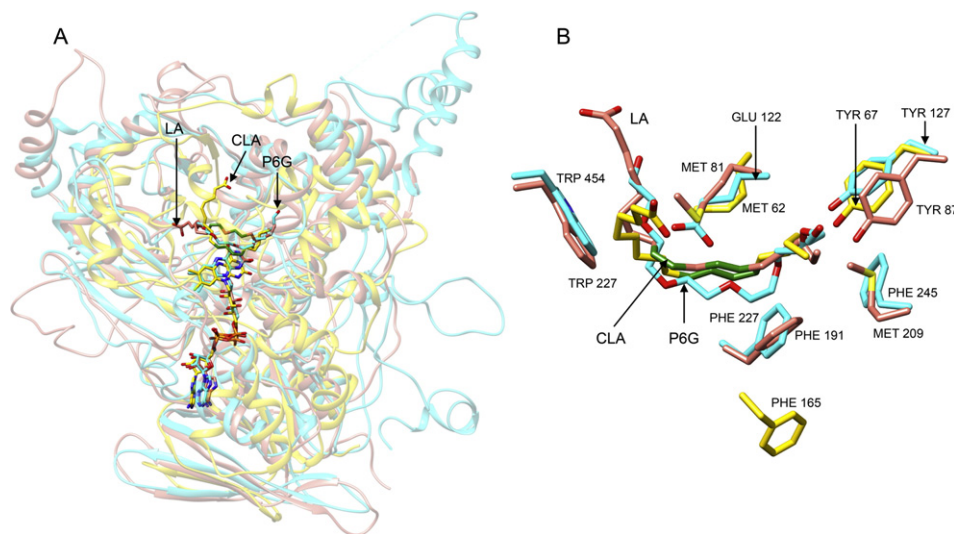


Fig. 9. Structural comparison of FAD-binding related proteins. LPH (depicted in pink), EMH (depicted in cyan) and PAI (depicted in yellow). (A) FAD molecules and active sites from each of the three proteins are located practically in identical regions at the core of the enzymes. (B) Identification of conserved amino acid residues involved in the active site. The molecule located in the active site of EMH was reported to be a 6 carbon-polyethylene glycol (P6G) [42], whereas the substrate of PAI was the bioactive isomer 10-*trans*-12-*cis*-CLA (CLA) [21]. Substrate of LPH was LA (LA).

(Fig. 7B). The FAD molecule was found to hold practically the same location and conformation than that identified experimentally on FAD-binding EMH and PAI (Fig. 8A).

Hydration of LA catalyzed by LPH, produces a hydroxylated enoic acid (10-HOE). The homology model of the protein with the docked ligand molecule may be helpful to comprehend the binding mode: LA binds to site 1 located on a cavity on domain 3 (Fig. 7A) which resembles almost identically the external binding site of LAH [27]. The most important feature in this site is that, in both proteins, LA molecule arranges around a methionine residue (Met156 in LPH and Met154 in LAH) which acts as a rigid pole for the hydrocarbon chain (Fig. 7D). LA also binds to site 2 which is a hydrophobic pocket at the core of LPH very close to the isoalloxazine ring of FAD molecule. This site resembles very much the binding site of EMH [42] and PAI [21,22] (Fig. 9A) since some amino acid residues are in identical conformation (Fig. 9B). Surprisingly, in site 2, the hydrocarbon chain of LA also arranges around a methionine residue (Met81). This behavior is consistent with the binding mode of PAI [21] which also binds LA around a methionine residue (Met64). In both sites, the ligand anchors to the cavity by hydrophobic interactions throughout the hydrocarbon chain. These findings, might lead to the assumption that LA binds first to LPH through external site 1 and after that, the protein could undergo a conformational change mostly in one of the many loops that are found in the structure of LPH (Fig. 6A) and a channel might be formed, from the surface to the interior of the protein where the FAD molecule is lodged (Fig. 7). These results shed light into the binding mode and conserved residues of hydratases from the *Lactobacillus* genus involved in the conversion of LA as a detoxifying mechanism against polyunsaturated fatty acids.

Hydration, as well as isomerization activity of LA in *L. plantarum* have always been reported in the plasmatic membrane-associated fraction [9], however no further studies were carried out to confirm or characterize the nature of the membrane–protein interaction. In this study, we reconstituted LPH in POPC:DMPC fluorescent liposomes which mimicked the native membrane environment of the cell. It was demonstrated through confocal fluorescence microscopy analysis, that LPH is a peripheral membrane protein since it interacts with the lipid bilayer in a superficial or extrinsic way (Fig. 8). During the purification process, the use of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.5 M) as a chaotropic salt, may have allowed the extraction or detachment of LPH from the membranes while maintaining it in a soluble state (Table S1). In this work, we suggest that the superficial attachment of the hydratase could be mediated by electrostatic

interactions between one of the positive-cationic patches on the surface of LPH (Fig. 10) and the phosphate-oxygen polar heads of phospholipids, since they have proven to have a very large negative surface potential available for electrostatic binding with various molecules [47].

Peripheral-electrostatic association of LPH with membranes through potential surfaces 1, 2 or 4 would allow the active site to bind extracellular fatty acid molecules and so, the peripheral nature of LPH can also be explained in terms of its enzymatic activity as the main goal of fatty acids hydratases is to participate in the cell detoxification from a fatty acid-rich environment, so in order to act as the first receptor, it needs to bind the toxic molecule and catalyze its hydration before it reaches plasmatic membranes and in this way, prevent the disruption of the lipid bilayers due to the kinked geometry of the unsaturated fatty acids [3] and also prevent the inhibition of enoyl-ACP reductase activity [4].

5. Conclusions

Hydratase from *L. plantarum*, here denoted as LPH, has enzymatic activity towards linoleic acid producing a hydroxylated enoic acid and was previously described only as a FAD-containing protein belonging to MCRA family. Here, we obtained the protein in its native form and explored, for the first time, two important attributes that were unknown: first, the location of the putative binding sites within the protein architecture and its characterization. Site 1 locks the hydrocarbon chain of the fatty acid through hydrophobic interactions but leaves the carboxylate group out of the cavity, facing the protein exterior and site 2 is located at the core of the protein in close contact with the FAD molecule suggesting a relocation of the substrate from the exterior to the interior where the enzymatic reaction takes place. Also, we identified a conserved methionine amino acid residue that plays an important role on packing the ligand on both binding sites. Second, we determined that interaction of native LPH with biomimetic membranes is peripheral and proposed that it is mediated by electrostatic interaction of one of the large positive surface potentials that can be found on the protein. The relevance of this study lies upon the fact that the peripheral location of membrane-associated LPH, has a functional implication on the cell detoxification from polyunsaturated fatty acids such as linoleic acid.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Programa de Apoyos para Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) in Mexico (funds IN207013). A special thanks to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) in Mexico for the student scholarship CVU/Reg: 271399/223477. The authors wish to thank Carmen Márquez, Lucero Ríos and F. Javier Pérez from Instituto de Química, UNAM for their technical support in the analysis of fatty acids and Carmen Santamaría for the experimental preparation of liposomes.

The confocal laser scanning microscopy study was done in the microscopy laboratory of CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, Guasave, Sinaloa, Mexico.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2015.09.014>.

References

- [1] D.L. Greenway, K.G. Dyke, Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*, *J. Gen. Microbiol.* 115 (1979) 233–245.
- [2] M.K. Raychowdhury, R. Goswami, P. Chakrabarti, Effect of unsaturated fatty acids in growth inhibition of some penicillin-resistant and sensitive bacteria, *J. Appl. Bacteriol.* 59 (1985) 183–188.
- [3] H. Keweloh, H.J. Heipieper, Trans unsaturated fatty acids in bacteria, *Lipids* 31 (1996) 129–137.

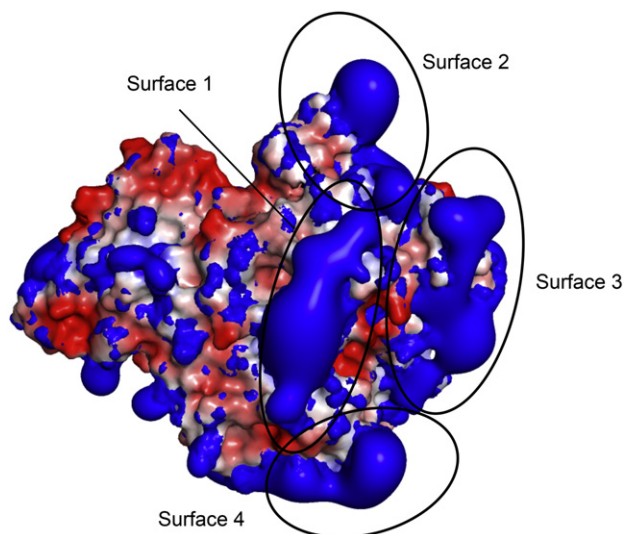


Fig. 10. Surface potential of LPH. Positive-cationic patches (in blue) of the protein were calculated using ABPS program [48]. Surfaces 1, 2 and 4 are the only sites available for electrostatic interaction with phosphate-oxygen from phospholipids while surface 3 is involved in the vicinity of active site.

- [4] C.J. Zheng, J.S. Yoo, T.G. Lee, H.Y. Cho, Y.H. Kim, W.G. Kim, Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids, *FEBS Lett.* 579 (2005) 5157–5162.
- [5] A. Buccioni, M. Decandia, S. Minieri, G. Molle, A. Cabiddu, Lipid metabolism in the rumen: new insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors, *Anim. Feed Sci. Technol.* 174 (2012) 1–25.
- [6] M.R. Maia, L.C. Chaudhary, L. Figueres, R.J. Wallace, Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen, *Antonie Van Leeuwenhoek* 91 (2007) 303–314.
- [7] N. McKain, K.J. Shingfield, R.J. Wallace, Metabolism of conjugated linoleic acids and 18: 1 fatty acids by ruminal bacteria: products and mechanisms, *Microbiol-Sgm* 156 (2010) 579–588.
- [8] I.S. Nam, P.C. Garnsworthy, Biohydrogenation of linoleic acid by rumen fungi compared with rumen bacteria, *J. Appl. Microbiol.* 103 (2007) 551–556.
- [9] S. Kishino, J. Ogawa, K. Yokozeki, S. Shimizu, Linoleic acid isomerase in *Lactobacillus plantarum* AKU1009a proved to be a multi-component enzyme system requiring oxidoreduction cofactors, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75 (2011) 318–322.
- [10] S. Kishino, S.B. Park, M. Takeuchi, K. Yokozeki, S. Shimizu, J. Ogawa, Novel multi-component enzyme machinery in lactic acid bacteria catalyzing C=C double bond migration useful for conjugated fatty acid synthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 416 (2011) 188–193.
- [11] S. Kishino, M. Takeuchi, S.B. Park, A. Hirata, N. Kitamura, J. Kunisawa, H. Kiyono, R. Iwamoto, Y. Isobe, M. Arita, H. Arai, K. Ueda, J. Shima, S. Takahashi, K. Yokozeki, S. Shimizu, J. Ogawa, Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 17808–17813.
- [12] B. Yang, H. Chen, Y. Song, Y.Q. Chen, H. Zhang, W. Chen, Myosin-cross-reactive antigens from four different lactic acid bacteria are fatty acid hydratases, *Biotechnol. Lett.* 35 (2013) 75–81.
- [13] B. Yang, H. Chen, Z. Gu, F. Tian, R.P. Ross, C. Stanton, Y.Q. Chen, W. Chen, H. Zhang, Synthesis of conjugated linoleic acid by the linoleate isomerase complex in food-derived lactobacilli, *J. Appl. Microbiol.* 117 (2014) 430–439.
- [14] A. Bhattacharya, J. Banu, M. Rahman, J. Causey, G. Fernandes, Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease, *J. Nutr. Biochem.* 17 (2006) 789–810.
- [15] I. Churrua, A. Fernandez-Quintela, M.P. Portillo, Conjugated linoleic acid isomers: differences in metabolism and biological effects, *Biofactors* 35 (2009) 105–111.
- [16] N.M. Racine, A.C. Watras, A.L. Carrel, D.B. Allen, J.J. McVean, R.R. Clark, A.R. O'Brien, M. O'Shea, C.E. Scott, D.A. Schoeller, Effect of conjugated linoleic acid on body fat accretion in overweight or obese children, *Am. J. Clin. Nutr.* 91 (2010) 1157–1164.
- [17] N.S. Kelley, N.E. Hubbard, K.L. Erickson, Conjugated linoleic acid isomers and cancer, *Br. J. Nutr.* 137 (2007) 2599–2607.
- [18] S. Benjamin, F. Spener, Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits, *Nutr. Metab.* 6 (2009) 36.
- [19] C.R. Kepler, S.B. Tove, Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. 3. Purification and properties of a linoleate delta-12-cis, delta-11-trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 5686–5692.
- [20] S.S. Peng, M.D. Deng, A.D. Grund, R.A. Rosson, Purification and characterization of a membrane-bound linoleic acid isomerase from *Clostridium sporogenes*, *Enzym. Microb. Technol.* 40 (2007) 831–839.
- [21] A. Liavonchanka, E. Hornung, I. Feussner, M.G. Rudolph, Structure and mechanism of the *Propionibacterium acnes* polyunsaturated fatty acid isomerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 2576–2581.
- [22] A. Liavonchanka, M.G. Rudolph, K. Tittmann, M. Hamberg, I. Feussner, On the mechanism of a polyunsaturated fatty acid double bond isomerase from *Propionibacterium acnes*, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 8005–8012.
- [23] L.E. Bevers, M.W. Pinkse, P.D. Verhaert, W.R. Hagen, Oleate hydratase catalyzes the hydration of a nonactivated carbon-carbon bond, *J. Bacteriol.* 191 (2009) 5010–5012.
- [24] Y.C. Joo, K.W. Jeong, S.J. Yeom, Y.S. Kim, Y. Kim, D.K. Oh, Biochemical characterization and FAD-binding analysis of oleate hydratase from *Macrococcus caseolyticus*, *Biochimie* 94 (2012) 907–915.
- [25] E. Rosberg-Cody, A. Liavonchanka, C. Gobel, R.P. Ross, O. O'Sullivan, G.F. Fitzgerald, I. Feussner, C. Stanton, Myosin-cross-reactive antigen (MCRA) protein from *Bifidobacterium breve* is a FAD-dependent fatty acid hydratase which has a function in stress protection, *BMC Biochem.* 12 (2011) 9.
- [26] A. Volkov, A. Liavonchanka, O. Kamneva, T. Fiedler, C. Goebel, B. Kreikemeyer, I. Feussner, Myosin cross-reactive antigen of *Streptococcus pyogenes* M49 encodes a fatty acid double bond hydratase that plays a role in oleic acid detoxification and bacterial virulence, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 10353–10361.
- [27] A. Volkov, S. Khoshnevis, P. Neumann, C. Herrfurth, D. Wohlwend, R. Ficner, I. Feussner, Crystal structure analysis of a fatty acid double-bond hydratase from *Lactobacillus acidophilus*, *Acta Crystallographica. Sect. D Biol. Crystallogr.* 69 (2013) 648–657.
- [28] M. le Maire, P. Champeil, J.V. Moller, Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents, *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000) 86–111.
- [29] P. Luna, M. Juarez, M.A. de la Fuente, Gas chromatography and silver-ion high-performance liquid chromatography analysis of conjugated linoleic acid isomers in free fatty acid form using sulphuric acid in methanol as catalyst, *J. Chromatogr. A* 1204 (2008) 110–113.
- [30] S. Boivin, S. Kozak, R. Meijers, Optimization of protein purification and characterization using ThermoFluor screens, *Protein Expr. Purif.* 91 (2013) 192–206.
- [31] S. Raman, R. Vernon, J. Thompson, M. Tyka, R. Sadreyev, J.M. Pei, D. Kim, E. Kellogg, F. DiMaio, O. Lange, L. Kinch, W. Sheffler, B.H. Kim, R. Das, N.V. Grishin, D. Baker, Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta, *Proteins* 77 (2009) 89–99.
- [32] Y.F. Song, F. DiMaio, R.Y.R. Wang, D. Kim, C. Miles, T.J. Brunette, J. Thompson, D. Baker, High-resolution comparative modeling with RosettaCM, *Structure* 21 (2013) 1735–1742.
- [33] P. Emsley, B. Lohkamp, W.G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot, *Acta Crystallogr. D* 66 (2010) 486–501.
- [34] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, Procheck – a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291.
- [35] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, The Swiss-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics* 22 (2006) 195–201.
- [36] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785–2791.
- [37] A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.* 13 (1965) 238–8.
- [38] J.L. Rigaud, D. Levy, Reconstitution of membrane proteins into liposomes, *Methods Enzymol.* 372 (2003) 65–86.
- [39] S. Bibi, R. Kaur, M. Henriksen-Lacey, S.E. McNeil, J. Wilkhu, E. Lattmann, D. Christensen, A.R. Mohammed, Y. Perrie, Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM, *Int. J. Pharm.* 417 (2011) 138–150.
- [40] D.V. Tulumello, C.M. Deber, Efficiency of detergents at maintaining membrane protein structures in their biologically relevant forms, *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 1351–1358.
- [41] G. Pugliesi, G. Archunan, R. Sowdhamini, DIAL: a web-based server for the automatic identification of structural domains in proteins, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) W130–W132.
- [42] M. Engleder, T. Pavkov-Keller, A. Emmerstorfer, A. Hromic, S. Schrempf, G. Steinkellner, T. Wriessnegger, E. Leitner, G.A. Strohmaier, I. Kaluzna, D. Mink, M. Schurmann, S. Wallner, P. Macheroux, K. Gruber, H. Pichler, Structure-based mechanism of oleate hydratase from *Elizabethkingia meningoseptica*, *Chembiochem: a European J. Chem. Biol.* 16 (2015) 1730–1734.
- [43] A.C. Wallace, R.A. Laskowski, J.M. Thornton, Ligplot – a program to generate schematic diagrams of protein ligand interactions, *Protein Eng.* 8 (1995) 127–134.
- [44] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403–410.
- [45] M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins, Clustal W and clustal X version 2.0, *Bioinformatics* 23 (2007) 2947–2948.
- [46] G. Kleiger, D. Eisenberg, GXXXG and GXXXA motifs stabilize FAD and NAD(P)-binding Rossmann folds through C-alpha-H...O hydrogen bonds and van der Waals interactions, *J. Mol. Biol.* 323 (2002) 69–76.
- [47] A. Mashaghi, P. Partovi-Azar, T. Jadidi, N. Nafari, P. Maass, M.R.R. Tabar, M. Bonn, H.J. Bakker, Hydration strongly affects the molecular and electronic structure of membrane phospholipids, *J. Chem Phys* 136 (2012).
- [48] N.A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M.J. Holst, J.A. McCammon, Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 10037–10041.

ANEXO 4:

Production of bioactive conjugated linoleic acid by the multifunctional enolase from *Lactobacillus plantarum*

Joana Ortega-Anaya and Alejandra Hernández-Santoyo

Artículo enviado a la revista International Journal of Biological Macromolecules

Production of bioactive conjugated linoleic acid by the multifunctional enolase from *Lactobacillus plantarum*

Joana Ortega-Anaya^a and Alejandra Hernández-Santoyo^{b*}

Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Deleg. Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F.

Tel: +52 55 5622-4568

Fax: +52 55 5616-2217

^ajoanna@comunidad.unam.mx

^bhersan@unam.mx

* Corresponding author

ABSTRACT

Lactobacillus plantarum α -enolase, a multifunctional-anchorless-surface protein belonging to the conserved family of enolases with a central role in glycolytic metabolism, was characterized to have a side role in the intricate metabolism of biohydrogenation of linoleic acid, catalyzing the formation of bioactive 9-*cis*-11-*trans*-CLA through dehydration and isomerization of 10-*hydroxy*-12-*cis*-octadecenoic acid. The identity of the enolase was confirmed through mass spectrometric analysis that showed the characteristic 442 amino acid sequence with a molecular mass of 48.03 kDa. The enolase was not capable of using linoleic acid directly as a substrate but instead uses its hydroxyl derivative 10-*hydroxy*-12-*cis*-octadecenoic acid to finally form bioactive conjugated linoleic acid. Biochemical optimization studies were carried out to elucidate the conditions for maximum production of 9-*cis*-11-*trans*-CLA and maximum stability of α -enolase when catalyzing this reaction. Furthermore, through structural analysis of the protein, we propose the binding sites of substrate and product molecules that were characterized as two hydrophobic superficial pockets located at opposite ends of the enolase connected through a channel where the catalysis of dehydration and isomerization might occur. These results prove that multifunctional α -enolase also plays a role in cell detoxification from polyunsaturated fatty acids such as linoleic acid, along with the linoleate isomerase complex.

KEYWORDS

10-*hydroxy*-12-*cis*-octadecenoic acid; conjugated linoleic acid; dehydration; enolase; isomerization; *Lactobacillus plantarum*.

ABBREVIATIONS

α -Eno: α -enolase; 10-HOE: 10-hydroxy-12-*cis*-octadecenoic acid, CLA: conjugated linoleic acid, DMPC: 1, 2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, LA: linoleic acid, POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine.

1. INTRODUCTION

Lactobacillus plantarum is a lactic acid bacteria that is broadly used as a starter in fermented foods and also as a gastrointestinal probiotic being able to adhere and colonize human intestinal mucosa, playing a critical role in competitive exclusion of pathogenic bacteria [1-3]. This adherence is related to the cell surface characteristics and more specifically, to the expression of surface proteins that directly mediate binding mechanisms to human intestinal cells [4, 5]. Alfa-enolase (α -Eno) from *Lactobacillus plantarum* is a classical glycolytic enzyme that is usually found in the cytoplasm, however, it has unexpectedly been found on the outer surface of the cell wall [3, 6] where it displays different, seemingly unrelated functions such as adhesion to epithelial cells and extracellular matrix proteins through binding to human plasminogen and fibronectin [5, 7]. Owing to these moonlighting functions, α -Eno has now been reclassified as a multifunctional-anchorless-surface protein [4, 8] that is also thought to have a role in cellular stress in response to different hostile environments [9, 10].

Linoleic acid (LA; 18:2 $\Delta^{9Z,12Z}$), along with other polyunsaturated fatty acids, are stress and toxic factors to many bacterial cells causing the inhibition of cell growth and deterioration of cellular membranes by blocking native fatty acid biosynthesis via the inhibition of enoyl-ACP reductase [11-13]. In order to prevent this toxicity, bacteria belonging to *Lactobacillus* genus, carry on a biohydrogenation process which is the complete reduction of double bonds on the carbon chain, producing non-toxic saturated fatty acids as the final product [14]. During biohydrogenation, LA is converted to saturated non-toxic stearic acid (SA; 18:0) [15] with the accumulation of various intermediate molecules such as conjugated linoleic acids (CLA; 18:2 $\Delta^{XX,YY}$) which are LA isomers with conjugated double bonds in either *cis* or *trans* configuration [16]. The predominant isomer produced by *Lactobacillus plantarum* is the bioactive molecule 9-*cis*-11-*trans*-CLA (rumenic acid; 18:2 $\Delta^{9Z,11E}$) which has been associated with a variety of health promoting effects for humans such as antiobesity and antiadipogenic activities [17], anticarcinogenic activity [18] and modulation of immune functions [19].

It has been demonstrated that 9-*cis*-11-*trans*-CLA synthesis in *Lactobacillus plantarum* occurs through a newly discovered and intricate metabolism consisting of multiple reactions catalyzed by multiple proteins [20]. The first step is hydration of the Δ^{9Z} double bond of LA which is mediated by a 64.7 kDa peripheral-membrane bound hydratase that produces 10-hydroxy-12-*cis*-octadecenoic acid (10-HOE; 18:1 Δ^{12Z}) as the only product [21, 22]. Once 10-HOE is produced, it can suffer various reactions (oxidation of hydroxyl

group, reduction of oxo group, dehydration and isomerization) catalyzed by the partially characterized linoleate isomerase complex (CLA-DH, CLA-DC, CLA-DH and CLA-ER), to finally produce monoenoic acids and conjugated linoleic acid isomers (CLA; 18:2 $\Delta^{x,y}$) [20]. These proteins, implicated in dehydration of the hydroxy-enoic acid and formation of bioactive isomers of CLA in *Lactobacillus plantarum*, have just been studied recently and hence, the participation of other proteins catalyzing similar or equivalent reactions cannot be disregarded.

In this work, we identified a protein isolated from *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 cells, which possess the ability to produce 9-*cis*-11-*trans*-CLA from LA when combined with the membrane-associated protein fraction. Mass spectrometric analysis showed that the isolated native enzyme is the multifunctional α -enolase. We determined that α -Eno is not capable of using directly LA as a substrate but instead uses 10-HOE, previously produced by the membrane fraction, to finally form bioactive CLA. We also performed biochemical optimization studies to elucidate the conditions for maximum formation of 9-*cis*-11-*trans*-CLA and maximum stability of α -Eno when catalyzing this reaction. Furthermore, we propose a three-dimensional arrangement of the protein and carried out molecular docking analysis with the substrate and the product in order to identify the binding sites of these molecules which were characterized as two hydrophobic superficial pockets located at opposite ends of the protein connected through a superficial channel where the catalysis of dehydration and isomerization of 10-HOE occurs. These results prove that multifunctional α -Eno is a side participant in the biohydrogenation process and plays a role in cell detoxification from polyunsaturated fatty acids such as LA, along with the linoleate isomerase complex.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Bacterial strain and growth conditions

Lactobacillus plantarum CFQ-100, a subculture of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 strain, was purchased from the WDCM 100 Culture Collection (*World Federation for Culture Collections*) of Faculty of Chemistry, UNAM, Mexico and subsequently cultured throughout all the experiments to obtain fresh cells. The strain was grown in 20 mL of MRS broth (*CONDA Lab, Spain*) supplemented with 180 μ g/mL of LA (99% purity, *Sigma Chemical Co., USA*) emulsified with 0.30% (w/v) of Tween 80 and incubated at 30 °C with shaking (120 strokes/min) for 17.5 hours so the cell growth has reached the end of the log phase without reaching the stationary phase. 10 mL of this seed culture was transferred into 1000 mL of fresh MRS/LA broth and incubated under the same conditions. The cell pellet was harvested by centrifugation (10,000xg, 30 min, 4 °C) and washed with 30 mL of sterile 0.85% NaCl. The biomass yield production was between 8.5-13 g/L (wet weight).

2.2. Enzyme purification and determination of the amino acid sequence

The harvested cell pellet was suspended in lysis buffer, which consisted of 100 mM potassium phosphate buffer pH 6.5 with 50 mM NaCl, 1 mM DTT and 1 mM PMSF. The suspension was then sonicated in a Misonix 3000 sonicator (*Qsonica LLT, USA*) using two cycles of 45W for 5 min each. After that, the cell debris and unbroken cells were separated by centrifugation (10,000xg, 30 min, 4 °C) and the clear supernatant was used. This crude extract was then ultracentrifuged (200,000xg, 60 min, 4 °C) and two fractions were obtained: the membrane-associated protein fraction observed as a gel-precipitate and the soluble protein fraction in the supernatant. The latter was first fractionated by selective precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (*High Purity Reactivos Analíticos, Mexico*) and α -Eno was found on the fraction saturated with 75-100%. The precipitate was further dialyzed (20x) using a membrane with a molecular weight cutoff between 12-14 kDa against enolase buffer consisting of 100 mM bis-tris buffer pH 6.0 with 50 mM NaCl added with 1 mM DTT and 1 mM PMSF. Afterwards, the fraction was subjected to anion exchange chromatography in a POROS™ HQ/H column (4.6 mm x 100 mm, *Life Technologies, USA*) using a HPLC system (*HP Agilent 1100 series, Agilent Technologies, Germany*) equilibrated with enolase buffer and eluted at a flow rate of 1.6 mL/min with a linear NaCl gradient of 0.05–1.0 M. All the fractions were collected and assayed for bioactive CLA formation. Once the active fraction was identified, it was applied on a BIO IEX/WAX column (4.6 mm x 250 mm x 5 μ m, *Agilent Technologies, USA*) equilibrated with enolase buffer containing 0.3 M NaCl. The elution flow rate was 1.6 mL/min with a step gradient of 0.3–0.7 M NaCl first, and 0.7–1.0 M NaCl after. All fractions collected were analyzed for the production of 9-*cis*-11-*trans*-CLA. Protein purity was analyzed by SDS–PAGE and protein concentration was determined using the bicinchoninic acid method (BCA) with Pierce™ BCA protein assay kit (*Pierce Biotechnology, USA*).

After purification, the amino acid sequence of the isolated protein was determined by peptide identification using tandem mass spectrometry coupled to liquid chromatography. Briefly, the purified protein was loaded into to a 10% SDS-PAGE stained with Coomassie blue R-250. A single band was excised and subjected to in-gel trypsin (10 μ g/mL) at 37 °C overnight. LC-MS/MS analysis digested-proteins [23] was carried out using a LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (*Thermo Fisher Scientific, USA*) equipped with a nanomate electrospray ionization source (*Advion, USA*), following ZipTip C18 sample clean-up (*Millipore, USA*) according to the manufacturer's instructions. Peptides were eluted from a C18 precolumn (2 cm x 100 μ m) onto an analytical C18 column (10 cm x 75 μ m). The elution flow rate was 400 nL/min with a step gradient of 5–10% acetonitrile with 0.1% formic acid (5 min), 10-35% (30 min), 35-50% (20 min), 50-95% (5min) and finally 95% over the last 5 minutes. Data dependent scanning was performed by the Xcalibur v 2.1.0 software [24] using a survey mass scan at 60,000 resolution in the Orbitrap analyzer scanning *m/z* 350-1600, followed by collision-induced dissociation (CID) tandem mass spectrometry (MS/MS) of the fourteen most intense ions in the linear ion trap analyzer. Precursor ions were selected by the monoisotopic precursor selection (MIPS) setting with selection or rejection of ions

held to a +/- 10 ppm window. Dynamic exclusion was set to place any selected *m/z* on an exclusion list for 45 seconds after a single MS/MS. All MS/MS spectra were searched against *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 proteins using Thermo Proteome Discoverer software 1.3 (*Thermo Fisher Scientific, USA*). To that protein database, common contaminant proteins (eg., keratins and others found at <ftp://ftp.thegpm.org/fasta/crap/>) were added to result in a combined protein database that contained 12,502 sequences. Variable modifications considered during the search included methionine oxidation (15.995 Da) and cysteine carbamidomethylation (57.021 Da). Proteins were identified at 99% confidence with XCorr cut-off values [25] as determined by a reversed database search. The protein and peptide identification results were also visualized with Scaffold v 3.6.1 software (*Proteome Software Inc., USA*) that relies on various search engine results (*i.e.*: Sequest, X!Tandem, MASCOT) and uses Bayesian statistics to reliably identify more spectra [26]. Proteins were accepted when they passed a minimum of two peptides identified at 95% peptide confidence and 99.9% protein confidence by the peptide and protein profit algorithms, respectively, within Scaffold.

2.3. Enzymatic assay and substrate specificity

Each enzymatic reaction was performed in triplicates and consisted on 5 mL of 20 mM potassium phosphate buffer pH 6.5, 500 μ L of protein α -Eno extract and 100 μ L of membrane-protein extract unless stated otherwise. 5.0 mg of 10-HOE or 19.8 mg of LA were added as substrates previously emulsified with 0.25% (w/v) of Tween 80. 10-HOE was obtained and purified according to the methodology reported by Ortega-Anaya *et al* [21]. The reaction was carried out for 24 hours at 30 °C and 200 strokes/min. Two negative controls were used consisting in a) all the components except the substrate and b) all the components except the protein extract. After incubation, the lipids were extracted with 4 mL of chilled hexane and then subjected to two cycles of freeze-thawing followed by centrifugation (3,500 \times g, 40 min, 4 °C) to break the emulsion previously formed. Afterwards, the organic phase was separated from the aqueous phase and washed with 1 mL of saturated NaCl. Finally, it was washed with 2 mL \times 2 of deionized H₂O, dried overnight with anhydrous Na₂SO₄ and then filtered through Whatman 2 paper. The fatty acids in the organic phase were methylated and then analyzed by GC to determine 9-*cis*-11-*trans*-CLA production (see section 2.4.).

2.4. Analysis of fatty acids

Fatty acids in hexane, were dried using a water bath at 40 °C under non-oxidizing conditions with a stream of N₂. Then, they were methylated by incubation with 2 mL of 1% H₂SO₄ in methanol (v/v) at 35 °C for 30 minutes [27]. The organic phase was extracted with hexane, neutralized with 1 mL of saturated NaHCO₃ and washed with 2 mL \times 2 of deionized H₂O, dried with anhydrous Na₂SO₄ and finally evaporated for GC analysis. Fatty acid methyl ester derivatives (FAMES) were separated, identified and quantified by a polar Heliflex™ Aqua Wax-DA capillary column (30 m length, 0.25 mm diameter and 0.25

m di) (*Alltech GmbH, Germany*) using an Agilent 6890 gas chromatographer (*Agilent Technologies, USA*) coupled to a FID detector at 240 °C. The injection volume was 1 µL and a programmed temperature vaporizer (PTV) was used in a split ratio of 1:50. Injection temperature was 240 °C. The temperature program was as follows: the initial oven temperature at 180 °C was held for 0.5 min and increased at 0.5 °C/min to reach 230 °C for 13 min. Hydrogen was used as the carrier gas with a constant flow rate of 1.8 mL/min. Standard 9-*cis*-11-*trans*-CLA, LA and 10-HOE were used to identify the reaction products by comparison of retention times. The amount of CLA produced was calculated from the integrated area of each peak, as total CLA, expressed in µmoles.

2.5. Effect of reaction conditions on α -Eno activity and stability

Using fluorescence-based thermal shift assays of native α -Eno, we studied the effects of various pH values and additives on the stability of the protein [28]. Assays were performed with 10 µL of freshly purified α -Eno added with SYPRO Orange dye (1:1000) (*Invitrogen, Life Technologies, USA*) whose $\lambda_{\text{excitation}} = 490$ nm and $\lambda_{\text{emission}} = 575$ nm [29] and mixed with 10 µL of each condition and. Fluorescence was recorded with a RT-PCR instrument (*Life Technologies, USA*) while the temperature was increased in a continuous step from 25-95 °C. For the analysis of different additives we used the Additive screen HT kit with 96 different conditions (*Hampton Research Corp., USA*) which in general, consisted on various sets of reagents included multivalent ions, salts, dissociating agents, linkers, polyamines, chaotropes, reducing and chelating agents, polymers, carbohydrates, polyols, amphiphiles, detergents, sulfobetaines and organic solvents (volatile and non-volatile) at various concentrations. For the analysis of pH values, we used the Wizard pH buffer kit with 96 different conditions (*Rigaku Reagents Inc., USA*) which consisted on sets of buffering salts at different pH values including sodium lactate-HCl (pH 2.4-5.2), sodium acetate-acetic acid (pH 3.4-6.2), MES-NaOH (pH 4.6-7.4), bis/tris-HCl (pH 5.2-8.0), imidazole-HCl (pH 5.4-8.2), sodium and potassium phosphate (pH 5.8-8.6), HEPES-NaOH (pH 6.0-8.8), tris-HCl (pH 6.6-9.4), bicine-NaOH (pH 7.0-9.8), CHES-NaOH (pH 8.0-10.8), glycine-NaOH (pH 8.2-11.0) and CAPS-NaOH (pH 8.8-11.6). Final concentration of each condition tested was half of the initial value since it was diluted 1:1 with the protein. Stabilizing conditions resulting from the latter experiments, were further investigated performing activity assays (see section 2.3).

2.6. Structural modeling of α -Eno and molecular docking with 9-*cis*-11-*trans*-CLA

3D-structure of *Lactobacillus plantarum* α -Eno was produced based on the amino acid sequence previously determined, using Robetta Server [30, 31] since there is no experimental structure reported to this date. The server used the *ab initio* method combined with the crystallographic structure of enolase from *Enterococcus hirae* (PDB code: 1iyx) chosen automatically by its 72% sequence homology. Once the structure was built, we used Coot program version 0.8 [32] to correct geometrical parameters. Finally the overall stereo chemical quality of the model was assessed using PROCHECK program [33] on the

Swiss Model Workspace [34]. Docking studies were carried out by using the program AUTODOCK 4.0 [35]. Hydrogens and Kollman charges were assigned to the receptor and the ligands were assigned with Gasteiger charges and nonpolar hydrogens using AutoDockTools 1.5.7. Docking simulations were run using Lamarckian Genetic algorithm that is known to be the most efficient and reliable method of Auto Dock. The grid maps were calculated using AutoGrid. Initially, potential binding sites were detected, based on the blind docking in which the box was sufficiently large to cover the whole protein 90 Å x 90 Å x 90 Å centered at the center of protein. The next step was a focused docking with a smaller box (40 Å x 40 Å x 40 Å), centered on the best energy result obtained in the blind docking. For all docking parameters, standard values were used as described before, except the amount of independent docking runs performed for each docking simulation, which was set to 200. Cluster analysis was performed on the docked results using a root mean square (RMS) tolerance of 0.5 Å, and the initial coordinates of the ligand were used as the reference structure.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Enzyme purification

L. plantarum α -enolase (α -Eno), a multifunctional protein, was here identified and characterized as a producer of bioactive 9-*cis*-11-*trans*-CLA. It was isolated from the soluble protein fraction of whole cells monitoring enzymatic activity based on the formation of 9-*cis*-11-*trans*-CLA. After removal of proteins precipitating from 0-75% of saturation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and two processes of anion exchange chromatography (Fig. S1), α -Eno was purified with a 2363-fold, a yield of 0.2% and a specific activity of 3.97×10^{-3} , as shown in table 1.

Table 1: Purification yield of native *L. plantarum* α -Eno

Step	Protein (mg)	Activity (U*)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Fold
Soluble protein	1.84×10^3	3.1×10^{-3}	1.68×10^{-6}	100	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ differential precipitation	30.6	4.7×10^{-3}	7.75×10^{-4}	1.6	461
Anion exchange chromatography (POROS HQ/H)	6.07	8.4×10^{-3}	1.38×10^{-3}	0.3	821
Anion exchange chromatography (BIO IEX/WAX)	4.15	16.5×10^{-3}	3.97×10^{-3}	0.2	2363

*An activity unit (U) is the amount of total CLA (μmoles) produced per minute, as determined by gas chromatography of the reaction products.

During dialysis of the $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitate, it was observed that the use of 100 mM of citrate, MES, sodium phosphate and potassium phosphate buffers at pH 6.0 produced a lower recovery of proteins, as well as a lower enzymatic activity in comparison with 100 mM bis/tris buffer pH 6.0 (data not shown). This suggested a high sensibility of the protein to the type of buffering salts used to solubilize it. This phenomena was further investigated by thermofluor assays (see section 3.4). SDS-PAGE analysis showed that α -Eno was purified to homogeneity showing a molecular mass of approximately 50 kDa (Fig. 1).

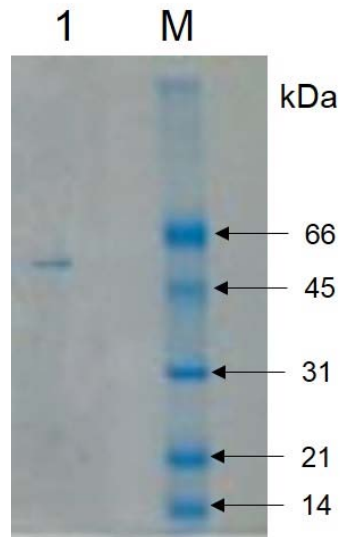


Fig.1. SDS-PAGE analysis of *L. plantarum* α -Eno. The purified protein (lane 1) was separated by 10% (w/v) SDS-PAGE followed by staining with Coomassie Blue R-250. Lane M: molecular weight markers.

3.2. Amino acid sequence analysis

To confirm the identity of α -Eno as a producer of 9-*cis*-11-*trans*-CLA, a sequence analysis was performed on the isolated protein using tandem MS/MS of the protein peptides generated by trypsin digestion. The results revealed a polypeptide chain composed of 442 amino acids with a calculated mass of 48,031.1 Da. The sequence (Fig. 2) corresponded to that of *L. plantarum* α -enolase (UniProtKB code: Q88YH3.1) with 100% identity.

```

      10          20          30          40          50          60
MSIITDIYAR EVLDSRGNPT VEVELYTESG AFGRGIVPSG ASTGEHEAVE LRDGDKSRFM

      70          80          90          100         110         120
GKGVTKAVDN VNKLIAKEIV GYDVTQRAI DQAMIKLDGT PNKAKLGANA ILGVSIAAAR

     130         140         150         160         170         180
AAADELEMPY YNYLGGFNAH VLPTPMNVI NGGAHANNDV DFQEFMIMPV GASSVKEAIR

     190         200         210         220         230         240
MGSETFHNLK AILNERGYST AVGDEGGFAP DLKNNEEPFE ILVEAIERAG YKPGKDIAIA

     250         260         270         280         290         300
FDCAASEFYN EETGKYDLKG EGENGQSFTA EEFVDLLDSI VDKYPIVSIE DPLDENNWED

     310         320         330         340         350         360
WQMATTKLGK KVQIVGDDL FVTNTDYLAKG IKMGVANSIL IKVNQIGTLT ETVEAIEMAK

     370         380         390         400         410         420
EAGYTAIVSH RSGETEDTTI ADLVVAMNAG QIKTGMSMRT ERIAKYNQLM RIEDQLESTS

     430         440
EYKGIHGFYN LDEAARNTIT SK

```

Fig. 2. Amino acid sequence of *L. plantarum* α -Eno obtained experimentally.

These results prove that the isolated protein, implicated in the formation of 9-*cis*-11-*trans*-CLA when combined with the membrane-protein fraction, is multifunctional α -Eno, thus suggesting a new enzymatic activity additional to the classical glycolytic function as well as its ability to bind human plasminogen and fibronectin [5, 7]. The interaction of α -Eno with fatty acids has been scarcely reported previously in a study that demonstrated the binding of surface-expressed α -Eno from *L. reuteri* to fat globules in food emulsions [36]. This information sheds light into a new moonlighting function of anchorless-surface α -Eno and its relationship with fatty acids.

3.3. Substrate specificity and 9-*cis*-11-*trans*-CLA production

In order to elucidate the role of α -Eno in the production of bioactive CLA, we measure enzymatic activity using LA and 10-HOE as substrates. The addition of membrane protein extract and native *L. plantarum* hydratase previously isolated in solution and reconstituted in DMPC:POPC liposomes, according to Ortega-Anaya *et al* [21] was also tested. The results are shown in table 2.

Table 2. Substrate specificity of *L. plantarum* α -Eno

Fatty acids produced from linoleic acid (70.8 μ moles)			
Protein sample	LA (μ moles)	9- <i>cis</i> -11- <i>trans</i> -CLA (μ moles)	10-HOE (μ moles)
α -Eno	67.9 \pm 1.6	n/d	n/d
α -Eno + membrane protein extract	60.8 \pm 1.2	6.0 \pm 0.9	1.7 \pm 0.08
α -Eno + hydratase	38.2 \pm 1.6	4.1 \pm 0.5	17.5 \pm 0.4
α -Eno + hydratase proteoliposomes	31.2 \pm 1.5	3.6 \pm 0.3	26.5 \pm 3.0
Fatty acids produced from 10-HOE (16.8 μ moles)			
Protein sample	LA (μ moles)	9- <i>cis</i> -11- <i>trans</i> -CLA (μ moles)	10-HOE (μ moles)
α -Eno	n/d	14.5 \pm 0.9	1.7 \pm 0.2
α -Eno + membrane protein extract	n/d	14.2 \pm 0.4	2.2 \pm 0.4
α -Eno + hydratase	n/d	12.0 \pm 0.3	2.6 \pm 0.2
α -Eno + hydratase proteoliposomes	n/d	13.6 \pm 0.2	2.0 \pm 0.2

n/d = not detected

Based on these results, it is shown that the substrate for α -Eno is 10-HOE and not LA since the production of CLA from LA only occurs when either membrane protein extract, *L. plantarum* hydratase in solution or hydratase reconstituted in liposomes, are added to the reaction mixture. α -Eno by itself did not exhibit enzymatic activity towards this fatty acid. Production of 9-*cis*-11-*trans*-CLA from LA had relative low yield (\approx 6.5%) and occurred with accumulation of an important amount of 10-HOE depending of the nature of the complementary hydratase (whether it was in protein extract, purified in solution or in liposomes). This behavior might be expected if we consider that LA is the direct substrate of the hydratase [21] but not of α -Eno, thus indicating that the predominant enzymatic reaction is hydration of LA resulting mostly in the formation of 10-HOE.

When 10-HOE was used as a substrate, α -Eno transformed it to 9-*cis*-11-*trans*-CLA with higher yields of conversion (\approx 86%) without the need of the addition of another protein component thus indicating that the substrate of α -Eno is 10-HOE and that it catalyzes the dehydration of the hydroxyl group located at C 9-10 forming a *cis* double bond whereas the existing *cis* double bond in C 12-13 is fully isomerized to a *trans* double bond in C 11-12 (Fig. 3). Finally, it can be stated from table 2, that the addition of membrane-associated proteins did not have a significant impact in the conversion of 10-HOE into CLA.

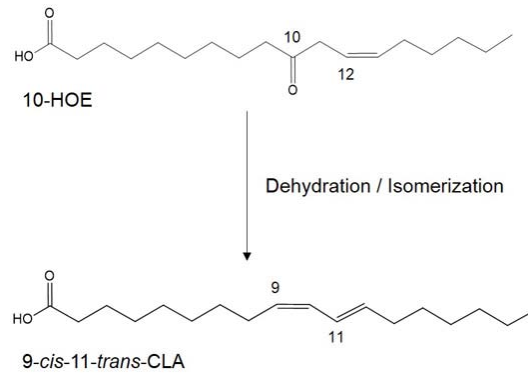


Fig. 3. Dehydration and isomerization of 10-HOE.

An example of the identification of reaction products using GC is shown in Fig. 4 which shows the retention times of both substrates tested, LA (6.8 min) and 10-HOE (14.3 min), and product 9-cis-11-trans-CLA (7.8 min).

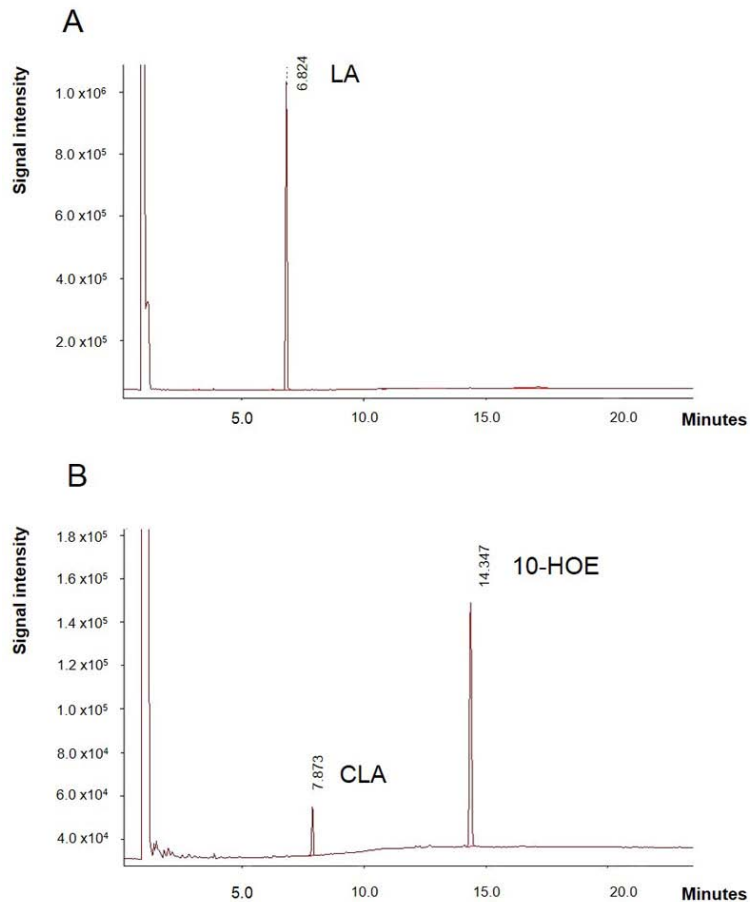


Fig. 4. Total ion gas chromatogram of the reaction of *L. plantarum* α -Eno with (A) LA where no conversion was observed and (B) with 10-HOE which was transformed to 9-cis-11-trans-CLA.

3.4. Effect of reaction conditions on activity and stability

Native α -Eno was characterized here, to evaluate the effect of pH on the protein stability and activity. The variation of pH values reveals that the protein displays enzymatic activity through a wide range of pH values (from 5.0-9.0); however optimal production of 9-*cis*-11-*trans*-CLA occurs at pH 7.0 (Fig. 4); however, high activity is maintained from this value to pH 9.0. The pH was varied from 4.0 to 9.0 using 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.0-5.5), 100 mM bis-tris buffer (pH 6.0-7.0), 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5-8.0) and 100 mM tris buffer (pH 8.5 and 9.0).

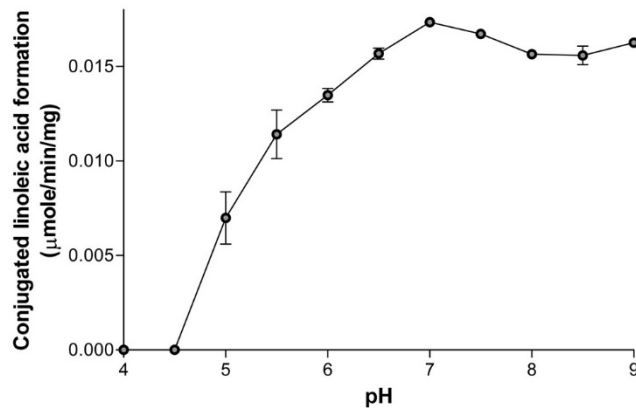


Fig. 5. pH effect on specific activity of *L. plantarum* α -Eno.

At highly acid pH values (4.0 and 4.5), the formation of CLA was completely abolished and a 32% of protein precipitation loss was also observed (data not shown) caused by this acid effect.

Interestingly, the thermal stability of α -Eno ($T_m=80.5$ °C) was greatly influenced not only by the pH value but also by the buffering salt. The protein showed a markedly preference for alkaline conditions (pH 8.6-11.0) buffered with glycine (Fig. 6F) which increased the T_m value over 4 °C suggesting high thermal stability when this buffer is used. This was not the case when alkaline conditions (pH 9.0-9.8) buffered with bicine were used (Fig. 6G) and T_m values were slightly decreased. Neutral and mildly acid conditions buffered with MES (Fig. 6D) had a negative impact on thermal stability and decreased the T_m value as well as more acid values buffered with lactate, acetate and bis-tris salts (Fig. 6B,C and E). The rest of the conditions analyzed resulted in aggregation of the protein and the fluorescence was uninterpretable.

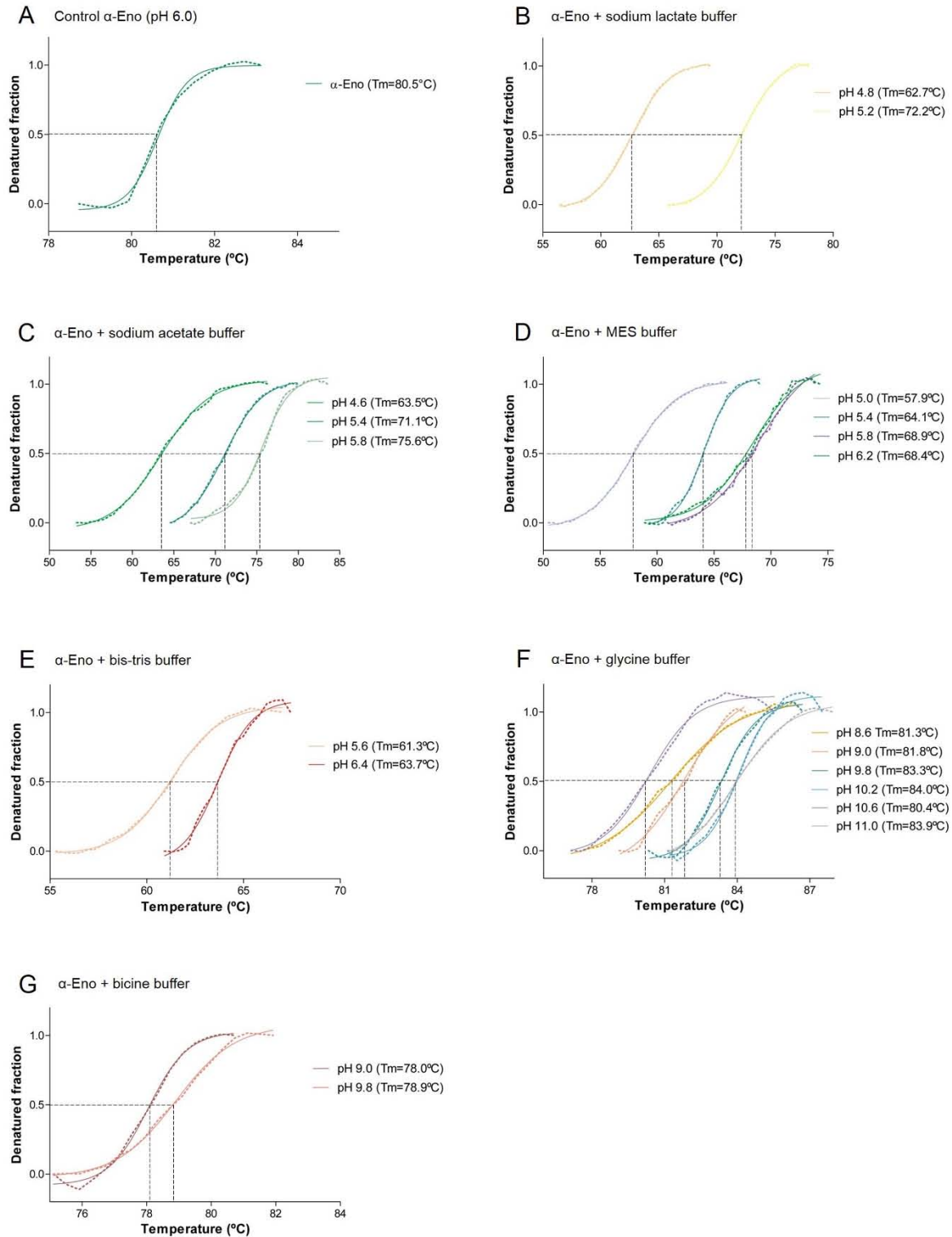


Fig. 6. Effect of pH on *L. plantarum* α -Eno thermal stability. Thermal denaturation (dotted lines) of the protein was assessed in solutions buffered by different salts: (A) control α -Eno, (B) sodium lactate buffer, (C) sodium acetate buffer, (D) MES buffer, (E) bis-tris buffer, (F) glycine buffer and (G) bicine buffer. The

different melting point values (T_m) were calculated at the inflexion point (dashed black lines) of the transition temperatures using Boltzmann's sigmoidal fit depicted as continuous lines.

The effect of various additives on thermal stability and activity of α -Eno was also investigated: only four additives had a positive impact on the protein whereas the rest of the conditions analyzed resulted in aggregation of the protein and the fluorescence was uninterpretable. Glycerol and $MgCl_2$ were the only additives that increased significantly the thermal stability of the protein (Fig. 7A) by increasing T_m values in +3.8 °C and +7.7 °C respectively. Conversely, the addition of acetonitrile and n -dodecyl- β -D-maltoside resulted in decreasing T_m values (-12.6 °C and -4.3 °C respectively). However, the unfolding transitions or these thermal shifts (Fig. 7A) occurred in a very short temperature range and with a very sharp form which might be an indication of stabilization of the protein towards conditions other than the temperature. This was further confirmed by activity assays where maximum production of CLA was achieved by the addition of acetonitrile and β -dodecyl-maltoside which increased the value approximately 6-fold (Fig. 7B). $MgCl_2$ and glycerol also increased 5-fold the enzymatic activity, compared to α -Eno without any additive (Fig. 6B).

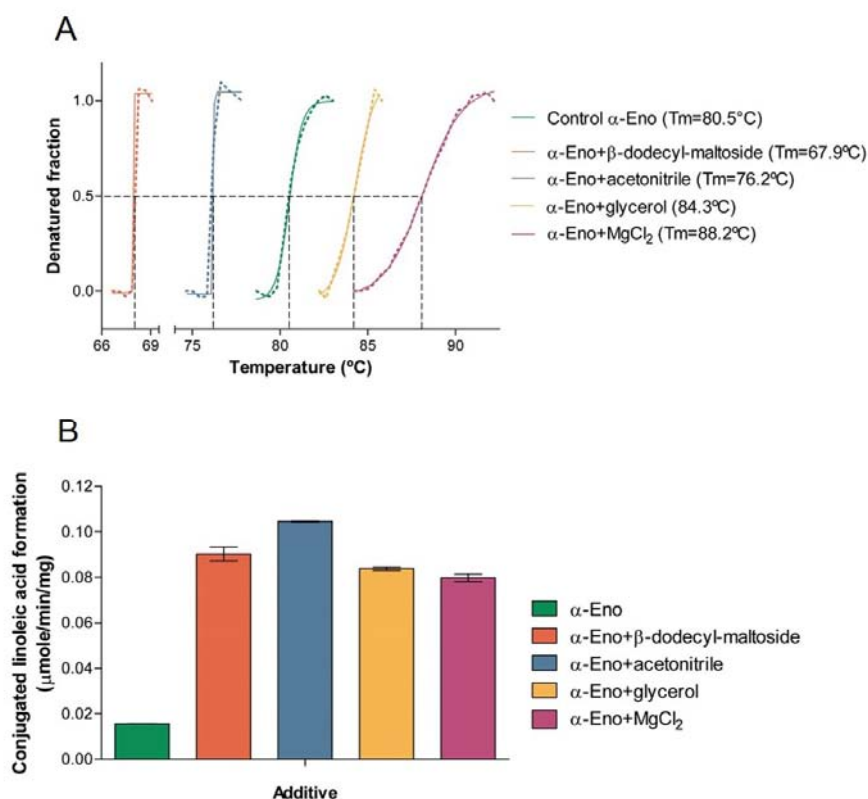


Fig. 7. Effect of additives on *L. plantarum* α -Eno. (A) Thermal denaturation of the protein (dotted lines). The different melting point values (T_m) were calculated at the inflexion point (dashed black lines) of the transition temperatures using Boltzmann's sigmoidal fit depicted as continuous lines. (B) Specific activity.

Thermal stabilization owing to MgCl₂ addition is expected since *L. plantarum* α-Eno holds one Mg²⁺ binding site through coordination between Asp242, Glu290 and Asp317 which is known to stabilize the structure of the protein as well as performing a catalytic role in the glycolytic activity by participating directly in the conversion of 2-phospho-D-glycerol to phosphoenolpyruvate [6, 7]. In the case of CLA formation, the addition of Mg²⁺ most likely has a structural role in stabilizing α-Eno rather than participating in the catalysis since in this work, we identified that the coordination site with this divalent metal is not engaged with the binding sites of neither fatty acid substrate (10-HOE) nor product (9-*cis*-11-*trans*-CLA). This is further discussed in section 3.5.).

3.5. Structural modeling of α-Eno and its interaction with 10-hydroxy-12-*cis*-octadecenoic acid and 9-*cis*-11-*trans*-CLA

The structural folding of the enolase family in many organisms has been widely known and studied for many years; they maintain high structural and amino acid sequence identity within the family (≥ 70%). However, the three-dimensional structure of *L. plantarum* α-Eno has not been reported to this date. In order to identify the putative binding sites of α-Eno with both, fatty acid substrate and product, a three-dimensional structural model was calculated (with a confidence of 0.8752) by homology modeling using an *ab initio* method based on the amino acid sequence of the protein (determined here experimentally, Fig. 2) combined with the crystallographic structure of *Enterococcus hirae* enolase (PDB code: 4ia5) due to their high sequence identity. Further analysis using DIAL server [37] resulted in the identification of the classical pair of domains that are found across the enolase family: domain 1 (residues 1-126) is depicted in light cyan (Fig. 8) and possess a mixed α/β fold composed of three antiparallel β-sheets next to a group of three α-helices. Domain 2 (residues 147-442), colored in dark cyan (Fig. 8) also has a mixed α/β fold which consists of eight β-sheets at the center of the domain surrounded by eight α-helices. Additionally, we identified a small connecting domain (residues 127-146), depicted in yellow, that is composed of a small helix and a loop.

Experimentally, it was demonstrated that α-Eno binds the 10-hydroxy-12-*cis*-octadecenoic acid molecule and transforms it to the bioactive isomer of LA, 9-*cis*-11-*trans*-CLA, however, no structural data has been reported regarding the binding of this protein to fatty acids even though it is known that *L. reuteri* α-Eno binds fatty acids from fat globules in food emulsions [36]. Molecular docking assays of the structure of α-Eno resulted in the identification of the binding sites of both, substrate and product that were surprisingly found in different locations within the protein (Fig. 8).

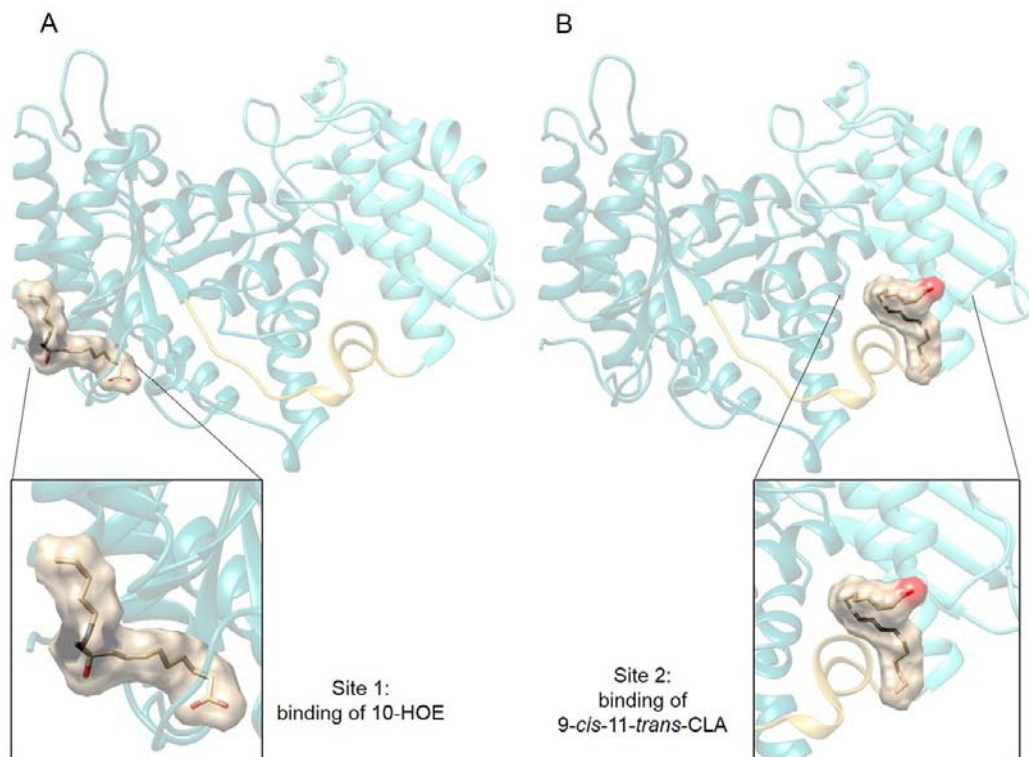


Fig. 8. Architecture of the binding sites of *L. plantarum* α -Eno with substrate (A) Overall location of site 1 where the 10-HOE molecule is allocated at domain 2. (B) Location of site 2 where 9-cis-11-trans-CLA is bound at domain 1. Double bonds of the fatty acid molecules are depicted in black.

Site 1: binding of 10-hydroxy-12-cis-octadecenoic acid (10-HOE)

This site was identified in a surface-exposed hydrophobic pocket at a lower side of domain 2 (Fig. 8A) in a flexible region given by two loops (residues 309-313 and 428-442 respectively) (Fig. 8A, inset). One glutamic acid residue (Glu433) interacts with the carboxylate of the fatty acid through hydrogen bonding while residues Lys307, Lys310, Lys311, Ile425, Leu431, Asp432, Ala434, Arg436 and Ile439 have hydrophobic contacts, according to the analysis using LigPlot+ (Fig 9B) [33]. Hydroxyl group in C 10 of the 10-HOE molecule appears to be surface-exposed which suggests it might establish hydrogen bonding with surrounding water molecules. On the other hand, the C 12 double bond is surrounded by positively charged amino acids (Lys310, Lys311, Arg436, and Lys442) (Fig. 9A) which might lead to a polarization and charge induction in the double bond.

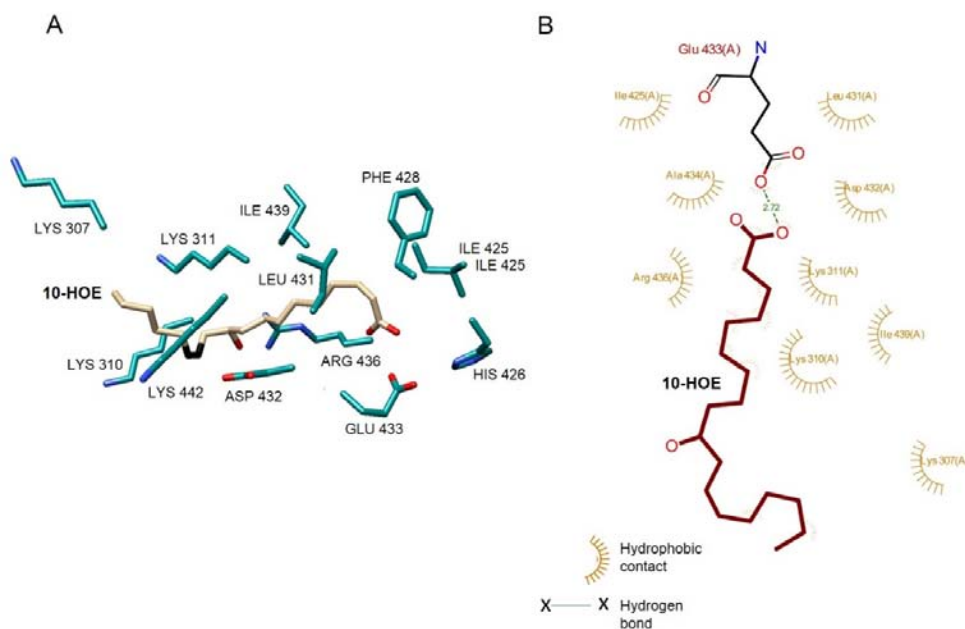


Fig. 9. (A) Depiction of residues that account for active site 1 and (B) their interaction with the 10-HOE molecule, according to LigPlot+ analysis. The double bond in the substrate is depicted in black.

Site 2: binding of 9-cis-11-trans-octadecadienoic acid (9-cis-11-trans-CLA)

This site was also identified in a surface-exposed hydrophobic pocket, however, the location resulted at the opposite end of α -Eno in a lower part of domain 1 (Fig. 8B). Residues Gln87 and Arg88 interact with the carboxylate of the fatty acid through hydrogen bonding while residues Thr85, Asp86, Leu126, Tyr133, Leu134 and Val353 have hydrophobic contacts, according to the analysis using LigPlot+ (Fig 10B) [33]. Interestingly, one tyrosine residue (Tyr133) was found in the neighborhood of the diene, probably having π - π interaction between the aromatic ring from the Tyr and the electronic density of the conjugated double bonds.

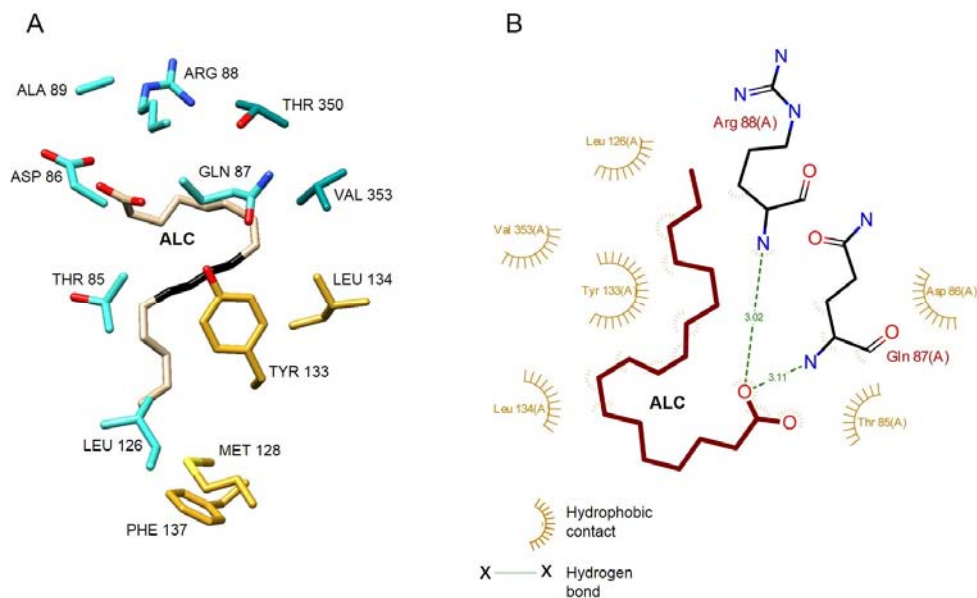
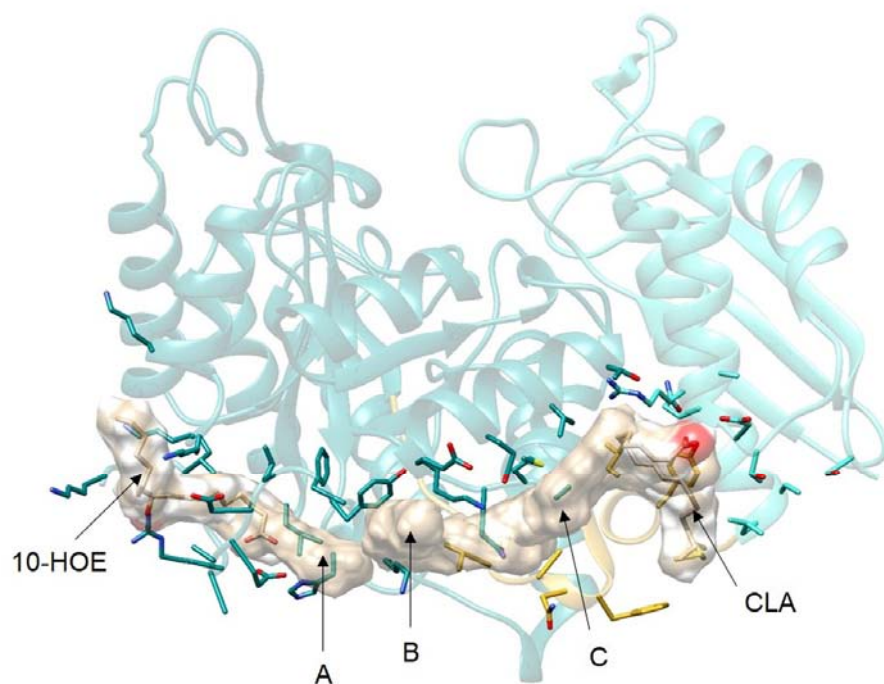


Fig. 10. (A) Depiction of residues that account for active site 2 and (B) their interaction with the 9-*cis*-11-*trans*-CLA molecule, according to LigPlot+ analysis. The conjugated double bonds in the product are depicted in black.

Additionally to the binding sites of the substrate and the product, three extra sites were also identified with favorable docking energy, which explain the trajectory that might undergo the 10-HOE molecule from the binding site 1 to the product binding site found at the opposite end of α -Eno (Fig. 11). This channel is located at the surface and runs across both domains of the protein. It consists on various hydrophobic residues (Phe, Ile and Leu) as well as ionic (Asp, His, Lys and Arg) and polar (Tyr, Ser, Met, Asn and Gln), which might lead 10-HOE from site 1 to site 2, owing to the complex nature of the channel.



	Binding free energy (Kcal/mol)				
SITE	1 (10-HOE binding)	A	B	C	2 (CLA binding)
Blind	-6.05	-7.61	-6.30	-6.28	-7.52
Refined	-7.61	-7.84	-6.72	-6.99	-7.63

Fig. 11. Depiction of the channel in *L. plantarum* α -Eno that shows the possible trajectory of the dehydration and isomerization of 10-HOE to produce 9-*cis*-11-*trans*-CLA. The channel was built based on the interconnection of three sites (A through C) that are connected at the same time with binding sites 1 and 2. The binding energy is shown for each site which is depicted as surface, colored in light grey.

Finally, it is proposed here that the catalysis of the dehydration and isomerization reaction is located within the channel; however, it was not possible, by means of molecular docking, to identify the exact location nor the amino acid residues which are involved in the reaction. Further experiments should be conducted in order to characterize the catalytic site.

4. CONCLUDING REMARKS

Enzymatic production of bioactive 9-*cis*-11-*trans*-conjugated linoleic acid is part of a detoxification mechanism against linoleic acid which is a toxic and stress factor for many lactic bacteria such as *Lactobacillus plantarum*. The complete process of detoxification metabolism has been denominated as biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids and consists of a very intricate group of reactions

catalyzed by many proteins which have been partially studied and characterized at the present; however, the participation of other proteins catalyzing equivalent or similar reactions is not omitted due to the complexity of the global process and the fact that it has been demonstrated that many enzymes display multifunctional activities such as the binding of fatty acids. In this work we demonstrated that multifunctional-anchorless-surface α -enolase isolated from *L. plantarum* cells, is involved in the formation of bioactive 9-*cis*-11-*trans*-CLA through a concerted dehydration and isomerization of 10-*hydroxy*-12-*cis*-octadecenoic acid, additionally to its central role in glycolytic metabolism, thus proving for the first time that this protein is a side participant in the biohydrogenation process and plays a role in cell detoxification from polyunsaturated fatty acids such as linoleic acid, along with the linoleate isomerase complex.

Biochemical optimization studies of the isolated enzyme revealed that the addition of $MgCl_2$, glycerol, n-dodecyl- β -D-maltoside and acetonitrile resulted in maximum production of 9-*cis*-11-*trans*-CLA and maximum stability of the enolase when catalyzing the dehydration and isomerization reaction. This results are relevant given that bioactive isomer 9-*cis*-11-*trans*-CLA possess many beneficial effects for humans and is currently produced by means of chemical synthesis. This work provides information about production of bioactive conjugated linoleic acid enzymatically synthesized in a concerted way from previously formed 10-*hydroxy*-12-*cis*-octadecenoic acid. Furthermore, a three-dimensional arrangement of the protein was calculated through homology modeling and molecular docking analysis were carried out with the substrate and the product in order to identify that the binding sites of these molecules are two hydrophobic superficial pockets located at opposite ends of the protein but connected through a channel where the catalysis of dehydration and isomerization of 10-*hydroxy*-12-*cis*-octadecenoic acid might occur. It is worth mentioning, that the binding sites of fatty acids is not in conflict with the glycolytic site since the latter is located at the upper side of the protein.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Programa de Apoyos para Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) in Mexico (funds IN207013). A special thanks to Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) in Mexico for the fellowship CVU/Reg: 271399/223477. The authors wish to thank Carmen Márquez and Lucero Ríos from Instituto de Química, UNAM for their technical support in the analysis of fatty acids.

Mass spectrometry and proteomics data were acquired by the Arizona Proteomics Consortium supported by NIEHS grant ES06694 to the SWEHSC, NIH/NCI grant CA023074 to the AZCC and by the BIO5 Institute of the University of Arizona. The Thermo Fisher LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer was provided by grant 1S10 RR028868-01 from NIH/NCRR.

REFERENCES

- [1] Z. Liu, T. Shen, P. Zhang, Y. Ma, H. Qin, *Lactobacillus plantarum* surface layer adhesive protein protects intestinal epithelial cells against tight junction injury induced by enteropathogenic *Escherichia coli*, *Mol. Biol. Rep.* 38 (2011) 3471-3480.
- [2] E. Lonnermark, V. Friman, G. Lappas, T. Sandberg, A. Berggren, I. Adlerberth, Intake of *Lactobacillus plantarum* reduces certain gastrointestinal symptoms during treatment with antibiotics, *J. Clin. Gastroenterol.* 44 (2010) 106-112.
- [3] K. Ramiah, C.A. van Reenen, L.M. Dicks, Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*, *Res. Microbiol.* 159 (2008) 470-475.
- [4] J. Burgain, J. Scher, G. Francius, F. Borges, M. Corgneau, A.M. Revol-Junelles, C. Cailliez-Grimal, C. Gaiani, Lactic acid bacteria in dairy food: surface characterization and interactions with food matrix components, *Adv. Colloid Interface Sci.* 213 (2014) 21-35.
- [5] J. Glenting, H.C. Beck, A. Vrang, H. Riemann, P. Ravn, A.M. Hansen, M. Antonsson, S. Ahrne, H. Israelsen, S. Madsen, Anchorless surface associated glycolytic enzymes from *Lactobacillus plantarum* 299v bind to epithelial cells and extracellular matrix proteins, *Microbiol. Res.* 168 (2013) 245-253.
- [6] C. Castaldo, V. Vastano, R.A. Siciliano, M. Candela, M. Vici, L. Muscariello, R. Marasco, M. Sacco, Surface displaced alpha-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein, *Microb. Cell Fact.* 8 (2009) 14.
- [7] V. Vastano, U. Capri, M. Candela, R.A. Siciliano, L. Russo, M. Renda, M. Sacco, Identification of binding sites of *Lactobacillus plantarum* enolase involved in the interaction with human plasminogen, *Microbiol. Res.* 168 (2013) 65-72.
- [8] V. Pancholi, Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases, *Cell Mol Life Sci* 58 (2001) 902-920.
- [9] P. Bove, P. Russo, V. Capozzi, A. Gallone, G. Spano, D. Fiocco, *Lactobacillus plantarum* passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis, *Microbiol. Res.* 168 (2013) 351-359.
- [10] D.I. Serrazanetti, M.E. Guerzoni, A. Corsetti, R. Vogel, Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli, *Food Microbiol.* 26 (2009) 700-711.
- [11] D.L. Greenway, K.G. Dyke, Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*, *J. Gen. Microbiol.* 115 (1979) 233-245.
- [12] M.K. Raychowdhury, R. Goswami, P. Chakrabarti, Effect of unsaturated fatty-acids in growth-inhibition of some penicillin-resistant and sensitive bacteria, *J. Appl. Bacteriol.* 59 (1985) 183-188.
- [13] C.J. Zheng, J.S. Yoo, T.G. Lee, H.Y. Cho, Y.H. Kim, W.G. Kim, Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids, *FEBS Lett.* 579 (2005) 5157-5162.
- [14] A. Buccioni, M. Decandia, S. Minieri, G. Molle, A. Cabiddu, Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors, *Anim. Feed Sci. Technol.* 174 (2012) 1-25.

- [15] M.R. Maia, L.C. Chaudhary, L. Figueres, R.J. Wallace, Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen, *Antoine Van Leeuwenhoek* 91 (2007) 303-314.
- [16] Y.L. Ha, N.K. Grimm, M.W. Pariza, Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid, *Carcinogenesis* 8 (1987) 1881-1887.
- [17] N.M. Racine, A.C. Watras, A.L. Carrel, D.B. Allen, J.J. McVean, R.R. Clark, A.R. O'Brien, M. O'Shea, C.E. Scott, D.A. Schoeller, Effect of conjugated linoleic acid on body fat accretion in overweight or obese children, *Am. J. Clin. Nutr.* 91 (2010) 1157-1164.
- [18] N.S. Kelley, N.E. Hubbard, K.L. Erickson, Conjugated linoleic acid isomers and cancer, *J. Nutr.* 137 (2007) 2599-2607.
- [19] S. Benjamin, F. Spener, Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits, *Nutr. Metab.* 6 (2009) 36.
- [20] S. Kishino, M. Takeuchi, S.B. Park, A. Hirata, N. Kitamura, J. Kunisawa, H. Kiyono, R. Iwamoto, Y. Isobe, M. Arita, H. Arai, K. Ueda, J. Shima, S. Takahashi, K. Yokozeki, S. Shimizu, J. Ogawa, Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 17808-17813.
- [21] J. Ortega-Anaya, A. Hernandez-Santoyo, Functional characterization of a fatty acid double-bond hydratase from *Lactobacillus plantarum* and its interaction with biosynthetic membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1848 (2015) 3166-3174.
- [22] B. Yang, H. Chen, Y. Song, Y.Q. Chen, H. Zhang, W. Chen, Myosin-cross-reactive antigens from four different lactic acid bacteria are fatty acid hydratases, *Biotechnol. Lett.* 35 (2013) 75-81.
- [23] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels, *Anal. Chem.* 68 (1996) 850-858.
- [24] N.L. Andon, S. Hollingworth, A. Koller, A.J. Greenland, J.R. Yates, 3rd, P.A. Haynes, Proteomic characterization of wheat amyloplasts using identification of proteins by tandem mass spectrometry, *Proteomics* 2 (2002) 1156-1168.
- [25] W.J. Qian, T. Liu, M.E. Monroe, E.F. Strittmatter, J.M. Jacobs, L.J. Kangas, K. Petritis, D.G. Camp, 2nd, R.D. Smith, Probability-based evaluation of peptide and protein identifications from tandem mass spectrometry and SEQUEST analysis: the human proteome, *J. Proteome Res.* 4 (2005) 53-62.
- [26] A. Keller, A.I. Nesvizhskii, E. Kolker, R. Aebersold, Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5383-5392.
- [27] P. Luna, M. Juarez, M.A. de la Fuente, Gas chromatography and silver-ion high-performance liquid chromatography analysis of conjugated linoleic acid isomers in free fatty acid form using sulphuric acid in methanol as catalyst, *J. Chromatogr. A* 1204 (2008) 110-113.
- [28] S. Boivin, S. Kozak, R. Meijers, Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens, *Protein. Expr. Purif.* 91 (2013) 192-206.

- [29] U.B. Ericsson, B.M. Hallberg, G.T. Detitta, N. Dekker, P. Nordlund, Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies, *Anal. Biochem.* 357 (2006) 289-298.
- [30] S. Raman, R. Vernon, J. Thompson, M. Tyka, R. Sadreyev, J. Pei, D. Kim, E. Kellogg, F. DiMaio, O. Lange, L. Kinch, W. Sheffler, B.H. Kim, R. Das, N.V. Grishin, D. Baker, Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta, *Proteins* 77 Suppl 9 (2009) 89-99.
- [31] Y. Song, F. DiMaio, R.Y. Wang, D. Kim, C. Miles, T. Brunette, J. Thompson, D. Baker, High-resolution comparative modeling with RosettaCM, *Structure* 21 (2013) 1735-1742.
- [32] P. Emsley, B. Lohkamp, W.G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot, *Acta Crystallogr. D* 66 (2010) 486-501.
- [33] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283-291.
- [34] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics* 22 (2006) 195-201.
- [35] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785-2791.
- [36] G. Brisson, H.F. Payken, J.P. Sharpe, R. Jiménez-Flores, Characterization of *Lactobacillus reuteri* interaction with milk fat globule membrane components in dairy products, *J. Agr. Food Chem.* 58 (2010) 5612-5619.
- [37] G. Pugalenti, G. Archunan, R. Sowdhamini, DIAL: a web-based server for the automatic identification of structural domains in proteins, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) W130-132.