

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

“Estudio genómico de *Lactobacillus plantarum* LL441 y caracterización del *locus* de la plantaricina C”

TRABAJO FIN DE MÁSTER

POR

SARA SÁEZ ORVIZ

Julio, 2016





Máster en Biotecnología Alimentaria

Universidad de Oviedo



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. **Baltasar Mayo Pérez**, Instituto de Productos Lácteos de Asturias - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC).

PROFESOR COTUTOR:

Dra. Dña. **Ana Belén Flórez García**, Instituto de Productos Lácteos de Asturias - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC).

CERTIFICA:

Que Dña. **Sara Sáez Orviz** ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Máster al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, 10ª promoción curso 2015-2016.

Villaviciosa, 7 de julio 2016

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Máster en Biotecnología Alimentaria

Quisiera agradecer, en primer lugar, el trabajo realizado por mi tutor, el Dr. Baltasar Mayo Pérez y mi cotutora, la Dra. Ana Belén Flórez García. Sus conocimientos, orientaciones, persistencia, paciencia y motivación, así como su apoyo y confianza, han sido fundamentales, tanto a la hora de llevar a cabo este proyecto como en la redacción del mismo. Ambos me han infundido sentido de la responsabilidad y rigor académico, sin los cuales no podría tener una formación académica completa.

Agradezco también la ayuda brindada por el resto del Grupo de Cultivos Lácteos Funcionales, formado por las doctorandas Lucía Guadamuro García, Lucía Vázquez Iglesias y la ayudante de investigación Irene Ordoñez. Gracias por ayudarme y hacerme amenas tantas horas pasadas en el laboratorio, así como los imprescindibles descansos del mediodía a la hora del café.

También quiero agradecer al resto del equipo que conforma el IPLA por haber generado un ambiente de trabajo cómodo, además de haber ayudado en todo lo que fuera posible.

A mi familia, en especial a mis padres, por ser mi apoyo constante e incondicional en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida.

A mi padre, por transmitirme su espíritu de trabajo y por sacrificar su tiempo ayudándome día a día, haciéndome grata cada travesía.

A mi madre, por animarme siempre a seguir adelante y a encontrar la luz al final del camino en los numerosos momentos de dificultad.

No hay palabras suficientes para agradeceros todo lo que habéis hecho, hacéis y, sé que haréis por mí.

A mis tres extraordinarios abuelos, por ser grandes consejeros y transmisores de historia. A pesar de todos los momentos difíciles vividos a lo largo de este año, deseo de corazón que lo que resta esté lleno de alegrías y satisfacciones. Muchas gracias por permitirme compartir otro logro académico con vosotros.

A mis amigos, los que están cerca y los que están lejos. Gracias por haberme apoyado, entendido y animado, especialmente durante este año y a lo largo de toda mi vida académica.

A mis compañeros del máster en Biotecnología Alimentaria, por haber hecho que este año intenso haya sido entretenido y agradable.

Y, por último, a todas aquellas personas que de un modo u otro colaboraron en la realización de este trabajo.

Muchas gracias a todos por vuestra ayuda, tiempo y dedicación.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES	6
2.1. Fundamentos teóricos	7
2.1.1. Las bacteriocinas	7
2.1.2. Los lantibióticos	10
2.1.3. Las bacterias del ácido láctico	13
2.1.4. Bacteriocinas producidas por las bacterias del ácido láctico	16
2.1.5. Aplicaciones alimentarias de las bacteriocinas producidas por las bacterias del ácido láctico	17
2.2. Antecedentes	19
2.3. Fundamentos experimentales	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Cepas, medios y condiciones de cultivo	29
3.2. Detección de la actividad inhibitoria de la plantaricina C	29
3.3. Efecto de las proteasas sobre la actividad antimicrobiana	30
3.3.1. Ensayo de difusión en placa	30
3.3.2. Ensayo de difusión en placa tras co-incubación proteasa-bacteriocina	30
3.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria	31

3.5. Extracción de ADN total	32
3.6. Extracción de ADN plasmídico	33
3.7. Análisis bioinformático	34
3.8. Southern Blot	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1. Actividad inhibitoria de la plantaricina C	37
4.2. Efecto de las proteasas sobre la actividad antimicrobiana.	38
4.3. Estudio de la resistencia a antibióticos de <i>L. plantarum</i> LL441	41
4.4. Caracterización del <i>locus</i> de la plantaricina C	43
4.5. Optimización de la extracción de ADN plasmídico de <i>L. plantarum</i> LL441	45
4.6. Localización cromosómica de la plantaricina C	48
5. CONCLUSIONES	51
6. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	53
7. BIBLIOGRAFÍA	56
8. APÉNDICES	63
8.1. Apéndice 1	64
8.2. Apéndice 2	66
8.3. Apéndice 3	67
8.4. Apéndice 4	69
8.5. Apéndice 5	70

Resumen

La fermentación es una forma simple, barata y segura de conservar los alimentos, además, de conseguir mejorar las características nutritivas y sensoriales de los mismos. Las bacterias del ácido láctico (BAL) se emplean habitualmente para llevar a cabo estas fermentaciones. En la actualidad, existe una demanda creciente de la sociedad por productos menos procesados y más naturales. De este modo, surge la bioconservación, en la cual se emplean conservantes de origen natural como las bacteriocinas. Sus características físicas y químicas hacen que las bacteriocinas sean unos de los aditivos naturales que puedan sustituir en un futuro a los conservantes químicos.

La microbiota presente en productos fermentados en los que no se emplean cultivos iniciadores comerciales presenta una gran variabilidad de cepas. En este contexto, se encontró en el queso de *Cabrales*, una cepa bacteriana, LL441, que se identificó como *Lactobacillus plantarum*. La cepa LL441 produce una bacteriocina, a la que se denominó plantaricina C. Esta bacteriocina pertenece al grupo de los lantibióticos y presenta un amplio espectro de actividad contra otras bacterias Gram-positivas.

El objetivo principal de este trabajo consistió en analizar el *locus* de la plantaricina C y determinar su localización genómica. Para asegurarnos de que trabajábamos con la cepa productora, se comprobaron de nuevo las diversas características fenotípicas de *L. plantarum* LL441 y las propiedades bioquímicas de la plantaricina C.

La plantaricina C tiene naturaleza proteica y su actividad es muy sensible a la digestión con proteasas. Es resistente a un cierto rango de temperaturas (al menos hasta 55°C) y tolera bien los cambios de pH (ácido y neutro). La cepa *L. plantarum* LL441 productora de la bacteriocina es susceptible a todos los antibióticos que se han ensayado y en su genoma no se han encontrado secuencias de resistencia a antibióticos, lo que permite su uso en la industria alimentaria sin riesgo a una transferencia horizontal de resistencias hacia otros microorganismos. El gen estructural de la plantaricina C se localizó en un “conting” de unas 18 kpb. El gen se agrupa con otros involucrados en su maduración y exportación formando una estructura de operón. La maduración implica una serie de modificaciones post-traduccionales características de los lantibióticos y es llevada a cabo por una larga proteína denominada LanM. Tras el gen *lanM* aparecen cuatro componentes de transportadores de tipo ABC que previsiblemente están implicados en la secreción y la inmunidad a la bacteriocina. Mediante experimentos de hibridación determinamos que el operón de la plantaricina C se encuentra codificado en un plásmido de los varios que contiene *L. plantarum* LL441.

Como futuras líneas de investigación con la bacteriocina proponemos conseguir descifrar la estructura del plásmido en que está codificada y conocer con más detalle las regiones que contiene y sus funciones.

Abstract

Fermentation is a simple, cheap and safe way to preserve food. This technique can also improve the nutritive and sensorial properties of food. Lactic acid bacteria (LAB) are one of the usual bacteria carrying out these fermentations. Currently, the society is demanding less processed and more natural products. Biopreservation allows the use of natural preservatives like bacteriocins. The physical and chemical characteristics of bacteriocins make them ideal natural preservatives that could replace chemical preservatives in the future.

The microbiota of fermented products without commercial starter cultures presents a great variability of different species and strains. A bacterial strain, LL441, was found among the dominant microbiota of a *Cabrales* cheese. It was classified as belonging to the *Lactobacillus plantarum* species. LL441 was shown to be capable of producing a bacteriocin (plantaricin C). This bacteriocin belongs to the group of lantibiotics and has a broad spectrum of activity against Gram-positive bacteria.

The main objective of this study was to analyse the *locus* of the plantaricin C and to determine its genomic location. To ensure that we were working with the plantaricin C producing strain, several phenotypic characteristics of *L. plantarum* LL441 and the biochemical properties of plantaricin C were tested again.

Plantaricin C has a proteinaceous nature and it is very sensitive to proteolytic degradation within its globular structure. It can resist to a wide range of temperatures (at least up to 55°C) and it also tolerates changes in pH (from acidic and neutral). The *L. plantarum* LL441 strain is susceptible to all antibiotics tested. Further, genome analysis did not reveal identification of antibiotic resistance genes, allowing its use in the food industry without risk of horizontal transfer to other microorganisms. The structural gene encoding the plantaricin C was located in a contig of about 18 kbp. The gene is grouped with others involved in maturation and export of the bacteriocin constituting an operon-like structure. Maturation of plantaricin C involves a series of post-translational modifications characteristic of the lantibiotics, which are carried out by a long enzyme, LanM. Downstream of the *lanM* gene, several components of ABC transporters appear that are probably involved in secretion and immunity. Hybridization experiments proved the plantaricin C operon was encoded in one of the numerous plasmids that *L. plantarum* LL441 harbour.

As a future research in this line, we proposed to investigate the structure of this plasmid and analysis of the functions of the different open reading frames it encodes.

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
<i>Figura 1</i>	Modo de acción habitual de las bacteriocinas en función de la clase a la que pertenecen [21].	9
<i>Figura 2</i>	Mecanismo general de formación de Lan y MeLan a través de las modificaciones post-traduccionales [27].	11
<i>Figura 3</i>	La nisina A es un lantibiótico de tipo A-I, con una estructura bastante lineal. La lacticina 481 es un lantibiótico de tipo A-II y en su estructura se observan dos regiones diferenciadas, una cola lineal y una región globular [27].	12
<i>Figura 4</i>	Representación de los <i>clusters</i> de biosíntesis y regulación en algunos lantibióticos [27].	13
<i>Figura 5</i>	Árbol filogenético basado en el análisis comparativo de las secuencias del gen ADN ribosomal 16S. En él se recogen los principales grupos filogenéticos pertenecientes a las BAL [30].	14
<i>Figura 6</i>	Imagen de microscopía electrónica de barrido (MEB) de <i>L. plantarum</i> [36].	16
<i>Figura 7</i>	Ejemplo de resultado del método de difusión en agar.	21
<i>Figura 8</i>	Secuenciación por terminación reversible cíclica empleada en la tecnología Illumina.	22
<i>Figura 9</i>	Ejemplo de visualización de las redes que proporciona el programa Cytoscape a partir de los datos de trabajo [49].	24
<i>Figura 10</i>	Etapas que tienen lugar en un ciclo de PCR [50].	25
<i>Figura 11</i>	Etapas del proceso de hibridación Southern [51].	26

Número	Título	Página
Figura 12	(1) Ensayo de difusión en placa con un inóculo de <i>L. sakei</i> CECT 906 al 2%. (2) Histograma que representa los diámetros de los halos de inhibición en centímetros para las diluciones ensayadas. A: sobrenadante y B: sobrenadante neutralizado. C-H: diluciones 1:10 del sobrenadante neutralizado.	37
Figura 13	Ensayo de difusión en placa con un inóculo de <i>L. sakei</i> CECT 906 al 1,5%. (S) sobrenadante neutralizado; (C1) control con agua; (C2) control de EDTA tetrasódico (0,2 g 100 ml ⁻¹); (P) pronasa, (T) tripsina y (PK) proteinasa K, todas ellas con una concentración de 20 mg ml ⁻¹ .	38
Figura 14	(A) Co-incubación del sobrenadante neutralizado con concentraciones crecientes de pronasa; (B) co-incubación del sobrenadante neutralizado con concentraciones crecientes de tripsina; (C) co-incubaciones del sobrenadante neutralizado con concentraciones crecientes de proteinasa K. Con cada una de las tres proteasas se ensayaron las concentraciones (1 a 6) de 0,15, 0,3, 0,6, 1,25, 2,5 y 5 mg ml ⁻¹ , respectivamente. C1- co-incubación del sobrenadante neutralizado con agua y C2- co-incubación del sobrenadante neutralizado con EDTA tetrasódico (0,2 mg ml ⁻¹). Todas las co-incubaciones de la imagen se realizaron durante 1 hora.	39
Figura 15	Representación esquemática de la plantaricina C, mostrando las uniones más probables. El aminoácido modificado lantionina se muestra en color azul claro, en azul oscuro se muestra la dihidroalanina, y la posición del grupo metilo en la β-metilantionina se indica con una m (círculo amarillo) [13]. Las líneas discontinuas hacen referencia a los puntos de corte: naranja para la tripsina, verde para la proteinasa K y azul para la pronasa.	40
Figura 16	Representación esquemática del <i>locus</i> de la plantaricina C, indicando la orientación y tamaños de las <i>orfs</i> y la homología de las proteínas codificadas.	43

Número	Título	Página
<i>Figura 17</i>	Resultado de la digestión de la extracción plasmídica con enzimas de restricción. (M) marcador A (Grisp, GRS Lodder 100 pb), (1, 1.P, 1.E y 1.H) ADN plasmídico sin digerir, digerido con PstI, con EcoRI y HindIII, respectivamente.	45
<i>Figura 18</i>	(A) curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> LL441. Los puntos indican las horas (4, 8 y 24) a las que se tomó muestra para llevar a cabo la extracción de ADN plasmídico. (B) Resultado de la extracción de ADN plasmídico a las 4, 8 y 24 horas a partir de 1, 2 y 5 ml de cultivo, respectivamente. M1; marcador A (Grisp, GRS Lodder 100 pb) (C) Perfil plasmídico, se distinguen, aproximadamente, 9 bandas. M2; marcador λ HindIII DIG 0,12-21,2 kbp.	46
<i>Figura 19</i>	Imágenes obtenidas en el programa Cytoscape (A) con todos los ensamblajes obtenidos y (B) tras tratar los datos. En naranja se muestra el ensamblaje en el que se encuentra la región que codifica la plantaricina C. En amarillo se muestran las relasasas y en verde las proteínas de replicación.	49
<i>Figura 20</i>	Resultado del southern blot. (U, 1, 2 y 3) ADN cromosómico sin digerir, digerido con PstI, EcoRI y HindIII, respectivamente. (U', 4, 5 y 6) ADN plasmídico sin digerir, digerido con PstI, EcoRI y HindIII, respectivamente. (M1) marcador DNA Molecular Weight Marker III y (M2) marcador λ HindIII DIG 0,12-21,2 kbp.	50

LISTA DE TABLAS

Número	Título	Página
<i>Tabla 1</i>	Concentraciones de las proteasas ensayadas y el compuesto empleado como control en cada caso.	30
<i>Tabla 2</i>	Agentes antimicrobianos ensayados con el kit VtetMIC™ Lact-1 y Lact-2.	31
<i>Tabla 3</i>	Valores de CIM ($\mu\text{g ml}^{-1}$) para la cepa <i>L. plantarum</i> LL441 y valores de punto de corte microbiológico establecidos por la EFSA [61].	42

1. INTRODUCCIÓN

La fermentación constituye uno de los procedimientos de conservación más antiguos y es una fuente inagotable de nuevos productos. Tradicionalmente, los procesos fermentativos se han llevado a cabo por medio de métodos empíricos que, a lo largo de los años, se han ido sustituyendo por procedimientos biotecnológicos cuidadosamente controlados. La fermentación es un proceso catabólico por el cual un compuesto se oxida de forma incompleta generando otros compuestos químicos, tales como el ácido láctico, el etanol, el ácido acético o el ácido butírico. Las transformaciones llevadas a cabo durante la fermentación modifican el sabor, aroma y textura de los alimentos, mejorando sus propiedades organolépticas y reológicas. Por otro lado, durante el proceso fermentativo también se produce la liberación de vitaminas, aminoácidos y ácidos grasos de cadena corta [1], viéndose incrementada así la funcionalidad y el valor nutricional de las materias primas utilizadas.

La fermentación es una forma simple, barata y segura de conservar los alimentos. Esta se puede realizar de forma espontánea por la acción de los microorganismos que se encuentran de manera natural en los alimentos crudos [2], o bien, mediante la adición deliberada de cultivos iniciadores formados por una selección de microorganismos bien definidos. La fermentación espontánea suele aportar al producto final propiedades organolépticas características, pero esta no solo complica la reproducibilidad del proceso sino que también supone un riesgo mayor de contaminación. Sin embargo, el empleo de cultivos iniciadores permite la estandarización de los productos finales y un buen control de todo el proceso [3].

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son los microorganismos más ampliamente utilizados en las fermentaciones alimentarias. Estos microorganismos tienen la capacidad de convertir los azúcares que se encuentran en los alimentos en ácidos orgánicos. Además, durante su actividad se consigue una bajada del pH del alimento, lo que contribuye a alargar la vida útil de los productos fermentados en comparación con la de las materias primas [4]. Actualmente, varias cepas de BAL son responsables de las fermentaciones lácticas (para la obtención de productos como el yogur y el queso), la fermentación alcohólica (con la que se obtiene el vino), y también en la producción de fermentados cárnicos y vegetales (como los embutidos y aceitunas) [1].

En la actualidad, existe una demanda creciente de la sociedad por una mayor seguridad de los alimentos que se consumen, pero además los consumidores exigen

también productos menos procesados, más naturales y con altos valores de conservación, calidad e inocuidad. Con el fin de satisfacer estas exigencias, las industrias alimentarias, además de controlar la higiene durante todo el proceso de producción, también buscan nuevos métodos de conservación para evitar la posible transmisión de enfermedades y la contaminación de los productos por factores accidentales [5].

La conservación de los alimentos en condiciones adecuadas para el consumo, se puede conseguir mediante procesos tecnológicos como la esterilización térmica, el secado y la congelación. Además, también se pueden conservar los productos alimentarios por medio del uso de aditivos, que al inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos, impiden o retrasan la alteración de los mismos [6]. El reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea, define aditivo alimentario como toda sustancia que no se emplea como alimento ni como ingrediente del mismo y que se añade intencionadamente a este con un propósito tecnológico, haciendo que el aditivo o sus subproductos se conviertan, directa o indirectamente, en un componente del alimento [7]. Los aditivos alimentarios cumplen funciones diversas y por ello se pueden agrupar en diferentes categorías: espesantes, gelificantes, estabilizadores, colorantes, edulcorantes, aromas y sabores, antioxidantes y conservantes, entre otros [6].

En la industria alimentaria se emplea una gran cantidad de conservantes químicos como el ácido benzoico, el ácido sórbico, el anhídrido sulfuroso, los nitritos y nitratos, etc. El inconveniente en la utilización de algunos de estos compuestos es que su inocuidad en algunos casos no está universalmente admitida; incluso a algunos de ellos se les asocia con graves enfermedades. Alternativamente, existen conservantes alimentarios de origen biológico, como los ácidos orgánicos y otros compuestos metabólicos producidos durante la fermentación (ácido láctico, ácido acético, H₂O₂, etc.), las bacteriocinas, los bacteriófagos, etc. [6]. El uso de microorganismos y/o sus metabolitos como conservantes se conoce con el nombre de bioconservación [8].

La bioconservación permite alargar la vida útil y la inocuidad de los alimentos mediante el empleo de microorganismos reconocidos como seguros por las autoridades europeas y americanas, y/o de sus metabolitos con el objetivo de inhibir el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos en los alimentos [9]. La finalidad es obtener

alimentos con óptimas condiciones higiénico-sanitarias y que tengan un menor procesamiento; lo que los consumidores perciben como “más natural”.

Algunas cepas de BAL que se emplean habitualmente en las fermentaciones son capaces de inhibir el crecimiento de otras especies debido a la producción de ciertos compuestos denominados bacteriocinas. Se trata de proteínas o péptidos con efecto bacteriostático o bactericida que inhiben otras especies bacterianas. Las bacteriocinas producidas por los propios cultivos iniciadores que se emplean en las fermentaciones industriales pueden utilizarse para mejorar la seguridad y la calidad de los productos fermentados, actuando como conservantes de carácter natural [6].

Una de las bacteriocinas más conocidas es la nisina (E-234), producida por cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cuyo empleo como aditivo está autorizado para la conservación de productos lácteos. Se ha comprobado que la nisina es eficaz frente a *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* [10]. Las posibilidades del uso de la nisina como conservante natural no se restringen sólo a los productos lácteos como los quesos, sino que también se ha empleado, aunque en menor medida, en la industria cárnica y tiene futuro en la industria cervecera por ser capaz de inhibir otras bacterias Gram-positivas que deterioran el producto durante o tras la fermentación debido a la producción de sabores, aromas o texturas indeseables [6].

Además, algunas bacteriocinas presentan una serie de características que las hacen idóneas para su uso en la industria alimentaria como la resistencia a tratamientos térmicos, la fácil difusión en cualquier alimento y el hecho de que sean degradadas por los enzimas digestivos, haciéndolas inocuas para el hombre. Por todo ello, es posible, que en un futuro, algunos aditivos químicos puedan ser sustituidos por bacteriocinas. Por tanto, se hace necesario una mejor caracterización de la actividad de las bacteriocinas en los alimentos, ya que su función está influenciada por diferentes factores como la composición de los propios alimentos, la interacción con sus componentes, la estabilidad de la bacteriocina a diferentes condiciones de pH, temperatura, humedad, etc. [6]. Además, es importante identificar las bacteriocinas que puedan ejercer mayores efectos conservadores en los distintos tipos de alimentos, ya que cada una de ellas tiene unas condiciones de actividad óptimas.

En estudios previos, tipificando la variedad microbiológica que se encuentra en productos lácteos que fermentan de forma natural, se aisló una cepa productora de una

bacteriocina en el queso de *Cabrales*, LL441. La cepa se identificó como *Lactobacillus plantarum* y a su bacteriocina se la denominó plantaricina C [11]. Para que la bacteriocina se pueda emplear de manera racional como agente conservante, es necesario realizar una caracterización más completa para conocer más detalles sobre sus propiedades genéticas y bioquímicas, incluyendo aspectos de estructura, espectro de inhibición, estabilidad, funcionamiento, etc. En trabajos previos, la plantaricina C ya se había purificado y se habían estudiado diversos aspectos de la actividad inhibidora de la plantaricina C, incluyendo espectro de actividad [11], modo de acción [12] y estructura [13]. Se han estudiado también los parámetros que influyen en la síntesis de la bacteriocina por la cepa productora [14], lo que resulta muy importante para maximizar su producción durante las fermentaciones y/o para su empleo como aditivo alimentario. Sin embargo, en cuanto a la genética de la bacteriocina no habíamos sido capaces de aislar y caracterizar el gen estructural, ni sabíamos nada sobre su localización genómica (cromosómica, plasmídica, etc.).

Por ello, y teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, en este trabajo nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1 Secuenciación genómica de la cepa *L. plantarum* LL441.
- 2 Caracterización de la región codificadora de la plantaricina C y sus regiones adyacentes.
- 3 Localización cromosómica del locus de la plantaricina C.

2. CONSIDERACIONES

TEÓRICAS Y

EXPERIMENTALES

2.1. Fundamentos teóricos

2.1.1. Las bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal que inhiben el crecimiento de otros microorganismos competidores y, por tanto, tienen gran potencial para ser utilizados de manera alternativa o combinada con los antimicrobianos convencionales [15].

En 1925 se describieron los primeros compuestos con actividad antimicrobiana producidos por una bacteria Gram-negativa, en concreto, *Escherichia coli*. A estas sustancias se les dio el nombre de colicinas. Se trata de un grupo diverso de proteínas que destruyen a bacterias relacionadas filogenéticamente mediante diversos mecanismos, tales como la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, cambios en la permeabilidad de la membrana celular o la inhibición de la actividad de enzimas celulares (RNasa, DNasa, etc.) [16]. Estudios posteriores, demostraron que las colicinas no se producían exclusivamente en *E. coli* ni en bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Por ello, en 1952 Jacob y colaboradores [17] propusieron el nombre de bacteriocina, para referirse a aquellas proteínas con actividad antibacteriana y de gran especificidad [18].

En la actualidad, sabemos que las bacteriocinas constituyen un grupo heterogéneo de péptidos de diferentes tamaños y con diversas estructuras, modos de acción y espectro antimicrobiano y se producen por cepas de la mayor parte de grupos y especies bacterianas [19]. Estas sustancias frecuentemente actúan frente a bacterias con las que están más estrechamente relacionadas, aunque, en estudios recientes, algunas de ellas se ha visto que pueden actuar frente a otras especies bacterianas, hongos e incluso, algunos parásitos [20].

- Clasificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas se clasifican, atendiendo a su tamaño molecular, propiedades físico-químicas, presencia de aminoácidos modificados y modo de acción, en cinco grupos o clases (clase I, II, III, IV y V) [21]. La mayor parte de las bacteriocinas descritas hasta el momento están incluidas en las clases I y II.

Las bacteriocinas que pertenecen a la **clase I** se conocen con el nombre de lantibióticos. Dentro de este grupo se incluyen bacteriocinas termoestables formadas por uno o dos péptidos de pequeño tamaño molecular (< 5 kDa) [22]. Las bacteriocinas de este grupo contienen aminoácidos poco comunes como la lantionina, la β -metilantionina y la dihidroalanina, las cuales se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de traducción [23]. Dentro del grupo de los lantibióticos, el más conocido es la nisina.

La **clase II** engloba péptidos pequeños (< 10 kDa), termoestables y no modificados post-traduccionalmente, con un alto contenido en aminoácidos poco voluminosos (como glicina y alanina) [24]. Este grupo se subdivide a su vez en tres subclases:

- La **clase IIa** está compuesta por bacteriocinas con una alta especificidad contra *L. monocytogenes*. Suele ser habitual que estas bacteriocinas tengan de 37 a 48 residuos aminoacídicos, con una región N-terminal en conformación de lámina beta plegada y una región C-terminal que contiene una o dos hélices alfa [25]. La clase IIa también recibe el nombre de pediocinas, ya que la pediocina PA-1 fue el primer miembro que se descubrió. Hasta el momento, hay más de 30 bacteriocinas que pertenecen a esta familia [16].
- La **clase IIb** está formada por bacteriocinas cuya actividad depende de la acción complementaria y sinérgica de dos péptidos [16]. Normalmente, los genes se encuentran localizados en el mismo operón y se expresan de forma simultánea. Dentro de este grupo se encuentran bacteriocinas como la lactococina F o la plantaricina S [24].
- La **clase IIc** suele incluir bacteriocinas sin aminoácidos modificados que no encajan bien en las dos clases anteriores, como la lactococina A, la enterocina P o la lactococina 972 [26].

Las bacteriocinas que pertenecen a la **clase III** son termolábiles, tienen un tamaño mayor que las de las otras clases (> 30 kDa), carecen de aminoácidos modificados y tienen una estructura proteica compleja. Dentro de este grupo se encuentra la helveticina J. Estas bacteriocinas han sido poco estudiadas y son las que despiertan un menor interés en la industria alimentaria [24].

Dentro de la **clase IV** se encuentran aquellas bacteriocinas que requieren de lípidos o carbohidratos para ser activas. Pertenecen a esta clase las bacteriocinas leuconocina S y lactocina 27.

Finalmente, en la **clase V** se encuentran las bacteriocinas que tienen estructura circular y que no están modificadas post-traduccionalmente, como la enterocina AS-48 [24].

- *Modo de acción de las bacteriocinas*

La mayoría de las bacteriocinas inhiben a las bacterias sensibles a través de la formación de poros en la membrana celular, disipando la fuerza motriz de protones. De manera general, cuando las bacteriocinas entran en contacto con la membrana de las bacterias sensibles, su extremo N-terminal con estructura de lámina beta plegada se une a la superficie celular, mientras que el extremo C-terminal, más hidrofóbico y con estructura de alfa hélice penetra en el interior de la membrana.

Los mecanismos de acción de las bacteriocinas más estudiados y mejor caracterizados son los de las adscritas a las clases I, Iib y III (*Figura 1*).

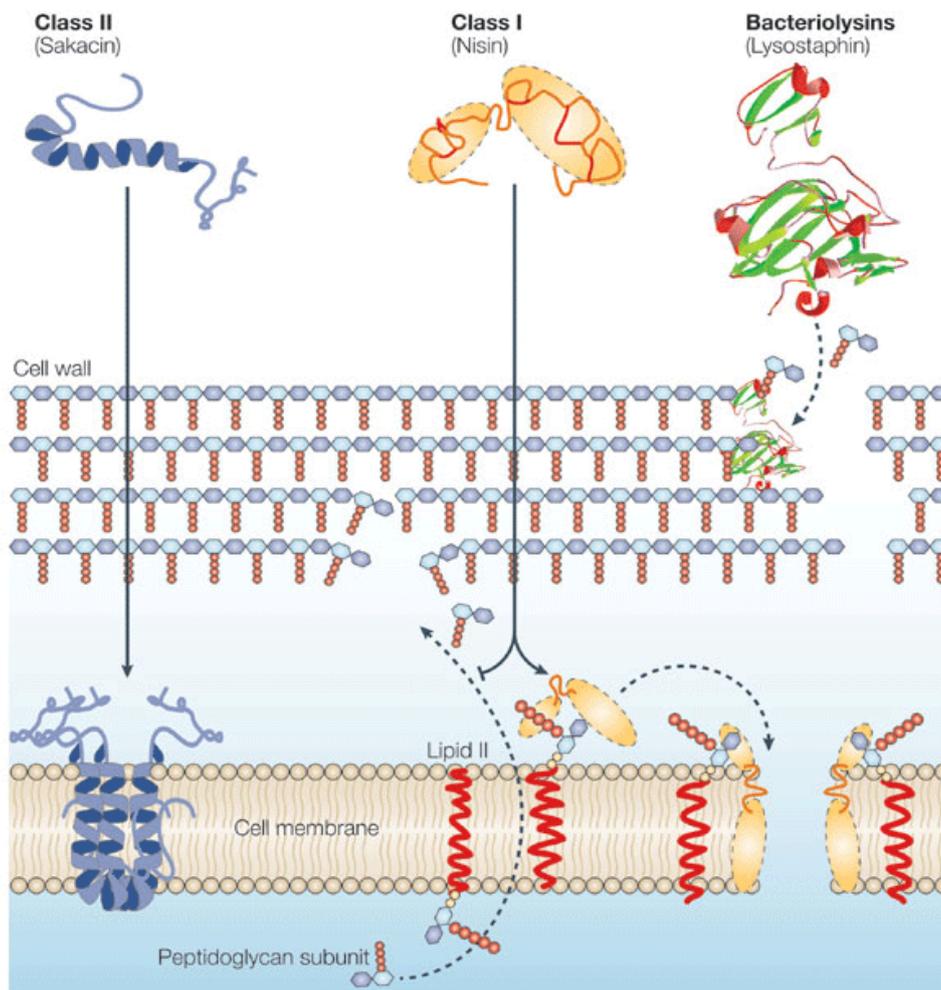


Figura 1: modo de acción habitual de las bacteriocinas en función de la clase a la que pertenecen [21].

En general, las bacteriocinas de la **clase I** muestran un modo dual de acción, al tener la habilidad de unirse al lípido II. Debido a esta unión, la muerte de la célula se puede deber a dos procesos diferentes: debido a un bloqueo de la síntesis de la pared celular o a la rápida formación de poros en la membrana.

En el caso de las bacteriocinas de la **clase IIb**, los dos péptidos que forman la bacteriocina forman una estructura de hélice-hélice que penetra en el interior de las membranas celulares. La naturaleza anfifílica de estas bacteriocinas facilita su inserción en la membrana de los microorganismos sensibles, causando su despolarización y la muerte celular [23].

Las bacteriocinas de **clase III**, como la lisostafina pueden actuar directamente en la pared celular de las células Gram-positivas, provocando la muerte y la lisis de las células diana [21].

2.1.2. *Los lantibióticos*

Los lantibióticos se definen como bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (< 5 kDa), termoestables y con modificaciones post-traduccionales, que dan lugar a los aminoácidos con enlaces tioéter lantionina (Lan) y β -metilantionina (MeLan). Inicialmente, se creía que el conjunto de los lantibióticos estaba formado por un grupo pequeño de péptidos con una actividad biológica limitada. Sin embargo, cada vez se incluyen más bacteriocinas en este grupo que presentan actividades biológicas de amplio espectro. En relación con otras bacteriocinas, los lantibióticos tienen una bioquímica, regulación genética, funciones biológicas y potencial único [25].

De manera general, los lantibióticos contienen de 19 a 38 aminoácidos que sufren numerosas modificaciones post-traduccionales. Debido a estas modificaciones, los lantibióticos se codifican inicialmente como prepéptidos. La primera modificación que se produce es la deshidratación de residuos de serina y treonina en su extremo C-terminal, lo que da lugar a los aminoácidos modificados 2,3-didehidroalanina (Dha) y Z-2,3-didehidrobutirina (Dhb), respectivamente. A través de la reacción entre el grupo tiol de las cisteínas con los residuos Dha y Dhb se forman los aminoácidos modificados Lan y MeLan, respectivamente (*Figura 2*) [25]. Como consecuencia de estas reacciones, los lantibióticos están formados por estructuras policíclicas conteniendo en su estructura anillos de Lan [27].

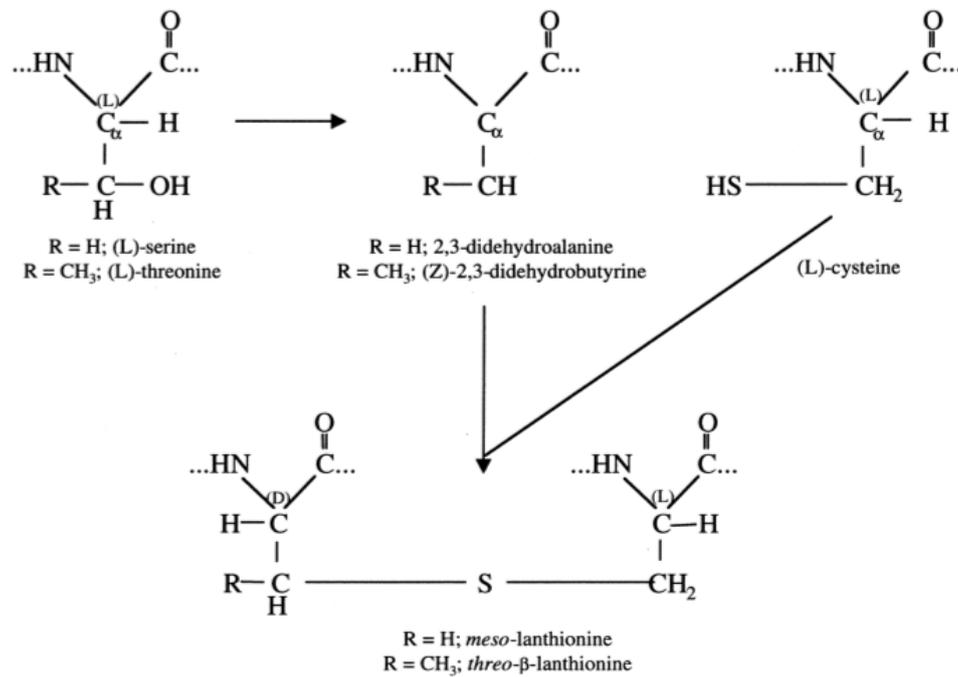


Figura 2: mecanismo general de formación de Lan y MeLan a través de las modificaciones post-traduccionales [27].

A pesar de las modificaciones de la secuencia, los lantibióticos no son funcionales hasta que se libera la secuencia líder [25]. Estas secuencias contienen de 23 a 59 aminoácidos [28]. La secuencia líder puede ser necesaria para la secreción y la maduración completa de la bacteriocina. Para aquellos lantibióticos que son procesados extracelularmente, la secuencia líder puede prevenir la activación de la bacteriocina antes de que esta se encuentre fuera de la célula [25].

En la actualidad, se conocen más de 50 lantibióticos aislados de bacterias Gram-positivas. Atendiendo a las diferencias que aparecen en las secuencias de péptido líder, la estructura del operón biosintético, la función y la estructura del lantibiótico una vez maduro, los lantibióticos se clasifican en dos categorías diferentes: de tipo A y de tipo B [28].

Los **lantibióticos de tipo A** se caracterizan por ser péptidos flexibles que están cargados de forma positiva [29]. A su vez, los lantibióticos de tipo A se dividen en dos subcategorías (Figura 3).

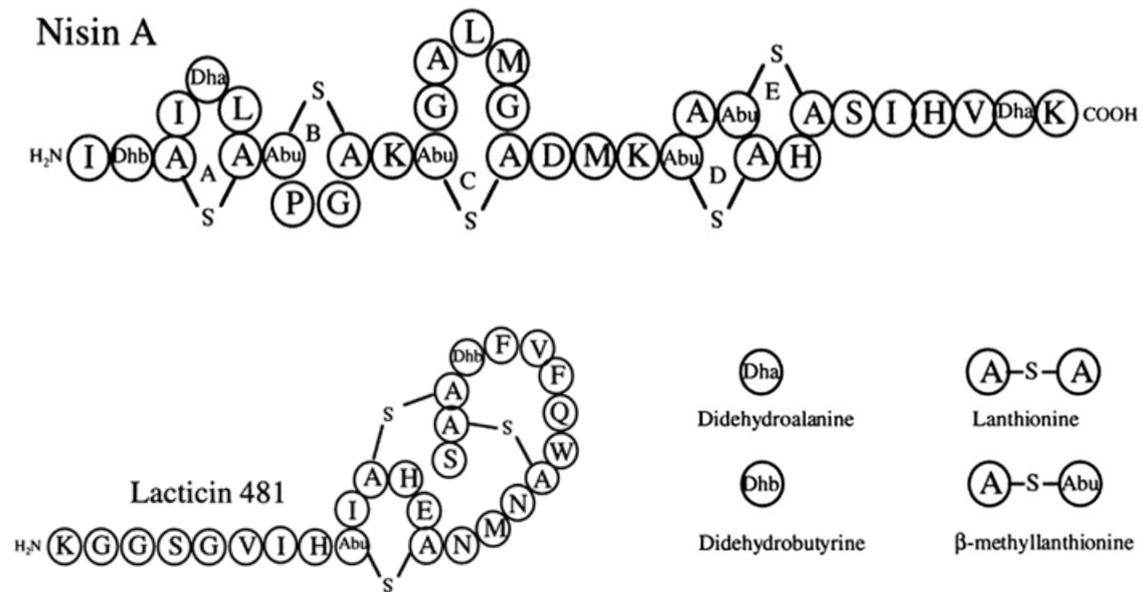


Figura 3: la nisina A es un antibiótico de tipo A-I, con una estructura bastante lineal. La lacticina 481 es un antibiótico de tipo A-II y en su estructura se observan dos regiones diferenciadas, una cola lineal y una región globular [27].

En los antibióticos de tipo A-I, los aminoácidos modificados Lan y MeLan se forman por la acción de dos enzimas diferentes: LanB, que deshidrata los residuos de treonina y serina, y LanC, que media los procesos de unión y ciclación. La estructura madura final de estos antibióticos es más lineal que los del tipo A-II. Dentro de los antibióticos de tipo A-I se encuentran las nisinas A y Z, ambas producidas por *L. lactis* subsp. *lactis* y que difieren en un solo aminoácido, así como la subtilina y la epidermina, entre otros.

Los antibióticos de tipo A-II, muestran dos regiones diferenciadas (cola y anillo) y los aminoácidos modificados se forman por la acción de una única enzima (LanM). Esta enzima presenta conjuntamente las actividades de deshidratación y ciclación. A pesar de que los exportadores de ambos tipos de antibióticos A son diferentes, ambos se designan bajo el nombre de LanT. Dentro de los antibióticos de tipo A-II se encuentra la lacticina 481, la citolisina y la salivaricina A [25].

Los **antibióticos de tipo B** son más globulares y compactos en toda su estructura [28]. Como ejemplos de antibióticos de este tipo se encuentran la cinamicina y la mersacidina.

- Organización génica del operón de los lantibióticos

Los genes que codifican para componentes involucrados en la biosíntesis, regulación e inmunidad de los lantibióticos se encuentran de forma habitual organizados en *clusters* en los microorganismos productores (Figura 4).

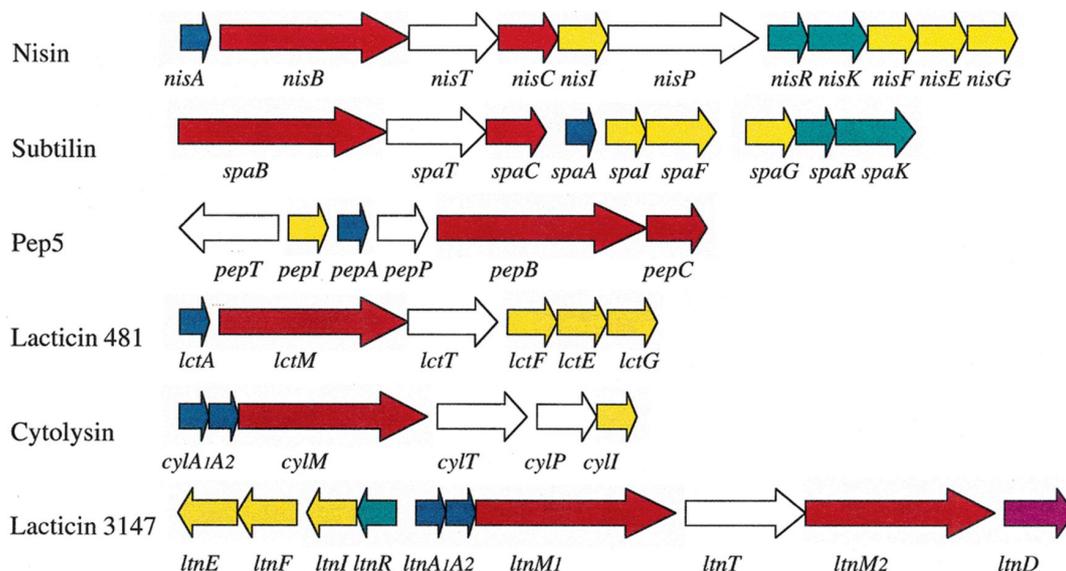


Figura 4: representación de los *clusters* de biosíntesis y regulación en algunos lantibióticos [27].

Los lantibióticos, al igual que el resto de las bacteriocinas, son sintetizados en el ribosoma. Los genes se pueden encontrar en elementos transponibles por conjugación (como la nisina), en el cromosoma de la bacteria (como la subtilina) o en plásmidos (como la lacticina 481) [28]. En muchos casos, el gen estructural (*lanA*) es el primer gen dentro del operón que incluye los genes de las enzimas que realizan las modificaciones (*lanB*, *lanC* y *lanM*), así como el transportador (*lanT*). Otros genes que están involucrados en la regulación y en la inmunidad se pueden encontrar en el mismo operón, aunque es más común que se encuentren en operones próximos [25].

La biosíntesis de los lantibióticos está frecuentemente regulada como una respuesta al estrés; por ejemplo, cuando las células entran en el final de la fase exponencial de crecimiento o al inicio de la fase estacionaria [25].

2.1.3. Las bacterias del ácido láctico

Las BAL son un grupo microbiano taxonómicamente muy diverso, en el cual se engloban microorganismos muy heterogéneos, tanto desde el punto de vista

morfológico como filogenético, pero con la producción de ácido láctico como característica común en todos ellos. Las BAL más representativas se encuadran en los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y la especie *Streptococcus thermophilus* (Figura 5) [30]. Dentro del grupo se incluyen habitualmente los géneros *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* pues comparten con los anteriores hábitats y aplicabilidad industrial.

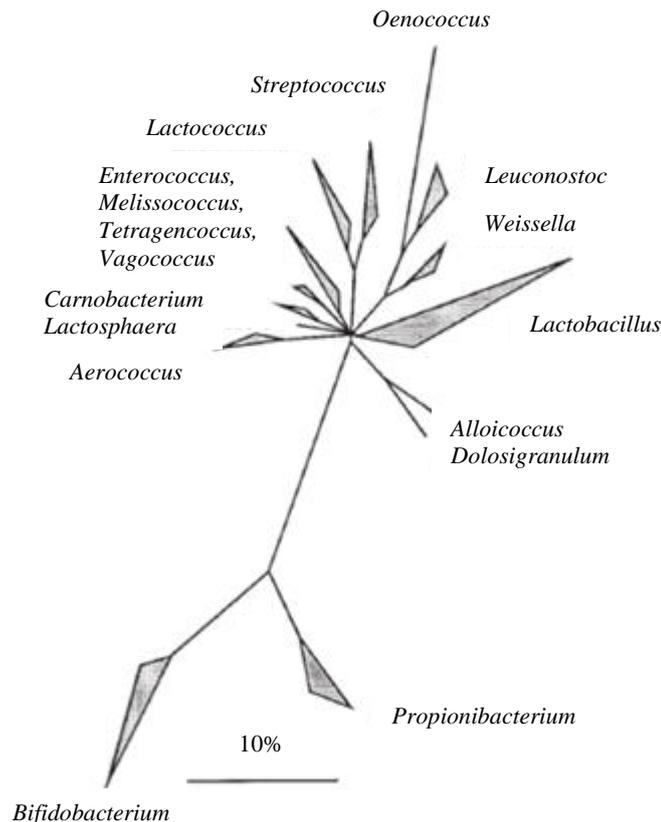


Figura 5: árbol filogenético basado en el análisis comparativo de las secuencias del gen ADN ribosomal 16S. En él se recogen los principales grupos filogenéticos pertenecientes a las BAL [30].

Algunas de las características generales de las bacterias pertenecientes a este grupo es que son Gram-positivas, anaerobias estrictas o aerotolerantes, comúnmente inmóviles, no esporuladas ni pigmentadas, con forma cocoide o bacilar y con la facultad de convertir los carbohidratos en ácido láctico [31]. El ácido láctico se puede producir como único producto final a partir de la degradación de las hexosas, aunque también pueden producirse metabolitos adicionales como acetato, etanol, CO₂, formato o succinato [32].

Se trata de un grupo muy exigente nutricionalmente y con una capacidad biosintética limitada, requiriendo diversos factores de crecimiento, como aminoácidos, vitaminas y

precursores de ácidos nucleicos. Por ello, se encuentran en nichos ecológicos ricos en nutrientes como la superficie de las plantas y el material vegetal en descomposición, los alimentos fermentados, la piel de los animales y las mucosas del tracto gastrointestinal (TGI) y genitourinario de los vertebrados.

Las BAL se han utilizado durante miles de años para la producción de alimentos, ya que desempeñan un papel importante en los procesos de fermentación. Estas bacterias constituyen una parte muy importante de nuestra dieta ya que poseen capacidades metabólicas de gran importancia para la elaboración y maduración de alimentos fermentados como queso, yogures, embutidos, etc. Así pues, el hombre ha consumido BAL a través de los productos fermentados desde tiempo inmemorial, por lo que se considera que estas bacterias presentan una seguridad cualificada desde el punto de vista de la seguridad alimentaria (Qualified Presumption of Safety o QPS) (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2007) [33] y GRAS (Generally Recognized As Safe, Food and Drug Administration (FDA)).

Dentro del grupo de las BAL y del género *Lactobacillus* se encuentra la especie *L. plantarum*. Se trata de una bacteria con forma bacilar (*Figura 6*) y anaerobia aerotolerante, por lo que puede crecer en presencia o ausencia de oxígeno.

L. plantarum se encuentra en nichos biológicos muy variados, como material vegetal, alimentos de origen vegetal y animal, en la saliva y en el TGI de los humanos. Esta especie se usa comúnmente en las fermentaciones alimentarias. Algunos ejemplos de productos fermentados en los que se encuentra *L. plantarum* son queso, pepinillos, aceitunas, chucrut, fermentados de pescado, embutidos y masas madre fermentadas [34].

Se han realizado numerosas investigaciones con esta especie debido a su gran capacidad de adaptación y sus numerosas aplicaciones. *L. plantarum* puede sobrevivir al pH bajo del estómago y del duodeno, resistiendo a los efectos de la bilis y colonizando temporalmente el tracto gastrointestinal. Motivo por el que algunas cepas de esta especie se han empleado en el tratamiento del síndrome del intestino irritado y, además, parecen tener efectos positivos en la reducción del dolor y la distensión abdominal [35]. Asimismo, se ha demostrado que *L. plantarum* puede mejorar la integridad de la barrera intestinal, la actividad metabólica de las células intestinales y estimular la respuesta del

sistema inmune [35]. Por todas estas razones, *L. plantarum* tiene un gran potencial como probiótico.

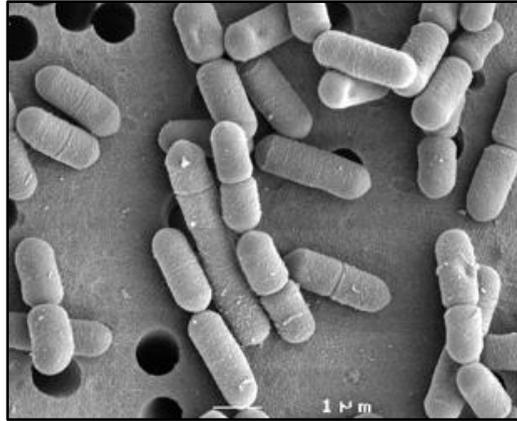


Figura 6: imagen de microscopía electrónica de barrido (MEB) de *L. plantarum* [36].

2.1.4. Bacteriocinas producidas por las bacterias del ácido láctico

Las bacteriocinas pueden ser sintetizadas por una amplia variedad de cepas bacterianas Gram-negativas o Gram-positivas. Sin embargo, las bacteriocinas producidas por las BAL han sido de gran interés para la industria alimentaria ya que tanto los microorganismos que se engloban en este grupo como sus productos metabólicos se consideran seguros para el consumo [15, 22]. Las bacteriocinas producidas por diferentes cepas de BAL que intervienen en procesos alimentarios pueden servir como barreras antimicrobianas (con efecto bacteriostático o bacteriolítico) reduciendo el número de microorganismos patógenos en los alimentos.

La actividad de las bacteriocinas de las BAL se comenzó a describir en 1928, cuando se encontró que ciertas cepas de *Lactococcus* que se empleaban en la fabricación de queso podían producir un efecto inhibitorio frente al crecimiento de otras BAL y, además, podían inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y nocivas para la conservación del queso. En 1933 se describió por primera vez una sustancia de naturaleza peptídica con actividad antimicrobiana producida por cepas de la especie *L. lactis* subsp. *lactis*; esta sustancia se denominó posteriormente nisina [22].

La mayor parte de las bacteriocinas producidas por las BAL son de naturaleza catiónica a pH neutro (debido a la presencia de residuos de lisina, arginina e histidina),

tienen naturaleza hidrofóbica (por estar formados por aminoácidos ácidos como la alanina, valina, leucina, metionina, etc.) y anfifílica, conteniendo globalmente de 20 a 60 residuos aminoacídicos.

Existe una gran variedad de bacteriocinas producidas por las BAL. Entre ellas se encuentra la nisina, que pertenece al grupo de los lantibióticos. Es producida por cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* y es efectiva contra bacterias pertenecientes al género *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria* [37]. La pediocina es una bacteriocina producida por *Pediococcus acidolactici* que pertenece a la clase IIa y presenta una alta actividad contra *Listeria monocytogenes* [38]. Otras bacteriocinas de importancia son las lactococinas, pertenecientes a la clase IIb y producidas por cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris*. Además, existen una gran variedad de plantaricinas, las cuales son bacteriocinas producidas por diferentes cepas de *L. plantarum* [22].

2.1.5. Aplicaciones alimentarias de las bacteriocinas producidas por las bacterias del ácido láctico

Las bacteriocinas pueden emplearse tanto para la conservación de alimentos como para la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos [39]. Las bacteriocinas tienen un gran potencial como bioconservante de numerosos productos. Una de las formas más habituales de empleo es la purificación o semipurificación de las bacteriocinas para que sean añadidas como ingredientes o aditivos directamente a los alimentos, o bien, en los envases y recipientes que contienen los productos alimentarios [40]. Otra forma de incorporar las bacteriocinas a los alimentos es a través de cultivos productores de bacteriocinas, de manera que las bacteriocinas se producirían *in situ* [40]. En este último caso es difícil cuantificar la cantidad de bacteriocina producida ya que las matrices de los alimentos son complejas [41]. Sin embargo, tiene la ventaja de que no es necesario declararlas como aditivos. Las bacteriocinas producidas por las BAL y utilizadas en la industria alimentaria deben ser compatibles con los procesos tecnológicos (pasteurización) y con las características del producto final (pH, porcentaje de grasa, etc.).

De todos los lantibióticos, el más conocido es la nisina, que se descubrió a principios de los años 20 y que está compuesto por 34 residuos aminoacídicos. Fue aprobada en 1969 por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

(FAO) y desde hace más de 40 años se ha convertido en la alternativa a los conservantes químicos convencionales. Está incluida como bioconservante en la lista europea de aditivos (E-234) y está aprobada en más de 50 países [33]. Algunos inconvenientes que presenta la aplicación de las bacteriocinas en la industria alimentaria son de carácter legal, y por ello, muy pocas bacteriocinas han sido aprobadas oficialmente para su uso en alimentación [42]. Por tanto, es importante que se potencie la búsqueda de nuevas bacteriocinas, se analice su actividad y propiedades en alimentos y se corrobore su inocuidad, para que en un futuro se apruebe un mayor número de bacteriocinas para su uso a nivel industrial.

2.2. Antecedentes

La microbiota presente en aquellos productos fermentados en los que no se emplean cultivos iniciadores comerciales contiene una gran variabilidad de cepas [2]. Dentro de este tipo de productos fermentados artesanales destacan los quesos. Los quesos elaborados de manera tradicional en los que se utiliza leche cruda y no se añaden cultivos iniciadores pueden ser una fuente de BAL con características bacteriocinogénicas [12]. En estudios previos, se analizaron 120 cepas de BAL, todas ellas procedentes de procesos en los que la fermentación de los alimentos se producía de manera espontánea sin el empleo de cultivos iniciadores. De todas las cepas analizadas, 75 pertenecían al género *Lactobacillus* y dentro de estas cepas, 9 pertenecían a la especie *L. plantarum*. Todas estas cepas presentaban una actividad antimicrobiana contra otras especies, siendo la actividad más interesante la que se correspondía con la cepa denominada *L. plantarum* LL441, aislada de queso de *Cabrales* [11].

Mediante el empleo de proteasas, se concluyó que la actividad antimicrobiana de esta cepa se debía a una bacteriocina, la cual se denominó plantaricina C [12]. Se determinó que la plantaricina C tenía un tamaño de 3,5 kDa y que tenía un amplio espectro contra otras bacterias Gram-positivas, especialmente contra aquellas bacterias que están asociadas con la contaminación del queso, como los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria* [37].

La estructura secundaria y terciaria de la plantaricina C se determinó empleando técnicas como la degradación automática de Edman y la resonancia magnética nuclear [13], permitiendo la adscripción de ésta a la clase I o grupo de los lantibióticos. Está formada por 27 aminoácidos, entre los cuales hay tres β -metilantioninas, una dehidroalanina y cinco lantioninas [13]. La estructura de esta bacteriocina comprende dos regiones diferenciadas: una región N-terminal lineal y una segunda región globular. Su mecanismo de acción se basa en su inserción en la membrana citoplasmática de los microorganismos sensibles de manera independiente de voltaje y sin necesidad de proteína receptora. Presumiblemente, la bacteriocina se polimeriza en la membrana creando una barrera estructural que da lugar a la formación de poros en la membrana plasmática, produciéndose la liberación de interior celular. Como consecuencia de esta actividad la célula muere y, en algunos casos, la lisis es inducida [13].

Tal y como se ha mencionado, aunque las características principales de la bacteriocina ya se habían estudiado, la genética de la plantaricina C se encontraba por resolver a pesar de los enormes esfuerzos que se hicieron en el pasado. En este trabajo decidimos abordar el estudio mediante una aproximación diferente: la secuenciación genómica de la cepa productora y el análisis de su secuencia.

Inicialmente, se repitieron algunos de los análisis fenotípicos más característicos de la cepa productora y de la plantaricina C para estar seguros de que la cepa que íbamos a secuenciar se trataba realmente de *L. plantarum* LL441 y que esta no había perdido ninguna de sus propiedades (y en particular la producción de la bacteriocina).

2.3. Fundamentos experimentales

En primer lugar se estudió el perfil de sensibilidad/resistencia a antibióticos de la cepa productora LL441. Para ello, se empleó la técnica de microdilución en placa microtituladora. Huys y colaboradores [43] estandarizaron la cantidad de inóculo, medio y condiciones de cultivo para determinar el grado de sensibilidad/resistencia a antibióticos en las BAL. Sus indicaciones, junto con las de otros autores y la EFSA, han permitido definir puntos de corte para la mayoría de los compuestos antimicrobianos en las BAL, pudiendo discriminar así de forma eficaz entre bacterias sensibles y resistentes.

La producción de plantaricina C por de *L. plantarum* LL441 y su actividad antimicrobiana se evaluó por el método de difusión en agar utilizando como microorganismo indicador la cepa *Lactobacillus sakei* CECT 906. En este método, sobre la superficie de una placa Petri se añadió una cantidad de medio sin inocular y una vez solidificada, se añadió medio de cultivo inoculado con la cepa sensible en una cantidad estandarizada, para obtener después de la incubación un cultivo en césped. Una vez solidificado, se hicieron pocillos en los que se añadieron las distintas proteasas y la bacteriocina, respectivamente. Las sustancias difundieron a través del agar y tras la incubación a 32°C durante 24 horas, se midieron los halos de inhibición. El efecto de distintos agentes proteolíticos, en concreto, de la pronasa, tripsina y proteasa K en la actividad antimicrobiana de la plantaricina C, se realizó mediante esta técnica (Figura 7).

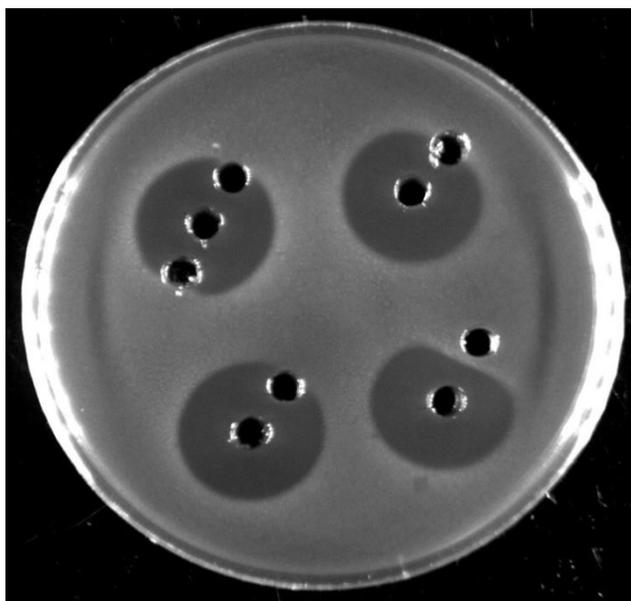


Figura 7: ejemplo de resultado del método de difusión en agar.

La identificación del gen estructural y la caracterización de la región codificadora y las regiones adyacentes a la plantaricina C se llevó a cabo tras la secuenciación masiva de su genoma utilizando la técnica Illumina (BioSystems) [15]. La secuenciación del ADN es un conjunto de métodos y técnicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, T, C y G). La elevada demanda de secuenciación de bajo coste ha dado lugar a las distintas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento. A estas secuenciaciones, entre las que se encuentra la tecnología Illumina, se denominan secuenciaciones de nueva generación (*Figura 8*).

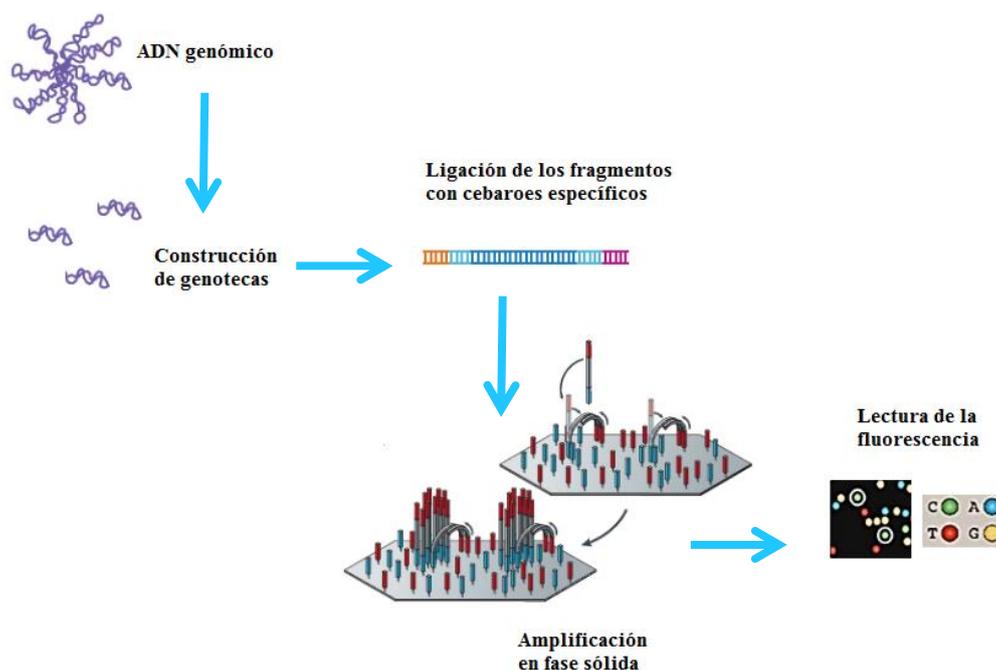


Figura 8: secuenciación por terminación reversible cíclica empleada en la tecnología Illumina.

En primer lugar se construyen genotecas, es decir, una colección de fragmentos del ADN total de *L. plantarum* LL441, de un tamaño de 0,5 kpb [15]. Para ello, se ligan adaptadores cortos a los fragmentos de ADN obtenidos, los cuales aportan la homología necesaria para el apareamiento de los cebadores que serán utilizados posteriormente en las etapas posteriores. Los fragmentos de ADN obtenidos se desnaturalizan, purifican y amplifican por PCR fijados en una fase sólida. La tecnología Illumina emplea terminadores reversibles fluorescentes de manera cíclica. En primer lugar se añaden los cuatro terminadores análogos a los cuatro dNTPs, marcados cada uno de ellos con un grupo fluorescente diferente. Los terminadores, una vez incorporados a la cadena en crecimiento irrumpen la síntesis. En esta etapa, una ADN polimerasa unida al templado con el iniciador ya apareado incorpora un único nucleótido terminador según del ADN molde. Después de la incorporación, se lavan los terminadores restantes y se capta la

fluorescencia para determinar la identidad del nucleótido incorporado. Para pasar al siguiente ciclo, se eliminan las regiones del nucleótido responsables de la terminación, así como los responsables de la fluorescencia y se realiza un nuevo lavado antes de pasar al siguiente ciclo [44].

Para analizar los datos obtenidos en la secuenciación se realizaron diferentes análisis bioinformáticos con diferentes programas y servidores:

- Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST)

RAST es un servicio totalmente automatizado para anotar genomas de bacterias y arqueas de manera casi completa. El servidor proporciona anotaciones de alta calidad para todo tipo de genomas.

El servidor es capaz de identificar las pautas abiertas de lectura codificadoras, los genes rRNA y tRNA, además de asignar funciones a las proteínas, tejiendo una malla de información para reconstruir la red metabólica, aportando información útil a los investigadores [45].

- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

BLAST es un programa informático de alineamiento de una secuencia, ya sea ADN, ARN o proteínas, con las presentes en la base de datos. Existen diferentes programas dentro de la familia BLAST, como Blastn y Blastp que permiten comparar secuencias de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente.

Por medio de un algoritmo, encuentra las secuencias de la base de datos que tienen un mayor parecido con la secuencia problema y, además, proporciona la significación de los resultados para poder tener más datos a la hora de considerar los resultados obtenidos.

Este programa permite cotejar las secuencias de interés con otras que han sido previamente caracterizadas y así poder conocer su función, las relaciones evolutivas entre las secuencias y ayudar a identificar genes que sean característicos de determinadas familias [46].

- PLACNET (Plasmid Constellation Network)

Este programa permite identificar y separar las secuencias del *core* (genes comunes a todas las cepas de una especie) y el plasmidoma de una cepa basándose en la información del ensamblaje y las secuencias depositadas en las bases de datos que se utilizan como referencia [47].

- Cytoscape

Cytoscape es un programa abierto que permite visualizar las interacciones moleculares y biológicas con datos de expresión de alto rendimiento y otros estados moleculares, distinguiendo las relaciones entre ellos por medio de redes (Figura 9) [48].

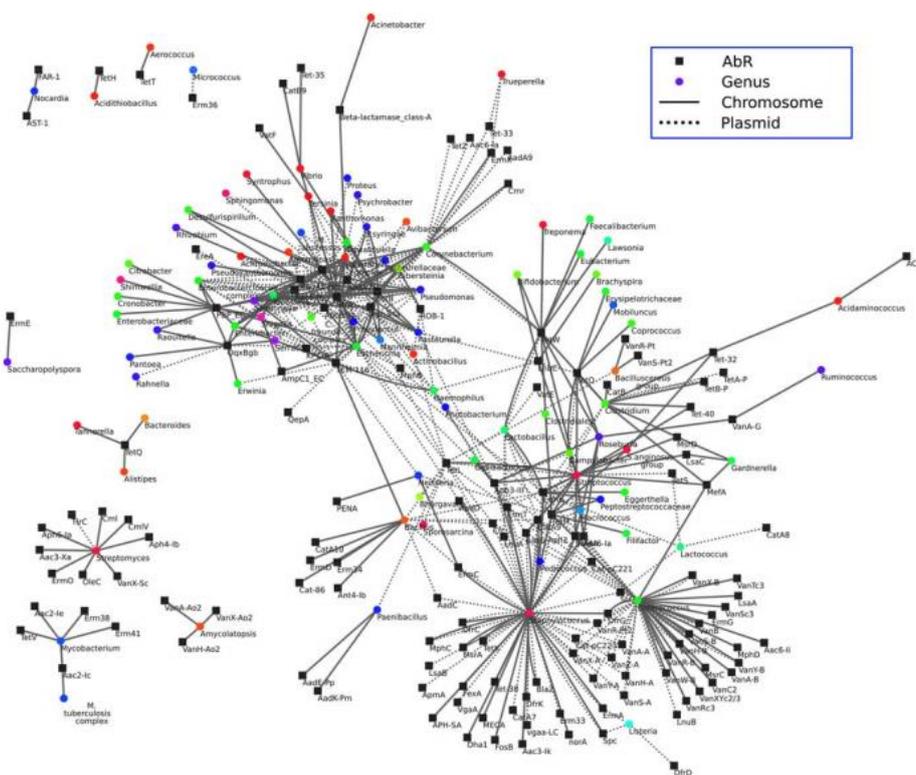


Figura 9: ejemplo de visualización de las redes que proporciona el programa Cytoscape a partir de los datos de trabajo [49].

Es importante conocer como de estable es la producción de plantaricina C en la cepa *L. plantarum* LL441. Para ello es imprescindible determinar si el gen que codifica para la plantaricina C se encuentra en un plásmido o en el cromosoma de *L. plantarum* LL441. La localización del gen de la plantaricina C se determinó mediante hibridación

con una sonda marcada (un fragmento un gen del operón de la plantaricina C) con digoxigenina (DIG).

La técnica de amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó para la obtención de un fragmento del gen *lanM* que se utilizó como sonda en la técnica de hibridación. La PCR consiste en la amplificación *in vitro* de una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos, en los que la secuencia original es copiada fielmente. Los equipos en los que se realiza la reacción de PCR se denominan termocicladores.

Es necesario disponer de fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla que sean complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores para que la enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. Los componentes importantes en la reacción son la secuencia que se va a copiar o ADN molde, la ADN polimerasa, los cebadores, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G)), un tampón que contenga el ión magnesio (Mg^{2+}) y agua.

Todos esos elementos interactúan en las tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión (Figura 10).

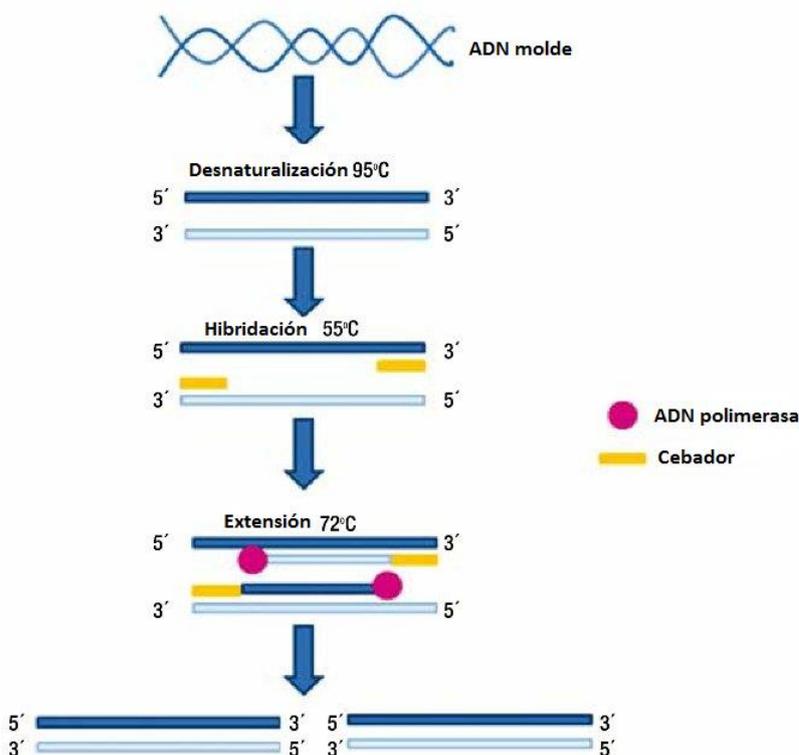


Figura 10: etapas que tienen lugar en un ciclo de PCR [50].

En la desnaturalización, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C. El tiempo de esta etapa depende de la secuencia del ADN molde, si la cantidad de G+C es alta, el tiempo necesario será mayor para romper las uniones ya que el apareamiento de esas bases está formado por tres enlaces, uno más que en las bases A+T. En la etapa de hibridación, los cebadores se alinean en el extremo 3' de la secuencia molde e hibridan con su secuencia complementaria. La temperatura de hibridación tiene que ser óptima para los cebadores diseñados, aunque de manera general oscila entre los 50 y 60°C. La última etapa es la de extensión, en la que la ADN polimerasa actúa sobre el complejo de secuencia molde y cebador en sentido 5' → 3' y comienza su función catalítica, agregando dNTPs complementarios para crear cadenas completas de ADN. La temperatura óptima de esta etapa es de 72°C. Estas tres etapas se repiten durante un número elevado de ciclos.

Una vez completada la reacción, la cantidad de fragmento amplificado se puede visualizar mediante técnicas sencillas de separación de fragmentos de ADN, como por ejemplo, mediante electroforesis en geles de agarosa. La electroforesis consiste en la separación de las moléculas a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas de acuerdo a su tamaño. De esta manera, se pueden conocer los tamaños de los fragmentos amplificados tras la PCR [50].

Para la localización del operón de la plantaricina C se utilizó la técnica de hibridación de ácidos nucleicos o Southern blot (*Figura 11*).

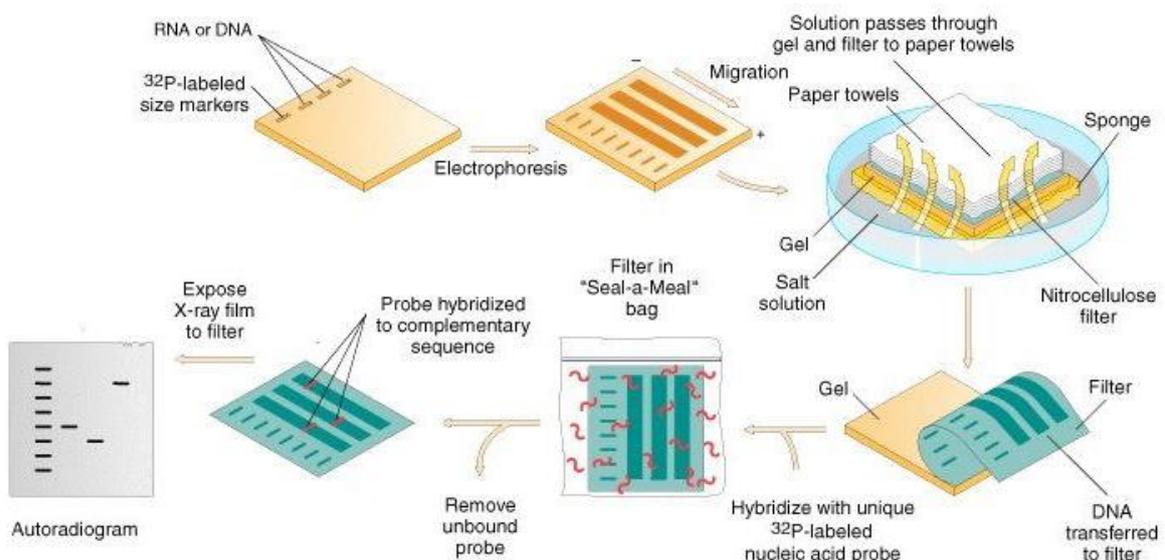


Figura 11: etapas del proceso de hibridación Southern [51].

Para poder realizar esta técnica, se separaron primero los fragmentos de ADN en un gel de agarosa por electroforesis. Posteriormente, se desnaturalizaron los fragmentos y se transfirieron a una membrana de nylon. La transferencia de ADN a la membrana ocurre cuando una solución atraviesa el gel por capilaridad, llevándose con él los fragmentos de ADN. Para hacer la transferencia también se pueden emplear métodos mecánicos que consisten en la utilización de peso o aparatos en los que se produce vacío. La fijación del ADN a la membrana de nylon se puede hacer sometiendo a esta a luz ultravioleta (UV) durante unos minutos. Posteriormente, se hibridaron los fragmentos de ADN con sondas complementarias marcadas, y tras una serie de lavados y tratamientos (bloqueo de la membrana, reacción con anticuerpos, etc.) se detectó el lugar en el cual se produjo la hibridación [51].

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas, medios y condiciones de cultivo

En este proyecto se estudió la cepa *L. plantarum* LL441 productora de plantaricina C. Como cepa indicadora se utilizó la cepa de colección *L. sakei* CECT 906 que resulta muy sensible a la plantaricina C.

Para la recuperación de ambas cepas, se empleó el medio sólido de Man Rogosa Sharpe (MRS) Agar (Scharlau, Scharlab, Barcelona, España) y ambas cepas se incubaron en aerobiosis a 32°C durante 48 horas.

Los microorganismos se conservaron de manera prolongada, a -80°C en medio de cultivo líquido (MRS), suplementado con un 20% de glicerol como agente crioprotector.

3.2. Detección de la actividad inhibitoria de la plantaricina C

El efecto inhibitorio de la plantaricina C se comprobó mediante un ensayo de difusión en placa, empleando la cepa indicadora *L. sakei* CECT 906. Para ello, las cepas *L. plantarum* LL441 y *L. sakei* CECT 906 se inocularon en medio MRS líquido (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) y se incubaron a 32°C durante 24 horas.

El cultivo de *L. plantarum* LL441 se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos (Kubota High Speed Refrigerated Centrifuge 6500, Japón). A continuación, el sobrenadante se recogió y se trató de dos formas diferentes:

- El sobrenadante se neutralizó con NaOH 0,1N (Scharlau) hasta alcanzar un pH de 6,5.
- El sobrenadante también se empleó tal y como se obtuvo tras la centrifugación, es decir, a un pH de 4,5.

Ambos sobrenadantes se filtraron con una membrana con poros de tamaño de 0,2 µm (Millipore, Bedford, MA, USA).

Para el ensayo de difusión, se prepararon placas de MRS con un 2% de agar (Roko Agar AB Eur, Industrias Roko, Llanera, Asturias). Sobre ellas, se añadió una capa de MRS con un 0,7% de agar y con un inóculo de la cepa indicadora *L. sakei* CECT 906 al 1 y al 2%, respectivamente. En cada pocillo se añadieron 50 µl de una de las siguientes disoluciones: sobrenadante (pH 4,5), sobrenadante neutralizado (pH 6,5) o distintas

diluciones del sobrenadante neutralizado. Para este último se prepararon diluciones 1:2 mezclando el sobrenadante neutralizado con una solución estéril de Ringer (VWR International, Darmstadt, Alemania).

3.3. Efecto de las proteasas sobre la actividad antimicrobiana

Para comprobar la naturaleza proteica de la plantaricina C producida por *L. plantarum* LL441 se realizaron dos ensayos diferentes, en los cuales se puso en contacto la bacteriocina con las enzimas pronasa, tripsina y proteinasa K (todas ellas de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.3.1. Ensayo de difusión en placa

Este ensayo se realizó de manera similar al citado en el Apartado 3.2. Se prepararon placas de MRS con un 2% de agar y sobre ellas se añadió un inóculo de la cepa indicadora *L. sakei* CECT 906 al 2% en MRS con un 0,7% de agar.

En cada pocillo central se añadieron 50 µl del sobrenadante neutralizado con NaOH 0,1N y en los pocillos adyacentes se añadieron 25 µl de proteasas (pronasa, tripsina y proteinasa K) con una concentración de 20 mg ml⁻¹. Como controles negativos se emplearon 25 µl de las suspensiones en las que se encontraban disueltas cada una de las proteasas, siendo agua para la pronasa y proteinasa K y EDTA tetrasódico (0,2 mg ml⁻¹) para la tripsina.

3.3.2. Ensayo de difusión en placa tras co-incubación proteasa-bacteriocina

Para evitar los posibles problemas en la difusión de las proteasas en el medio de cultivo, se realizaron una serie de modificaciones sobre el ensayo citado anteriormente. Se elaboró una mezcla que contenía 50 µl del sobrenadante neutralizado con 25 µl de distintas concentraciones de enzima (Tabla 1) o con los controles negativos (EDTA tetrasódico (0,2mg ml⁻¹) y agua).

Tabla 1: concentraciones de las proteasas ensayadas y el compuesto empleado como control en cada caso.

	Control	Concentraciones ensayadas (mg ml ⁻¹)						
<i>Pronasa</i>	Agua	5	2,5	1,25	0,6	0,31	0,15	
<i>Proteinasa K</i>	Agua	5	2,5	1,25	0,6	0,31	0,15	
<i>Tripsina</i>	EDTA (0,2 mg ml ⁻¹)	5	2,5	1,25	0,6	0,31	0,15	

Las mezclas se incubaron durante 30 minutos ó 1 hora a las temperaturas óptimas de cada una de las enzimas. Las mezclas que contenían proteinasa K se incubaron a 55°C y las que tenían pronasa y tripsina se incubaron a 37°C.

3.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La determinación de la CIM de la cepa productora a 16 antibióticos se realizó empleando un kit comercial (VetMIC™ Lact-1 y Lact-2) (National Veterinary Institute of Sweden, Uppsala, Sweden). El rango de concentración de los antibióticos aparece detallado en la *Tabla 2*.

Tabla 2: agentes antimicrobianos ensayados con el kit VetMIC™ Lact-1 y Lact-2.

<i>Agente antimicrobiano</i>	<i>Rango de concentraciones ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	<i>Agente antimicrobiano</i>	<i>Rango de concentraciones ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>
Gentamicina	0,5 - 256	Ampicilina	0,03 - 16
Kanamicina	2 - 1024	Penicilina	0,03 - 16
Estreptomycin	0,5 - 256	Vancomicina	0,25 - 128
Neomicina	0,5 - 256	Virginamicina	0,016 - 8
Tetraciclina	0,12 - 64	Linezolida	0,03 - 16
Eritromicina	0,016 - 8	Trimezoprima	0,12 - 64
Clindamicina	0,03 - 16	Ciprofloxacina	0,25 - 128
Cloranfenicol	0,12 - 64	Rifampicina	0,12 - 64

L. plantarum LL441 se recuperó en medio LSM [10% de MRS y un 90% de IsoSensitest (Oxoid)], y se incubó durante 48 horas a 32°C hasta obtener colonias aisladas. Varias colonias se resuspendieron en una solución salina estéril (0,9% de NaCl) hasta conseguir una densidad óptica (DO) correspondiente a 1 en la escala de McFarland (aproximadamente 3×10^8 ufc ml^{-1}). A partir de esta suspensión, se realizó una dilución 1:1000 en medio de cultivo LSM líquido, siendo la concentración final de inóculo de 3×10^5 ufc ml^{-1} aproximadamente. 100 μl de esta suspensión se emplearon para inocular cada pocillo de la placa microtituladora.

Las placas se incubaron en condiciones de aerobiosis a 32°C. Los resultados se leyeron a las 24 y 48 horas, observando si se producía inhibición o no del crecimiento

en cada uno de los pocillos de la placa. La CIM se corresponde con la concentración más baja de antibiótico en la que visualmente no se observa crecimiento.

Para el caso de la tetraciclina, se realizó un ensayo en mayor profundidad, utilizando un rango de concentración de antibiótico mayor que el que presenta el sistema comercial. En una placa microtituladora se prepararon las siguientes diluciones del antibiótico: 0,12, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Los medios de cultivo, la concentración de inóculo bacteriano y las condiciones de cultivo fueron los mismos que los indicados anteriormente.

3.5. Extracción de ADN total

Partiendo de un cultivo en MRS líquido de *L. plantarum* LL441 incubado durante 24 horas, se realizó la extracción del ADN total de esta cepa. Para ello, se empleó el kit DNeasy[®] Blood and Tissue de Quiagen (*Apéndice 1*), y se siguieron las recomendaciones del fabricante, aunque con algunas modificaciones. Puesto que *L. plantarum* LL441 es un microorganismo Gram positivo y, por ello, la lisis es más compleja, ésta se llevó a cabo empleando 400 μl de un tampón que contiene Tris-HCl 50 mM a pH 8,0 y EDTA 10 mM y estaba suplementado con 30 mg ml^{-1} de lisozima, 1 μl de mutanolisina (150 U μl^{-1}) y 4 μl de RNAsa (10 mg ml^{-1}) (todas ellas de Sigma-Aldrich). La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos, seguida de una incubación a 55°C durante otros 30 minutos. A continuación, se siguió el procedimiento descrito por el fabricante.

La visualización del ADN total se realizó tras una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón 1X TAE (40 mM Tris, 20 mM de ácido acético y 1 mM de EDTA) a 75 V durante, aproximadamente 120 minutos y la tinción se realizó con bromuro de etidio (0,5 mg ml^{-1}). La imagen se capturó bajo luz UV empleando el equipo G-Box (Syngene, Cambridge, Reino Unido).

La concentración de ADN total y la relación de absorbancia a 260 y 280 nm se midieron con un espectrofotómetro Epoch (BioTek, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EEUU). Las muestras de ADN total se conservaron a -20°C hasta su uso.

3.6. Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción del ADN plasmídico se llevaron a cabo tres protocolos diferentes. En todos los casos, se partió de una alícuota de 2 ml de un cultivo en medio líquido MRS o en medio líquido MRS suplementado con treonina 40 mM (Thermo Fisher, Karlsruhe, Alemania) o con glicina al 1% (Panreac, Barcelona, España), de *L. plantarum* LL441 incubado durante 24 horas. La lisis bacteriana se realizó tal y como se describe en el *Apartado 3.5*.

- *Protocolo 1*. La extracción plasmídica se realizó según el método descrito por O'Sullivan y Klaenhammer en 1993 [52] (*Apéndice 2*). Después de la lisis bacteriana, se añadió acetato de sodio 3M con un pH de 4,8 a 4°C, manteniendo la muestra en hielo 5 minutos. Tras centrifugar la muestra, se conservó el sobrenadante y se añadió isopropanol a temperatura ambiente. Después de centrifugarlo de nuevo y conservar el pellet, se añadió acetato de amonio 7,5M y la purificación se realizó con fenol/cloroformo. Tras la precipitación, la muestra se lavó con etanol, se secó al vacío y se resuspendió en un volumen de agua destilada.

- *Protocolo 2*. La extracción plasmídica se realizó siguiendo el protocolo descrito anteriormente, pero empleando para los pasos de desnaturalización y neutralización las soluciones del kit "Plasmid Mini Kit" de Quiagen (Quiagen, Hilden, Alemania) (*Apéndice 3*). La muestra se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol, se secó al vacío y se resuspendió en un volumen de agua destilada.

- *Protocolo 3*. En el último método de extracción ensayado (*Apéndice 4*), tras la lisis, se realizaron varias incubaciones en hielo, tratando la muestra con NaOH 2N, Tris-HCl con un pH 8,0 y NaCl 5M. Tras centrifugar la muestra y conservar el sobrenadante, se añadió el tampón TE (Tris-HCl a pH 8,0 y EDTA) en una proporción 10:1. Tras la purificación con fenol/cloroformo, la muestra se incubó a -20°C durante media hora. Después de la precipitación del ADN plasmídico con isopropanol, se lavó la muestra con etanol al 70%, se secó al vacío y se resuspendió en un volumen de agua destilada.

De todos los procedimientos empleados, los mejores resultados se obtuvieron en la extracción plasmídica llevada a cabo con las soluciones del kit "Plasmid Mini Kit" de Quiagen (*Extracción 2*). Para mejorar el método y obtener una extracción aún mejor, se partió de un cultivo de *L. plantarum* LL441 en medio MRS líquido que se incubó

durante 24 horas y durante el cual se fueron tomando muestras a distintos tiempos de incubación (4, 8 y 24 horas). Además de recoger muestras a diferentes tiempos de incubación, se tomaron también distintos volúmenes en cada uno de los tiempos (1, 2 y 5 ml).

Los perfiles plasmídicos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón 1X TAE (40 mM Tris, 20 mM de ácido acético y 1 mM de EDTA) a 75 V durante aproximadamente 150 minutos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron como se indica anteriormente.

3.7. Análisis bioinformático

La secuenciación del genoma completo se realizó empleando la plataforma “HiSeq 2000” de Illumina (Biosystems). Se utilizó ADN total de la cepa *L. plantarum* LL441, según el procedimiento descrito en el *Apartado 2.3*, para construir genotecas de un tamaño de 0,5 kpb que se sometieron posteriormente a secuenciación por los dos extremos en el secuenciador “HiSeq 2000” en el Instituto de Genómica de Beijing (BIG) (Beijing, China). Las secuencias obtenidas se filtraron por calidad con el programa FastQC y el ensamblaje de las secuencias *de novo* en “contigos” empleando los programas SPAdes Assembler version 3.5.0 [53] y Velvet Optimizer v.1.2.10. (<https://www.ebi.ac.uk/~zerbino/velvet/>). La anotación se realizó con el sistema de anotación RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) y el del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/). Como complementación a estas anotaciones, las secuencias de ADN y proteínas deducidas se analizaron de forma individual mediante el programa BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.8. Southern Blot

El ADN total y el ADN plasmídico de la cepa *L. plantarum* LL441 se digirieron con las enzimas de restricción PstI, EcoRI y HindIII (Roche, Basel, Switzerland). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,7% a 75V durante aproximadamente 120 minutos con las muestras de ADN total y plasmídico digerido y sin digerir. Tras la electroforesis, el ADN total y el ADN plasmídico se transfirieron a una membrana de

nylon (GE Heath Care Bio-Sciences, Little Chalfont, UK) por peso, empleando un protocolo estandarizado *Sambrook y colaboradores* [54] (Apéndice 5).

Como sonda se empleó una secuencia interna de 1.249 pb del gen *lanM*; este gen sigue al gen estructural de la plantaricina C y codifica el enzima encargado de las modificaciones post-traduccionales. La secuencia nucleotídica se amplificó por PCR empleando los cebadores específicos *lanMF* (5' GGGTAACACCAGAAGAACAG 3') (posiciones 11441-11463) y *lanMR* (5' TGCCCACGCTGTTGTAAAGC 3') (posiciones 12770-12690). Inicialmente, para conocer las mejores condiciones para realizar la PCR, se empleó una rampa de temperaturas de anillamiento entre 50 y 60°C. Las condiciones de amplificación seleccionadas incluyen un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de amplificación a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 45 segundos y 72°C durante 1 minuto y un último paso de extensión a 72°C durante 10 minutos.

El marcaje de la sonda con DIG, un compuesto no radioactivo, se realizó mediante PCR. En la mezcla de amplificación se emplearon 2 µl de ADN total (concentración de 139,33 ng µl⁻¹), 1 µl de la polimerasa TAQ y 5 µl del tampón MgCl₂ (ambos de Roche), 1 µl de cada uno de los cebadores (*lanMF* y *lanMR*), 5 µl de la mezcla “DIG-High Prime DNA Labelling” (Roche) y 35 µl de agua destilada. En esta reacción se genera un producto de amplificación marcado con DIG debido a que la mezcla contiene el desoxinucleótido uracilo unido a una molécula de DIG.

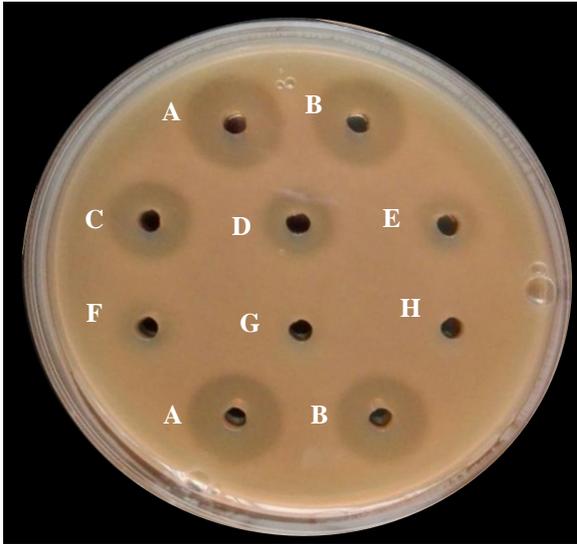
La membrana de hibridación se lavó con distintas soluciones salinas con diferentes concentraciones de tampón SSC (compuesto por 3M NaCl, 0,3M CitNa₃ a pH 7,0). La hibridación de la sonda y la detección se llevó a cabo de manera inmunológica con el kit “Detection Starter Kit II” (Roche). La sonda hibridada se detectó inmunológicamente con el anticuerpo anti-DIG-AP y se reveló con el sustrato CSPD. La desfosforilación enzimática del sustrato CSPD por medio de una fosfatasa alcalina emite luz a una longitud de onda máxima de 477 nm. La captura de esta quimioluminiscencia se realizó con el equipo “ImageQuant 350 Digital Imaging System” (GE Healthcare, Pittsburgh, EEUU).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Actividad inhibitoria de la plantaricina C

Comprobamos que la cepa *L. plantarum* LL441 continuaba produciendo la bacteriocina dado que producía un efecto inhibitorio en el crecimiento de la cepa indicadora *L. sakei* CECT 906 (Figura 12) empleando el método de difusión en placa.

1)



2)

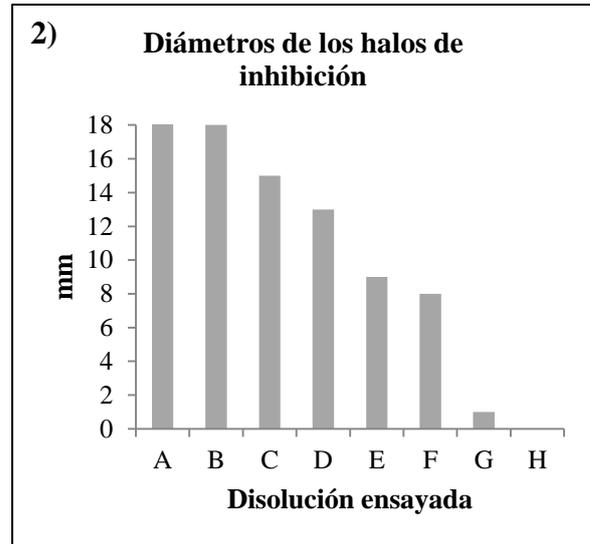


Figura 12: (1) Ensayo de difusión en placa con un inóculo de *L. sakei* 906 al 2%. (2) Histograma que representa los diámetros de los halos de inhibición en centímetros para las disoluciones ensayadas.

A: sobrenadante y B: sobrenadante neutralizado. C-H: diluciones 1:10 del sobrenadante consecutivas.

El sobrenadante del cultivo de *L. plantarum* LL441 en el que se encontraba la bacteriocina, tenía un pH inicial aproximadamente de 4,5. Este bajo pH inicial se debe a la producción de diferentes ácidos como el ácido acético y, de forma mayoritaria, el ácido láctico [55]. Es precisamente esta muestra (Figura 12.1.A) la que posee una mayor actividad inhibitoria, ya que, además de por la presencia de la bacteriocina los ácidos presentes en el sobrenadante inhiben el crecimiento de la cepa indicadora. Para evitar este posible efecto sinérgico de los ácidos orgánicos, la actividad antimicrobiana se analizó utilizando sobrenadante neutralizado. Al neutralizar con NaOH 0,1N el sobrenadante hasta un pH aproximado de 6,5, la inhibición de la cepa indicadora fue ligeramente menor a la ejercida junto con el pH ácido (Figura 12.1.B).

En lo relativo al pH, en estudios anteriores [11] se demostró que la plantaricina C es más estable en el ambiente ácido y a pH neutro (aproximadamente 6,5) que en medios alcalinos. Esta estabilidad a pH neutro es una propiedad interesante. La nisina tiene su

máxima solubilidad y estabilidad a pH 2,0, disminuyendo ambas propiedades a medida que aumenta el pH. Por ello, no se puede emplear en alimentos con poca acidez [11].

A medida que se diluyó el sobrenadante neutralizado, el halo de inhibición fue disminuyendo (*Figura 12.2*), hasta desaparecer por completo con una dilución del sobrenadante neutralizado de 1:64 (*Figura 12.1.G*). Con esta dilución, la concentración de plantaricina C es muy baja o inexistente, con lo que no se produce la inhibición del crecimiento de la cepa sensible.

4.2. Efecto de las proteasas sobre la actividad antimicrobiana.

Aunque esta caracterización ya se había llevado a cabo con anterioridad [11], realizamos un nuevo ensayo de difusión en placa para conocer el efecto de diferentes proteasas (pronasa, tripsina y proteinasa K) sobre la actividad de la plantaricina C.

Los resultados obtenidos en este trabajo se muestran en la *Figura 13*. Como puede observarse, la actividad de la bacteriocina se ve afectada en diferentes grados con las proteasas ensayadas. Empleando pronasa con una concentración de 20 mg ml⁻¹, se observó que el halo de inhibición desaparecía bruscamente en la zona próxima a esta proteasa. Con la misma concentración de tripsina el efecto observado aunque patente era menor. Por el contrario, no se observó inhibición de la actividad en el ensayo con proteinasa K.

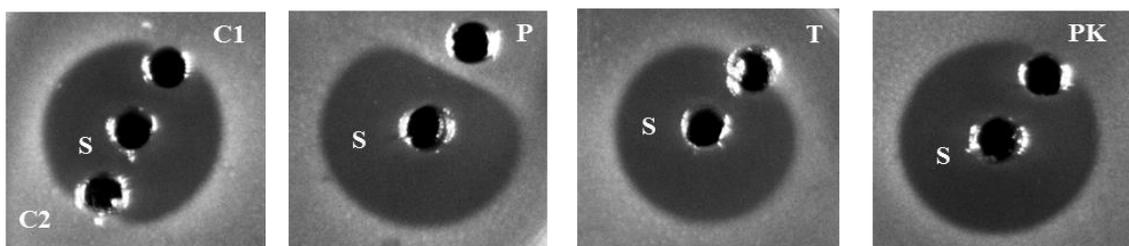


Figura 13: ensayo de difusión en placa con un inóculo de *L. sakei* CECT 906 al 1,5%. (S) sobrenadante neutralizado; (C1) control con agua; (C2) control de EDTA tetrasódico (0,2 g 100 ml⁻¹); (P) pronasa, (T) tripsina y (PK) proteinasa K, todas ellas con una concentración de 20 mg ml⁻¹.

Para solventar los posibles problemas de difusión en la placa, tanto del sobrenadante como de las proteasas, se llevó a cabo un ensayo de co-incubación. Para ello, el sobrenadante neutralizado y diferentes concentraciones de proteasas (5, 2,5, 1,25, 0,6,

0,3 y 0,15 mg ml⁻¹) se incubaron durante 30 minutos y 1 hora a la temperatura óptima de cada una de las enzima.

La pronasa inhibió el efecto de la bacteriocina en todas las concentraciones ensayadas, independientemente del tiempo de incubación, ya que en ninguno de los casos se observó inhibición en el crecimiento de *L. sakei* CECT 906 (*Figura 14.A*). La tripsina inhibió el efecto de la plantaricina C (*Figura 14.B*), aunque en menor medida que la pronasa, lo que apoyaba los datos del experimento anterior (*Figura 13*). En el primer ensayo de difusión, no se observó que la proteinasa K inhibiese la actividad de la bacteriocina. Sin embargo, tras la co-incubación sí se observó inhibición de la plantaricina C (*Figura 14.C*). Al contrario que la pronasa y la tripsina, en ninguna de las concentraciones ensayadas de la proteinasa K se inhibe por completo la actividad de la bacteriocina. A ambos tiempos de incubación se produce una disminución del diámetro del halo de inhibición desde la concentración de 5 a 1,25 mg ml⁻¹. Sin embargo, para 1 hora de incubación, el diámetro del halo es menor, siendo para la concentración de 5 mg ml⁻¹ algo más de la mitad del halo de inhibición del sobrenadante (0,7 y 1,5 cm, respectivamente) (*Figura 14.C.6*). Aunque tiene muy poco efecto, la proteinasa K es capaz de hidrolizar la bacteriocina tras prolongadas incubaciones, algo que no había sido visto con anterioridad [11].

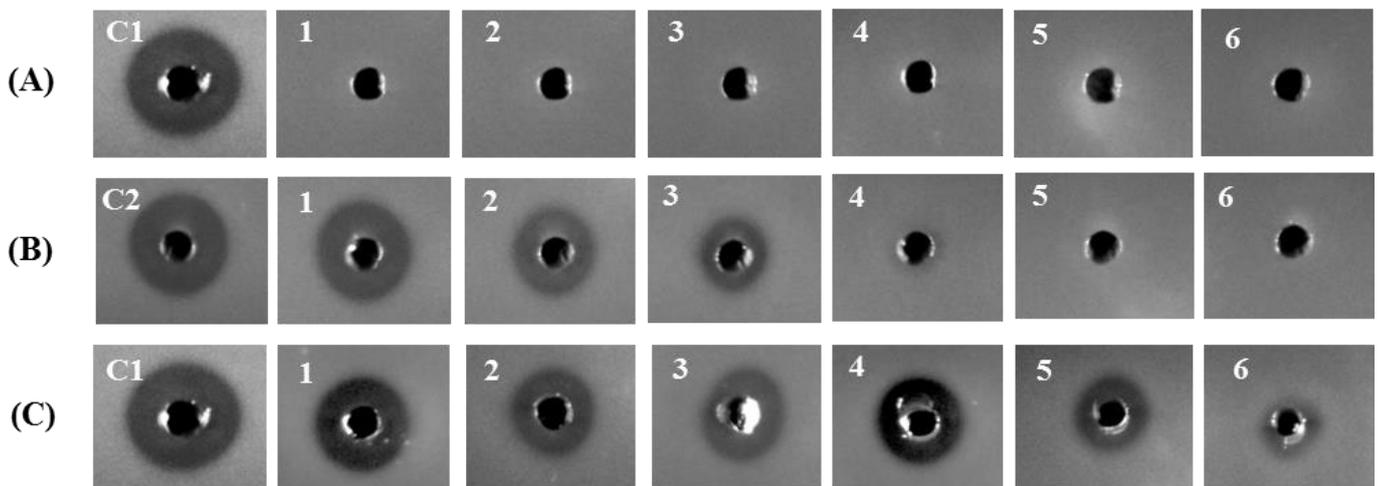


Figura 14: (A) co-incubación del sobrenadante neutralizado con concentraciones crecientes de pronasa; (B) co-incubación del sobrenadante neutralizado con concentraciones crecientes de tripsina; (C) co-incubaciones del sobrenadante neutralizado con concentraciones crecientes de proteinasa K. Con cada una de las tres proteasas se ensayaron las concentraciones (1 a 6) de 0,15, 0,3, 0,6, 1,25, 2,5 y 5 mg ml⁻¹, respectivamente. C1- co-incubación del sobrenadante neutralizado con agua y C2- co-incubación del sobrenadante neutralizado con EDTA tetrasódico (0,2 mg ml⁻¹). Todas las co-incubaciones de la imagen se realizaron durante 1 hora.

Las tres enzimas proteolíticas empleadas presentan diferentes características. La pronasa (EC 3.4.24.4) es una enzima proteolítica no específica que procede de *Streptomyces griseus*. Actúa cortando sobre la siguiente secuencia aminoacídica: aa-aa-aa-aa-H-corte-H-aa-aa-aa, siendo aa un aminoácido cualquiera y H un aminoácido hidrofóbico como alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptófano y tirosina [56].

La tripsina (EC 3.4.21.4) es una enzima peptidasa que se produce en el páncreas y es secretada en el duodeno. A diferencia de la pronasa, se trata de un enzima específico que tiene un residuo de aspartato localizado en su región catalítica cuya función es la de atraer y estabilizar lisinas y argininas produciéndose allí su corte, excepto cuando el residuo siguiente es una prolina. Además son endopeptidasas, con lo que el corte sólo tiene lugar en medio de la cadena de aminoácidos, no en las zonas terminales [57].

La proteinasa K (EC.3.4.21.14) es una proteasa altamente activa pero su especificidad es variable. Fue aislada del hongo *Tritirachium álbum* y es considerada como una proteasa selectiva de proteínas asociadas a los ácidos nucleicos. Actúa preferentemente sobre residuos de aminoácidos aromáticos alifáticos, aumentando su corte cuando en la siguiente posición se encuentra una alanina [58].

La estructura secundaria y terciaria de la plantaricina C ya había sido caracterizada en estudios previos [13] (Figura 15).

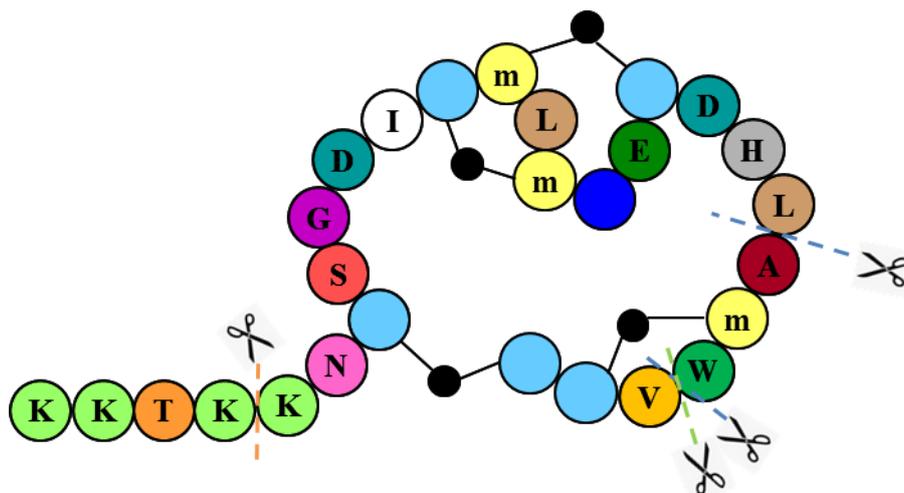


Figura 15: representación esquemática de la plantaricina C, mostrando las uniones más probables. El aminoácido modificado lantionina se muestra en color azul claro, en azul oscuro se muestra la dihidroalanina, y la posición del grupo metilo en la β -metilantionina se indica con una m (círculo amarillo) [13]. Las líneas discontinuas hacen referencia a los puntos de corte: naranja para la tripsina, verde para la proteinasa K y azul para la pronasa.

La secuencia aminoacídica de la bacteriocina sufriría una serie de modificaciones post-traduccionales dando lugar a la presencia de nueve aminoácidos modificados (cinco lantioninas, tres β -metilantioninas y una dihidroalanina). Al igual que se había comentado anteriormente para otras bacteriocinas, la plantaricina C comprende dos regiones diferenciadas: una región N-terminal lineal y una región C-terminal globular.

Según los sitios de corte de las enzimas ensayadas, suponiendo que no actúan sobre los aminoácidos modificados y en base a la estructura propuesta para la plantaricina C, se originarían diferentes cortes sobre la secuencia aminoacídica (*Figura 15*). La enzima que más cortes produciría sería la pronasa, que cortaría en la zona globular de la proteína, teniendo que superar las dificultades de acceso de la estructura secundaria y terciaria. Con los resultados obtenidos, parece que la pronasa es capaz de acceder a estos residuos y digerir sin dificultad la bacteriocina (*Figura 14.A*).

La tripsina tendría un sitio de corte en la zona lineal de la proteína (*Figura 15*). El corte entre las dos lisinas iniciales no se produciría, ya que esta enzima al ser una endopeptidasa no actúa sobre las regiones terminales. El efecto del corte de la bacteriocina sobre la zona lineal de la proteína tiene un efecto menor que el corte sobre la estructura globular, ya que el efecto sobre la degradación de la bacteriocina es menor que en el caso de la pronasa (*Figura 14.B*).

La proteinasa K tendría un único sitio de corte en una zona donde también actúa la pronasa (*Figura 15*). Esta enzima es la que menos influencia tiene en la degradación de la bacteriocina, ya que la cepa sensible logra crecer en casi todas las concentraciones ensayadas (*Figura 14.C*). Puede que en esta zona de corte la estructura de la bacteriocina dificulte el acceso del enzima y por tanto, se reduzca la actividad de la proteinasa K.

4.3. Estudio de la resistencia a antibióticos de *L. plantarum* LL441

La CIM de la cepa *L. plantarum* LL441 para 16 agentes antimicrobianos diferentes se determinó por el método de microdilución en placa microtituladora (VetMICTM).

La CIM de *L. plantarum* LL441 para 13 de los antibióticos ensayados (gentamicina, estreptomycin, neomicina, eritromicina, clindamicina, cloranfenicol, ampicilina, penicilina, virginiamicina, linezolid, trimezoprima, ciprofloxacina, y rifampicina) fue

inferior a $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Tabla 3). Para estos antibióticos, los valores de CIM se encontraban por debajo del punto de corte microbiológico establecido por la EFSA [33]. Estos valores de cortes microbiológicos para los distintos agentes antimicrobianos permiten diferenciar a los microorganismos en dos grupos: resistentes, si su CIM es superior al límite establecido, y susceptibles, si su CIM es menor al límite [59]. Tras la comparación con los datos de la EFSA y los valores de CIM descritos en otros trabajos de investigación, podemos concluir que la cepa *L. plantarum* LL441 es susceptible a los 13 antibióticos mencionados.

Tabla 3: valores de CIM ($\mu\text{g ml}^{-1}$) para la cepa *L. plantarum* LL441 y valores de punto de corte microbiológico establecidos por la EFSA [59].

Agente antimicrobiano	CIM ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	
	LL441	EFSA [59]
Gentamicina	0,4	16
Kanamicina	8	64
Estreptomicina	2	n.r
Neomicina	0,5	-
Tetraciclina	16	32
Eritromicina	0,06	1
Clindamicina	0,5	2
Cloranfenicol	2	8
Ampicilina	2	2
Penicilina	1	-
Vancomicina	128	n.r.
Virginiamicina	2	-
Linezolida	1	-
Trimezoprima	0,12	-
Ciprofloxacina	4	-
Rifampicina	0,5	-

n.r.; no requerido; (-); no hay datos

Dado que en la anotación del RAST se encontraron diversos genes que se consideraban como posibles determinantes de resistencia para el antibiótico tetraciclina y que la CIM de este antibiótico estaba muy próxima al punto de corte microbiológico propuesto por la EFSA, se realizó un nuevo ensayo con un rango de concentraciones mayor que el del kit comercial VetMICTM para verificar el resultado. Sin embargo, el valor de CIM que obtuvimos en este caso fue idéntico. Concluimos, por tanto, que la cepa LL441 era susceptible a tetraciclina y los genes relacionados con la resistencia a este antibiótico codifican seguramente factores de elongación y otras proteínas que

interactúan con el ribosoma y que, por este motivo, guardan homología estructural con las proteínas de resistencia a tetraciclina de protección ribosomal.

La cepa *L. plantarum* L441 fue capaz de crecer a la máxima concentración de vancomicina ensayada, y por ello su CIM es $> 128 \mu\text{g ml}^{-1}$. La vancomicina es un glicopéptido que actúa inhibiendo la síntesis de peptidoglicano, y con ello, la síntesis de la pared celular bacteriana. Afecta principalmente a microorganismos Gram positivos y actúa uniéndose al fragmento D-Alanina-D-Alanina que es el precursor final para la síntesis del peptidoglicano. Sin embargo, en la especie *L. plantarum* el precursor final para la síntesis del peptidoglicano es la D-Alanina-D-Lactato. Por tanto, la vancomicina no tiene diana celular sobre la que actuar y no se inhibe la síntesis de la pared celular [60]. La resistencia inherente a un género o especie se denomina resistencia intrínseca. Este tipo de resistencia no es transmisible por ello, la cepa *L. plantarum* LL441 resistente a vancomicina puede usarse en la industria alimentaria ya que esta resistencia no supone un riesgo desde el punto de vista de la salud.

4.4. Caracterización del locus de la plantaricina C

Tras la secuenciación genómica y el ensamblaje de las lecturas se obtuvieron 170 “contigs” con tamaños comprendidos entre las 201 y 116.756 kpb. El genoma de *L. plantarum* LL441 incluyó un total de 3.167.386 pb con un porcentaje de GC del 44,42% [15]. El servidor RAST identificó y anotó 2.917 genes. El gen estructural que codifica la bacteriocina se encontró en un segmento de 18.828 pb (Figura 16).

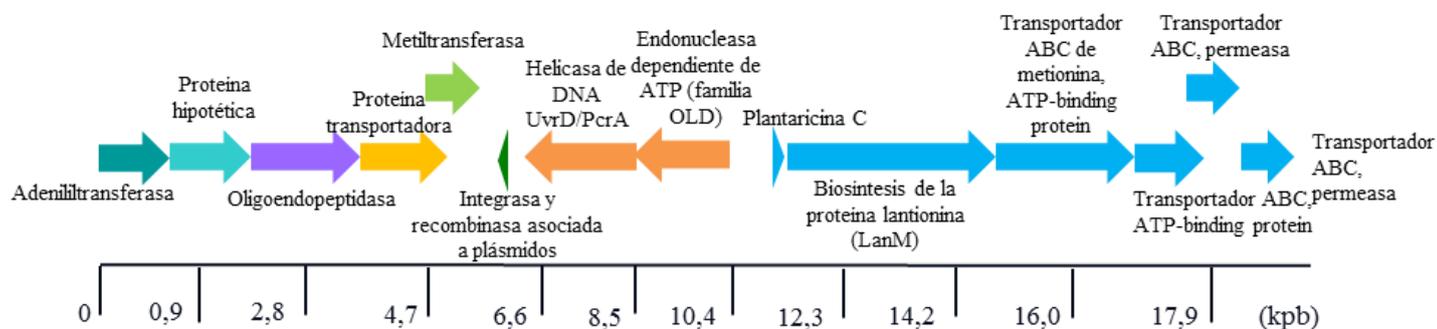


Figura 16: representación esquemática del locus de la plantaricina C, indicando la orientación y tamaños de las orfs y la homología de las proteínas codificadas.

El operón génico implicado en la codificación, modificación y transporte de la plantaricina C tiene un tamaño aproximado de 7,8 kpb. Esta región, presenta una identidad nucleotídica del 91% con una parte del plásmido pPECL-6 de *Pediococcus clausсенii* ATCC BAA-344 [61], aunque la producción de bacteriocina en esta cepa no está descrita. En BAA-344, la región génica aparece flanqueada por secuencias de inserción, lo que sugiere una adquisición horizontal [15].

En *L. plantarum* LL441, el locus de la plantaricina C parece que está compuesto por seis pautas abiertas de lectura (*orfs*) en un único operón (en azul en la Figura 16). El primer gen codifica para la proteína estructural de la plantaricina C, un péptido formado por los siguientes 58 aminoácidos:

MKKNLMNSAEESGNVLEELNNAQLGMISGGKKTCKNSSGDICTLTSECDHLATWVCC

De ellos, los 31 primeros (en azul) forman el péptido señal de secreción, que tiene una longitud semejante a otros péptidos líder [25]. Los otros 27 aminoácidos (en verde), tal y como se demostró con la secuenciación N-terminal de la bacteriocina purificada [11], dan lugar a la forma procesada y activa de la bacteriocina.

Tanto la propia bacteriocina como el péptido señal de la bacteriocina parecen ser muy específicos, ya que no presentan homología con regiones similares de otras proteínas, a excepción de las que se codifican en el plásmido citado anteriormente. El motivo GG antes del punto de corte es característico de muchas bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas, así como de proteínas de diversos sistemas de señalización celular [15].

Tras el gen estructural aparece un gen de 3 kpb de tamaño. Este gen codifica para la enzima LanM, característica de los lantibióticos de clase II-A, la cual lleva a cabo las modificaciones post-traduccionales de la plantaricina C, para dar lugar a los aminoácidos Lan, MeLan y Dha [28].

Las bacteriocinas se sintetizan como péptidos inactivos, para que las propias bacterias productoras sean inmunes. Existen dos mecanismos para lograr esta inmunidad: por medio de una proteína (LanI) o a través de transportadores ABC, las cuales pueden ser codificadas en dos o tres *orfs* separadas [25]. En el locus de la plantaricina C aparecen cuatro genes que codifican componentes de este tipo de transportadores (Figura 16). También aparecen este tipo de proteínas en los locus de

otras bacteriocinas como la nisina, epidermina, lacticina 481 y mersacidina [25]. En estos casos, el dominio ABC intracelular es codificado por el gen *lanF*, mientras que otros dos genes (*lanE* y *lanG*) codifican el resto de subunidades.

4.5. Optimización de la extracción de ADN plasmídico de *L. plantarum* LL441.

La extracción de ADN plasmídico de la cepa *L. plantarum* LL441 se llevó a cabo con tres protocolos diferentes para conocer con cuál de ellos se obtenía el mejor perfil plasmídico. Además, con cada uno de ellos, se ensayaron diferentes medios de cultivo líquidos (MRS, MRS suplementado con treonina 40 mM o MRS suplementado con glicina al 1%).

Con ninguno de los tres métodos de extracción ensayados se observaron diferencias en los perfiles plasmídicos. Los mejores resultados se obtuvieron con el método desarrollado por *O'Sullivan y Klaenmhammer* [52] empleando las soluciones de desnaturalización y neutralización del kit comercial “Plasmid Mini Kit” (Quiagen).

En la *Figura 17*, se observan los perfiles de ADN plasmídico que se obtuvieron con el método mencionado anteriormente, tanto sin digerir (1) como digerido con las enzimas de restricción *Pst*I, *Eco*RI y *Hind*III.

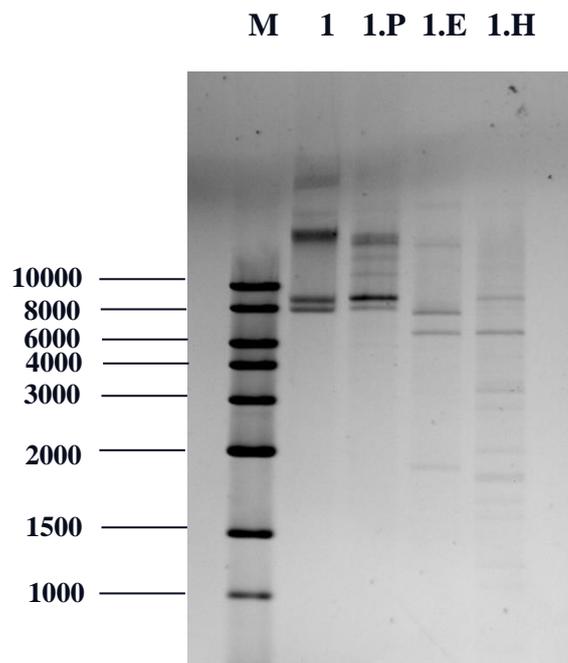
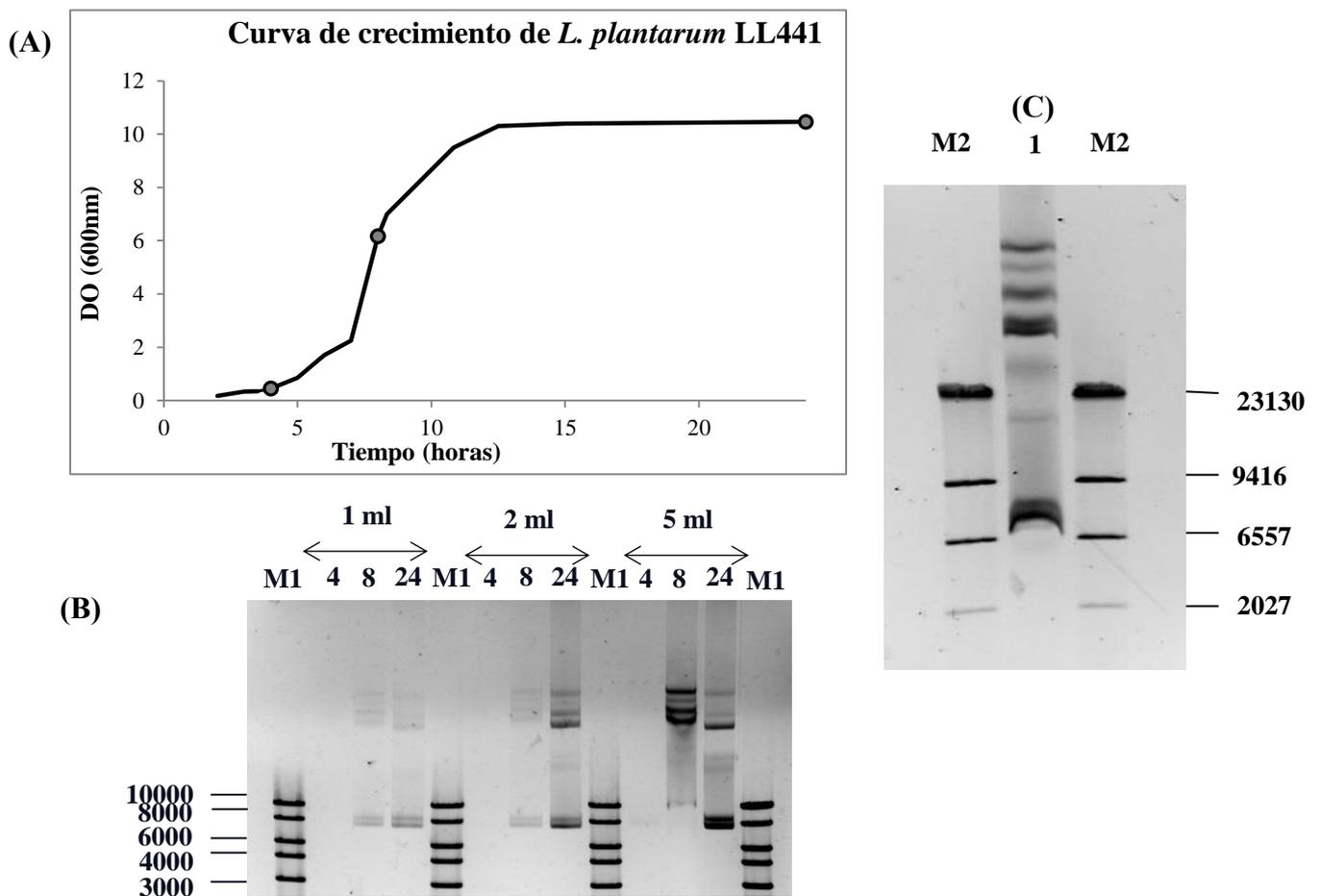


Figura 17: resultado de la digestión de la extracción plasmídica con enzimas de restricción. (M) marcador A (Grisp, GRS Lodder 100 pb), (1, 1.P, 1.E y 1.H) ADN plasmídico sin digerir, digerido con *Pst*I, con *Eco*RI y *Hind*III, respectivamente.

En la muestra sin digerir se pueden contemplar cuatro o cinco bandas plasmídicas; estas pueden corresponder a un número idéntico de plásmidos, aunque algunas pueden ser formas estructurales distintas (superenrollada, circular cerrada o lineal) de una misma molécula. Puesto que el número de copias de los plásmidos puede ser diferente en las distintas fases de crecimiento celular, se optimizó el método de extracción tomando diferentes volúmenes de medio de cultivo (1, 2 y 5 ml) a distintos tiempos de incubación (4, 8 y 24 horas). Para llevar a cabo la optimización del aislamiento se tuvo que determinar primeramente la curva de crecimiento de la cepa.

Se observaron diferencias entre los volúmenes y tiempos de incubación ensayados (Figura 18).



En la curva de crecimiento de *L. plantarum* LL441 (*Figura 18.A*), se puede observar que a las 4 horas el cultivo se encuentra en el final de la fase de latencia. En esta fase apenas hay incremento en el número de células pero hay una gran actividad metabólica. Puesto que el número de células es relativamente bajo a las 4 horas, no se logró extraer una cantidad suficiente de ADN plasmídico con ninguno de los volúmenes ensayados (*Figura 18.B*).

A las 8 horas de incubación, *L. plantarum* LL441 se encuentra en una fase de crecimiento exponencial (*Figura 18.A*). En esta etapa cada vez que pasa un tiempo de generación la población se duplica. Con todos los volúmenes ensayados se logró extraer ADN plasmídico, obteniéndose el mismo perfil en todos los casos, aunque con mayor intensidad a mayor volumen de cultivo empleado (*Figura 18.B*).

Tras 24 horas de incubación, el cultivo se encontraba en la fase estacionaria de crecimiento. En esta etapa aparecen limitaciones del crecimiento que pueden surgir por diferentes motivos como el agotamiento de algún nutriente esencial, la acumulación de productos tóxicos, porque se alcance un número de células elevado para el espacio disponible o por una combinación de las causas anteriores. Para este tiempo de incubación se logró extraer ADN plasmídico con todos los volúmenes ensayados, obteniéndose en todos los casos el mismo perfil plasmídico, aunque con una mayor intensidad para los volúmenes de 2 y 5 ml de cultivo (*Figura 18.B*).

Resaltar que no se observaron diferencias en el número de bandas obtenidas a las 8 y 24 horas de incubación, es decir, no se detectaron diferencias entre la fase exponencial y estacionaria. Por tanto, los plásmidos que contiene la cepa *L. plantarum* LL441 se están replicando al mismo nivel en ambas etapas del crecimiento (metabolismo primario y secundario).

En la *Figura 18.C* se puede observar el perfil plasmídico de la cepa *L. plantarum* LL441, distinguiéndose aproximadamente 9 bandas diferentes. Puesto que los plásmidos pueden encontrarse en diferentes conformaciones, de manera superenrollada, circular relajada y lineal, el número de plásmidos estimados es de entre 4 y 7. El análisis posterior del genoma de LL441 permitió detectar la presencia de cuatro genes que codifican para proteínas de replicación plasmídica, de manera que este es posiblemente el número de plásmidos distintos de la cepa.

En diversos estudios llevados a cabo con la especie *L. plantarum* se ha observado que de manera habitual contiene un número variable de plásmidos. El perfil plasmídico obtenido (*Figura 18*) muestra que 5 de las bandas obtenidas tienen un tamaño superior a 23,13 kpb y las otras 2 bandas tienen un tamaño aproximado de 20,0 y 7,0 kpb, aproximadamente. *Mourad y colaboradores* [38] observaron que en 9 de las 12 cepas de *L. plantarum* analizadas había de una a tres bandas de plásmidos, con tamaños entre 5,4 a 12,2, kpb. En estudios previos llevados a cabo por *Xanthopoulos y colaboradores* [62] también se observaron diferentes plásmidos en cepas de *L. plantarum* aisladas a partir de queso Feta y *Ruiz-Barba y colaboradores* [63] observaron que cepas de *L. plantarum* presentes en fermentaciones de aceitunas, presentaban de 5 a 16 bandas plasmídicas, con tamaños comprendidos entre las 2,0 y las 68 kpb.

4.6. Localización cromosómica de la plantaricina C

La primera aproximación para conocer la localización del gen de la plantaricina C se realizó por medio de un análisis de las secuencias de *L. plantarum* LL441 a través del programa PLACNET empleando el software Cytoscape. El programa PLACNET busca homologías entre las secuencias obtenidas de la secuenciación masiva, diferenciando el *core* o núcleo cromosómico de las secuencias que pueden encontrarse en plásmidos, mientras que el software Cytoscape permite observar gráficamente el análisis realizado.

Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 19*. Al introducir todos los datos disponibles en el programa se obtuvo la imagen que se muestra en la *Figura 19.A*. Para poder desgranar las secuencias ensambladas y relacionarlas más claramente unas con otras, se eliminaron aquellos fragmentos que mostraron un tamaño inferior a 500 pb. Una vez tratados los datos y separados los distintos fragmentos en función de las uniones que mostraban con otro se obtuvo la *Figura 19.B*.

A través del tratamiento con PLACNET y Cytoscape, se observó que tanto la región que codifica para la bacteriocina como las regiones con las que está unida están relacionadas con secuencias contenidas en varios plásmidos: el citado pPECL-6 y pPECL-5 de *P. claussenii* [61] y LBPP4 de *L. plantarum* subsp. *plantarum* P-8 [64].

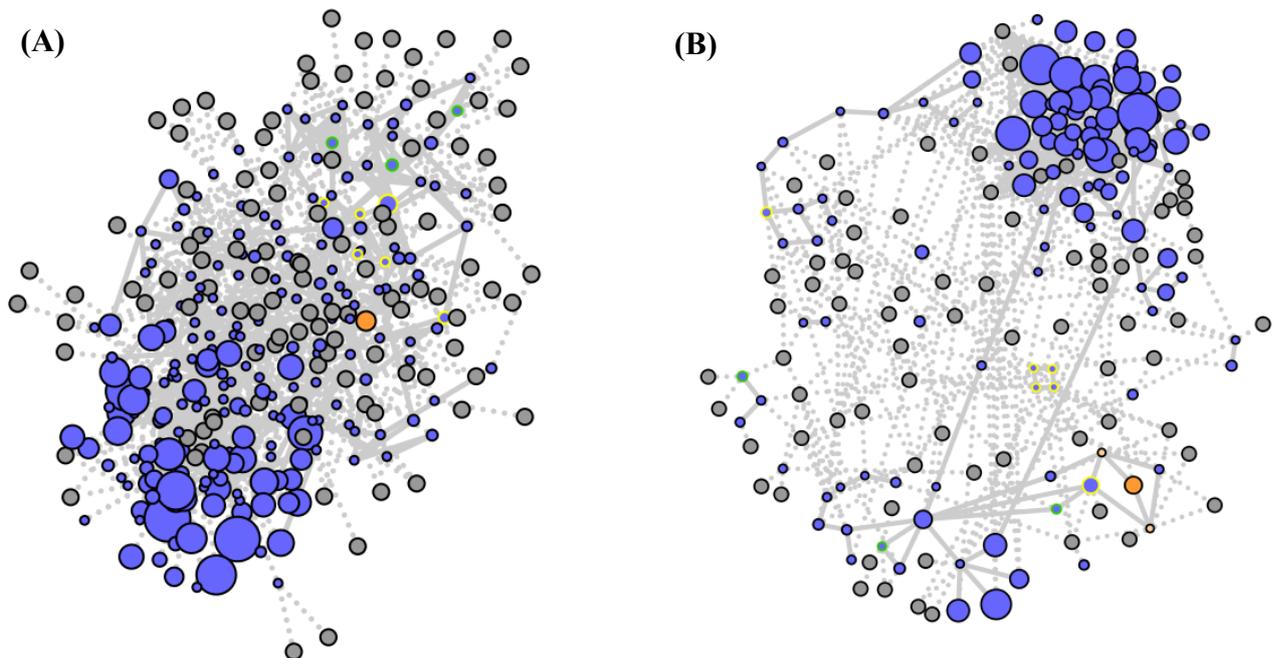


Figura 19: imágenes obtenidas en el programa Cytoscape (A) con todos los ensamblajes obtenidos y (B) tras tratar los datos. En naranja se muestra el ensamblaje en el que se encuentra la región que codifica la plantaricina C. En amarillo se muestran las relasasas y en verde las proteínas de replicación.

Para confirmar la localización plasmídica del gen según sugería el programa PLACNET, se realizó un análisis Southern. Para ello se partió de una muestra de ADN total y de ADN plasmídico de la cepa, ambas sin digerir y digeridas con los enzimas de restricción PstI, EcoRI y HindIII y posteriormente se realizó una hibridación con una sonda marcada con digoxigenina que incluía una secuencia interna del gen *lanM*.

Tras la hibridación de la sonda y la detección se obtuvo la imagen que se muestra en la Figura 20. Se observó que la hibridación de la sonda tuvo lugar en la muestra de ADN plasmídico de *L. plantarum* LL441, tanto la que fue digerida como la que no (Figura 20 U', 4, 5 y 6). Por tanto, el gen que codifica para la bacteriocina se encuentra en uno de los plásmidos que contiene *L. plantarum* LL441.

En la muestra de ADN sin digerir (Figura 20.U') se puede observar que la sonda hibridó en una banda con tamaño aproximado de 23 kpb y en otra que tiene un tamaño superior, en la cual la intensidad es mayor. El resto de la hibridación que aparece en la parte superior de esta última banda puede deberse a restos que aparecen en la calle del gel. En cuanto a la digestión con enzimas de restricción, se puede observar que con el enzima PstI sólo se produce hibridación en una banda con un tamaño menor de 23 kpb

(Figura 20.4). Con la enzima EcoRI, se observan dos bandas con un tamaño inferior a 2 kpb (Figura 20.5). La digestión con el enzima HindIII dio como resultado dos bandas, una con un tamaño aproximado de 6 kpb y otra más pequeña de menos de 2 kpb (Figura 20.6). El análisis *in silico* del “contigo” en el que se encuentra el cluster de la bacteriocina confirmó los resultados de la hibridación con EcoRI y HindIII.

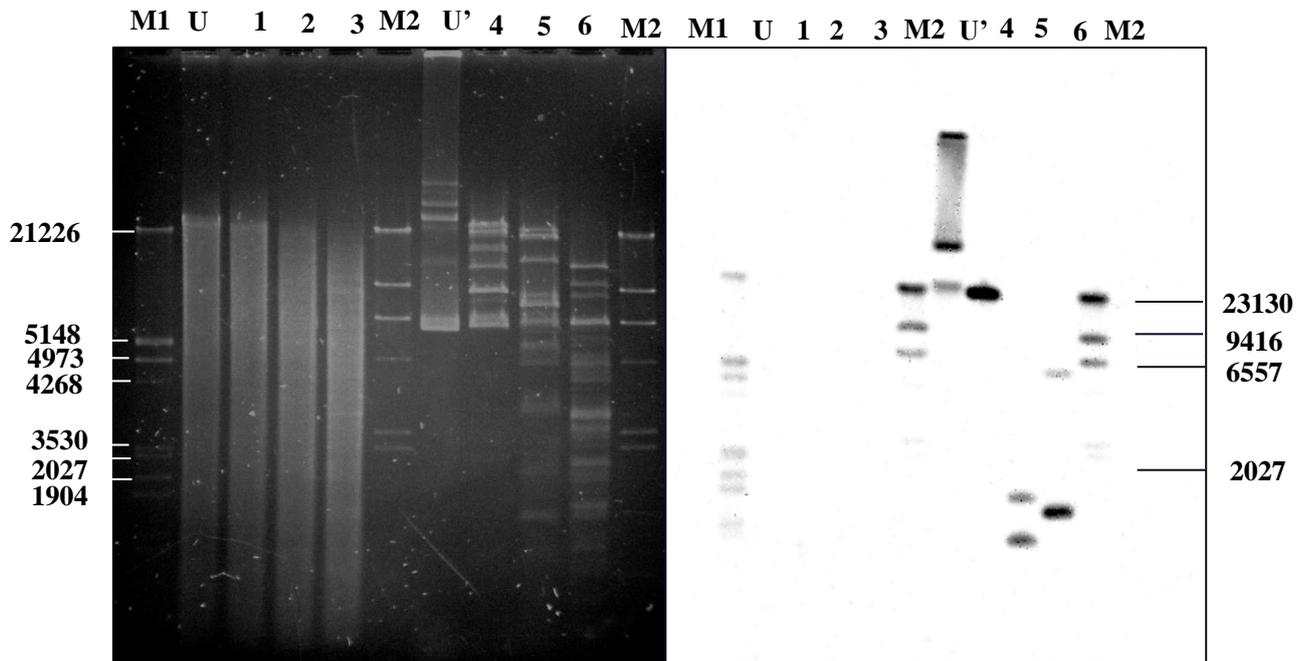


Figura 20: resultado del Southern Blot. (U, 1, 2 y 3) ADN cromosómico sin digerir, digerido con PstI, EcoRI y HindIII, respectivamente. (U', 4, 5 y 6) ADN plasmídico sin digerir, digerido con PstI, EcoRI y HindIII, respectivamente. (M1) marcador DNA Molecular Weight Marker III y (M2) marcador λ HindIII DIG 0,12-21,2 kbp.

Se han descrito diferentes cepas de *L. plantarum* que producen bacteriocinas cuyos genes se encuentran en plásmidos. *van Reenen y colaboradores* [65] observaron que la bacteriocina 423 producida por la cepa *L. plantarum* 423 se encontraba codificada en un plásmido que tenía un tamaño aproximado de 6 kpb. *Kanatani y colaboradores* [66] detectaron que la cepa *L. plantarum* LTF154 contenía 3 plásmidos diferentes pLP1541, pLP1542 y pLP1543, de 2,8, 9,5 y 40 kpb, respectivamente, encontrándose la bacteriocina codificada en un gen del plásmido de mayor tamaño pLP1542.

5. CONCLUSIONES

1

Los análisis fenotípicos iniciales permitieron corroborar que la cepa de trabajo era *L. plantarum* LL441. Esta cepa continúa produciendo la bacteriocina, plantaricina C, de manera estable desde que fue aislada por primera vez.

2

La plantaricina C se encuentra en un locus que está formado, además de por el gen que codifica para la proteína estructural, por el gen que codifica la enzima LanM, responsable de las diferentes modificaciones post-traduccionales a las que son sometidas los lantibióticos de clase A-II y por 4 genes que codifican componentes de transportadores ABC que estarán involucrados en la exportación y/o inmunidad a la bacteriocina.

3

La plantaricina C se encuentra en una región codificada en un plásmido de los 4-6 que contiene la cepa *L. plantarum* LL441.

6. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP	Alcalina fosfatasa
ARN	Ácido ribonucleico
β	Beta
BAL	Bacterias del Ácido Láctico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
°C	Grados Celsius
C	Citosina
CE	Conformité Européenne
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CO₂	Dióxido de carbono
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1]decan}-4-yl)phenyl phosphate
Dha	2,3-didehidroalanina
Dhb	Z-2,3-didehidrobutirina
DIG	Digoxigenina
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
DO	Densidad Óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EFSA	European Food Safety Authority
etc.	Etcétera
EEUU	Estados Unidos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Food and Drug Administration
G	Guanina
GRAS	Generally Recognized As Safe
H₂O	Agua
IPLA	Instituto de Productos Lácteos de Asturias
kDa	Kilodalton
kpb	Kilo pares de bases
Lan	Lantionina

LSM	Lactic acid bacterium Susceptibility test Medium
M	Molar
MEB	Microscopio electrónico de barrido
MeLan	β -metilantionina
Mg²⁺	Catión magnesio
mg	Miligramos
μg	Microgramos
μl	Microlitros
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros
<i>orf</i>	Marco abierto de lectura (Open Reading Frame)
PLACNET	Plasmid Constellation Networks
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrogeniones
QPS	Qualified Presumption of Safety
RAST	Rapid Annotation using Subsystem Technology
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	ARN ribosomal
subsp.	Subespecie
T	Timina
TGI	Tracto gastrointestinal
tRNA	ARN de transferencia
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta
V	Voltios

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **Shirai Matsumoto K., Mlalpica Sánchez F.P.** 2013. Manual de prácticas de laboratorio de tecnología de fermentaciones alimentarias. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
2. **Herrero M., Mayo B. González B., J.E. Suárez.** 1996. Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, **81**, 565-570.
3. Página web de Probiosearch S.L. Consultada el 8 de junio de 2016. Disponible en: <http://www.probiosearch.com>.
4. Página web de la Fundación Española del Corazón. Consultada el 7 de junio de 2016. Disponible en: <http://www.fundaciondelcorazon.com/nutricion>.
5. **Pérez Cabrejas D., Sánchez Paniagua L.** 2003. Leches fermentadas: aspectos nutritivos, tecnológicos y probióticos más relevantes. Agencia Aragonesa de Seguridad Alimentaria.
6. **Durán L.** 2001. Aditivos naturales. *Abor CLXVIII*. **661**, 87-107.
7. **Diario Oficial de la Unión Europea L 354/16.** 16 de diciembre de 2008. Reglamento (CE) N° 1333/2008 del parlamento europeo y del consejo. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2008/354/L00016-00033.pdf>.
8. **Pineda D.** 2000. Bioconservación de los alimentos. Dirección de Innovación y Desarrollo Tecnológico. Ministerio de Economía de El Salvador.
9. **Herrero Sánchez M.E.** 2013. Evolución de bacteriófagos y bacteriocinas para la eliminación de *Listeria monocytogenes*. Trabajo de Fin de Máster en Biotecnología Alimentaria. Universidad de Oviedo.
10. **Zottola E.A., Yezzi T.L., Ajao D.B., Roberts R.F:** 1994. Utilization of Cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. *International Journal of Food Microbiology*, **1-2**, 227-238.
11. **González B., Arca P., Mayo B., Suárez J.E.** 1994. Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Applied and Environmental Microbiology*. **60(6)**, 2158-2163.
12. **Gonzalez, B., E. Glaasker, E. Kunji, A. Driessen, J. E. Suarez, W. N. Konings,** 1996. Bactericidal mode of action of plantaricin C. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2701-2709.

13. **Turner, D. L., L. Brennan, H. E. Meyer, C. Lohaus, C. Siethoff, H. S. Costa, B. González, H. Santos, J.E. Suárez.** 1999. Solution structure of plantaricin C, a novel lantibiotic. *European Journal of Biochemistry* **264**, 833-839.
14. **Bárcena, J.M., F. Siñeriz, D. González de Llano, A. Rodríguez, J.E. Suárez.** 1998. Chemostat production of plantaricin C by *Lactobacillus plantarum* LL441. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3512-3514.
15. **Mayo B., Suárez E., Delgado S. Guadamuro L. A.B. Flórez.** Secuencia y análisis del locus de la plantaricina C, lantibiótico producido por *Lactobacillus plantarum* LL441. XIX Congreso SEM Microbiología de los Alimentos.
16. **Cleveland J., Montville T.J., Ness I.F., Chikindas M.L.** 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, **71**, 1-20.
17. **Jacob F., Siminovitch J., Wollman E.** 1952. Sur la biosynthese d'une colicine et sur son mode d'action. *Annales de l'Institut Pasteur*, **83**, 295-315.
18. **Daw M.A., Falkier F.R.** 1996. Bacteriocins: nature function and structure. *Micron*, **27(6)**, 467-479.
19. **Dobson A., Cotter P.D., Ross R.P., Hill C.** 2011. Bacteriocin production: a probiotic trait?. *Applied and Environmental Microbiology*. 1-6.
20. **Svetoch E.A., Eruslanov B.V., Perelygin V.V., Mitsevich E.V., Mitsevich I.P., Borzenkov V.N., Levchuck V.P., Svetoch O.E., Kovalev Y.N., Stepanshin Y.G., Sirasuga G.R., Seal B.S., Stern N.J.** 2008. Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 bacteriocin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56(6)**, 1942-1948.
21. **Cotter P.D., Hill C., Ross R.P.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 777-788.
22. **Monroy Costa M.C., Castro Barrera T., Fernández Perrino F.J., Mayorga Reyes L.** 2009. Revisión bibliográfica: bacteriocinas producidas por bacterias probióticas, *ContactoS*, **73**, 63-72.
23. **Yusuf M.A.** 2013. Lactic acid bacteria: bacteriocin producer: a mini review. *IOSR Journal of Pharmacy*, **3(4)**, 44-50.
24. **Reviriego Herráez C.** 2009. *Lactococcus lactis* productores de pediocina PA-1 y *Enterococcus* aislados de leche materna como agentes bioconservantes en quesos. Tesis Doctoral. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid.

25. **Willey J.M., van der Donk A.** 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annual Review Microbiology*, **61**, 477-501.
26. **Beristain-Bauza S.C., Palou E., López Malo A.** 2012. Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, **6(2)**, 64-78.
27. **McAuliffe O., Ross R.P., Hill C.** 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEM Microbiology Reviews*, **25**, 285-308.
28. **Asaduzzaman S.M., Al-Mahin A., Bashar T., Noor R.** 2011. Lantibiotics: a candidate for future generation of antibiotic. *Standford Journal of Microbiology*, **1(1)**, 1-12.
29. **Suárez de Gea A.M.** 1997. Producción de anticuerpos frente a la nisina A: estrategias de inmunización y desarrollo de inmunoensayos. Tesis Doctoral. Departamento de Nutrición y Bromatología (Higiene y Tecnología de los Alimentos). Universidad Complutense de Madrid.
30. **Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U.** 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **73**, 366-373.
31. **Kandler O., Weiss N.** 1896. Bergey's manual of systematic bacteriology. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt (Eds). Volumen 2, Baltimore: Williams and Wilkins, 1209-1234.
32. **Salminen S., von Wright A., Morellii L., Marteau P., Brassart D., de Vos W.M., Fondén R., Saxelin M., Birkeland S., Mattila-Sandholm T.** 1998. Demonstration of safety of probiotics, a review. *International Journal of Food Microbiology*, **44**, 1-2-, 93-106.
33. **EFSA.** 2007. *EFSA Journal*, **314**:1-16.
34. **Plumed-Ferrer C.** 2007. *Lactobacillus plantarum* from application to protein expression. Doctoral Dissertation. Department of Biosciences, Applied Biotechnology, Nutrition and Food Biotechnology. University of Kuopio.
35. **Nissen L., Chingwaru W., Sgorbati B., Biavati B., Cencic A.** 2009. Gut health promoting activity of new putative probiotic/protective *Lactobacillus* spp. strains: a functional study in the small intestinal cell model. *International Journal of Food Microbiology*, **135(3)**, 288-294.
36. **Bron P.A., Marco M., Hoffer S.M., van Mullekom E., de Vos W.M., M. Kleerebezem.** 2004. Genetic characterization of the bile salt response in

- Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters *in vitro* and *in situ* in the gastrointestinal tract. *Journal of Bacteriology*, **186(23)**, 7829-7835.
37. **Maldonado R., Llanca L.** 2007. Efecto de la incorporación de la nisina sobre la supervivencia del *Staphylococcus aureus* en queso de mano. *Revista de la Facultad de Agronomía*, **33**, 147-163.
38. **Mourad K.** 2007. Plasmid DNA studies in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from olive fermentations: production of and immunity to plantaricin OL15 is associated to a 9,6 kpb plasmid pOL15. *Grasas y aceites*, **58(2)**, 136-141.
39. **Soomro A.H., Masud T., Anwaar K.** 2002. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health: a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, **1(1)**, 20.14.
40. **Pérez R.H., Zendo T., Sonomoto K.** 2014. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, **13(1)**, 1-13.
41. **Beshkova D., Fregova G.** 2002. Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*, **12(4)**, 419.-432.
42. **Parada J.L., Ricoy Caron C., Medeiros A.B.P., Soccol C.R.** 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **50(3)**, 521-542.
43. **Huys G., D'Haene K., Cnockaert M., Tosi L., Danielse M., Flórez A.B., Mättö J., Axelsson L., Korhoen J., Mayrhofer S., Egervärn M., Giacomini M., Vandamme P.** 2012. Intra- and interlaboratory performances of two commercial antimicrobial susceptibility test methods for *bifidobacterias* and *nonenterococcal* lactic acid bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54(6)**, 2567-2574.
44. **Rodicio M.R.** 2015-2016. Técnicas moleculares en biotecnología y seguridad alimentaria. Tema 4: genómica y metagenómica. Aplicaciones en biotecnología y seguridad alimentaria. Máster en Biotecnología Alimentaria. Universidad de Oviedo.
45. Página web de RAST. Disponible en: <http://rast.nmpdr.org/>. Consultada el 8 de junio de 2016.
46. Página web de BLAST. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Consultada el 8 de junio de 2016.

47. **Lanza V.F., del Toro N., Garcillán-Barcia M.P., Mora A., Blanco J. Coque T.M.** 2014. Plasmid flux in *Escherichia coli* ST131 sublineages, analyzed by plasmid constellation network (PLACNET), a new method for plasmid reconstruction from whole genome sequences. *PLOS Genetics*, **10(12)**, 1-21.
48. Página web de Cytoscape. Disponible en: <http://www.cytoscape.org/>. Consultada el 8 de junio de 2016.
49. **Fernández Lanza V., Tedim A.P., Martínez J.L., Baquero F., Coque T.M.** 2015. The plasmidome of *Firmicutes*: impact on the emergence and the spread of resistance to antimicrobials. *Microbiology Spectrum*, **3(2)**, 1-37.
50. **Tamay de Dios L., Ibarra C., Velasquillo C.** 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* **2(2)**, 70-78.
51. **Prescott, Harley.** *Klein's Microbiology*. Wiley, Sherwood y Woolverton. Eds 7th. Ed. McGraw.
52. **O'Sullivan D.J., Klaenhammer T.R.** 1993. Rapid mini-prep isolation of high quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, **59(8)**, 2730-2733.
53. **Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulkov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribitcki A.D., Sirotkin A.V., Vyahhni N., Tesler G., Aleseyev M.A., Pevzner P.A.** 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to singlecell sequencing. *Journal of Computational Biology*, **19**, 455-477.
54. **Sambrook J., Russell D.W.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
55. **Estela W., Rychtera M., Melzoch K., Quillama E., Egoavil E.** 2007. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos en batch y en continuo. *Revista Peruana de Biología*, **14(2)**, 271-275.
56. Página web de Sigma-Aldrich. Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/>. Consultada el 31 de mayo de 2016.
57. Página web de Merck. Disponible en: <http://www.merckmillipore.com/>. Consultada el 31 de mayo de 2016.
58. Página web de Probiotek. Disponible en <http://www.probiotek.com/>. Consultada el 31 de mayo de 2016.

59. **European Food Safety Authority (EFSA)**. 2012. Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, **10**, 2740-2750.
60. **Deghorain M., Goffin P., Fontaine L., Mainardi J.L., Daniel R., Errington J., Hallet B., Hols P.** 2007. Selectivity for D-lactate incorporation into the peptidoglycan precursor of *Lactobacillus plantarum*: role of add a VanX-like D-Alanyl-D-Alanine dipeptidase. *Journal of Bacteriology*, **189(1)**, 4332-4337.
61. **Pittet V., Abegunde T., Marfleet T., Haakensen M., Morrow K., Jayaprakash T., Schroeder K., Trost B., Byrns S., Bergsveinson J., Kusalik A., Ziola B.** 2012. Complete genome sequence of the beer spoilage organism *Pediococcus claussenii* ATCC BAA-344T. *Journal of Bacteriology*, **194(5)**, 1271-1272.
62. **Xanthopoulos V., Hatikamari M., Adamidis T., Tsakalidou E., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E.** 2000. Heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* isolates from Feta cheese throughout ripening. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 1056-1064.
63. **Ruiz-Barba J.L., Piard J.C., Jimenez-Díaz R.** 1991. Plasmid profiles and curing of plasmids in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, **71**, 417-421.
64. **Zhang W., Sun Z., Bilige M., Zhang H.** 2015. Complete genome sequence of probiotic *Lactobacillus plantarum* P-8 with antibacterial activity. *Journal of Biotechnology*, **193**, 41-42.
65. **van Reenen C.A., Dicks L.M.T., Chikindas M.L.** 1998. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, **84**, 1131-1137.
66. **Kanatani K., Oshimura M.** 1994. Plasmid-associated bacteriocin production by a *lactobacillus plantarum* strain. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **58(11)**, 2084-2086.

8. APÉNDICES

8.1. Apéndice 1

Protocolo de extracción de ADN total empleando el kit DNeasy[®] Blood and Tissue de Quiagen

- Composición del tampón enzimático de lisis
 - 20 mM de Tris-HCl a pH 8,0.
 - 2 mM de EDTA.
 - 1,2% de Tritón X-100.
 - Justo antes de su uso añadir 20 mg de lisozima por mililitro de mezcla.
- Procedimiento:
 1. Resuspender el pellet en 180 µl del tampón enzimático de lisis.
 2. Añadir 1 µl de mutanolisina y 4 µl de RNasa.
 3. Incubar 1 hora a 37°C. Tras la incubación aumentar la temperatura del baño a 56°C.
 4. Añadir 25 µl de proteínasa K y 200 µl de tampón AL (sin etanol). Mezclar empleando vórtex. Tras esta etapa el lisado tiene que aparecer transparente.
 5. Incubar 30 minutos a 56°C. Una vez transcurrido este tiempo hay que esperar a que las muestras atemperen antes de continuar con el paso siguiente.
 6. Añadir 200 µl de etanol (al 96 o al 100%) a las muestras. Mezclarlas usando el vórtex. En este paso, es importante que la solución sea homogénea. En el caso de que aparezca algún precipitado blanco se mantiene dentro del tubo.
 7. Pipetear la mezcla, incluyendo los posibles precipitados, en la columna que tiene colocado el tubo colector de 2 ml. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto. A continuación se tira el sobrenadante y el tubo colector.
 8. Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml. Añadir 500 µl del tampón AW1. Centrifugar 1 minuto a 8000 rpm. Tirar el sobrenadante y el tubo colector.
 9. Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml. Añadir 500 µl del tampón AW2. Centrifugar 3 minutos a 14000 rpm para secar la membrana. Para conseguir un mejor secado, este paso se puede repetir de nuevo durante 1 minuto. Tirar el sobrenadante.

10. Colocar la columna en un tubo nuevo de 2 ml. Pipetear 100 μ l de agua en la membrana de la columna. Incubar a temperatura ambiente 1 minuto. Tras este tiempo, centrifugar 1 minuto a 8000 rpm para eluir el ADN total.

8.2. Apéndice 2

Método de extracción de ADN plasmídico desarrollado por O'Sullivan y Klaenhammer [52]

Se parte de un cultivo incubado durante 24 horas. Partiendo de 2 ml de cultivo, se centrifugan 3 minutos a máxima velocidad. A continuación se sigue el siguiente procedimiento:

1. Resuspender el pellet en 25% de sacarosa que contiene 30 mg ml⁻¹ de lisozima hasta un volumen final de 200 µl. Añadir 20 µl de proteasa K. Incubar a 37°C durante 15 minutos. Pasado ese tiempo añadir 200 µl de SDS al 3% e incubar a 55°C durante 10 minutos.
2. Añadir 200 µl de NaOH 0,2N. Mantener a temperatura ambiente durante 7 minutos.
3. Añadir 300 µl de acetato de sodio 3M frío a pH 4,8. Mezclar inmediatamente y se mantiene en hielo 5 minutos. Centrifugar a máxima velocidad a 4°C durante 15 minutos.
4. Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf® limpio. Añadir 650 µl de isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar bien y centrifugar a 4°C durante 15 minutos.
5. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 320 µl de agua destilada. Añadir 200 µl de acetato de amonio 7,5M que contiene 0,5 mg ml⁻¹ de bromuro de etidio. Añadir 350 µl de fenol/cloroformo. Mezclar bien y centrifugar a máxima velocidad y temperatura ambiente durante 5 minutos.
6. Transferir el sobrenadante a un nuevo Eppendorf® y añadir 1 ml de etanol a 20°C. Mezclar bien y centrifugar a máxima velocidad a 4°C durante 15 minutos.
7. Lavar el pellet con etanol al 70% a temperatura ambiente. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 40 µl de Tris-EDTA + 0,1 mg ml⁻¹.

8.3. Apéndice 3

Método de extracción de ADN plasmídico para el kit comercial “Plasmid Mini Kit) de Quiagen

Se parte de un cultivo incubado durante 24 horas. Partiendo de 2 ml de cultivo, se centrifugan 3 minutos a máxima velocidad. A continuación se sigue el siguiente procedimiento:

1. Lavar el pellet con 500 μ l del tampón P1. Éste contiene 50 mM de Tris-HCl a pH 8,0 y 10 mM de EDTA.
2. Centrifugar a 4°C y 14000 rpm durante 10 minutos.
3. Resuspender el pellet en 400 μ l del tampón P1 que además contiene 30 mg ml⁻¹, 1 μ l de mutanolisina (150u μ l⁻¹) y 4 μ l de RNasa (10 mg ml⁻¹).
4. Incubar 30 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, incubar otros 30 minutos a 55°C.
5. Añadir 400 μ l del tampón P2.
6. Incubar no más de cinco minutos a temperatura ambiente. En este punto, el lisado aparecerá viscoso.
7. Añadir 400 μ l del tampón P3.
8. Mantener en hielo 30 minutos, mezclando periódicamente para que el sulfato dodecil potásico no precipite.
9. Centrifugar 30 minutos a 4°C y 14000 rpm.
10. Recoger el sobrenadante y centrifugar otra vez 15 minutos a 4°C y a 14000 rpm.
11. Recoger el sobrenadante. Lavar con 300 μ l de etanol al 70%.
12. Purificación mediante una extracción con fenol/cloroformo:
 - Mantener las muestras en hielo. Añadir 200 μ l de fenol/cloroformo.
 - Centrifugar 5 minutos a 12800 rpm.
 - Se obtienen dos fases en el tubo Eppendorf[®]. Coger la fase superior y pasar a un tubo Eppendorf[®] nuevo.
 - Repetir la extracción añadiendo 200 μ l de fenol/cloroformo.
 - La extracción se repite hasta que la fase superior sea transparente.
 - Cuando esté transparente, se añaden 200 μ l de cloroformo/isoamílico para eliminar los restos de fenol. Se centrifuga 5 minutos a 12800 rpm.
 - Coger la fase superior y pasar a un tubo Eppendorf[®] nuevo.

13. Centrifugar 30 minutos a 4°C y a 14000 rpm. Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet con 10 µl de agua Sigma.

8.4. Apéndice 4

Método de extracción de ADN plasmídico

Se parte de un cultivo incubado durante 24 horas. Partiendo de 2 ml de cultivo, se centrifugan 3 minutos a máxima velocidad. A continuación se sigue el siguiente procedimiento:

1. Lavar con 500 μ l de tampón Tris-HCl 50 mM a pH 8,0 y con sacarosa al 25%.
2. Resuspender el precipitado en 200 μ l de Tris-HCl pH 8,0 con 10 mg ml⁻¹ de lisozima.
3. Incubar 30 minutos a 35°C.
4. Añadir 100 μ l de EDTA 150 mM. Dejar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir 150 μ l de SDS al 3%. Dejar 10 minutos a temperatura ambiente hasta que aparezca mucosidad.
6. Añadir 50 μ l de NaOH 2N con un pH de 12,0 preparada en el acto. Incubar 5 minutos en hielo.
7. Añadir 200 μ l de Tris-HCl 2N a pH 8,0 y 80 μ l de NaCl 5M. Incubar en hielo 10 minutos.
8. Centrifugar 15 minutos a 4°C y 14000 rpm.
9. Recoger el sobrenadante y añadir 200 μ l de tampón TE (Tris-HCl pH 8,0 y EDTA en una proporción 10:1).
10. Extracción fenol/cloroformo (*Apéndice 4*).
11. Precipitar con 0,7 o un volumen de isopropanol.
12. Incubar 30 minutos a -20°C.
13. Centrifugar 30 minutos a 4°C y 14000 rpm.
14. Lavar con 100 μ l de etanol al 70%. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad.
15. Secar al vacío y resuspender en 50 μ l de agua sigma.

8.5. Apéndice 5

Protocolo de transferencia de ADN a una membrana de nitrocelulosa

Soluciones necesarias:

- Solución I: HCL 0,25N
- Solución II: NaOH 0,5M y NaCl 1M.
- Solución III: NaCl 3M y Tris-HCl 0,5M pH 8,0.

El procedimiento que se siguió para fijar el ADN del gel de agarosa a la membrana de nitrocelulosa es el siguiente:

1. Colocar el gel en agitación durante 15 minutos con la solución I cubriéndolo. Tras este tiempo, eliminar la solución y lavar el gel con agua destilada.
2. Eliminar el agua y añadir la solución II. Dejar en agitación durante 20 minutos. Tirar y añadir disolución nueva, manteniendo en agitación otros 20 minutos. Eliminar la solución y lavar 3 veces con agua destilada. Es importante lavar bien el gel.
3. Colocar el gel en la solución III y mantener 1 hora en agitación.
4. Lavar el gel con agua destilada.
5. Con papel de film y celo hacer un hueco del tamaño del gel en la meseta. Colocar el gel dentro del hueco. Sobre él se colocará una membrana de nitrocelulosa del mismo tamaño del gel. Sobre la membrana se coloca un papel 3 MM de igual tamaño al gel y sobre éste un montón de servilletas con el mismo tamaño del gel. Por último, se coloca un cristal y sobre éste dos pesos. El conjunto se equilibra con ayuda de una burbuja. El montaje se deja toda la noche para que el ADN pase a la membrana de nitrocelulosa por peso.

Protocolo de fijación del ADN a la membrana

1. Limpiar el transiluminador con etanol o agua destilada. Colocar la membrana con el ADN hacia abajo.
2. Encender la luz ultravioleta y exponer la membrana 1 minuto y 30 segundos exactos.
3. Tras la fijación, se envuelve la membrana en papel de aluminio hasta su uso.

Protocolo de prehibridación de la membrana de nitrocelulosa

1. Preparar la solución DIG Easy Hyb añadiendo 64 ml de H₂O m_q en dos veces al propio bote. Disolver bien con ayuda de un baño a 37°C. Una vez suspendido conservar durante 1 mes a temperatura ambiente (entre 15 y 25°C).
2. Prehibridar con la solución DIG Easy Hyb precalentada (10 ml 100 cm⁻²) a 38°C que es la temperatura de hidribación seleccionada.
3. Prehibridar durante 2 horas.

Protocolo de hervido de la sonda

1. Precalentar 15 ml de la solución DIG Easy Hyb a 38°C.
2. Desnaturalizar la sonda (el producto de PCR) hirviéndolo en un baño de agua durante 5 minutos, pasándolo rápidamente a un baño de agua con hielo.
3. Añadir 20 µl de la sonda marcada a los 15 ml de la solución DIG Easy Hyb precalentada.
4. Eliminar la sonda de Prehibridación y añadir la mezcla de solución de hibridación y sonda a la membrana de nitrocelulosa. Incubar 24 horas.

Protocolo de lavados de la membrana de nitrocelulosa

Soluciones necesarias:

- Tampón de lavado: 0,1M ácido maleico, 0,15M NaCl y 0,3% Tween 20 a pH 7,5.
- Tampón de ácido maleico: 0,1M ácido maleico y 0,15M de NaCl a pH 7,5.
- Tampón de detección: 0,1 M Tris-HCl y 0,1M de NaCl a pH 9,5.
- SSC 20x: 3M NaCl y 0,3M de CitNa₃ a pH 7,0.
- A partir del stock SSC 20x se preparan dos soluciones de:
 - SSC 2x y 0,1% de SDS.
 - SSC 0,5x y 0,1% de SDS.

El procedimiento que se llevó a cabo fue el siguiente:

1. Calentar la solución de SSC 0,5x y 0,1% de SDS a 55°C. Descongelar la solución de bloqueo.
2. Hacer dos lavados de 10 ml con la solución SSC 2x y 0,1% de SDS durante 5 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

3. Tirar la solución y realizar un aclarado con la solución SSC 0,5x y 0,1% de SDS.
4. Hacer 2 lavados de 15 minutos cada uno con la solución de SSC0,5x y 0,1% de SDS precalentada a 68°C y en agitación.

Protocolo de detección inmunológica

Todas las incubaciones se realizan a 25°C. Se necesitan las siguientes soluciones:

- Solución de bloqueo 1x: diluir 1:10 la solución de bloqueo 10x empleando la solución de ácido maleico. Esta solución se debe preparar en fresco.
- Solución de anticuerpos: esta solución se debe preparar 10 minutos antes de su uso.
 - Centrifugar anti-digoxigenin durante 5 minutos a máxima velocidad antes de usarla. Tomar el volumen de la superficie el tubo.
 - Diluir la anti-digoxigenin-AP en la solución de bloqueo con un factor 1:10000.

El protocolo que se siguió fue el siguiente:

1. Tirar la solución de lavado y aclarar la membrana con el tampón de lavado.
2. Añadir 35 ml del tampón de lavado durante 1 minuto.
3. Aclarar con la solución de bloqueo 1x. A continuación, añadir 100 ml de la solución de bloqueo 1x e incubar durante 30 minutos.
4. Eliminar la solución de bloqueo 1x y añadir 20 ml de la solución de anticuerpos. Incubar durante 30 minutos exactos.
5. Eliminar la solución de anticuerpos y realizar dos lavados de 15 minutos cada uno con 100 ml del tampón de lavado, aclarando previamente la membrana con la misma solución.
6. Eliminar el tampón de lavado y equilibrar la membrana con 20 ml del tampón de detección durante 3 minutos exactos.

Protocolo de revelado de la membrana de nitrocelulosa

1. Colocar la membrana con el ADN hacia arriba en una bolsa de plástico y añadir "SPS ready to use" con una pipeta. Verter, aproximadamente, 2 ml.
2. Cerrar la bolsa y extender el sustrato uniformemente sin que queden burbujas. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (entre 15 y 25°C).

3. Sellar la bolsa e incubar 10 minutos a 37°C.
4. Exponer la membrana al equipo de captación de imagen.