

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**Estrategias de identificación de genes de
proteasas en una cepa de
Pseudomonas fluorescens
alterante de leche**

**TRABAJO FIN DE MASTER
POR**

LIDIA RODRIGO TORRES

JULIO, 2013





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dra. D^a. M^a DEL ROSARIO RODICIO RODICIO, Catedrática de Microbiología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo y Dr. D. JOSE MARIO DÍAZ FERNÁNDEZ Catedrático de Ingeniería Química del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de Medio Ambiente de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que D^a. Lidia Rodrigo Torres ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 7^a promoción curso 2012-2013.

Oviedo, de 18 de Julio de 2013

D^a. M^a del Rosario Rodicio Rodicio

D. Jose Mario Díaz Fernández

V^oB^o

Mario Díaz Fernández

Coordinador del Máster en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a la Dra M^a del Rosario Rodicio Rodicio, su dedicación y el haberme permitido trabajar en su laboratorio, y al Dr. Jose Mario Díaz Fernández, la oportunidad que me ofrecieron de desarrollar este proyecto de investigación bajo su dirección.

A Vanessa García Menéndez, por su paciencia, dedicación, sus enseñanzas, su tiempo, su apoyo y su confianza.

A los demás miembros del laboratorio M1: Raquel, Marina, Rakia, Nacho, Mateo, Javier. Gracias por los buenos momentos y por vuestro apoyo.

A Cristina Cuervo, por su ayuda incondicional.

A todos mis compañeros/as del máster.

A mi pareja, Javier, por su interminable paciencia, comprensión, por animarme y por haberme acompañado en esta experiencia.

A mi familia.

ÍNDICE

RESUMEN	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABLAS.....	xv
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Alteración de los alimentos	2
1.2 Antecedentes	2
1.3 Objetivos.....	6
CONSIDERACIONES TEÓRICAS	7
2.1 Microorganismos en los alimentos	8
2.2 Microorganismos en la leche.....	11
2.2.1 Composición de la leche	11
2.2.2 Origen de la microbiota de la leche cruda	17
2.2.3. Alteraciones microbianas de la leche y productos lácteos	18
2.2.4 Medidas de higiene y criterios microbiológicos en la producción de leche y sus derivados	21
2.3 Determinación de la calidad higiénica de la leche	23
2.4 Tratamientos térmicos de higienización de la leche	25
2.5 Actividad proteolítica y lipolítica en la leche	27
2.6 <i>Pseudomonas</i> psicrótrofas	29
2.7 Proteasas producidas por <i>Pseudomonas</i> psicrótrofas	30
MATERIAL Y MÉTODOS	36
3.1 Diseño de oligonucleótidos	37
3.2 Extracción de ADN	40
3.3 Amplificación por PCR	41
3.4 Electroforesis en gel de agarosa	43
3.5 Purificación de los productos de PCR	45
3.6 Purificación de fragmentos de ADN separados en gel de agarosa	46
3.7 Secuenciación	48
3.8 Clonación.....	51
3.9 Medios de cultivo	58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
4.1 Diseño de oligonucleótidos	60
4.2 Amplificación por PCR y secuenciación.....	65
4.3 Amplificación por PCR, clonación y secuenciación	70
4.4 Amplificación por PCR y secuenciación de genes de proteasas y peptidasas de cepas de colección de <i>Ps. fluorescens</i>	73
CONCLUSIONES	76

ABREVIATURAS	78
BIBLIOGRAFÍA	81
APÉNDICE	90

RESUMEN

RESUMEN

La leche es un alimento muy completo nutricionalmente y por ello fácilmente alterable por microorganismos si no se adoptan unas medidas de higiene adecuadas. El análisis de un lote de leche esterilizada comercial alterada reveló la presencia de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* con actividad proteolítica y lipolítica.

El objetivo de este trabajo fue diseñar oligonucleótidos y utilizar la técnica de amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), seguida de secuenciación o de clonación y secuenciación, para identificar el gen o genes responsables de la actividad proteolítica de esa bacteria. Los oligonucleótidos se diseñaron en base a secuencias de genes de proteasas de *Ps. fluorescens* descritas en la bibliografía y depositadas en bases de datos, siendo *aprX*, codificante de una metaloproteasa alcalina, el más común. Utilizando como molde el ADN total de la cepa de *Ps. fluorescens* aislada de la muestra de leche, se realizaron PCRs variando distintas condiciones para optimizar la reacción. Sin embargo, no fue posible conseguir amplificaciones específicas. Así, la secuenciación de los fragmentos obtenidos, bien directamente o bien después de su clonación, no reveló homología con genes de proteasas. Esto está de acuerdo con la elevada variabilidad de estos genes, y pone de manifiesto la necesidad de estrategias alternativas para la identificación del gen o genes responsables de la actividad proteolítica de *Ps. fluorescens* implicada en la alteración de leche.

ABSTRACT

Milk is very complete nutritionally and so easily disturbed by microorganisms unless proper hygiene measures are taken. An analysis of a commercial sterilized altered milk batch revealed the presence of a *Pseudomonas fluorescens* strain with proteolytic and lipolytic activity.

The objective of this study was to design oligonucleotides and using the PCR (Polymerase Chain Reaction) technique, followed by sequencing or cloning and sequencing to identify the gene or genes responsible for the proteolytic activity of the bacteria. The oligonucleotides were designed based on gene sequences of *Ps. fluorescens* proteases described in the literature and deposited in databases, being *aprX*, encoding an alkaline metalloprotease, the most common gene. Using as template total DNA from the *Ps. fluorescens* strain isolated from the milk sample, PCRs were performed varying different conditions to optimize amplification. However, it was not possible to achieve specific amplifications. Thus, sequencing of the fragments obtained, either directly or after cloning revealed no homology with the protease genes. This is in agreement with the high variability of these genes, and demonstrates the need for alternative strategies for the identification of the gene or genes responsible for the proteolytic activity of *Ps. fluorescens* involved in the alteration of milk.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Detección de la actividad lipolítica de las bacterias aisladas en agar tributirina.	4
Figura 2. Fotografías de <i>Ps. fluorescens</i>	5
Figura 3. Micela de caseína.....	13
Figura 4. Estructura del glóbulo graso de leche bovina.....	15
Figura 5. Tanques de refrigeración de leche cruda.....	22
Figura 6. Pasteurizador de placas.....	26
Figura 7. Esquema de un esterilizador de botellas.....	26
Figura 8. Homogenización de la leche para estabilización de la grasa.....	28
Figura 9. Estructura del operón aprX-lipA en <i>Ps. fluorescens</i> B52.....	34
Figura 10. Esquema de los pasos a seguir en la extracción cromosómica de ADN bacteriano.	40
Figura 11. Reacción en Cadena de la Polimerasa. <i>Biología Molecular y Celular</i> . Lodish. 5ª Edición	41
Figura 12. Preparación de un gel de agarosa para separar fragmentos de ADN.....	44
Figura 13. Secuenciación automática.....	48
Figura 14. Cromatograma.....	49
Figura 15. Alineación de la secuencia introducida en BLAST con las depositadas en las bases de datos..	51
Figura 16. Vector pUK1921.....	52
Figura 17. Digestión con enzimas de restricción y ligación.	53
Figura 18. Alineación con la aplicación <i>Contig Express</i> de 10 secuencias de genes de proteasas de <i>Ps. fluorescens</i> para generar el “contig 0”.....	63
Figura 19. Fotografías de los geles de agarosa de las electroforesis de los productos de PCR.	67
Figura 20. A) Gel de agarosa de la electroforesis de los productos de PCR obtenidos con los cebadores pcon7-1F/3R con sitios de restricción con diluciones de ADN genómico de <i>Ps. fluorescens</i> . B) Gel de agarosa de la electroforesis de las dos bandas recortadas del gel y purificadas.	70
Figura 21. Digestión con XbaI y EcoRI de plásmidos extraídos de colonias blancas de <i>E. coli</i> obtenidas en el experimento de clonación.....	71

Figura 22. A) Productos de PCR que se utilizaron para la clonación (calle 2). B) Digestión con XbaI y EcoRI de los plásmidos obtenidos en el experimento de clonación. Se escogen para secuenciar los plásmidos recombinantes que se muestran encuadrados, ya que las inserciones se aproximan al tamaño esperado (la línea negra marca aproximadamente el tamaño esperado de 927 pb).	72
Figura 23. PCR con los oligonucleótidos lsp1F/1R utilizando como molde ADN genómico de una cepa de colección de <i>Ps. fluorescens</i> . Se observa un único producto de PCR de tamaño esperado (333 pb), indicado con flecha (calle 3).....	74
Figura 24. Cromatograma resultado de la secuenciación del amplicón de 333 pb obtenido con los cebadores lsp 1F/1R, utilizando como molde ADN de la cepa de colección de <i>Ps. fluorescens</i>	74
Figura 25. Resultado de la alineación de la secuencia del amplicón de <i>lsp</i> utilizando BLAST.	75
Figura 26. Gen <i>lsp</i> de <i>Ps fluorescens</i> NCIB 10586 (N° acceso M35366). Oligonucleótidos: lsp1F/lsp1R.	91
Figura 27. Gen <i>pcp</i> de <i>Ps fluorescens</i> MFO (N° acceso X75919). Oligonucleótidos pcp1F/pcp1R.....	91
Figura 28. Gen codificante de una zinc metaloproteasa de <i>Ps fluorescens</i> Pf-0 (N° acceso CP000094). Oligonucleótidos znprot1F/znprot1R	92
Figura 29. Gen <i>aprAPF33</i> de <i>Ps fluorescens</i> N°33 (N° acceso AB015053). Oligonucleótidos: pcon6-1F, pcon9-1F, pcon10-1F/pcon6-1R, pcon9-1R, pcon10-2R	92
Figura 30. Gen <i>priA</i> de <i>Ps. fluorescens SIKWI</i> (N° acceso AF083061). Oligonucleótidos pcon1-1F, pcon7-1F/pcon1-1R, pcon7-3R. El oligonucleótido pcon1F-1F no anilla con la secuencia por poseer 4 diferencias respecto a la misma. El programa informático no lo admite.	93
Figura 31. Gen <i>priA</i> de <i>Ps. fluorescens SIKWI</i> (N° de acceso AF083061) desde el nucleótido 1 hasta el 180. Se muestra resaltada en negro la secuencia de ADN molde donde hibridaría el oligonucleótido pcon1-1F (CAAGcCAGCACcGCtTAcTC) en la posición 40.	93
Figura 32. Gen <i>aprX</i> de <i>Ps fluorescens A506</i> (N° acceso AY298902). Oligonucleótidos pcon6-1F, pcon7-1F/pcon6-1R, pcon7-3R. El oligonucleótido pcon7-3R no hibrida con la secuencia porque tiene una diferencia respecto a la misma.....	94
Figura 33. Gen <i>aprX</i> de <i>Ps. fluorescens A506</i> (N°acceso AY298902) desde el nucleótido 811 hasta el 1170. Se muestra resaltada en negro la secuencia de ADN molde donde hibridaría el oligonucleótido pcon7-3R (ACGCCCTTGCGATGGAcAC), en la posición 1010.	94
Figura 34. Gen <i>aprX</i> de <i>Ps fluorescens CY091</i> (N° acceso AF 004848). Oligonucleótidos pcon1-1F, pcon7-1F, pcon10-1F/pcon1-1R, pcon7-3R, pcon10-2R. El oligonucleótido pcon7-3R no hibrida con la secuencia por tener una diferencia respecto a la misma.	95

Figura 35. Gen <i>aprX</i> de <i>Ps. fluorescens</i> CY091 (N°acceso AF004848) desde el nucleótido 901 hasta el 1260. Se muestra resaltada en negro la secuencia de ADN molde donde hibridaría el oligonucleótido pcon7-3R (ACGCCCTTGGCGATGGAcAC), en la posición 1010.....	95
Figura 36. Gen homólogo a <i>aprX</i> de <i>Ps fluorescens</i> N°114 (N° acceso AB013895). Oligonucleótidos pcon1-1F, pcon9-1F, pcon10-1F/pcon1-1R, pcon9-1R, pcon10-2R. El oligonucleótido pcon1-1F no hibrida con la secuencia por tener una diferencia respecto a la misma.	96
Figura 37. Gen homólogo de <i>aprX</i> de <i>Ps. fluorescens</i> No114 (N° de acceso AB013895) desde el nucleótido 1 hasta el 180. Se muestra resaltada en negro la secuencia de ADN molde donde hibridaría el oligonucleótido pcon1-1F (CAAGCCAGCACCGCtTACTC) en la posición 40..	96
Figura 38. Gen <i>aprX</i> de <i>Ps. fluorescens</i> B52 (N° acceso AF216700). Oligonucleótidos pcon1-1F, pcon7-1F/pcon1-1R, pcon7-3R.	97
Figura 39. Gen <i>aprX</i> de <i>Ps. fluorescens</i> F (N° acceso DQ146945). Oligonucleótidos pcon6-1F, pcon9-1F, pcon10-1F/pcon61R, pcon9-1R, pcon10-2R.....	97
Figura 40. Gen <i>aprX</i> de <i>Ps. fluorescens</i> ATCC17400 (N°acceso EU360312). Oligonucleótidos pcon6-1F, pcon9-1F/pcon6-1R, pcon9-1F.....	98
Figura 41. Gen <i>aprX</i> de <i>Ps. fluorescens</i> CIP7325 (N° acceso EU360311). Oligonucleótidos pcon1-1F, pcon7-1F, pcon9-1F/pcon1-1R, pcon7-3R, pcon9-1R. El oligonucleótido pcon1-1R, no se muestra porque el programa no permite hibridarlo con la secuencia porque posee una diferencia respecto a ésta.	98
Figura 42. Gen <i>aprX</i> de <i>Ps. fluorescens</i> CIP7325 (N° acceso EU360311) desde 991 hasta 1434 .Se muestra resaltada en negro la secuencia de ADN molde donde hibridaría el oligonucleótido pcon1-1R (GTGGTGACGAGGAAaTCCGC), en la posición 1397.....	99
Figura 43. Gen homólogo de <i>aprX</i> de <i>Ps. fluorescens</i> Pf-01 (N° acceso CP000094). Oligonucleótidos pcon6-1F, pcon9-1F, pcon10-1F/pcon6-1R, pcon9-1R, pcon10-2R	99

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de las bacterias aisladas en la leche alterada.....	3
Tabla 2. Clasificación general de las proteasas	32
Tabla 3. Principales endopeptidasas bacterianas.....	33
Tabla 4. Concentración y volumen de los reactivos de la PCR en la mezcla.....	43
Tabla 5. Componentes de la reacción de digestión del producto de la PCR y del vector de clonación.....	53
Tabla 6. Soluciones RF1 y RF2 para la preparación de células competentes	55
Tabla 7. Soluciones usadas en la extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina.	57
Tabla 8. Medios de cultivo	58
Tabla 9. Secuencias de genes de proteasas y peptidasas de <i>Ps. fluorescens</i> consideradas en este trabajo	60
Tabla 10. Alineación de secuencias.....	62
Tabla 11. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación por PCR de genes de proteasas.	64
Tabla 12. Tamaño del fragmento amplificado en cada secuencia utilizando las parejas de oligonucleótdos indicadas.....	65
Tabla 13. Parejas de oligonucleótidos, temperatura de hibridación, longitud del amplicón y tiempo de elongación empleada en cada reacción de PCR.....	66
Tabla 14. Oligonucleótidos con secuencias diana para enzimas de restricción	70

INTRODUCCIÓN

1.1 Alteración de los alimentos

Existe gran diversidad de alimentos en cuanto a composición química y características organolépticas. Las características óptimas para su consumo a menudo dependen de la subjetividad del consumidor pero también es cierto que los alimentos no son aptos para el consumo de forma permanente. De hecho, existen múltiples factores que limitan su “vida útil” término que define el tiempo en que un alimento conservado en unas condiciones determinadas se considera seguro, conserva unas características físicas, químicas, biológicas y sensoriales adecuadas y una composición nutricional acorde con el etiquetado (IFST, 1993).

Los factores que limitan la vida útil del alimento pueden ser de naturaleza física (humedad, temperatura, radiación y agresiones mecánicas), de naturaleza química (reacciones de oxidación, actividad enzimática del propio alimento y reacciones químicas inherentes al mismo) y de naturaleza biológica (actividad microbiana, insectos, roedores y otros animales). Estos factores pueden dar lugar a “alimentos alterados” que ya no se consideran aceptables por el consumidor por cuestiones de calidad o seguridad.

Uno de los factores más importantes que produce alteración en los alimentos es la actividad microbiana. La presencia de microorganismos en los alimentos puede ser de origen endógeno, cuando ya se encontraban en la fuente del alimento, o de origen exógeno, cuando la contaminación se produce durante el procesado de la materia prima. La composición química del alimento y sus condiciones de conservación influyen decisivamente en el crecimiento de los microorganismos y el tipo predominante. Además, la carga microbiana inicial influye en la vida útil del alimento.

1.2 Antecedentes

La leche se define como el “*producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, del ordeño higiénico, regular y completo de vacas sanas y bien alimentadas*”. Siempre que se indica la palabra “leche” se entiende como leche de vaca, si es de otro animal se ha de especificar (Código Alimentario Español, Decreto 2484/1967).

Debido a su composición nutritiva y a su elevado contenido en agua, la leche constituye un medio ideal para el crecimiento de microorganismos (Gilmour y Rowe,

1990). Éstos pueden metabolizar sus componentes para producir derivados lácteos fermentados, siendo una transformación deseada y controlada, o pueden realizar procesos alterativos no controlados que originen sabores, olores y texturas no deseadas.

En un estudio anterior de una leche comercial alterada se identificaron y caracterizaron las bacterias presentes y se investigó la actividad proteolítica y lipolítica de las mismas (Vanessa García, Tesis de Licenciatura, 2011).

Se analizaron muestras de dos botellas de leche desnatada esterilizada de marca blanca (LA1 y LA2) pertenecientes a un lote donde se encontró una botella con sabor amargo (LA2), y se tomó una botella de otro lote como control (LC). Los experimentos consistieron en el aislamiento de bacterias presentes y su caracterización en base a tinción de Gram y pruebas bioquímicas de la catalasa y oxidasa, y su identificación mediante amplificación por PCR del gen que codifica al ADN ribosómico 16S y posterior secuenciación. Las bacterias detectadas en cada muestra se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de las bacterias aisladas en la leche alterada (Vanessa García, Tesis de Licenciatura, 2011).

Muestra	Cepa	Aspecto colonias	Gram	Cat / Ox	Proteólisis / Lipólisis
LA1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Crema	Negativo	+ / +	+ / +
LA1	<i>Pantoea agglomerans</i>	Amarilla	Negativo	+ / -	+ / -
LA1	<i>Micrococcus luteus</i>	Amarilla	Positivo	+ / +	- / -
LA1	<i>Staphylococcus equorum</i>	Blanca	Positivo	+ / -	ND
LA2	<i>Providencia alcalifaciens</i>	Crema	Negativo	+ / -	- / -
LA2	<i>Myroides spp.</i>	Amarilla	Negativo	+ / +	- / -
LA2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Crema	Positivo	+ / -	- / -

Cat, catalasa; Ox, oxidasa; ND, resultado no determinado; +, resultado positivo; -, resultado negativo

En la muestra control no se observó crecimiento microbiano, como es de esperar en una leche esterilizada, mientras que en la muestra LA1 el recuento fue de 10^4 ufc/ml (unidades formadoras de colonias por ml) y en la muestra LA2 de 10^9 ufc/ml, siendo este último valor coherente con el sabor amargo y desagradable de esta leche. En ambos casos, el número de bacterias fue muy superior al aceptable de acuerdo con el criterio microbiológico establecido para una leche esterilizada (estabilidad microbiológica tras incubación 30°C 15 días o a 55°C 7 días) (Reglamento (CE) 2073/2005). Estos

recuentos sugieren bien que el proceso de esterilización fallara o, lo que es más probable, que la contaminación hubiera ocurrido durante o después del envasado.

Además, se estudió la actividad proteolítica y lipolítica de las bacterias detectadas, ya que la degradación de proteínas y grasas se suele asociar a sabores amargos y rancios respectivamente. Para ello se sembró un cultivo puro de las bacterias aisladas en agar gelatina y tributirina.

El agar gelatina (30 g de peptona bacteriológica, 20 g de agar, 1 L de agua destilada) permite ver la capacidad de los microorganismos de producir enzimas proteolíticos exocelulares que degradan la gelatina. Tras 24 horas de incubación se revelan las placas con HCl que precipita las proteínas intactas dando un precipitado opaco. La actividad proteolítica se detecta por la aparición de un halo transparente alrededor de la zona de crecimiento.

El agar tributirina (5 g de peptona, 3 g de extracto de levadura, 10 g de tributirina, 12 g de agar, 1L de agua destilada) permite diferenciar a los microorganismos productores de lipasas. La tributirina es un triacilglicerol que forma una emulsión opaca en el agar. Tras el periodo de incubación, la actividad lipolítica se revela precipitando la tributirina con HCl. La aparición de un halo alrededor de la colonia muestra una actividad lipolítica positiva.

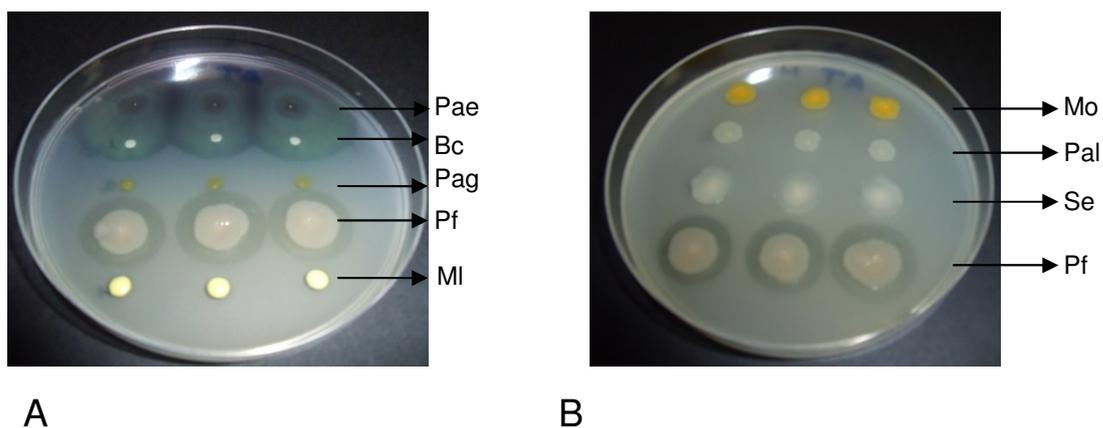


Figura 1. Detección de la actividad lipolítica de las bacterias aisladas en agar tributirina. **A)** Bacterias de la muestra LA1: Control positivo, *Pseudomonas aeruginosa* (Pae); control negativo, *Bacillus cereus* (Bc). La zona de crecimiento de *Ps. aeruginosa* y el halo de lipólisis se solapan con la zona de crecimiento de *B. cereus*; *Pantoea agglomerans* (Pag; negativa); *Pseudomonas fluorescens* (Pf; positiva); y *Micrococcus luteus* (MI; negativo). **B)** Bacterias de la muestra LA2: *Myroides* (Mo; negativo); *Providencia alcalifaciens* (Pal; negativa); *Staphylococcus epidermidis* (Se; negativo); *Pseudomonas fluorescens* de la muestra LA1, utilizada aquí como control positivo. (Vanessa García, Tesis de Licenciatura, 2011)

A la vista de las imágenes se pudo observar que solo *Pseudomonas fluorescens* presentó actividad lipolítica, mientras que tanto *Pantoea agglomerans* como *Ps. fluorescens* mostraron actividad proteolítica.

Ps. fluorescens es un bacilo Gram negativo, aerobio, catalasa positivo y oxidasa positivo, con múltiples flagelos. Se encuentra de forma natural en suelo, plantas y agua. Produce un pigmento, la pioverdina, que actúa como sideróforo para la captación de hierro y emite fluorescencia verde-azulada cuando se expone a luz ultravioleta de onda larga (400 nm). Su temperatura óptima de crecimiento es de 25-30°C, aunque también puede crecer a temperatura de refrigeración (3-7°C). Es por tanto una bacteria psicrótrofa, y se ha asociado al deterioro de alimentos refrigerados, incluida la leche. Es capaz de secretar enzimas proteolíticos y lipolíticos termoestables, capaces de resistir incluso tratamientos de esterilización, siendo responsables de alteraciones en los alimentos que causan grandes pérdidas económicas.

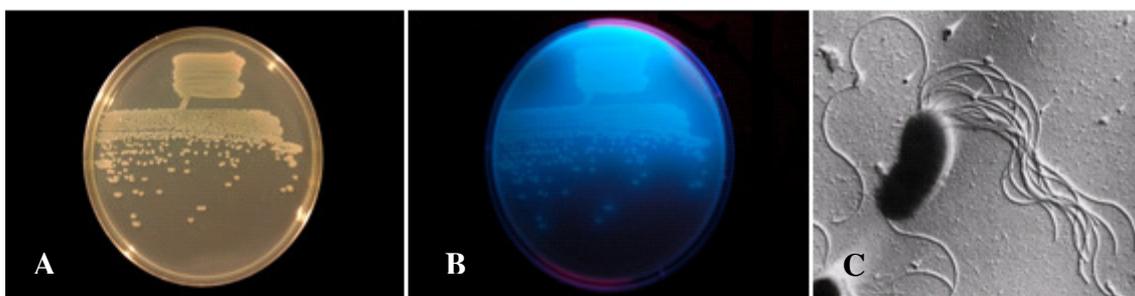


Figura 2. Fotografías de *Ps. fluorescens*. A) Cultivo puro de *Ps. fluorescens* en agar TY (*Tryptone-Yeast Extract*) bajo luz blanca (Autor: Ninjata Coshell), B) Cultivo puro de *Ps. fluorescens* en agar TY, iluminado con luz UV, (Autor: Ninjata Coshell), C) Imagen tomada de *Ps. fluorescens* en Microscopio Electrónico de Transmisión.

El género *Pantoea* incluye varias especies generalmente asociadas a plantas aunque algunas especies pueden causar infecciones en humanos. Son bacilos Gram negativos, catalasa positivos y oxidasa negativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, anaerobios facultativos. *Pa. agglomerans*, que fue anteriormente clasificada como *Enterobacter agglomerans* o *Erwinia herbicola*, es la especie de *Pantoea* más comúnmente aislada en humanos y está ampliamente distribuida en la naturaleza, habiéndose aislado de agua, plantas, suelo, animales, además de humanos. Es un patógeno oportunista común en infecciones nosocomiales (Delétoile *et al.*, 2009). Crece bien en agar nutritivo a 30°C y algunas cepas crecen lentamente a 4 o 41°C pero no a 44°C. Produce colonias amarillas o amarillo-rojizas (figura 1A). Además de su

potencial patogénico, se confirmó su potencial alterante en alimentos al mostrar actividad proteolítica en agar gelatina cuando se aisló de la muestra LA1.

Aunque ambas bacterias, *Pa. agglomerans* y *Ps. fluorescens*, son capaces de producir enzimas extracelulares, es llamativo que se encontraran en la muestra de leche LA1 que no presentó alteración organoléptica. Pero hay que tener en cuenta que la acumulación y acción de estos enzimas solo es notable cuando la bacteria productora está en un número igual o superior a 10^6 ufc/ml (Sorhaug and Stepaniak, 1997), mientras que el recuento bacteriano total fue de 10^4 ufc/ml, no habiéndose alcanzado dicho umbral en el momento del análisis. La muestra LA2, sí mostró un sabor desagradable y unos recuentos altos lo que se corresponde con la alteración, pero sin embargo, las bacterias aisladas no mostraron actividad proteolítica ni lipolítica. Es posible que bacterias con esas actividades ya no estuvieran presentes en el momento del análisis, al haber sido desplazadas por otras bacterias, o eliminadas durante el tratamiento térmico de la leche, quedando activos sus enzimas termorresistentes.

1.3 Objetivos

En base a los resultados obtenidos en este trabajo anterior, se decidió continuar con la investigación de la capacidad alterante de la leche por parte de *Ps. fluorescens* estudiando las bases genéticas de la producción de proteasas. Anteriormente, se utilizaron oligonucleótidos diseñados por otros autores para la amplificación por PCR del gen *aprX* de *Pseudomonas* spp., codificante de una proteasa (Vanessa García, Comunicación personal), pero se obtuvo un resultado negativo. Ante estos resultados, este trabajo abordó los siguientes objetivos:

- Diseño de oligonucleótidos para la amplificación por PCR de genes que codifican proteasas.
- Caracterización de los genes amplificados mediante secuenciación o clonación y secuenciación.

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.1 Microorganismos en los alimentos

El conocimiento de la composición microbiológica de los alimentos es importante desde el punto de vista industrial, sanitario y económico.

Como se comentó en el apartado anterior, muchos microorganismos se utilizan para la elaboración de alimentos (derivados lácteos, bebidas fermentadas, encurtidos, productos cárnicos, pan y productos de pastelería) y de ahí su importancia a nivel industrial. Estos microorganismos se han venido utilizando desde la antigüedad y no suponen peligro para el consumidor. De hecho, en su mayoría dotan al alimento de unas características que permiten su conservación en el tiempo. Un ejemplo de microorganismos de este grupo lo representan las bacterias del ácido láctico o la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Pero se dan casos en que los alimentos resultan contaminados por microorganismos patógenos que pueden incorporarse al alimento desde diversas fuentes (endógenas o exógenas) a lo largo de toda la cadena de producción. La falta de higiene en la misma y un cocinado defectuoso son las principales causas de que un patógeno o sus metabolitos lleguen al consumidor y provoquen enfermedad. Ésta puede ser de tres tipos: intoxicación (ingestión de toxinas sintetizadas en el alimento), toxiinfección (ingestión de microorganismos vivos que producen toxinas una vez en el organismo del consumidor) e infección (ingestión, multiplicación y dispersión del microorganismo en el organismo del consumidor). En este caso es importante identificar al patógeno (virus, bacterias, hongos, parásitos) y estudiar su virulencia para determinar su potencial dañino y poder establecer un tratamiento adecuado para limitar los efectos sobre la salud. Algunos ejemplos son *Staphylococcus aureus* (bacteria Gram positiva) o *Aspergillus* spp. (hongo) que causan intoxicaciones alimentarias, *Escherichia coli* enterotoxigénica (bacteria Gram negativa) que causa toxiinfección, *Salmonella* spp. (bacteria Gram negativa) o el virus Norwalk que causan infección.

Los microorganismos presentes en los alimentos pueden ocasionar también alteraciones organolépticas, las cuales pueden conducir a importantes pérdidas económicas a nivel industrial. El Código Alimentario Español define “alimento alterado” como todo aquel “que durante su obtención, preparación, manipulación, transporte, almacenamiento o tenencia, y por causas no provocadas deliberadamente,

sufre variaciones en sus caracteres organolépticos, composición química o valor nutritivo de tal forma que la aptitud para el consumo queda anulada o disminuida, aunque permanezca inocuo”.

No hay relación directa entre alteración y patogenicidad. A veces un microorganismo alterante puede ser patógeno, como algunas cepas proteolíticas de *Clostridium botulinum* (bacteria Gram positiva), que sintetizan toxina botulínica (considerada la toxina más potente de la naturaleza) y a la vez, degradan las proteínas de alimentos enlatados con producción de gas y abombamiento de las latas. Otras veces, el microorganismo alterante puede ser inocuo como *Acetobacter* (bacteria Gram negativa) que produce ácido acético a partir etanol en condiciones aerobias, provocando la alteración del vino.

Las bacterias dada su diversidad genética, su extraordinaria capacidad de multiplicación, de adaptación al ambiente, y de competencia con otros microorganismos son el grupo más frecuentemente involucrado en la alteración de los alimentos.

Entre las bacterias Gram negativas destacan diversas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella* y *Aeromonas*. Suelen alterar alimentos almacenados en frío, de elevada actividad de agua, pH cercano a la neutralidad y en un ambiente aerobio. Como ejemplos cabe destacar pescado, carne, leche, derivados lácteos y huevos. Muchos de estos microorganismos sintetizan pigmentos y proteasas y lipasas termoestables capaces de resistir los tratamientos térmicos de conservación, por lo que estas enzimas pueden degradar proteínas y lípidos aun cuando se han destruido las células vegetativas que los han producido, dando lugar a agriado y rancidez. Esto es especialmente importante en la leche envasada.

Las bacterias Gram positivas no esporuladas más destacadas son las bacterias lácticas (*Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp.), y *Brocothrix thermosphacta*. Las bacterias lácticas se utilizan de manera rutinaria como cultivos iniciadores o adjuntos en la fabricación de alimentos como los derivados lácteos y productos cárnicos y muchas de ellas tienen efecto beneficioso ya que son consideradas como microorganismos “probióticos”. Sin embargo también existen numerosas cepas con capacidad para alterar los alimentos, especialmente en alimentos envasados al vacío o en atmósfera protectora. Las alteraciones más comunes son la

acidificación por una producción en exceso de ácido láctico, producción de CO₂, producción de exopolisacáridos que dan aspecto mucoso y viscoso y producción de aminas biógenas que pueden tener efecto tóxico.

Respecto a las bacterias alterantes Gram positivas esporuladas se destacan diversas especies de *Bacillus* y *Clostridium*, ambos géneros constituyen importantes agentes alterantes de los alimentos procesados térmicamente, ya que producen endosporas que sobreviven a estos tratamientos. Por ejemplo, *B. cereus* crece en la leche pasteurizada, almacenada a 5°C y es responsable de la “coagulación dulce”, coagulación proteolítica en ausencia de acidificación y de la “nata amarga” por efecto lipolítico. *B. stearothermophilus* origina la “acidificación plana” de los alimentos enlatados ya que se desarrolla produciendo ácido pero no gas por lo que la lata no se abomba; por el contrario *C. thermosaccharolyticum* genera gas y altera los alimentos enlatados provocando un abombamiento del envase. Por su parte, *Desulphotomaculum nigrificans* es responsable de la alteración “maloliente sulfurosa” debida a la producción de sulfuro de hidrógeno y al consiguiente abombamiento y mal olor. *C. tyrobutyricum* y *C. butyricum* causan el hinchamiento tardío en quesos, que se caracteriza por la formación de ácido butírico, gases y olores anómalos, con pérdida de calidad.

Las levaduras y mohos, en general, toleran mejor que las bacterias las condiciones pH ácido y/o baja actividad de agua. Consecuentemente son alterantes típicos de alimentos como frutas, hortalizas, cereales y productos horneados. En la fruta, los microorganismos liberan pectinasas que originan podredumbres blandas. *Penicillium* es el principal alterante de la fruta. Los mohos producen esporangios pigmentados que dan un color característico a los alimentos. *Rhizopus nigricans* es un moho alterante del pan (“pan florecido”, con manchas negras) y también lo son *Neurospora sitophila* (“pan rojizo”), *Penicillium* (“moho azul”) y *Aspergillus* (“moho verde”). Las levaduras osmófilas de los géneros *Saccharomyces* y *Torulopsis* crecen a concentraciones elevadas de azúcar (65-70%) y alteran zumos, mermeladas y miel. Los hongos también causan diversos tipos de alteración cárnica, como enmohecimiento “algodonoso” debido a diversas especies de los géneros *Mucor*, *Rhizopus* y *Thamnidium*.

Las características del alimento y las condiciones de conservación determinan los microorganismos alterantes que se pueden desarrollar en el mismo y su actividad metabólica. La carga microbiana presente en la materia prima es indicador de la calidad,

y determina la vida útil del alimento, pese a que puede ser eliminada por los distintos tratamientos a los que es sometido el alimento. Además se puede utilizar como criterio de valoración de la materia prima a la hora del pago al productor primario (RD 460/2002). Resulta imprescindible también la identificación de los microorganismos contaminantes y su potencial alterante para poder prever la posible alteración del alimento y establecer unas condiciones de conservación, un tratamiento adecuado y una elaboración adecuada para poder determinar la vida útil y evitar pérdidas económicas.

2.2 Microorganismos en la leche

2.2.1 Composición de la leche

“*Leche* es la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenida mediante uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración ulterior” (Codex alimentarius).

La leche es el único alimento para crías de mamíferos durante los primeros meses de vida cubriendo los requerimientos nutricionales e inmunológicos. La leche y los productos lácteos tienen un papel primordial en la alimentación humana y su consumo está extendido prácticamente en todos los países y culturas.

Es un líquido de composición compleja, blanco y opaco, de sabor dulce y acidez cercana a la neutralidad (pH 6,5-6,7). La leche, como medio heterogéneo, posee tres fases: emulsión de glóbulos de materia grasa, suspensión coloidal de proteínas y solución verdadera de lactosa y sales minerales. También contiene otros componentes minoritarios tales como lecitinas, vitaminas, nucleótidos, gases disueltos, etc.

La composición de la leche varía en el transcurso del periodo de lactancia, según el estado de salud del animal mamífero, la alimentación, la genética, la especie, el clima.

Dado que la leche de vaca es la más consumida por el ser humano, nos centraremos en la composición de la misma, que se describe a continuación:

- *Agua*

Es el componente mayoritario. Constituye el 87% del peso.

- *Fración proteica*

Las proteínas más abundantes en la leche son las caseínas (26 g/Kg de leche), seguidamente las seroproteínas (6,3 g/Kg de leche) y las proteínas que forman parte del glóbulo graso (0,4 g/Kg de leche).

Las caseínas constituyen el 80% de las proteínas totales. Su punto isoeléctrico es de pH 4,6. Existen tres tipos de caseínas: α -caseínas, β -caseínas y κ -caseínas. La más abundante es la α -caseína, de dos tipos, α s1-caseína y α s2-caseína; tienen la característica de precipitar a bajas concentraciones de Ca^{2+} , a baja y media temperatura. Las β -caseínas son similares a las anteriores pero precipitan en presencia Ca^{2+} solo por encima de los 20°C. Las κ -caseínas son menos abundantes pero de mayor importancia, ya que son el sustrato específico del cuajo (enzima proteolítica del estómago de rumiantes), utilizado en la fabricación de queso, y presentan una gran solubilidad incluso a concentraciones elevadas de Ca^{2+} .

Las caseínas se agrupan formando submicelas de 10-15 nm de tamaño y éstas se agrupan en micelas de 0,4 μm de tamaño, que se encuentran en suspensión coloidal. Las submicelas se mantienen unidas dentro de la micela por uniones de fosfato cálcico o magnésico. El Ca^{2+} en pequeñas concentraciones (como las que hay en la leche) favorece la formación de micelas, pero una concentración 10 veces mayor, provoca por el contrario, la disociación de las caseínas y la precipitación de las sensibles al Ca^{2+} . Las temperaturas bajas favorecen la disociación ya que la estabilidad de los diferentes complejos se reduce hacia 0-5°C. Las caseínas se distribuyen heterogéneamente en la micela, siendo las κ -caseínas, las que se localizan externamente (figura 3)

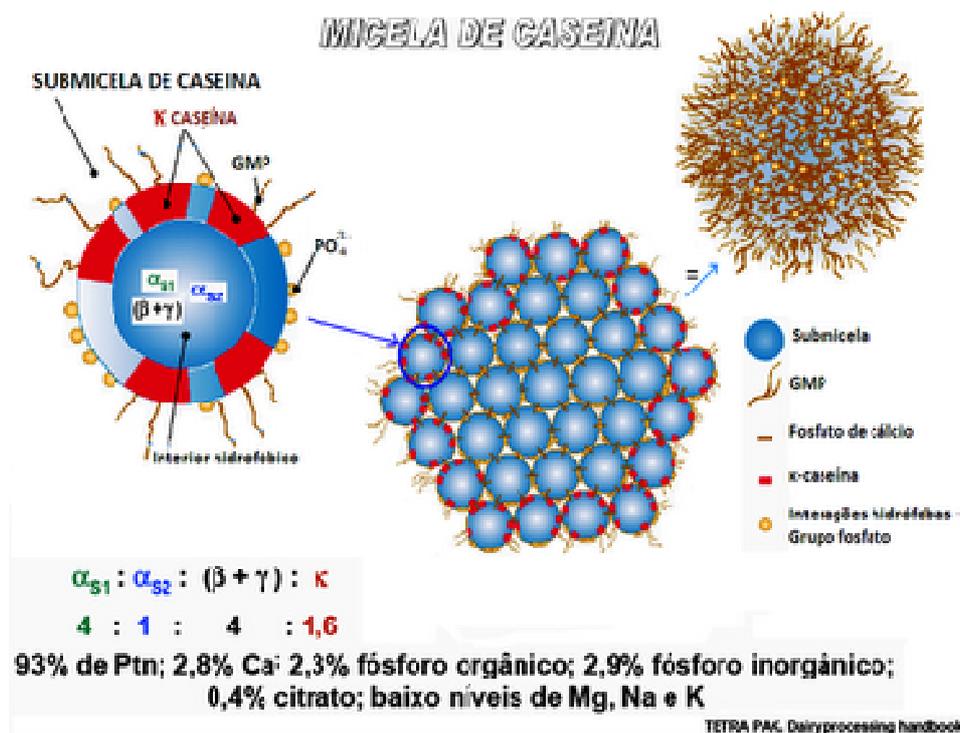


Figura 3. Micela de caseína

Las seroproteínas quedan disueltas en el suero cuando precipitan las caseínas. Son las albúminas (α -lactoalbúmina, Albúmina de Suero Sanguíneo, Albúmina de Suero Bovino-BSA-), las globulinas (inmunoglobulinas, β -lactoglobulina, lactoferrina) y las proteosomas-peptonas. La lactoferrina posee elevada afinidad por el hierro, actúa como agente quelante de hierro, nutriente esencial para los microorganismos, por lo que su presencia disminuye la capacidad de éstos para reproducirse. Existen otras sustancias en la leche con actividad antimicrobiana, son la lisozima y lactoperoxidasa, que se comentan a continuación en el apartado de enzimas.

La leche también contiene enzimas, a continuación se describen los más importantes:

- **Lactoperoxidasa:** libera oxígeno atómico de los peróxidos como el agua oxigenada para transferirlo a otras moléculas oxidables, se inactiva calentando a 75°C 30 minutos o 80°C 30 segundos. Se utilizaba para comprobar la eficacia del tratamiento térmico de la leche (reacción de Storch). Se considera que tiene actividad antimicrobiana porque oxida el tiocianato (SCN^-) dando compuestos tóxicos, principalmente hipotiocianato ($OSCN^-$). Se considera que la actividad antimicrobiana del hipotiocianato radica en la oxidación de grupos sulfhidrilos

de diversas enzimas y otras proteínas microbianas, aunque también puede oxidar el NADH y el NADPH.

- Catalasa: descompone el agua oxigenada en oxígeno molecular. Aparece ligada a la caseína y precipita con ella. Las leches patológicas (mamíticas) y anormales (calostro) tienen una actividad catalásica elevada. Se inactiva calentando a 75°C 60 segundos. Se utilizaba para detectar fraudes, ya que, en las granjas se añadía agua oxigenada a la leche para disminuir la cantidad de microorganismos. La catalasa al descomponer el agua oxigenada permitía descubrir este hecho.
- Fosfatasa alcalina: hidroliza ésteres fosfóricos. Está adsorbida a los glóbulos grasos. La resistencia al calor de este enzima es ligeramente superior a la de las bacterias patógenas que pueden existir en la leche, por ello se mide la actividad de este enzima como control de la pasteurización, tanto alta como baja.
- Lipasas: hidrolizan los triacilgliceroles en glicerol y ácidos grasos, por lo tanto son un factor de rancidez. Los fluoruros, el agua oxigenada, los metales pesados y la acidez la inactivan. Es muy sensible al calor a diferencia de las lipasas de microorganismos contaminantes, se inactiva a 70°C 15 segundos. Se encuentran ligadas a la caseína. La leche también puede contener lipasas de origen microbiano.
- Proteasas: la plasmina es la principal proteasa natural de la leche, es de origen sanguíneo y de naturaleza similar a la tripsina. La leche tiene el sistema plasmina completo formado por su precursor, el plasminógeno, la propia plasmina y sus inhibidores. La plasmina y el plasminógeno se encuentran unidos a la caseína y precipitan con ella en la elaboración de quesos. Es altamente resistente a la temperatura, parece ser que los tratamientos de ultra alta temperatura (en inglés *Ultra-High Temperature* -UHT-) a 142°C 4 segundos solo la inactivan parcialmente, pero tiene muy baja actividad frente a la κ -caseína. La leche también puede contener proteasas de origen microbiano.
- Lisozima: son glucosaminidasas que provocan la lisis del enlace entre el N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina del peptidoglicano de la pared bacteriana. Es de origen leucocitario. En leche de vaca normal es escasa pero abundante cuando la leche presenta leucocitos como respuesta a una infección.

- *Fración lipídica*

La materia grasa de la leche se compone de triacilgliceroles que representan un 98% del total de grasas, fosfolípidos que constituyen el 0,5-1% del conjunto y sustancias insaponificables que son solubles en grasa e insolubles en agua y suponen el 1% del total de grasas. Los triacilgliceroles son ésteres de glicerol y ácidos grasos. Los ácidos grasos mayoritarios en la leche son el ácido palmítico (saturado) y el ácido oleico (insaturado). Los triacilgliceroles pueden hidrolizarse por compuestos químicos o por lipasas, dejando libres los ácidos grasos y el glicerol que lo componen dando lugar al enranciamiento de la leche asociado a sabores indeseables.

Los lípidos se agrupan en la leche originando glóbulos (figura 4), con un “core” hidrófobo formado principalmente por triacilgliceroles y una membrana formada principalmente por fosfolípidos y lipoproteínas (*Milk Fat Globular Membrane*, MFGM). Los glóbulos de grasa se encuentran en emulsión en la leche y de forma dispersa y se extraen fácilmente de ella.

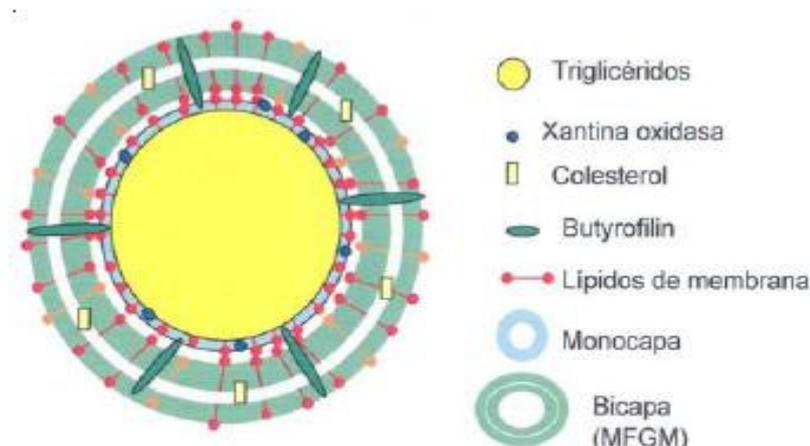


Figura 4. Estructura del glóbulo graso de leche bovina

- *Glúcidos*

El principal glúcido de la leche es la lactosa. Es un disacárido formado por glucosa y galactosa. La principal fuente de lactosa en la naturaleza es la leche. Se encuentra soluble en el lactosuero. Es más abundante en la leche humana que en la de rumiantes (en la leche humana la concentración se encuentra alrededor de 62 g/L y en la leche de vaca se encuentra alrededor de 50 g/L).

La lactosa interacciona con las sustancias nitrogenadas de la leche en una serie de reacciones complejas conocidas con el nombre genérico de reacciones de *Maillard* que conducen a la formación de compuestos condensados y reductores de color oscuro. Ocurren cuando la leche se calienta a altas temperaturas y tiempo prolongado y también se observa en la leche en polvo almacenada largo tiempo correspondiendo con un “envejecimiento bioquímico”.

La lactosa es el componente más lábil frente a la acción microbiana. La transforman en ácido láctico y en otros ácidos alifáticos. Este hecho está implicado activamente en la fabricación de queso.

- *Vitaminas*

La leche contiene la mayoría de las vitaminas pertenecientes a los dos grandes grupos: liposolubles e hidrosolubles. Su concentración es reducida.

- Vitaminas liposolubles: A, D, E, K. Se encuentran asociadas al glóbulo graso. Por ello se concentran en natas y mantequillas y se pierden en la leche desnatada y el lactosuero.
- Vitaminas hidrosolubles: vitaminas del grupo B, vitamina C, etc. Se encuentran en la fase acuosa de la leche.

Las vitaminas se inactivan por el calor, por la oxidación y por la luz; por ello los procesamientos industriales pueden afectar al contenido vitamínico de la leche, aunque no todas se ven afectadas por igual.

- *Minerales*

Los minerales se encuentran en todas las leches en una proporción que varía entre 3-10 g/L. Es una proporción baja pero algunos forman parte estructural importante de las proteínas, como el fosfato, el calcio y el magnesio. Se encuentran principalmente en forma de cationes y aniones: Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , PO_4^{3-} , caseinatos, citratos; unidos a caseínas o libres.

- *Otros componentes*

La leche contiene una pequeña fracción de gases que pueden presentarse disueltos, dispersos o ligados. Suponen entre un 6-10% en volumen. Los principales son oxígeno molecular, dióxido de carbono y nitrógeno molecular.

2.2.2 Origen de la microbiota de la leche cruda

Dada su riqueza nutritiva y elevado contenido en agua, la leche es un medio muy rico para la gran mayoría de microorganismos.

La leche se produce de manera estéril en la glándula mamaria pero al salir por los conductos galactóforos y ya en contacto con la superficie de la ubre se puede contaminar tanto por células somáticas del propio animal como por numerosos microorganismos. Estos también pueden alcanzar la leche en cualquier paso del procesado si no se toman medidas de higiene adecuadas.

- *Microorganismos procedentes de las ubres*

La leche contiene microorganismos que están presentes en los conductos galactóforos, incluso si el animal está sano, y en la superficie de las ubres. Por ello, la leche recién ordeñada presenta normalmente alrededor de 5.000-50.000 ufc/ml. Los microorganismos saprófitos de la ubres son principalmente bacterias del ácido láctico (estreptococos lácticos y lactobacilos) y micrococcos (Gram positivas). Si el animal está enfermo, además puede transferir a la leche especies patógenas.

- *Microorganismos de otra procedencia*

Durante el ordeño, almacenamiento, transporte desde la granja a la industria, la leche se puede contaminar por otros microorganismos procedentes del propio animal, del ambiente (lecho, suelo, aire, agua), de la maquinaria de ordeño y de los manipuladores. La contaminación posterior al tratamiento es improbable dado que a partir de este momento el manejo de la leche en la industria se realiza en condiciones de esterilidad, pero puede haber defectos en los envases que permitan la entrada de aire y contaminantes ambientales que alteren la leche antes de llegar al consumidor.

Las principales fuentes de contaminación son las siguientes:

- Tegumentos y heces del animal: pueden aportar bacterias esporuladas de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, así como bacterias de origen intestinal como las enterobacterias (incluyendo patógenas, por ejemplo *Salmonella*). Estos microorganismos junto con los procedentes de las ubres constituyen la “contaminación endógena”.
- Equipos de ordeño y de almacenamiento de la leche: bacterias del ácido láctico y micrococcos (Gram positivas), también *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* (Gram negativas) y levaduras.
- Suelo, agua, aire y piensos: esporas de bacterias y hongos del suelo, incluyendo bacterias filamentosas del género *Streptomyces* (Gram positivo), Gram negativas aerobias procedentes del agua (*Pseudomonas*), esporas y micrococcos del aire, microbiota diversa de piensos (ensilado) como bacterias del ácido láctico y *C. butyricum*. El lecho del animal puede contener microorganismos que procedan de éste, de los piensos y del ambiente.
- Manipuladores: sobre todo *Staphylococcus*, procedentes de las manos pero también del tracto nasofaríngeo, y microorganismos de origen fecal.
- Vectores: insectos que pueden transmitir microbiota diversa.
- Las levaduras y mohos que pueden encontrarse en la leche son: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefyr*, *Toluropsis lactis-condensi*, *Debattyomyces hansenii* (levaduras) y *Geotrichum candidum*, *Penicillium casei*, *P. roqueforti*, *P. camembertii* y *Mucor*, (mohos) y otros.

2.2.3. Alteraciones microbianas de la leche y productos lácteos

La refrigeración de la leche en las granjas y en las cisternas de transporte hasta la industria, ha influido considerablemente en la naturaleza de la microbiota de la leche cruda. Antes de la implantación de la refrigeración para conservar la leche recién ordeñada, la alteración más frecuente era la acidificación y cortado. La microbiota dominante la constituían bacterias acidolácticas, que crecen a temperaturas superiores a 10°C (mesófilas) y producen ácido láctico a partir de la lactosa. Éste ácido provoca una caída del pH que, cuando desciende por debajo del punto isoeléctrico de las caseínas (pH 4,6), hace que éstas coagulen dando lugar al cortado. Entre 10 y 37°C las bacterias lácticas más frecuentemente implicadas en dichas alteraciones eran *Lactococcus lactis* y

los *Lactobacillus* spp. Otras bacterias contaminantes de la leche como los coliformes, estafilococos y enterococos también pueden fermentar la lactosa en esas condiciones. Por encima de 37°C intervienen principalmente *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. Tras la pasteurización puede producirse también acidificación, con o sin producción de gas, por *Clostridium* y *Bacillus*, productores de endosporas.

El enfriamiento rápido y la refrigeración de la leche hicieron disminuir los casos de acidificación y cortado por las bacterias lácticas, favoreciendo el desarrollo de bacterias psicrótrofas, capaces de crecer a la temperatura de almacenamiento de la leche, entre 3 y 7°C. Estas bacterias proceden del suelo, del agua o de los forrajes. Entre las Gram negativas se incluyen especies de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* y *Cytophaga*, mientras que entre las Gram positivas destacan especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*.

Las bacterias psicrótrofas a menudo originan, en condiciones de bajas temperaturas, proteasas y lipasas termorresistentes. Se trata de enzimas extracelulares resistentes a la pasteurización, por lo que se necesitan tratamientos térmicos más drásticos como UHT para inactivarlas, aunque algunos de ellos pueden soportar también éstos últimos. Las proteasas degradan las caseínas produciendo gelificación y agriado y las lipasas actúan sobre los triacilglicérols de la leche liberando ácidos grasos que originan rancidez y mal olor. Las proteasas y lipasas también producen alteraciones en derivados lácteos, por ejemplo, en la fabricación de queso pueden disminuir el rendimiento y provocar la pérdida de caseína y lípidos en el suero; en la mantequilla las lipasas excretadas por *Ps. fluorescens* degradan lípidos produciendo rancidez; en la nata *B. cereus* produce lecitinasas que atacan a los glóbulos grasos dando lugar a un producto más licuado de lo deseable.

Otras alteraciones en la leche ocasionadas por la acción de microorganismos son el hilado o filado, debido a la producción de filamentos mucilaginosos por bacterias como *Alcaligenes*, *Micrococcus* y *Enterobacter*; la alcalinización por producción de amoniaco como consecuencia de la desaminación de aminoácidos por *Ps. fluorescens* y *A. faecalis*; coloraciones anormales por la síntesis de pigmentos por parte de *Ps. aeruginosa* (azul), *Flavobacterium* (amarillo) o *Serratia* (roja); sabores anormales a caramelo, a jabón o a pescado por varias especies de *Lactococcus*, *Pseudomonas*,

Bacillus, y por la levadura *T. amara*; olores anómalos a fruta por la acción de *Ps. fragi*, *F. lactis*, o a caseína por *M. caseolyticus*.

Los derivados lácteos tienen en general unas características especiales que los hace más resistentes a la contaminación microbiana, pero, al mismo tiempo esas características son selectivas para los microorganismos que pueden colonizarlos y alterarlos.

La leche concentrada puede ser alterada por levaduras y hongos osmófilos de los géneros *Torulopsis*, *Penicillium* y *Aspergillus*, ya que tiene una actividad del agua (a_w) reducida respecto a la leche líquida natural.

La mantequilla es una emulsión de la grasa de la leche en agua, que se obtiene mediante batido de la fracción grasa, con un 15% de agua y un 80% de grasa, siendo por su baja a_w , muy estable. Además la adición de sal en su elaboración es también desfavorable para el desarrollo microbiano. Su alteración se debe principalmente a bacterias psicrótrofas, ya que se almacena en refrigeración. *Pseudomonas* y otros bacilos psicrótrofos Gram negativos son responsables de originar rancidez por hidrólisis de la grasa con liberación ácidos grasos. También puede alterarse por la actividad proteolítica de *Alt. putrefaciens* que puede crecer en superficie, dando lugar a olores pútridos y pigmentación superficial. Además, pueden aparecer mohos y levaduras originando coloraciones anormales como *Alternaria*, *Cladosporium*, *Geotricum* (mohos) y *Torula* (levadura) que produce coloraciones negras.

La nata es una emulsión de grasa en agua que no se somete a un proceso de batido. Suele alterarse por *B. cereus* que produce un lecitinasa que ataca a los glóbulos grasos liberando agua, originando un producto más licuado de lo normal.

Los yogures y productos similares, suelen alterarse en escasas ocasiones porque se fabrican con leche pasteurizada y bajo condiciones controladas. Aunque la pasteurización no garantiza la destrucción de bacterias esporuladas, el bajo pH (<4,5) y el mantenimiento de la cadena de frío impiden la germinación de las esporas. Muy esporádicamente pueden aparecer contaminados por *Penicillium*.

Los quesos pueden sufrir alteraciones muy diversas debidas al largo proceso de fabricación, maduración y almacenaje. Las causas de la alteración son variadas: físico-

químicas, malas prácticas en la elaboración y microbiológicas. En los quesos con elevada a_w tipo Camembert o Brie puede aparecer podredumbre blanca o gris, debido al desarrollo de bacterias, levaduras o mohos indeseables en el interior, dando lugar a olores muy desagradables. Son menos frecuentes en quesos de maduración larga tipo manchego. También puede aparecer amargor debido a un desarrollo excesivo de bacterias lácticas que pueden dar lugar a la aparición de péptidos amargos. Las condiciones anaerobias que se dan en el interior del queso pueden facilitar el desarrollo de *C. butyricum*, que puede dar lugar a bolsas de gas que quedan atrapadas en el queso y que si son abundantes pueden derivar en el estallido del mismo. También el ácido butírico que suelen producir confiere un sabor y olor desagradables. Es común la colonización superficial de los quesos por mohos (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*).

2.2.4 Medidas de higiene y criterios microbiológicos en la producción de leche y sus derivados

Los principios de producción de un alimento inocuo, de buena calidad nutritiva y una vida útil prolongada se basan en la adopción de una serie de medidas de higiene y buenas prácticas a lo largo de la cadena alimentaria.

La normativa europea y nacional regula una serie de medidas de higiene en el sistema de producción y en los operadores (Reglamento (CE) 852/2004) y unos criterios de calidad de la materia prima (Reglamento (CE) 853/2004, Reglamento (CE) 2073/2005) esenciales para garantizar la salud de los consumidores y el libre mercado. Toda regulación alimentaria se fundamenta en el Análisis de Peligros y Puntos de Críticos de Control (APPCC) que permite detectar los peligros que pueden acontecer en cada punto de la cadena alimentaria, cómo evitarlos y los responsables de su control.

Las medidas de higiene a llevar a cabo en la recolección, manipulación y almacenamiento de la leche cruda se recogen en el Reglamento (CE) 853/2004, relativo a productos de origen animal, y se resumen a continuación:

- La leche cruda debe proceder de animales sanos, que no muestran síntomas de enfermedad infecciosa que pueda ser transmitida a los humanos a través de la leche, en especial infecciones del aparato genital, enteritis con diarrea, infección en las ubres, libres oficialmente de brucelosis y/o tuberculosis, ni heridas en las ubres; que no se les haya suministrado medicamentos prohibidos (Directiva

96/23/CE) y si les han suministrado medicamentos autorizados, que se haya superado el período de espera prescrito para los mismos.

- El equipo de ordeño, la manipulación y el almacenamiento de la leche deben asegurar la mínima contaminación.
- El ordeño debe realizarse siempre con las ubres limpias y el ordeñador debe asegurarse que la leche cumple con unas buenas características organolépticas y físico-químicas. Si no es así no se destinará al consumo humano.
- La leche se almacenará a temperatura inferior a 8°C si se recoge diariamente y a menos de 6°C si no es así. El almacenamiento de la leche debe realizarse en un lugar separado de donde están los animales, debe tener un buen sistema de refrigeración y todas las superficies y objetos en contacto con la leche deben ser fáciles de limpiar, desinfectados periódicamente y mantenidos en buenas condiciones, con sustancias fácilmente eliminables y no tóxicas.
- Debe mantenerse la cadena de frío durante el transporte y a su llegada a la industria procesadora no debe ponerse a más de 10°C. Las cisternas de transporte deben limpiarse y desinfectarse después de cada transporte si es posible o al menos una vez al día cuando no es posible.
- Estos requisitos de frío no necesitan cumplirse si la leche va a procesarse en menos 2 de horas desde su recogida; si se necesita una temperatura superior por especificaciones técnicas del producto lácteo que se va a elaborar y así está autorizado; y si se cumplen los criterios microbiológicos que se muestran a continuación.
- Deben recogerse muestras representativas y aleatorias de leche de la explotación productora, por personas autorizadas y en condiciones higiénicas adecuadas, que cumplan con los siguientes criterios:
 - Para leche cruda de vaca:
Recuento en placa a 30°C: ≤ 100.000 ufc/ml (media geométrica de dos meses con al menos dos muestras válidas al mes).



Figura 5. Tanques de refrigeración de leche cruda

Recuento de células somáticas por ml: ≤ 400.000 (media geométrica de tres meses con al menos una muestra válida al mes).

- Para leche cruda de otras especies:

Recuento en placa a 30°C: $\leq 1.500.000$ ufc/ml; sin embargo si esta leche se pretende utilizar en la fabricación de productos que no impliquen un tratamiento térmico de la leche, el recuento en las mismas condiciones debe ser ≤ 500.000

- No contener residuos de antibióticos, en cantidad superior a lo permitido.

Para la elaboración de derivados lácteos procedentes de leche de vaca, la calidad microbiológica de la leche justo antes del momento de procesado debe cumplir:

- Para leche cruda: Recuento en placa a 30°C: ≤ 300.000 ufc/ml.
- Para leche procesada: Recuento en placa a 30°C: ≤ 100.000 ufc/ml.

Si esto no se cumple, se debe informar a las autoridades competentes para que corrijan la situación.

- El envasado debe realizarse en condiciones asépticas en el mismo sitio donde se realiza el último tratamiento térmico, y debe ser adecuado para que tras su apertura, siempre quede evidencia de ello.

Los criterios de calidad deben ser controlados por las administraciones según el Reglamento (CE) 854/2004.

Respecto a los criterios microbiológicos de los alimentos, éstos se recogen en el Reglamento (CE) 2073/2005, donde se regulan los límites establecidos de determinados microorganismos patógenos y sus metabolitos en leche y derivados lácteos, así como los métodos analíticos de referencia para la determinación de cada uno de ellos.

2.3 Determinación de la calidad higiénica de la leche

La calidad microbiológica de la leche se debe determinar tanto en la leche cruda como en el producto acabado, así como en los derivados lácteos. Los operadores económicos vinculados a la producción y comercialización de leche cruda de vaca deben realizar unos controles mínimos obligatorios para garantizar que se cumplen los requisitos higiénico-sanitarios y poder comercializar dicha leche. Tales controles afectan tanto a la explotación como al centro lácteo (Real Decreto 1728/2007).

Antes de cargar la leche en la cisterna de transporte, se deben evaluar los siguientes parámetros:

- Color, olor, contaminación macroscópica, apariencia normal.
- Temperatura: ha de ser verificada en el almacenamiento en la granja, en el transporte y en la recepción y almacenamiento en la planta procesadora. Es importante mantener la cadena de frío y procesar la leche en un tiempo adecuado.
- pH: mantenido entre 6,5 y 6,7 indica que no ha tenido lugar actividad microbiológica alterante.
- Acidez titulable: la acidez se puede expresar de varias formas. Una de las más comunes es la acidez en grados Dornic (°D): valoración de 100 mL de leche con NaOH (1/9) N, con fenolftaleína como indicador. La leche normal tiene una acidez de 15°D. Es una medida indirecta de la concentración de ácido láctico presente en la leche, resultado de la fermentación de la lactosa por microorganismos contaminantes.
- Estabilidad al alcohol: es una prueba que se emplea para determinar de manera preliminar la estabilidad de la leche a los tratamientos térmicos. Cuando se mezclan una cierta cantidad de leche con la misma cantidad de una solución alcohólica de cierta graduación, se produce una deshidratación parcial de coloides de proteínas de la leche que pueden desembocar en floculación. La elección de la concentración de la solución de etanol depende del tipo de tratamiento al que se va a someter la leche. Generalmente es de 68% cuando se ensayan leches para la pasteurización, y hasta 72% o más (a veces hasta 74%) cuando se trata de seleccionar leches para la esterilización. Si tras la mezcla, en frío, se observa floculación, la leche no será estable. La floculación ocurre en leches anormales debido a una alteración microbiológica, un contenido anormal de albúminas o un desequilibrio salino (Chavez *et al*, 2004).
- Determinación de residuos de antibióticos “in situ”, al menos para detección de β -lactámicos y tetraciclinas.

En la explotación láctea se deben recoger muestras periódicamente para que sean analizadas por un laboratorio acreditado para determinar los siguientes parámetros: punto crioscópico (entre -0,56 y -0,52°C; si es superior la leche está adulterada con

agua), concentración de grasa, proteínas, extracto seco magro, gérmenes a 30°C y células somáticas.

En la industria procesadora de leche se deben realizar las observaciones y determinaciones citadas anteriormente en la cisterna antes de descargarla. Además, es necesario revisar las condiciones de limpieza de la misma y la temperatura de transporte que no debe superar nunca los 10°C.

Cuando no se cumplen los requisitos establecidos relativos a contenido de gérmenes y células somáticas, los operadores de la empresa alimentaria deben informar a la autoridad competente y adoptar medidas para corregir la situación. Si en un plazo de tres meses no se corrige, se procede a prohibir el suministro de leche por parte de la explotación.

Los resultados de las pruebas analíticas de la leche cruda en la explotación se tienen en consideración para el pago por calidad por parte del comprador al productor.

En los productos terminados se realizan las determinaciones de los microorganismos patógenos y/o toxinas de acuerdo con lo establecido en el Reglamento (CE) 2073/2005, en leche y derivados: *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, enterobacterias coliformes, *E. coli*, estafilococos coagulasa positivos, estabilidad microbiológica y toxinas según el caso.

2.4 Tratamientos térmicos de higienización de la leche

En el Reglamento (CE) 2074/2005, que contempla las medidas de aplicación para lo dispuesto en los reglamentos citados en el apartado anterior, se establece que para garantizar la higiene, la leche cruda y los productos lácteos según el caso, han de someterse a alguno de los tratamientos térmicos que se citan a continuación:

- Pasteurización: Es un proceso tecnológico que se lleva a cabo mediante el uso de calor. Su misión es eliminar los microorganismos patógenos y parte de los saprófitos, sin comprometer las características organolépticas de la leche ni sus cualidades nutritivas. La combinación tiempo/temperatura no está prefijada siempre; depende de la calidad higiénica inicial y la duración requerida del producto. El proceso más frecuente de pasteurización, denominado HTST “*High*

Temperature Short Time”, se realiza a 72-75°C no menos de 15 segundos. Cuando se tratan volúmenes de leche pequeños (100 – 500 L) se emplea una pasteurización más suave durante un tiempo más prolongado, a 63-65 °C durante 30 minutos, denominada LTH “*Low Temperature Holding*”. El reglamento europeo también acepta cualquier otra combinación de temperatura y tiempo que consiga el mismo efecto. En ambos casos se consigue destruir a la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, causante de la tuberculosis, y también inactiva la fosfatasa alcalina (su inactividad se utiliza como evidencia de la pasteurización). La leche así tratada se comercializa como “leche fresca” y se puede conservar entre 4-8°C durante 8-10 días en un envase sin abrir.

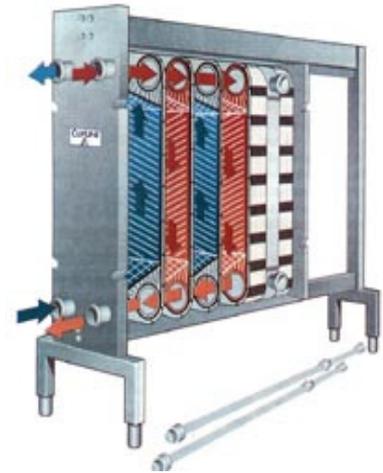


Figura 6. Pasteurizador de placas

- **UHT**: Es un tratamiento en el que se aporta un flujo de calor continuo a alta temperatura durante un breve período de tiempo (no menos de 135°C durante unos segundos), con el fin de que no queden microorganismos o esporas viables que puedan proliferar en el producto tratado cuando sea mantenido en un recipiente aséptico cerrado a temperatura ambiente, y que sea suficiente para garantizar la estabilidad microbiológica de los productos tras un período de incubación de 15 días a 30°C en un recipiente cerrado o de 7 días a 55°C en un recipiente cerrado, o tras cualquier otro método que demuestre que se ha aplicado el tratamiento térmico apropiado.

Además de estos dos procedimientos contemplados por el reglamento europeo, la leche cruda puede someterse a otros tratamientos:

- **Esterilización**: Este tratamiento térmico consiste en aplicar una temperatura de entre 115°C durante 15-20 minutos o 125°C durante 4-5 minutos o combinaciones que alcancen los mismos resultados. En este caso, la leche se puede esterilizar antes o después de ser

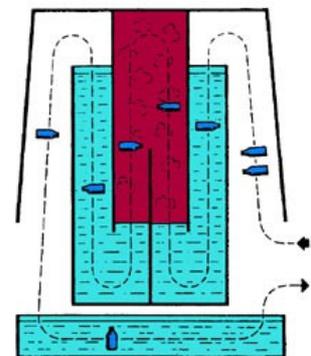


Figura 7. Esquema de un esterilizador de botellas

envasada (figura7). Es un tratamiento que compromete el valor nutricional de la leche y sus características organolépticas.

- **Microfiltración:** También llamada “pasteurización fría”. Es una técnica reciente, que consiste en hacer pasar la leche (desnatada previamente para que la grasa no obture los poros) por unas membranas de tamaño de poro de unas micras que permite retener los microorganismos, incluso las esporas. La nata con el concentrado de bacterias se someten a un tratamiento UHT antes de homogeneizar la leche con la grasa. Pero se requiere posteriormente un tratamiento posterior de pasteurización (exigido por ley). Esta leche puede llegar a durar hasta 35 días en refrigeración, presentando buenas características organolépticas.

2.5 Actividad proteolítica y lipolítica en la leche

La vida útil de la leche pasteurizada se encuentra influenciada por la calidad de la leche cruda (Barbano, 1992). El recuento de bacterias y de células somáticas guarda correlación con la cantidad de enzimas proteolíticos y lipolíticos resistentes al calor en la leche.

Se requieren altos recuentos de bacterias psicrótrofas para que produzcan suficientes proteasas y lipasas resistentes al calor como para alterar la leche después del tratamiento térmico. Medidas de higienización, refrigeración y adición de CO₂ a la leche se usan para controlar el crecimiento de microorganismos totales y psicrótrofos. Pero también se ha correlacionado el recuento de células somáticas con cantidades altas de plasmina y lipoproteína lipasa en leche. La leche incrementa su número de células somáticas cuando las vacas padecen mastitis, inflamación de la ubre que resulta frecuentemente de una infección bacteriana (comúnmente causada por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* spp. y *Mycoplasma* spp. (Riffon *et al.*, 2001). En muchas ocasiones los altos recuentos de células somáticas en muestras de leche tomadas del tanque de refrigeración se deben a unas pocas vacas; es importante por ello identificarlas y aislarlas. Debido a la respuesta inflamatoria, la síntesis de los componentes propios de la leche se reduce y se liberan a ésta una serie de componentes sanguíneos, entre ellos enzimas hidrolíticos que alteran sus características por la ruptura de las caseínas y de las grasas (Grieve *et al.*, 1985). Los principales enzimas liberados

son la plasmina y la lipoproteína lipasa (Azzara *et al.*, 1985), mencionadas anteriormente.

Se han asociado altos recuentos de células somáticas con altas concentraciones de plasmina, plasminógeno y proteasas de origen somático (Verdi *et al.*, 1987), que además puede resistir incluso al tratamiento UHT, quedando una actividad del 30-40% (Alichanidis *et al.*, 1986). La plasmina actúa fundamentalmente sobre la β -caseína, las α 2-caseínas y α 1-caseínas siendo éste el orden de susceptibilidad, mientras que la κ -caseína es resistente. La acción sobre la β -caseína, conduce a la formación de las γ 1, γ 2 y γ 3 caseínas. La lipoproteína lipasa, aunque origina sabores desagradables en leche cruda, se desactiva y desnaturaliza mediante tratamiento con calor. Este enzima actúa cuando el glóbulo graso se rompe o desestructura, cosa que ocurre cuando la leche se agita, mezcla u homogeniza; por ello es importante tener en cuenta estas técnicas.

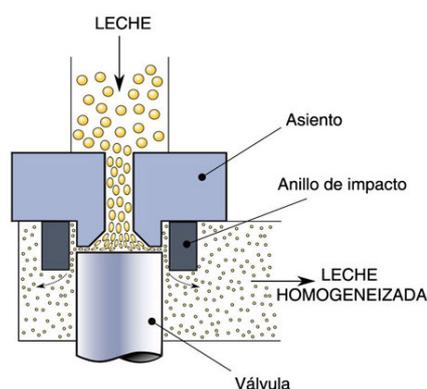


Figura 8. Homogenización de la leche para estabilización de la grasa

La contaminación microbiana se ha ido reduciendo a lo largo de los años por la implementación de exhaustivas medidas de higiene y nuevos diseños de equipos. Vacas en mejores condiciones higiénicas, equipos de “*cleaning in place*”, el rápido enfriamiento de la leche mediante intercambiadores de calor antes de su almacenamiento en tanques de frío, son ejemplos de ello. Pero el rápido enfriamiento y almacenamiento en frío, ha conducido a la selección de las bacterias psicrótrofas en la leche cruda frente a las mesófilas que antes predominaban. Éstas son capaces de liberar al medio proteasas y lipasas resistentes al calor, que contribuyen a la alteración de la leche y productos lácteos.

Las proteasas hidrolizan proteínas liberando pequeños péptidos que causan amargor, gelificación de leche tratada térmicamente y reducen el rendimiento quesero. Concretamente, las proteasas bacterianas causan desestabilización de las micelas de caseínas, hidrolizando más rápidamente a la κ -caseína en una acción similar a la quimosina del cuajo de ternera. La β -caseína es degradada en menor proporción que la κ -caseína y las α 1-caseínas y las α 2-caseínas prácticamente no sufren alteración (Gebre-Egziabher *et al.*, 1980)

Las lipasas catalizan la hidrólisis de triacilgliceroles para dar diacilgliceroles, monoacilgliceroles y ácidos grasos libres (Andrewes *et al.*, 2007), causando defectos en leche, queso, nata y mantequilla. Estas enzimas actúan sobre agregados moleculares del sustrato, que pueden ser monocapas, micelas o emulsiones aceite/agua. Todas estas estructuras tienen en común que se orientan en una interfase. Las lipasas se sintetizan por microorganismos, plantas y animales, pero las de microorganismos son más estables y muchas se comercializan debido a sus aplicaciones biotecnológicas (Borgstrom & Brockman, 1984; Jaeger *et al.*, 2002). En la leche, las lipasas bacterianas actúan sobre glóbulos grasos intactos. Existen diversos tipos de lipasas con diferentes especificidades según longitud de la cadena de los ácidos grasos, estructura, grado de insaturación y posición de corte. Los ácidos grasos que se originan contribuyen de manera diferente a los cambios organolépticos en la leche: los de cadena corta (C_4 - C_8) originan sabores rancios intensos, los de cadena media (C_{10} - C_{14}) originan sabores jabonosos y los de cadena larga (C_{14} , C_{16} , C_{18}) prácticamente no contribuyen al sabor.

Se han aislado numerosos géneros de bacterias en leche almacenada en frío: Gram negativas (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*) y Gram positivas (*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*) (Sørhaug *et al.*, 1997). La predominancia de algunos de estos géneros en la leche cruda se ha visto que puede variar según la estación del año, en función de su temperatura óptima de crecimiento (Hantsis-Zacharov *et al.*, 2007), pero el género más frecuente en leche cruda es *Pseudomonas* (Martins *et al.*, 2006).

2.6 *Pseudomonas* psicrótrofas

El género *Pseudomonas* pertenece al Dominio *Bacteria*, Filo *Proteobacteria*, Clase *Gammaproteobacteria*, Orden *Pseudomonadales*, Familia *Pseudomonadaceae*.

Son bacterias Gram-negativas, no formadoras de esporas, bacilares, con flagelos polares, aerobias estrictas, aunque algunas especies pueden utilizar el nitrato como aceptor terminal de electrones, y positivas para las pruebas de la oxidasa y catalasa.

Su hábitat natural es el suelo y también el agua. Poseen una gran versatilidad metabólica, en gran parte debida a elementos genéticos móviles, como plásmidos y trasposones, que codifican enzimas que permiten degradar gran número de sustratos, por lo que contribuyen al reciclado biológico de la materia orgánica, especialmente *Ps. putida*. Algunas especies sintetizan un pigmento fluorescente en condiciones de baja concentración de hierro, la pioverdina (sideróforo). Pueden ser patógenos oportunistas de animales como *Ps. aeruginosa* (Hattemer *et al.*, 2013) y de plantas como *Ps. viridiflava* (González *et al.*, 2012) o *Ps. syringae* (Rico *et al.*, 2011). Algunas sintetizan cápsula de exopolisacáridos que facilita la adhesión celular, la formación de biopelículas y la resistencia a la fagocitosis, aumentando su patogenicidad.

Las *Pseudomonas* psicrótrofas son reconocidas como importantes microorganismos degradadores por la producción de enzimas extracelulares. Los microorganismos psicrótrofos tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 25 y 30°C, pero pueden crecer también a temperaturas entre -5 y 5°C. Estas bacterias se han aislado a partir de numerosos alimentos mantenidos en refrigeración; la más común aislada en leche es *Ps. fluorescens*, siendo la especie más estudiada como potencial alterante. *Ps. fragi* y *Ps. lundensis* son otras especies de *Pseudomonas* típicamente involucradas en la alteración de leche y productos lácteos (Deeth *et al.*, 2002, Marchand *et al.*, 2009) pero también se han aislado *Ps. aeruginosa*, *Ps. alcaligenes*, *Ps. putida* y *Ps. aureofaciens* (Arslan *et al.*, 2011; Deeth *et al.*, 2002). Aunque las bacterias psicrótrofas se destruyen con los tratamientos térmicos de higienización de la leche, sus enzimas proteolíticos pueden mantener suficiente actividad para degradar las proteínas de la leche UHT conservada a temperatura ambiente, provocando, como se dijo anteriormente, sabores amargos y gelificación.

2.7 Proteasas producidas por *Pseudomonas* psicrótrofas

Actualmente las proteasas son clasificadas en base a tres criterios principales: el tipo de reacción catalizada, la naturaleza química del sitio catalítico y la relación evolutiva.

Las proteasas se dividen en dos grupos principales: exopeptidasas y endopeptidasas, dependiendo del sitio de acción (tabla 2). Las exopeptidasas cortan el enlace peptídico en los extremos amino o carboxi-terminal, liberando un solo aminoácido, mientras que las endopeptidasas cortan las proteínas en enlaces peptídicos internos de la molécula. Basándose en el grupo funcional del sitio activo se clasifican en cuatro grupos: serín-proteasas, aspártico-proteasas, cisteín-proteasas y las metaloproteasas. Dentro de estos cuatro grupos se clasifican en familias dependiendo de su secuencia de aminoácidos. Hay un grupo que no entraría en la clasificación estándar, son las proteasas que necesitan ATP para su actividad.

Exopeptidasas. Las aminopeptidasas suelen ser enzimas intracelulares y generalmente cortan el aminoácido N-terminal de proteínas inmaduras. Están ampliamente extendidas en bacterias y hongos. Las carboxipeptidasas se clasifican en serincarboxipeptidasas, cisteincarboxipeptidasas y metalocarboxipeptidasas, basándose en la naturaleza de los aminoácidos del sitio activo. Se han aislado metalocarboxipeptidasas en *Pseudomonas spp.*, que requieren Zn^{++} o Co^{++} para su actividad.

Endopeptidasas. Se clasifican en serín-proteasas, cisteín-proteasas, aspártico-proteasas y metaloproteasas.

Las serín-proteasas contienen el aminoácido serina en su sitio activo, flanqueado por residuos de glicina; son comunes en bacterias, hongos, virus y eucariotas. Según el pH óptimo de actividad se clasifican en:

- Serín-proteasas alcalinas: con pH óptimo alrededor de 10 y tamaños entre 15 y 30 KDa. *Arthrobacter*, *Streptomyces* y *Flavobacterium spp.* las sintetizan.
- Subtilisinas. Sintetizadas en su mayoría por el género bacteriano *Bacillus*. Con pH óptimo de 10 y temperatura óptima de actividad de 60°C. Hay dos subtipos: Calsberg (utilizada en detergentes) y Nagase o BPN, sintetizadas por *B. liqueniformis* y *B. amyloliquefaciens*, respectivamente.

Las aspártico-proteasas o proteasas ácidas: pH óptimo entre 3-4 y masa molecular de entre 30 y 45 KDa. El sitio activo está formado por Asp-Ser/Thr-Gly

(Aspártico-Serina/Treonina-Glicina). Son sintetizadas por mohos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Neurospora*.

Las cisteín-proteasas se encuentran tanto en procariotas como en eucariotas. Se han caracterizado, por ejemplo, las de *C. histolyticum* y *Streptococcus spp.*

Las metaloproteasas son las proteasas más diversas. Se caracterizan porque requieren un ion metálico divalente para su actividad. Se clasifican en neutras, alcalinas, de *Myxobacter I* y de *Myxobacter II*. Las neutras tienen especificidad por los aminoácidos hidrófobos mientras que las alcalinas muestran gran variedad de dianas. Todas son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA. La termolisina es una proteína neutra, sintetizada por *B. stearothermophilus*, con un átomo de Zn y cuatro de Ca que confieren la termorresistencia. Es muy estable a altas temperaturas (resiste una hora a 80°C). La colagenasa de *C. histolyticum* o la elastasa de *Ps. aeruginosa* son otros ejemplos de metaloproteasas neutras. Las proteasas alcalinas de *Ps. aeruginosa* y *Serratia spp.* son activas entre pH 7 y 9, y ocupan un rango de 48-60 KDa de peso molecular (Rao *et al.*, 1998).

Tabla 2. Clasificación general de las proteasas

PROTEASA	MODO DE ACCIÓN
Exopeptidasas	
<i>Aminopeptidasas</i>	•↓-○-○-○-○---
Dipeptidil peptidasa	••↓-○-○-○---
Tripeptidil peptidasa	•••↓-○-○---
<i>Carboxipeptidasas</i>	---○-○-○-○-○↓•
Serín-proteasa	
Metaloproteasa	
Cisteín -proteasa	
Peptidil dipeptidasa	---○-○-○-○↓-••
Dipeptidasas	•↓-•
<i>Omega peptidasas</i>	*-•↓-○-○---
	---○-○-○↓-•-*
Endopeptidasas	----○-○-○↓-○-○-○---
Serín-proteasa	
Cisteín-proteasa	
Aspártico- proteasa	
Metaloproteasa	
Endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido	

Como se ha citado, las proteasas más comúnmente encontradas en hongos son cisteín-proteasas y proteasas ácidas, mientras que en bacterias están más extendidas las proteasas alcalinas (Apr), las neutras (Npr) y las serín-proteasas (Sub) (Kalisz, 1988).

Tabla 3. Principales endopeptidasas bacterianas (Bach *et al.*, 2000; adaptado de Rao *et al.*, 1998).

Tipo catalítico	Subgrupo	Subclase	Grupos bacterianos que incluyen productores de proteasas (con secuencias de genes en NCBI)	Especies bacterianas
Serín peptidasas	Serín-proteasas alcalinas; Subtilisin-like peptidasas		Grupo CFB (<i>Cytophaga</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Bacterioides</i>), alfa y gamma proteobacterias, <i>Bacillus</i> y <i>Clostridium</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp.	
	Subtilisinas (Sub)	Calsberg, BPN	<i>Bacillus</i> spp.	<i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. liqueniformes</i>
Cisteín-peptidasas			<i>Porphyromonas gingivalis</i> ; <i>Streptococcus pyogenes</i>	
Metaloproteasas	Neutras (Npr)	<i>Termolisinas-like</i>	<i>Bacillus</i> ; <i>Streptococcus</i> spp.; <i>B. subtilis</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Erwinia chrysantemii</i> , <i>Vibrio</i> spp.	<i>B. cereus</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> ,
		Colagenasa	Grupo CFB, <i>Clostridium</i> spp., <i>Vibrio</i> spp., <i>B. cereus</i>	
		Elastasa	<i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Vibrio</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp.	
	Alcalinas (Apr)		Gammaproteobacterias	<i>Ps. fluorescens</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Ps. tolaasii</i> , <i>Erwinia chrysantemii</i> , <i>Serratia marcescens</i>

La actividad proteolítica es más frecuentemente detectada en leche y por ello la mayor parte de la investigación se ha focalizado en la producción y expresión de proteasas (Mckellar, 1989, Liao *et al.*, 1998, Dufour *et al.*, 2008). La metaloproteasa alcalina AprX, codificada por el gen *aprX*, es la principal responsable de la degradación

de la leche (Dufour *et al.*, 2008). Este gen está ampliamente extendido en *Pseudomonas spp.* (Duong *et al.*, 2001, Liao and McCallus, 1998, Kawai *et al.*, 1999), pero su regulación es compleja. Se sabe que está regulado por *quorum sensing* (sustancias acumuladas a medida que aumenta la población microbiana; Liu *et al.*, 2000), por la temperatura (cuando aumenta la temperatura por encima del óptimo de crecimiento disminuye su expresión), por los niveles de hierro en el medio (cuando aumentan los niveles disminuye su expresión; Woods *et al.*, 2001) y por variación de fase (Chabeaud *et al.*, 2001).

Ps. fluorescens, *Ps. lundensis* y *Ps. fragi* son las especies más frecuentemente involucradas en la alteración de la leche (Marchand *et al.*, 2009). *Ps. fluorescens* solo produce una proteasa en concreto, una metaloproteasa alcalina dependiente de zinc, con un pH óptimo entre 6,5 y 8. Este gen se encuentra en un operón formado, en la mayoría de las cepas, por el gen *aprX*, el gen *inh* (inhibidor), tres genes que codifican un sistema de transporte de la proteasa de tipo I, dependiente de ATP (TISS: *Type I Secretion System*), y el gen *lip* de una lipasa, dispuestos en ese orden. En la cepa B52 de *Ps. fluorescens* existen dos genes de proteasas más: *prtA* y *prtB* (Figura 9). El producto del gen *aprX* de dos cepas de *Ps. fluorescens* mostró un peso molecular similar, cercano a los 50 KDa. Este peso molecular fue también constatado por diversos autores que estudiaron la alteración de leche por proteasas (Kumura *et al.*, 1999, Liao *et al.*, 1998).

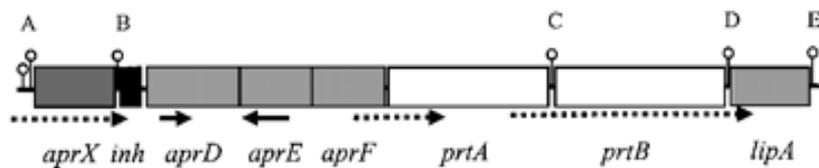


Figura 9. Estructura del operón *aprX-lipA* en *Ps. fluorescens* B52 (Woods *et al.*, 2001)

Esta proteasa pertenece a la familia de las serralisinas, aparentemente bastante conservadas entre las bacterias Gram negativas. Tienen en común: un motivo de unión a zinc, un dominio de unión a calcio caracterizado por contener cuatro glicinas, un gran número de aminoácidos hidrófobos y ningún residuo de cisteína (Kumura *et al.*, 1999). La secuencia de aminoácidos de las metaloproteasas de bacterias poco emparentadas como *Serratia marcescens* o *Erwinia chrysantemii* comparten un 50-60 % de homología con proteasas alcalinas de *Ps. fluorescens* y *Ps. aeruginosa* (Liao *et al.*, 1998, Kumura *et al.*, 1999).

La alteración de la leche y productos lácteos puede generar grandes pérdidas económicas para la industria lechera y también gran cantidad de residuos. Para prevenir la alteración de los productos lácteos, es importante la detección de cepas de *Pseudomonas* con alto potencial alterante en leche.

El hecho de que el gen *apr* esté extendido entre las bacterias y sea conservado, ha permitido que diversos autores hayan desarrollado técnicas de PCR para detectar el gen *aprX* en distintos grupos bacterianos (Marchand *et al.*, 2009, Bach *et al.*, 2001), pero además de las regiones conservadas existen regiones variables y pequeñas diferencias que hacen difícil que funcione un solo par de oligonucleótidos, por lo que podría ser útil la PCR múltiple con oligonucleótidos para detectar diferentes genes de manera simultánea u oligonucleótidos degenerados, que permitan incluir esas diferencias (Bach *et al.*, 2001).

Cabe mencionar que aunque se detecte el gen de la proteasa, esto no indica que haya expresión y por tanto, actividad proteolítica alterante. De hecho, algunos autores comprobaron que diferente actividad proteolítica o ausencia de ella, no se debía a diferencias en la secuencia del gen, sino a una regulación o expresión diferencial (Dufour *et al.*, 2008, Marchand *et al.*, 2009). Se han propuesto por ello técnicas inmunológicas para detectar enzimas proteolíticas, pero para ello se debe conocer mejor la composición y estructura de las proteasas.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos son moléculas de ADN de unos pocos nucleótidos. Éstos se utilizan como cebadores (denominados también iniciadores o *primers*) en la replicación natural del ADN, ya que la polimerasa requiere siempre un extremo 3' OH donde añadir los nucleótidos complementarios a la cadena que se está copiando. También se utilizan en la PCR de manera artificial donde se unen por complementariedad de bases a los extremos de un segmento de ADN (previa desnaturalización) que se quiere copiar y amplificar, con el mismo objetivo, servir de cebador a la polimerasa.

En este trabajo se diseñaron oligonucleótidos para amplificar fragmentos internos de genes de proteasas, previamente detectados en cepas de *Ps. fluorescens*, partiendo de secuencias ya descritas en la bibliografía. Con esto se pretendió obtener, mediante PCR, múltiples copias de dichos fragmentos, que nos permitieran posteriormente caracterizarlos bien directamente por secuenciación o mediante clonación y secuenciación.

El diseño de oligonucleótidos constó de los siguientes pasos:

1) Búsqueda de secuencias de proteasas en bases de datos

Se partió con una búsqueda en bases de datos del mayor número de secuencias de genes de enzimas proteolíticas descritos en *Ps. fluorescens*. Se recurrió, para ello, a la página web del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, que aporta además, información bibliográfica.

Las secuencias se depositan en las bases de datos con un número de acceso (*Accession Number*) que permite su identificación y búsqueda rápida por parte de los investigadores (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>). Las secuencias encontradas con su número de acceso así como los genes a los que pertenecen, las cepas y la publicación donde se describen se muestran en la tabla 9 (Resultados y Discusión).

2) Alineación de secuencias para obtener secuencias consenso. Las secuencias encontradas se descargan en formato FASTA. A continuación se abren los archivos con las secuencias a alinear con la aplicación *Contig Express* del programa *Vector NTI®* de Life Technologies™. Se seleccionan las secuencias y se aplica la herramienta

“*Assemble Selected Fragments*”. Inmediatamente aparecen las secuencias consenso bajo la denominación “*Contig*”. En primer lugar se realizó el ensamblaje de las 13 secuencias de proteasas incluidas en la tabla 10 (contig 0), viéndose así que 10 de ellas tenían regiones comunes, pero se vio que había demasiadas diferencias en la secuencia consenso respecto a cada una individual como para diseñar sobre ella los cebadores. Entonces, se llevó a cabo el ensamblaje en grupos de 5 secuencias, para encontrar el mayor número de similitudes y encontrar así las secuencias que más se parecían entre ellas. En la tabla 10 se muestran los diferentes “contigs” o secuencias consenso obtenidas y las secuencias que incluyeron. Las tres últimas secuencias no entraron en la alineación.

3) Diseño de los oligonucleótidos. Una vez tenemos las secuencias consenso, se copian y abren con en el programa *Clone Manager Suite 9*. Este programa puede generar automáticamente los *primers* más adecuados con la herramienta “*Design Primers*” pero no tiene en cuenta las diferencias de las secuencias individuales respecto a la secuencia consenso. Por ello se realizó una búsqueda manual de los oligonucleótidos en aquellas regiones de la secuencias consenso que mostraron menos diferencias con las secuencias individuales. De este modo, se conseguiría que los oligonucleótidos pudieran hibridar con el mayor número de secuencias, y hubiera más probabilidad de amplificar el gen o genes de proteasas de la cepa de *Ps. fluorescens* alterante de la leche.

Los criterios a tener en cuenta a la hora del diseño de los oligonucleótidos se exponen a continuación:

- Tamaño: suelen ser de 20-25 nucleótidos. Se diseñaron de 20 pb.

- % GC: debe estar entre 40 y 60%, si es superior se necesita una temperatura elevada para la desnaturalización porque la hibridación con el ADN molde es muy estable mientras que si es inferior, la unión con es débil y poco estable.

- Tm: *Melting temperature* o temperatura de fusión, es la temperatura a la que los oligonucleótidos se desnaturalizan. Lo ideal es que esté comprendida entre 55 y 65°C y debe ser igual para los dos oligonucleótidos utilizados en la PCR. Se calcula con la siguiente fórmula: $T^a \text{ hibridación} = [2x(A+T) + 4x(G+C)] - 4$

- Estabilidad: relacionada con la T_m y la composición de los oligonucleótidos. Mide la ΔG entre el extremo 5' y el extremo 3' en Kcal. Debe ser $\leq 1,2$ Kcal.

- Dímeros: se debe evitar que los oligonucleótidos hibriden entre sí por tener secuencias complementarias. La formación de dímeros de oligonucleótidos reduce la probabilidad de hibridación con la molécula de ADN molde.

- Horquillas (*hairpins*): esto sucede cuando en un mismo oligonucleótido existe complementariedad de bases entre secuencias internas. Se debe evitar por la misma razón que en el caso anterior.

- *Run of bases*: sucede cuando un oligonucleótido tiene varios nucleótidos seguidos iguales. Esto puede generar uniones inespecíficas con el ADN molde en el caso de repeticiones de Gs o Cs o aberturas en el apareamiento oligonucleótido-templado en el caso de As o Ts. No deben diseñarse oligonucleótidos con más de 4 bases iguales seguidas.

- *GC Clamp*: significa presencia de bases G o C en el extremo 3'. Hace que haya una fuerte interacción entre el oligonucleótido y el templado, pudiendo favorecer una unión inespecífica. Se debe evitar que los oligonucleótidos tengan más de 3 bases GC en los últimos 5 nucleótidos del extremo 3', sin embargo, una única base G o C en dicho extremo es favorable para mantener el oligonucleótido unido al templado.

- Diferencias en el extremo 3': ya que los oligonucleótidos se diseñan sobre la secuencia consenso y esta puede tener diferencias respecto a las secuencias individuales, se debe evitar que estas diferencias se localicen en el extremo 3' del oligonucleótido, para aumentar la probabilidad de unión y estabilidad con la secuencia homóloga que tengan las bacterias objeto de estudio.

Teniendo en cuenta estos criterios se diseñaron los oligonucleótidos más adecuados para amplificar secuencias de genes de proteasas.

Una vez diseñados, los oligonucleótidos se compraron a la compañía Sigma Aldrich®. Éstos son enviados en tubos de forma deshidratada. Se resuspenden en H_2O milliQ y se preparan alícuotas de uso a concentración 10 mM.

3.2 Extracción de ADN

A partir de la cepa de *Ps. fluorescens* procedente de la muestra de leche LA1, y conservada a -70°C en solución de glicerol, se tomó un volumen de $4\ \mu\text{l}$ y se sembró en estrías por agotamiento en LA (tabla 8), para obtener colonias aisladas. La incubación se realizó durante 24 horas a 37°C . A continuación con un asa de siembra o punta de pipeta estériles se recogió inóculo de una colonia y se pasó a 5 ml de medio líquido LB (ver tabla de medios apartado 3.9), se incubó en agitación durante 24 horas a 37°C . Tras esto, se procedió con el protocolo de extracción de ADN.

Para extraer el ADN del cultivo líquido de bacterias se utilizó el *Gen Elute™ Bacterial Genomic DNA kit* de Sigma Aldrich®. El protocolo se divide en los siguientes pasos (ver figura 10):

1. Se centrifuga 1,5 ml de un cultivo líquido de bacterias dos minutos a 13.000 rpm. Eliminar el sobrenadante completamente.
2. Añadir $20\ \mu\text{l}$ de solución RNasa, mezclar e incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente.
3. Añadir $20\ \mu\text{l}$ de solución de Proteinasa K a la muestra. Mezclar e incubar 30 minutos a 55°C .
4. Añadir $200\ \mu\text{l}$ de solución de Lisis C, mezclar con vórtex 15 segundos, incubar a $55\ ^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos.
5. Depositar la columna en un tubo de 2 ml y añadir $500\ \mu\text{l}$ de la solución de preparación de la columna. Centrifugar a 11.000 rpm, 1 minuto. Desechar el eluído.
6. Añadir $200\ \mu\text{l}$ de etanol 95-100% al lisado (paso 4) y mezclar en vórtex durante 5-10 segundos. Es importante que se mezcle bien.
7. Transferir todo el contenido del tubo del paso anterior a la columna. Centrifugar a 8.000 rpm, 1 minuto. Desechar el tubo conteniendo el eluído y poner la columna en un tubo nuevo de 2 ml.
8. Añadir $500\ \mu\text{l}$ de Solución de Lavado 1 a la columna y centrifugar 1 minuto a 8.000 rpm. Retirar y conservar la columna, desechar el eluído del tubo.

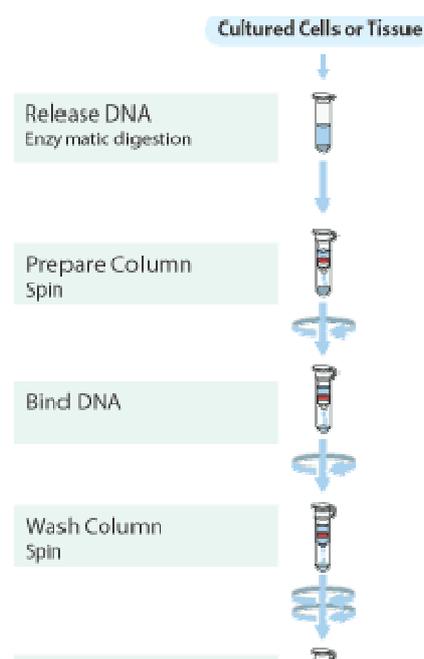


Figura 10. Esquema de los pasos a seguir en la extracción cromosómica de ADN bacteriano.

9. Añadir 500 μl de Solución de Lavado 1 a la columna y centrifugar 3 minutos a 13.000 rpm. Retirar y conservar la columna, desechar el eluido del tubo. Centrifugar de nuevo sin añadir nada a la columna durante 1 minuto adicional para eliminar cualquier resto de etanol. Desechar el tubo de 2 ml y poner la columna en un nuevo tubo.
10. Añadir 200 μl del tampón de elución (Tris HCl 10 mM, EDTA 0,5 mM, pH 9,0) directamente en el centro de la columna y dejar incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 8.000 rpm para eluir el ADN.

Almacenar a 4°C para usarlo a corto plazo y a -20°C para usarlo a largo plazo. El tampón de elución estabiliza el ADN a estas temperaturas. La congelación y descongelación pueden dañar el ADN.

3.3 Amplificación por PCR

La PCR permite obtener múltiples copias de un fragmento de ADN. Para ello se repite un número determinado de veces un ciclo de tres fases (figura 11): desnaturalización del ADN molde y de los oligonucleótidos, hibridación de los mismos y extensión por la ADN polimerasa a partir de sus extremos 3'; con una etapa de desnaturalización inicial más duradera para separar totalmente las hebras del ADN y una extensión final para terminar de extender todos los oligonucleótidos.

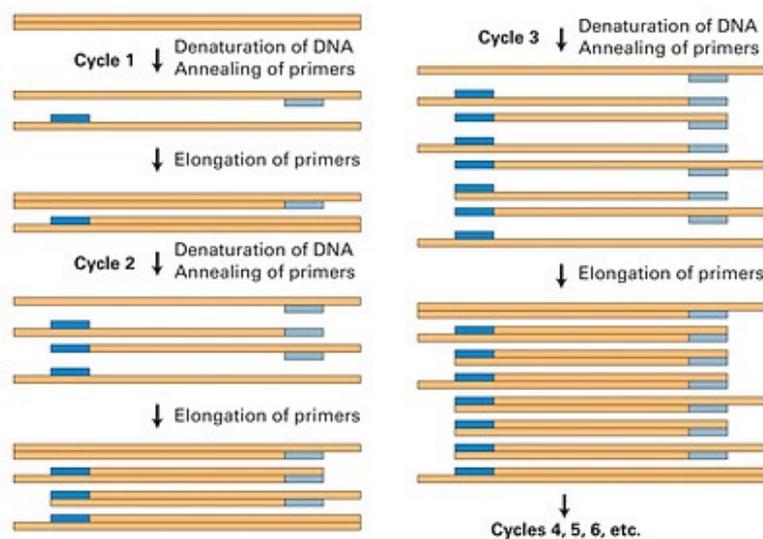


Figura 11. Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Biología Molecular y Celular*. Lodish. 5ª Edición

Al final de la PCR se obtienen 2^n copias del fragmento de interés a partir de un solo templado, siendo “n” el número de ciclos.

La temperatura de hibridación de los oligonucleótidos depende de su contenido en A+T y G+C. Cuanto mayor sea el contenido en G y C mayor temperatura necesitará el oligonucleótido para hibridar, ya que estas uniones son más fuertes que las que se producen entre A y T (en el apartado 3.1 se indicó la fórmula para calcular la temperatura de hibridación). Si en una pareja de oligonucleótidos empleada en una reacción de PCR, cada uno de ellos tiene una T_m distinta, se utiliza la T_m , ya que de otro modo, no se produciría el anillamiento del cebador que anilla a menor temperatura.

El tiempo de extensión de los oligonucleótidos depende del tamaño del fragmento amplificado y también de la capacidad de adición de dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato) de la polimerasa. En general se toma como referencia que la polimerasa tarda 60 segundos en añadir 1000 pb. Con este dato se calcula el tiempo de extensión según la longitud de los amplicones que se quieren obtener con cada par de oligonucleótidos y que se pueden ver en la tabla 13. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso es de 72°C.

Para que la reacción de amplificación tenga lugar se necesita, por tanto, un ADN molde, una pareja de oligonucleótidos que delimiten el fragmento a amplificar, uno en sentido directo (*forward*) y otro en sentido reverso (*reverse*), una mezcla de los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dTTP), una solución tampón con $MgCl_2$ (la ADN polimerasa necesita Mg^{2+} para su actividad) al pH adecuado para que funcione el enzima, el enzima termoestable *Taq* ADN polimerasa (*Taq* hace referencia a la bacteria Gram negativa *Thermus aquaticus*) y agua destilada estéril. También se puede añadir a la mezcla de la PCR una sustancia orgánica llamada DMSO (dimetilsulfóxido) que ayuda a evitar la formación de estructuras secundarias tanto en el ADN como en los oligonucleótidos cuando se reduce la temperatura desde 94°C, utilizada en la desnaturalización, facilitando la unión oligonucleótido-templado y así evitar la aparición de bandas inespecíficas en la PCR.

La mezcla de componentes se prepara en un volumen final de 15, 25 o 50 μ l, según el objetivo de la PCR. En este trabajo se realizó generalmente la reacción en un volumen de 15 μ l, que se emplea para *screening*, es decir, para rastreo o prueba de si

existe o no amplificado y en caso afirmativo ver si el amplicón es del tamaño adecuado, y en un volumen de 50 μl , donde parte se emplea para verificar la amplificación y el resto para secuenciar o clonar el amplicón, si se ha obtenido éste. A continuación se muestra una tabla (tabla 4) con las concentraciones y las cantidades de cada componente de la reacción según el volumen final.

Tabla 4. Concentración y volumen de los reactivos de la PCR en la mezcla

Volumen final (μl)	ADN molde (μl)	Oligonucleótido directo 10 μM (μl)	Oligonucleótido reverso 10 μM (μl)	dNTP 2 mM (μl)	Tampón 10x (μl)	H ₂ O (μl)	Taq Polimerasa 5U/ μl (μl)
15	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	7,42	0,08
25	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	9,87	0,13
50	5	5	5	5	5	19,75	0,25

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- Desnaturalización inicial: 95°C, 4 minutos
- 30 ciclos {
 - Desnaturalización: 94°C, 30 segundos
 - Hibridación de oligonucleótidos: temperatura según tabla 13, 30 segundos
 - Elongación de oligonucleótidos: 72°C, tiempo según tabla 13
- Extensión final: 72°C, 7 minutos

Se realizaron 30 ciclos de los tres pasos intermedios de desnaturalización, hibridación y elongación. Los termocicladores utilizados fueron el *MinicyclerTM Thermal Cycler* (BIO-RAD) y el *Gene Amp PCR System 9700* (PE Applied Biosystems).

3.4 Electroforesis en gel de agarosa

Para comprobar que la PCR ha funcionado y se ha amplificado el fragmento del tamaño adecuado, se realiza la separación de los productos de la reacción mediante electroforesis en gel de agarosa.

La agarosa es un polisacárido que forma un gel tanto más compacto cuanto mayor es su concentración. Se utiliza para separar macromoléculas cargadas, entre ellas el ADN. A mayor concentración, más pequeños son los huecos que deja la matriz del gel y por tanto permite discriminar mejor los fragmentos de ADN de tamaño pequeño.

A menor concentración, forma un entramado más laxo que permite discriminar mejor los fragmentos de mayor tamaño. Utilizaremos disoluciones de agarosa al 1% en tampón TAE para discriminar fragmentos entre 500-1500 pb y de 0,75 % en TAE para tamaños superiores a 1500 pb.

El tampón TAE se preparó como stock, 25 veces más concentrado de lo que se necesita (25X: Tris 242 g, Ácido acético glacial 57,1 ml, 100 ml EDTA 0,5 M pH 8, H₂O MilliQ hasta 2 L), y a partir de éste se prepara la solución de uso (1X) con 40 ml de TAE 25X y 960 de agua destilada. La mezcla de agarosa y tampón se calienta hasta disolver la agarosa y se vierte en un molde de electroforesis con un peine que deja unos pocillos donde luego se deposita el ADN. Se deja enfriar a temperatura ambiente hasta que el gel se haya formado (figura 12).

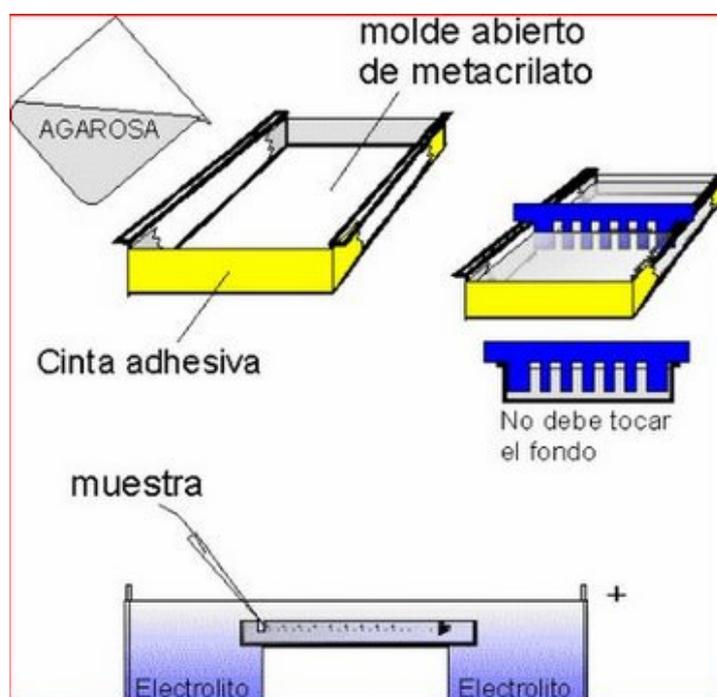


Figura 12. Preparación de un gel de agarosa para separar fragmentos de ADN

El molde con el gel se introduce en la cubeta de electroforesis que está llena de TAE a la misma concentración con la que se prepara la agarosa (1X), y que permite la conducción eléctrica en la cubeta.

Una vez finalizada la reacción de PCR, se le añade a ésta o a un volumen de la misma el tampón de carga (*Loading buffer 10X*) que contiene EDTA 100 mM pH8, glicerol 50%, SDS 1%, azul de bromofenol (p/v) 0,2% y sirve para visualizar el avance del ADN y dar peso a la muestra cuando se deposita en el pocillo. Se añade en una

décima parte del volumen de la reacción de PCR que se carga (entre 5 y 10 μ l normalmente).

En los pocillos de los extremos se carga un marcador de tamaños. En este trabajo se utilizó siempre el ADN del fago λ digerido con el enzima de restricción PstI, que da un patrón de bandas de tamaños determinados. Esto permite estimar el tamaño de los fragmentos que se obtienen en la amplificación por PCR por comparación con los fragmentos de referencia.

Se conectan los electrodos a la cubeta y se corre el gel a 90V, 400 mA y 40 minutos. La diferencia de potencial generada hace que las moléculas de ADN, cargadas negativamente, se muevan desde el polo negativo, cerca del cual se sitúan los pocillos, hacia el polo positivo, separándose en función del tamaño a medida que migran a través del gel. Cuando termina la separación, el gel se tiñe con una solución diluida de bromuro de etidio, que es un fluoróforo que se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN y da fluorescencia naranja cuando se ilumina con luz ultravioleta. El gel se sumerge en esta disolución durante 5-10 minutos y después se eliminan los restos de bromuro de etidio manteniéndolo en agua unos 15 minutos. Por último se visualiza en el transiluminador UV *Gel Doc*TM *XR* de BIO-RAD y se toman fotografías con el programa *Quantity One* de BIO-RAD.

3.5 Purificación de los productos de PCR

Es el paso que se realiza cuando en la PCR obtenemos solo un amplicón bien definido. Entonces se eliminan todos los reactivos que están en la mezcla de la PCR y que pueden interferir posteriormente en la secuenciación, dejando purificado el producto de amplificación.

Para ello se utiliza el *Strataprep PCR purification kit* de Agilent Technologies©. El protocolo se describe a continuación:

1. Se añade un volumen de *DNA-binding solution* igual al volumen de la reacción de PCR en el mismo tubo de microcentrífuga donde se realizó ésta.
2. Depositar una columna de separación en un tubo de microcentrífuga de 2 ml y añadir la mezcla producto de PCR-*DNA-binding solution* a la columna.

3. Centrifugar a velocidad máxima durante 30 segundos. Nota: el producto de PCR es retenido en la matriz de la columna. La capacidad de retención de ésta es de alrededor de 10 µg.
4. Retirar la columna y conservar. Desechar el líquido que aparece en el tubo de 2 ml. Colocar de nuevo la columna en el tubo.
5. Preparar el tampón de lavado 1X (*1X wash buffer*) añadiendo 40 ml de etanol 100% al recipiente *5X wash buffer* (10mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM NaCl). Esto se realiza solo una vez, y se marca en la etiqueta para posteriores usos. Se almacena a temperatura ambiente.
6. Añadir 750 µl del tampón de lavado 1X sobre la columna.
7. Centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos.
8. Retirar y conservar la columna, descartar el líquido y volverla a colocar en el tubo de 2 ml. Repetir los pasos 6 y 7.
9. Centrifugar adicionalmente 30 segundos a máxima velocidad para eliminar los restos de tampón de lavado.
10. Retirar y conservar la columna y depositarla sobre un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml nuevo. El tubo anterior de 2 ml se desecha.
11. Eluir el ADN: añadir 50 µl de agua destilada estéril sobre la matriz de la columna, teniendo cuidado de no tocarla. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
12. Centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos.
13. El ADN se obtiene en el eluido. Desechar la columna y almacenar el producto de PCR a -20°C.

3.6 Purificación de fragmentos de ADN separados en gel de agarosa

Como resultado de la PCR se obtuvieron varias bandas inespecíficas en la electroforesis, por lo que para secuenciar la banda del tamaño adecuado se procedió a recortarla del gel y purificarla. También se realizó cuando el fragmento se digirió posteriormente y se ligó con un vector de clonación.

La reacción de PCR realizada en volumen de 50 µl, se carga en el gel de agarosa en dos pocillos unidos. Una vez realizada la electroforesis se recorta la banda adecuada visualizando el gel en el transiluminador UV.

Se utilizó el kit *StrataPrep DNA Gel Extraction* de Agilent Technologies©. Este kit contiene unas columnas de microcentrífuga con una matriz de fibra de sílice. La agarosa se disuelve en presencia de sales caotrópicas y el ADN queda unido a la matriz. Después de varios lavados para eliminar la agarosa, el ADN se libera de la matriz de fibra de sílice con un eluyente adecuado. El protocolo a seguir se describe a continuación.

1. Se pesan los tubos de microcentrífuga con la banda recortada en balanza de precisión, haciendo 0 con un tubo vacío. Preferentemente se deben usar tubos de 2 ml. Se añaden 300 µl de tampón de extracción de ADN por cada 100 mg de agarosa.
2. Se calienta la mezcla durante al menos 10 minutos en un baño de 50°C, agitando de vez en cuando. Comprobar que la agarosa se ha disuelto completamente antes de continuar con el siguiente paso.
3. Colocar la columna con la matriz de fibra de sílice en un tubo nuevo de 2 ml y transferir la mezcla a la columna con cuidado de no dañar la matriz.
4. Se centrifuga a máxima velocidad durante 30 segundos. Nota: el ADN queda unido a la matriz, la capacidad máxima de retención es de 10 µg.
5. Se prepara el tampón de lavado 1X (*1X wash buffer*) añadiendo el mismo volumen de etanol 100% al recipiente que contiene 25 ml de *2X wash buffer* (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, 2,5 mM EDTA). Esto se realiza solo una vez, y se marca en la etiqueta que ya se ha añadido el etanol para posteriores usos. Se almacena a temperatura ambiente.
6. Terminada la centrifugación, se retira y conserva la columna y se desecha el líquido. Se vuelve a depositar la columna en el tubo de 2 ml vacío.
7. Se añaden 750 µl del tampón de lavado 1X sobre la columna.
8. Centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos.
9. Retirar y conservar la columna, descartar el líquido y volverla a colocar en el tubo de 2 ml vacío. Repetir los pasos 7 y 8.
10. Centrifugar adicionalmente 30 segundos a máxima velocidad para eliminar los restos de tampón de lavado.
11. Se retira y conserva la columna y se deposita sobre un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml nuevo. El tubo anterior de 2 ml se desecha.

12. Elución del ADN: añadir 50 µl de agua destilada estéril sobre la matriz de la columna, teniendo cuidado de no tocarla. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
13. Centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos.
14. Se obtiene el ADN en el eluido. Desechar la columna y conservar el producto de PCR a -20°C. Nota: para tamaños entre 250 pb y 9 kb se espera un porcentaje de recuperación del 80%.

3.7 Secuenciación

Una vez purificados los productos de PCR, se procedió a su secuenciación. Actualmente existen varias metodologías de secuenciación, pero normalmente se emplea la secuenciación cíclica automática (figura 13), que es similar a una amplificación convencional.

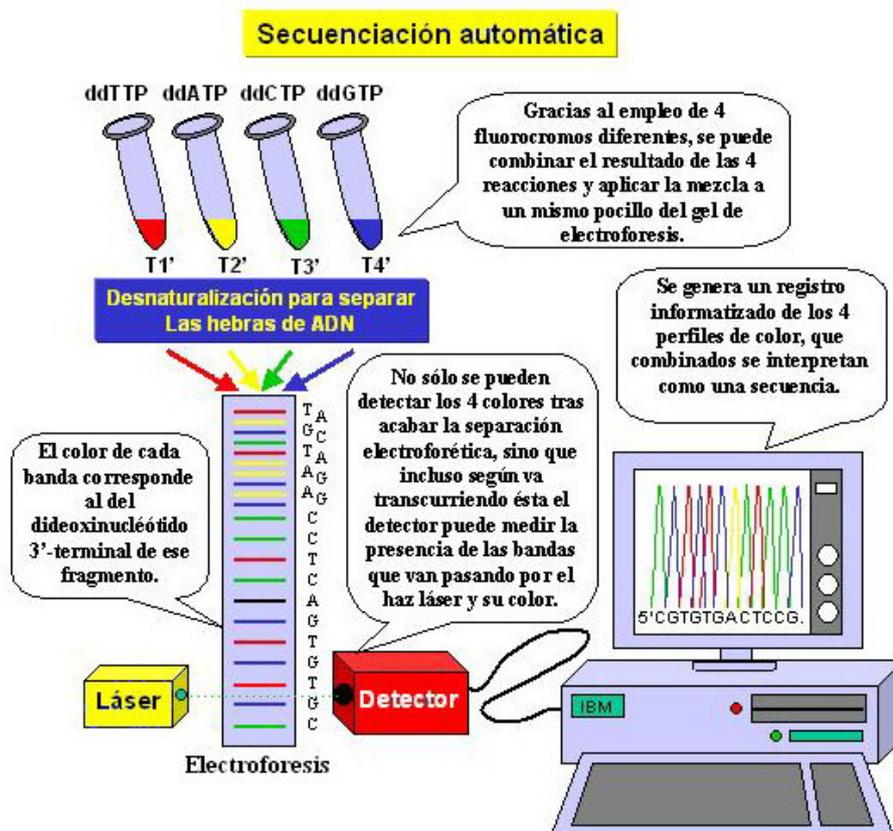


Figura 13. Secuenciación automática

Para la reacción se necesitan la ADN polimerasa termorresistente, el ADN molde (producto de la amplificación anterior), los 4 dNTPs y el tampón de la polimerasa. Pero en la secuenciación cíclica se utiliza un único oligonucleótido iniciador, de manera que solo se sintetiza una cadena por reacción. Además de los dNTPs, en esta reacción se añaden ddNTPs (dideoxirribonucleótidos) marcados con un fluorocromo diferente cada uno, que cuando son incorporados por la ADN polimerasa interrumpen la síntesis de ADN. Si los ddNTPs están marcados por fluorocromos diferentes se lleva a cabo una única reacción, si no es así, se llevan a cabo cuatro reacciones separadas. Los fluorocromos permiten identificar el nucleótido añadido en la última posición. Ajustando las condiciones de la reacción, el resultado será una mezcla de fragmentos de todos los tamaños posibles que se diferencian en un nucleótido. Para secuenciar la cadena complementaria se repite el proceso.

Los fragmentos obtenidos se separan en función de su tamaño, generalmente por electroforesis capilar, al ser sometidos a un campo eléctrico. Los de menor tamaño se desplazan más rápido que los de mayor tamaño a través de la matriz que rellena el capilar. Al final de éste, los fragmentos van pasando por un haz de rayos láser que excita el fluorocromo que tiene cada fragmento en el terminador, lo que provoca la emisión de luz de longitud de onda diferente según el fluorocromo. A medida que los fragmentos van pasando por el láser en orden de tamaño, un detector capta la señal emitida, que se transforma y procesa mediante un programa informático, que indica el orden de salida y el terminador que emitió la señal fluorescente, obteniéndose así la secuencia de nucleótidos. El programa informático genera un “cromatograma” (figura 14), donde se muestran los picos correspondientes a los sucesivos fragmentos, utilizando un código de colores que identifica a los distintos nucleótidos terminales. Por encima de los picos se muestra la secuencia.

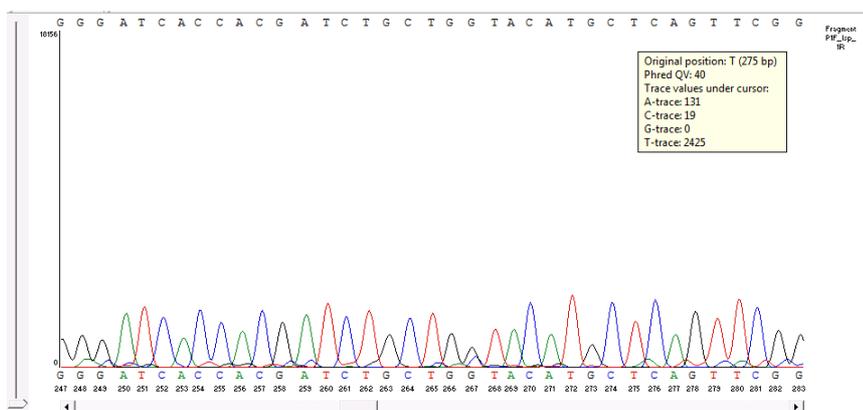


Figura 14. Cromatograma

El número de nucleótidos leídos por un secuenciador automático es de 500 a 900, dependiendo del capilar utilizado en la electroforesis. Normalmente, aunque se necesita un solo iniciador para la secuenciación, se suelen proporcionar los dos iniciadores para confirmar la secuencia en ambas direcciones.

En este trabajo, la secuenciación la llevó a cabo la compañía *Macrogen Inc.* Cuando la secuencia está completada, envían un archivo con extensión “abi”, que contiene el cromatograma. En este trabajo se utilizó la aplicación *Contig Express* del programa *Vector NTI*®, para visualizar el cromatograma y analizar la secuencia.

Una vez tenemos la secuencia, se compara en las bases de datos. Actualmente existen distintas bases de datos, como GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DDBJ (DNA databank of Japan), RDP (Ribosomal Database Project) y RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms). El programa más utilizado en la comparación de secuencias de nucleótidos es “Nucleotide BLAST” (blast.ncbi.nlm.nih.gov), que compara una secuencia problema con las depositadas en una base de datos conjunta integrada por GenBank, EMBL y DDBJ, y calcula la significancia estadística de las alineaciones. Los resultados se presentan en tres secciones

- Representación gráfica del resultado de la comparación. Se utilizan colores para indicar el grado de similitud: de mayor (rojo) a menor (negro). Se observa también la posición y extensión de la similitud (figura 15).
- Lista de las secuencias similares, de más parecidas a menos parecidas.
- Alineamientos entre la secuencia problema (query) y las secuencias similares, encontradas en las bases de datos (subject). Se indica, en cada caso, el porcentaje de identidad.

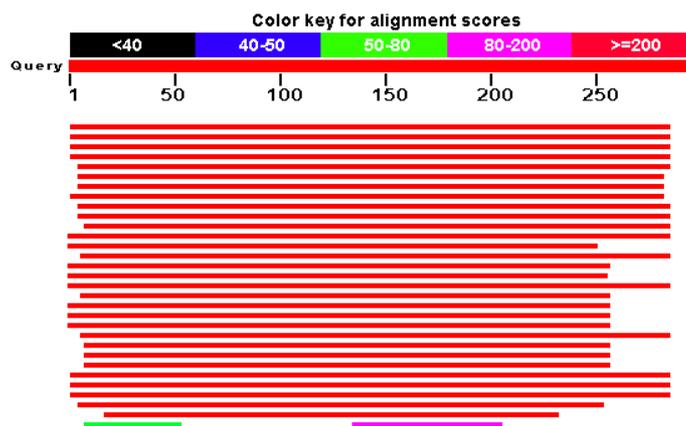


Figura 15. Alineación de la secuencia introducida en BLAST con las depositadas en las bases de datos. Se muestra la secuencia introducida (*Query*) en color rojo mostrando una homología de más de 200 pb (*Color Key Alignment scores*: color rojo) con las secuencias depositadas (barras horizontales rojas de la parte inferior). Debajo de las líneas rojas, aparece una línea verde y otra rosa indicando una similitud con la secuencia introducida de entre 50 y 80 pb y entre 80 y 200 pb respectivamente.

El programa BLAST establece similitudes entre secuencias, lo cual permite identificar el gen correspondiente, inferir la función de la proteína que codifica y establecer relaciones evolutivas o parentescos entre familias de genes.

3.8 Clonación

La clonación consiste en obtener múltiples copias idénticas de un fragmento de ADN mediante replicación *in vivo*. Para llevar a cabo la clonación, el fragmento de ADN se inserta en un vector apropiado, un plásmido en este caso, que se introduce en una bacteria hospedadora mediante un proceso llamado “transformación”. Una vez el vector con el inserto ligado está dentro de la bacteria, ésta lo replica como si fuera propio, obteniéndose múltiples copias del mismo. Posteriormente se realiza una extracción de los plásmidos replicados, se seleccionan aquellos que poseen el inserto que nos interesa y a partir de aquí se puede secuenciar el inserto usando oligonucleótidos universales, externos al sitio de inserción.

El vector que se utilizó para la clonación fue el plásmido pUK1921 (Heinisch, 1993). Este vector tiene un tamaño de cerca de 3 kb y contiene un gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección, así como una secuencia de clonación múltiple (*polylinker*) que incluye sitios únicos de reconocimiento para 10 enzimas de restricción, que hacen posible la clonación direccional. El *polylinker* está localizado en el extremo 5' del gen que codifica el fragmento α del enzima β -galactosidasa *lacZ*, lo que permite la detección de plásmidos recombinantes (figura 16).

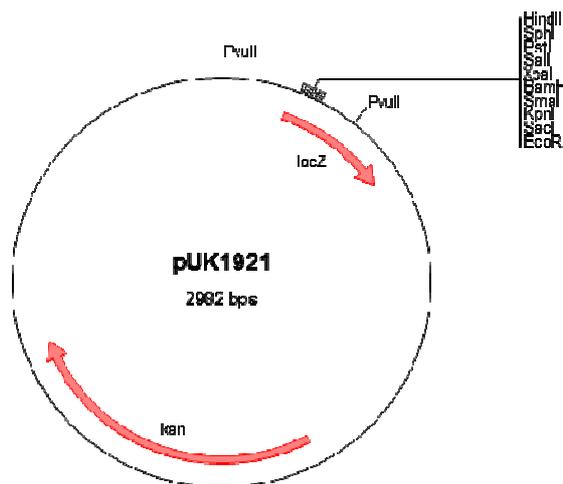


Figura 16. Vector pUK1921 (Heinisch, 1993)

A continuación se explica el procedimiento realizado:

- 1) PCR utilizando oligonucleótidos con sitios diana de enzimas de restricción en los extremos 5'. Se escogieron los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia consenso 7 de proteasa (pcon7) y se añadió en el extremo 5' de cada uno de ellos la secuencia que es reconocida y cortada por los enzimas de restricción elegidos: XbaI y EcoRI para los oligonucleótidos *forward* y *reverse*, respectivamente (tabla 14). Previamente se comprobó que esos enzimas no tenían dianas en el interior del fragmento de interés, ya que de otra manera cortarían también el producto de PCR. El ADN adicional incorporado a los cebadores no afecta a sus temperaturas de hibridación.
- 2) Purificación de la reacción de PCR como se describió en el apartado 3.4
- 3) Purificación del vector. La extracción del vector se llevó a cabo mediante la técnica de lisis alcalina que se describe en el punto 10), a partir de células de *E. coli* DH5a. Posteriormente se realiza una digestión enzimática con algún enzima cuyo sitio de corte se encuentre en el *polylinker* del vector para comprobar su tamaño.
- 4) Digestión de los productos de PCR por un lado y del vector de clonación por otro, con los mismos enzimas de restricción (XbaI y EcoRI), con el objetivo de generar extremos compatibles entre ambos. Los extremos que originan estos enzimas se llaman “cohesivos” (figura 17), y se unen por complementariedad de

bases. Además, al utilizar dos enzimas diferentes se evita la religación del vector.

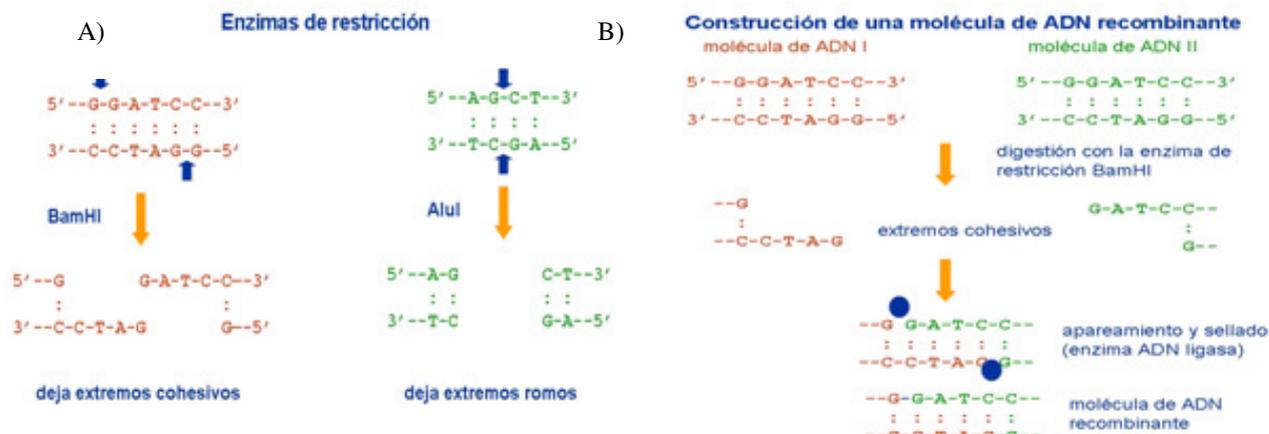


Figura 17. Digestión con enzimas de restricción y ligación. A) Tipo de extremos que dejan los enzimas de restricción al cortar la molécula de ADN. B) Ejemplo de corte con un solo enzima de restricción (BamHI) y ligación de dos moléculas de ADN.

Para realizar la digestión se prepara la mezcla de componentes que se muestra en la tabla 5. El tampón utilizado ha de ser compatible para la actividad de los dos enzimas. En este caso se utilizó el tampón M (composición no mostrada por el fabricante). Se dejó actuar a los enzimas durante 4 horas a 37°C.

Tabla 5. Componentes de la reacción de digestión del producto de la PCR y del vector de clonación

Componente de la mezcla de reacción	Mezcla para digestión de los productos de PCR (μl)	Mezcla para digestión del vector pUK1921 (μl)
PCR / Vector	10	4
XbaI (15U/ μl)	1	1
EcoRI(15U/ μl)	1	1
Tampón M	2	2
H ₂ O	6	12
TOTAL	20	20

5) Ligación del producto de PCR y el vector de clonación digeridos. Primero se lleva a cabo la purificación de ambas reacciones, eliminando así los elementos de la anterior reacción que pueden interferir con la ligación (enzimas, tampón). Para ello se mezclaron 5 μl de la reacción de digestión del vector y 20 μl de la reacción de digestión de la PCR. Se agitó pipeteando para mezclar. A

continuación se utilizó el kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* de ©GE Healthcare, para la purificación, de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Añadir 500 µl de tampón de captura tipo 3 a la muestra y agitar vigorosamente, comprobar que el color es amarillo.
2. Poner una columna en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml y verter en ésta la mezcla anterior. Centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos. Conservar la columna y tirar el líquido recogido en el tubo.
3. Añadir 500 µl de tampón de lavado tipo 1, al que previamente se le ha añadido etanol 100% (volumen según kit), centrifugar a máxima velocidad durante 10 segundos y tirar el líquido recogido.
4. Repetir este paso.
5. Colocar la columna en un tubo *ependorf* nuevo, añadir 15 µl de agua destilada estéril, dejar en reposo 1 minuto a temperatura ambiente, centrifugar a máxima velocidad durante un minuto. Desechar la columna y conservar el eluido que contiene la mezcla de producto de PCR y vector digeridos, para su ligación.

La mezcla de ligación contiene: los 15 µl del eluido anterior, 1 µl de enzima ligasa T4 (1 U/µl), 2 µl del tampón de la ligasa y 2 µl de agua destilada estéril (volumen final 20 µl). La mezcla se mantiene durante toda la noche a temperatura ambiente.

- 6) Obtención de células competentes. Se utilizan células de *E. coli* DH5α para la clonación del vector con el inserto. Para que incorporen este ADN, las células deben estar en estado de competencia, es decir, su membrana debe ser permeable al ADN. El método se describe a continuación:
 1. Crecer a 37 °C y agitación durante una noche una colonia de *E.coli* en 1-2 ml de LB.
 2. Pasar 500-700 µl del cultivo incubado toda la noche a 100 ml de LB. Incubar 2 horas a 37°C en agitación hasta obtener una suspensión de células con una absorbancia de 0,45-0,55 a 600 nm.
 3. Dejar en hielo 10-15 minutos.

4. Centrifugar 5 minutos a 3.800 revoluciones por minuto (rpm) a una temperatura de 4°C, dos tubos con 50 ml de cultivo cada uno. Hay que pesarlos previamente para ver que están equilibrados.
5. A partir de aquí se realiza todo en hielo. Tirar el sobrenadante (en campana de flujo laminar).
6. Resuspender en 5ml de solución RF1 (tabla 6).
7. Mantener 15-20 minutos en hielo.
8. Centrifugar a la misma velocidad que en el punto 4, eliminar sobrenadante (en campana de flujo laminar).
9. Resuspender en 2 ml de RF2 (tabla 6).
10. Mantener 20 minutos en hielo.
11. Alicuotar 200 µl en tubos eppendorf que previamente se habían dejado enfriando a -70°C. Hacer esto en la cámara de 4°C.
12. Guardar a -70°C.

Tabla 6. Soluciones RF1 y RF2 para la preparación de células competentes

RF1 (RbCl 100mM, MnCl ₂ x4H ₂ O 50mM, KAc 30mM, CaCl ₂ x2H ₂ O 10 mM, Glicerol 15%(v/v). Para 1 L:	RF2 (MOPS (ácido 3-morfolino-propano-sulfónico) 10mM, RbCl 10mM, CaCl ₂ x2H ₂ O 70mM, Glicerol 15% (v/v)). Para 1 L:
12 g de RbCl	20 ml MOPS 0,5 M pH 6,8
9,9 g MnCl ₂ x4H ₂ O	1,2 g RbCl
30 ml solución KAc 1M pH 7,5	11 g CaCl ₂ x2H ₂ O
1,5 g CaCl ₂ x2H ₂ O	150 g Glicerol
150 g Glicerol	Ajustar pH a 6,8 con NaOH
pH final 5,8 ajustado con ác. acético 0,2 M	Esterilizar por filtración (filtro 0,22 µm)
Esterilizar por filtración (filtro 0,22 µm)	

- 7) Transformación de la ligación en células competentes de *Escherichia coli*. El vector ligado con el inserto se ha de introducir en una bacteria que llevará a cabo su replicación, generando múltiples copias. Para introducir el ADN ligado en las células competentes, se descongela una alícuota de 200 µl en hielo, se añaden

los 20 µl de la reacción de ligación, se mezcla suavemente y se deja 30 en hielo. A continuación se da un choque térmico calentando a 42°C, 2 minutos (esto hace que el ADN pase al interior de las células), se pone en hielo 1 minuto, se añade posteriormente 1 ml de medio líquido SOC (tabla 8), medio nutritivo isotónico para que las células sobrevivan a las transformación, y se incuba a 37°C durante 1 hora y media o 2 horas, para que se expresen los genes aportados por el vector. Transcurrido este tiempo se siembran 100 µl en una placa y 50 µl en otra, en medio sólido para transformantes: LA suplementado con IPTG, Xgal y kanamicina (tabla 8) Se centrifuga el resto, se desecha el sobrenadante dejando 150 µl aproximadamente, que se siembran en el mismo medio de la misma manera. Las placas se incuban a 37 °C toda la noche.

- 8) Selección de colonias con plásmido recombinado. El medio utilizado contiene componentes que permiten el crecimiento selectivo de las bacterias que han adquirido el vector con el inserto. El IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido) es un inductor del operón *lac* que activa la expresión del gen *lacZ*. El Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) es un sustrato sobre el que actúa el enzima β-galactosidasa, si el gen *lacZ* está intacto, el enzima estará activo y degradará este sustrato dando un producto de color azul (colonias azules), mientras que si el gen está interrumpido por el inserto, no habrá degradación de Xgal y las colonias aparecerán blancas. La kanamicina es el antibiótico que permite seleccionar las bacterias que han adquirido el vector pUK1921 tanto si tiene inserto como si no, de tal manera que solo pueden crecer en la placa las bacterias con el vector.
- 9) Selección de las colonias con plásmido e inserto. Tras el período de incubación se pican las colonias blancas con puntas de pipeta estériles o palillos estériles, que se introducen en tubos con 2 ml de medio LB suplementado con 2 µl de kanamicina 50 mg/ml. Siempre se pone un control negativo sin inóculo para verificar que el medio no esté contaminado. Se incuban a 37°C una noche en agitación.
- 10) Extracción del ADN plasmídico mediante la técnica de lisis alcalina (Sambrook and Russel). Esta técnica permite la extracción o preparación de ADN plasmídico a pequeña escala (1,5-2 ml); por ello se llama Minipreparación o, más comúnmente, Miniprep. El procedimiento se desarrolla de la siguiente manera:

1. Centrifugación de 1,5 ml del cultivo en un tubo *eppendorf* a velocidad máxima durante 2 minutos.
2. Después de eliminar totalmente el sobrenadante, añadir al sedimento que contiene las bacterias 125 µl de Solución 1 (tabla 7), y se agita bien. Esta solución contiene RNasa que degrada el ARN, de manera que solo se extrae el ADN.
3. Añadir 125 µl de Solución 2 (tabla 7) y mezclar por inversión La exposición de las bacterias a un detergente aniónico fuerte a pH elevado, abre la pared celular y desnaturaliza y libera las proteínas, el ADN cromosómico y el ADN plasmídico.
4. Añadir 175 µl de Solución 3 (tabla 7) se mezcla por inversión hasta ver grumos blanquecinos y se deja en hielo 5 minutos. Centrifugar 8 minutos a velocidad máxima y 4°C. Esta solución neutraliza el pH. Con ello el ADN plasmídico que está en forma circular y superenrollado se renaturaliza mientras que el ADN cromosómico que se encuentra fragmentado, en forma lineal, no lo hace.
5. Extraer 400 µl de sobrenadante a un tubo nuevo y añadir a éste 1 ml de etanol absoluto frío, que precipita el ADN. Mezclar por inversión. Centrifugar 5 minutos a velocidad máxima y 4°C. Decantar y secar totalmente, con bomba de vacío, para eliminar restos de etanol. Resuspender en 75 µl de agua destilada estéril. Conservar a -20°C.

Tabla 7. Soluciones usadas en la extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina.

Solución 1	1 ml H ₂ O miliQ, 1,5 µl de RNasa 20 mg/ml
Solución 2 (10 ml)	1 ml de SDS 10%, 1ml de NaOH 2N, 8 ml agua milliQ
Solución 3 (100 ml)	29,5 g de AcK, hasta 60 ml de agua milliQ, ajustar el pH 5.5 con Ácido acético glacial, y completar el volumen hasta 100 ml con agua milliQ.

- 11) Digestión de los plásmidos para comprobar que contienen inserto y seleccionar el plásmido con el inserto que interesa. Para verificar que la extracción plasmídica se ha realizado correctamente y que, como esperamos, el vector contiene inserto, se realiza la digestión de las Minipreps. En este caso en la mezcla de la reacción se añaden 2 µl de la Miniprep, 1 µl enzima XbaI, 1 µl del

enzima EcoRI, 2 µl tampón M, 14 µl de agua (Volumen final 20 µl). Incubar a 37°C, 4 horas.

12) Electroforesis en gel de agarosa al 0,75%. Las condiciones de electroforesis son 80 V, 400 mA, 60 minutos. Si la digestión se ha realizado correctamente, se observará en el gel, una banda del tamaño del vector (3 kb, aproximadamente) y otra banda del tamaño del inserto. Si los tamaños coinciden con lo esperado se secuenciará el inserto a partir del vector, usando oligonucleótidos externos al sitio de clonación.

13) Secuenciación. Ver apartado 3.6

3.9 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados se describen en la tabla 8. Una vez preparados y distribuidos en botellas de 100 mL se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos (el medio de selección de transformantes no se autoclava después, se prepara sobre LA ya esterilizado).

Tabla 8. Medios de cultivo

Medio de cultivo	Composición	Utilización
LB (Caldo Luria-Bertani) Medio líquido	Para 1 L: 5 g de extracto de levadura 5 g de triptona 5 g de NaCl hasta 1 L de H ₂ O	Medio líquido general de crecimiento
LA (Agar Luria-Bertani) Medio sólido	Para 1 L: 5 g de extracto de levadura 5 g de triptona 5 g de NaCl 20 g agar hasta 1 L de H ₂ O	Medio sólido general de crecimiento
LA + IPTG + Xgal + Kanamicina (antibiótico de selección del vector pUK1921)	Para 100 ml de medio LA fundir, dejar enfriar y añadir en campana de flujo laminar: 100 µl de Xgal 20 mg/ml 100 µl de IPTG 200 mg/ml 100 µl de kan 50 mg/ml	Medio selectivo y diferencial para el crecimiento de bacterias transformadas
SOC (<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>)	Para 1 L: 20 g de triptona 5 g de extracto de levadura 3,6 g de glucosa 0,186 g de KCl 0,5 g de NaCl 0,96 g de MgCl Hasta 1 L de H ₂ O	Medio nutritivo para la transformación de células competentes

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Diseño de oligonucleótidos

1) Búsqueda de secuencias en bases de datos

Las secuencias de genes de proteasas y peptidasas de *Ps. fluorescens* descritas en la bibliografía y utilizadas en este trabajo se reúnen en la tabla 9.

Tabla 9. Secuencias de genes de proteasas y peptidasas de *Ps. fluorescens* consideradas en este trabajo

Gen/enzima	Número de acceso	Cepa	Artículo
<i>aprAPF33 / alkaline protease</i>	AB015053	<i>Ps. fluorescens</i> N°33	Kumura <i>et al.</i> 1999
<i>prtA / protease</i>	AF083061	<i>Ps. fluorescens</i> SIKW1	Ahn <i>et al.</i> 1999
<i>aprX / extracellular alkaline metalloprotease</i>	AY298902	<i>Ps. fluorescens</i> A506	Anderson <i>et al.</i> 2004
<i>aprX / metalloprotease</i>	AF004848	<i>Ps. fluorescens</i> CY091	Liao <i>et al.</i> 1998
<i>sn / metalloprotease</i>	AB013895	<i>Ps. fluorescens</i> N° 114	Kumeta <i>et al.</i> 1998
<i>aprX / metalloprotease</i>	AF216700	<i>Ps. fluorescens</i> B52	Woods <i>et al.</i> 2001
<i>aprX / metalloprotease</i>	DQ146945	<i>Ps. fluorescens</i> F	Dufour <i>et al.</i> 2008
<i>aprX / metalloprotease</i>	EU360312	<i>Ps. fluorescens</i> ATCC17400	Dufour <i>et al.</i> 2008
<i>aprX / metalloprotease</i>	EU360311	<i>Ps. fluorescens</i> CIP7325	Dufour <i>et al.</i> 2008
<i>sn / metalloprotease</i>	CP000094	<i>Ps. fluorescens</i> Pf0-1	Silby <i>et al.</i> 2009
<i>sn / zinc protease</i>	CP000094	<i>Ps. fluorescens</i> Pf0-1	Silby <i>et al.</i> 2009
<i>lsp / signal peptidase II</i>	M35366	<i>Ps. fluorescens</i> NCIB 10586	Isaki <i>et al.</i> 1990
<i>pcp / pyrrolidone carboxyl peptidase</i>	X75919	<i>Ps. fluorescens</i> MFO	Gonzales <i>et al.</i> 1994

Se muestra el número de acceso en NCBI, la cepa de *Ps. fluorescens* donde se identificó y los autores de la publicación donde se describen dichas secuencias. sn, sin nombre asignado al gen por los autores. Las secuencias mostradas en gris fueron utilizadas como control.

El gen *aprX* como ya se explicó en el apartado de “Consideraciones teóricas” codifica una metaloproteasa alcalina extracelular, ampliamente extendida entre distintas *Ps. fluorescens* como se puede observar en la tabla 9. Estas cepas se aislaron de leche en la mayoría de los casos. El gen *prtA* (proteasa A), dada la homología que presentó con *aprX* al realizar alineamientos, se puede considerar el mismo.

Se encontraron también genes anotados únicamente como metaloproteasas y una zinc proteasa. En este trabajo se puso de manifiesto que los genes de las metaloproteasas muestran homología con los genes *aprX* de distintas cepas de *Ps. fluorescens*. Sin embargo, éste no es el caso del gen que codifica la zinc proteasa, que sería una metaloproteasa distinta.

En la tabla también se incluyen otros dos genes que no alinearon con las secuencias *aprX*, se trata de los genes *lsp* (peptidasa de la prolipoproteína señal II) y *pcp* (pyrrolidone carboxyl peptidase), utilizados como control. El primero codifica una peptidasa situada en la membrana interna de bacterias Gram negativas que corta una prolipoproteína con péptido señal y la transforma en apolipoproteína, que es modificada posteriormente por N-acilación para dar la lipoproteína de Braun madura, cuya función es unir la membrana externa a la pared celular. El gen *pcp* se detectó en el genoma de una cepa de *Ps. fluorescens* aislada en leche (Gonzales *et al.* 1994). Codifica una peptidasa exocelular del tipo aminopeptidasa, cisteín peptidasa, que elimina el ácido piroglutámico, también conocido como ácido pirrolidona carboxílico, del extremo N-terminal de péptidos y proteínas. Este residuo indica que ese péptido o proteína tienen una función biológica importante. Este enzima está presente en bacterias pero también en plantas y animales. Se utiliza en la secuenciación de proteínas.

2) Alineación de secuencias

La alineación de las secuencias seleccionadas se realizó como se explicó en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos, incluyendo en primer lugar todas las secuencias. Se observó que alinearon 10 de las 13 secuencias, obteniéndose la secuencia consenso (SC) 0. Sin embargo, al existir muchas diferencias entre ellas no se encontraron regiones idénticas lo suficientemente amplias para el diseño de cebadores que permitieran la amplificación de todos los genes comparados. Por ello, se repitieron los alineamientos realizando 10 combinaciones de esas secuencias en las que se tomaron 5 cada vez. Esto se realizó con el fin de encontrar las que presentaran mayor similitud para el diseño de oligonucleótidos específicos. En la tabla 10 se muestran las secuencias que se combinaron en cada alineación, denominando SC 1 a SC 10 a las secuencias consenso resultantes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 10. Alineación de secuencias.

Gen/enzima	Número de acceso (NCBI)	Cepa	SC 0	SC 1	SC 2	SC 3	SC 4	SC 5	SC 6	SC 7	SC 8	SC 9	SC 10
<i>aprAPF33 / alkaline protease</i>	AB015053	<i>Ps. fluorescens</i> N°33	x		x	x	x	x	x			x	x
<i>prtA / protease</i>	AF083061	<i>Ps. fluorescens</i> SIKW1	x	x	x	x	x	x		x	x		
<i>aprX / extracellular alkaline metalloprotease</i>	AY298902	<i>Ps. fluorescens</i> A506	x			x	x	x	x	x	x		
<i>aprX / metalloprotease</i>	AF004848	<i>Ps. fluorescens</i> CY091	x	x						x			x
<i>sn / metalloprotease</i>	AB013895	<i>Ps. fluorescens</i> N° 114	x	x	x	x	x					x	x
<i>aprX / metalloprotease</i>	AF216700	<i>Ps. fluorescens</i> B52	x	x	x					x			
<i>aprX / metalloprotease</i>	DQ146945	<i>Ps. fluorescens</i> F	x						x		x	x	x
<i>aprX / metalloprotease</i>	EU360312	<i>Ps. fluorescens</i> ATCC17400	x				x	x	x		x	x	
<i>aprX / metalloprotease</i>	EU360311	<i>Ps. fluorescens</i> CIP7325	x	x	x	x				x	x	x	
<i>sn / metalloprotease</i>	CP000094	<i>Ps. fluorescens</i> Pf0-1	x					x	x				x
<i>sn / zinc protease</i>	CP000094	<i>Ps. fluorescens</i> Pf0-1											
<i>lsp / signal peptidase II</i>	M35366	<i>Ps. fluorescens</i> NCIB 10586											
<i>pcp / pyrrolidone carboxyl peptidase</i>	X75919	<i>Ps. fluorescens</i> MFO											

Se crearon 10 secuencias consenso (SC) alineando cinco secuencias cada vez (indicadas con x). Tres de ellas, señaladas en gris, quedaron excluidas de los alineamientos.

Los números de acceso corresponden a la base de datos NCBI. sn, sin nombre asignado al gen por los autores.

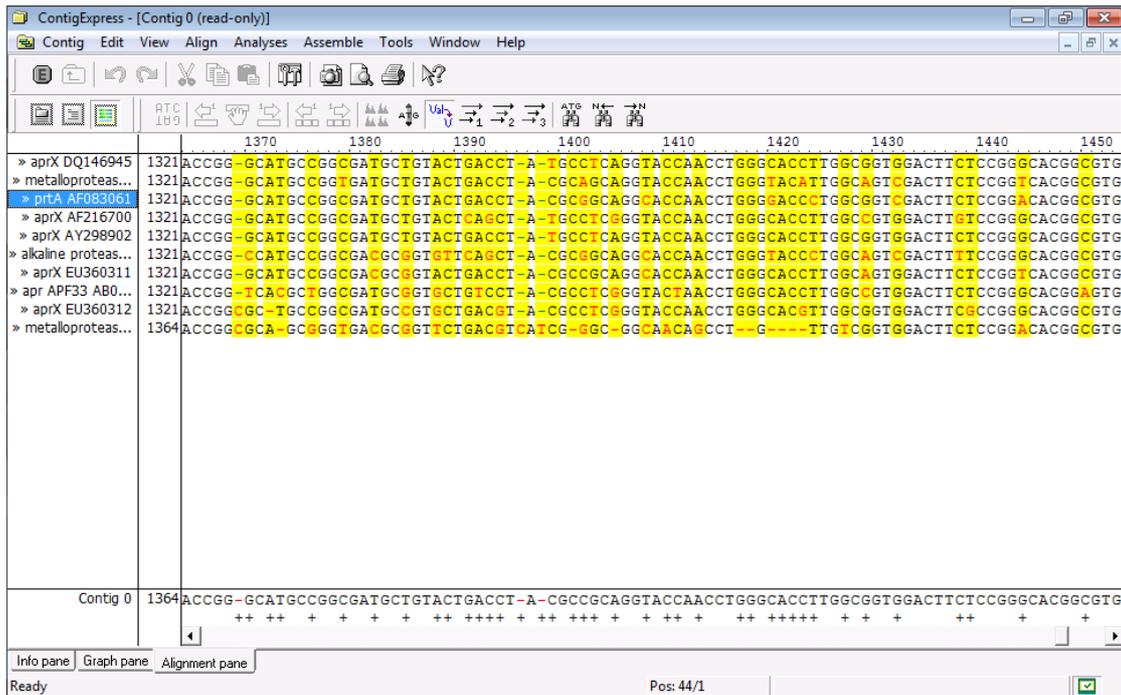


Figura 18. Alineación con la aplicación *Contig Express* de 10 secuencias de genes de proteasas de *Ps. fluorescens* para generar el “contig 0”. En la parte inferior se ve la secuencia consenso. Las bases diferentes en alguna de las secuencias se marcan con “+” en la secuencia consenso y se destacan en amarillo en cada secuencia individual. Cada base diferente se destaca en cada secuencia de color rojo

3) Diseño de oligonucleótidos

En la tabla 11 se muestran los cebadores diseñados que se utilizaron en las PCRs posteriores, sus secuencias y la Tm. La denominación “pcon” hace referencia a que fueron diseñados en base a una secuencia consenso de genes de proteasas y va seguida del número de ésta, de un número de serie y de F o R (*forward o reverse*). No se pudieron diseñar oligonucleótidos en base a las secuencias consenso 2, 3, 4, 5 y 8, por no cumplirse los criterios especificados en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos. Las denominaciones lsp, pcp (controles) y znprot corresponden a los genes que quedaron excluidos en las alineaciones, como se indicó anteriormente.

Tabla 11. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación por PCR de genes de proteasas.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)
lsp1F	AGGTCAGCAAGGCTCACTTC	58
lsp1R	TAGTGGCGGTTCTGCCAATG	58
pcp1F	TGTACTGCTGACGGGTTTCG	58
pcp1R	GCACGTGGATAAACCCACTG	58
znprot1F	TGTCGCAGGTCTGGTACAAG	58
znprot1R	GTTCGCGGGTCAAATACAGC	58
pcon1-1F	CAAGCCAGCACCGCTTACTC	60
pcon1-1R	GTGGTGACGAGGAAATCCGC	60
pcon6-1F	CGGCAACCTCACGGTCAATG	60
pcon6-1R	CGGTCAGGTCGATCTTGTC	60
pcon7-1F	TGTATGACCGTGGCGGCAAC	60
pcon7-3R	ACGCCCTTGGCGATGGACAC	60
pcon9-1F	CCTCACGGTCAATGGCAAAC	58
pcon9-1R	CGGTCAGGTCGATCTTGTC	60
pcon10-1F	CCTCACGGTCAATGGCAAAC	58
pcon10-2R	CGAGAACCAGCTTGTCGG	60

En el apéndice se muestran esquemáticamente las secuencias de los distintos genes de proteasas con los oligonucleótidos anillados y la posición de anillamiento (parte derecha de las figuras). Algunos oligonucleótidos no se muestran hibridados por poseer alguna diferencia en la secuencia respecto a la secuencia del ADN molde. Aunque el programa informático no permita su hibridación, ésta puede ocurrir. Además en todas las secuencias anilla al menos una pareja de cebadores lo cual garantiza la amplificación en el caso de que esa secuencia sea la correspondiente al gen *aprX* de la cepa de *Ps. fluorescens* aislada de leche.

A veces se toleraron estas diferencias cuando el oligonucleótido cumplía con los demás criterios; también ocurrió a la inversa, permitiéndose el incumplimiento de algún criterio como alto contenido en GC o estabilidad baja, si el oligonucleótido no tenía diferencias respecto a la secuencia molde. Sin embargo, nunca se toleró el incumplimiento de criterios como la formación de dímeros, formación de horquillas, diferencias en el extremo 3' respecto al ADN molde, más relevantes para la reacción de amplificación.

4.2 Amplificación por PCR y secuenciación

Los oligonucleótidos descritos en el apartado anterior se utilizaron para la amplificación por PCR de genes de proteasas utilizando el ADN genómico extraído de la cepa aislada de *Ps. fluorescens* de la muestra de leche LA1.

Se calculó la temperatura de anillamiento de cada pareja de oligonucleótidos (apartado 3.1) y el tamaño esperado para el fragmento amplificado a partir de los distintos genes *aprX* (tabla 12). También se determinó el tiempo de elongación atendiendo a la longitud del amplicón (apartado 3.3). Dado que no se conoce la secuencia concreta del gen *aprX* que podría tener la cepa estudiada, se utilizó el mayor tiempo de extensión calculado añadiendo 5-10 segundos más.

Como resultado, se obtuvieron las condiciones de PCR que se indican en la tabla 13.

Tabla 12. Tamaño del fragmento amplificado en cada secuencia utilizando las parejas de oligonucleótdos indicadas.

GEN AMPLIFICADO	TAMAÑO DEL AMPLICÓN OBTENIDO CON LAS PAREJAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS (pb)				
	pcon1-1F/pcon1-1R	pcon6-1F/pcon6-1R	pcon7-1F/pcon7-3R	pcon9-1F/pcon9-1R	pcon10-1F/pcon10-2R
<i>apr APF33</i> de <i>Ps. fluorescens</i> No33 (AB015053)		1168		1162	792
<i>prtA</i> de <i>Ps. fluorescens</i> SIKW1 (AF083061)	1357		927		
<i>aprX</i> de <i>Ps. fluorescens</i> A506 (AY298902)		1153	927		
<i>aprX</i> de <i>Ps. fluorescens</i> CY091 (AF004848)	1357		927		777
Homólogo de <i>aprX</i> de <i>Ps. fluorescens</i> No114 (AB013895)	1354			1144	777
<i>aprX</i> de <i>Ps. fluorescens</i> B52 (AF276700)	1357		927		
<i>aprX</i> de <i>Ps. fluorescens</i> F (DQ146945)		1153		1147	777
<i>aprX</i> de <i>Ps. fluorescens</i> ATCC17400(EU360312)		1168		1162	
<i>aprX</i> de <i>Ps. fluorescens</i> CIP7325 (EU360311)	1357		927	1147	
Homólogo de <i>aprX</i> de <i>Ps. fluorescens</i> Pf-01 (CP000094)		1153			777

Los genes que no fueron nombrados por los autores (sn, en tabla 10) se nombran aquí como “homólogos de *aprX*” al verificar su alineamiento con la secuencia de este gen.

Tabla 13. Parejas de oligonucleótidos, temperatura de hibridación, longitud del amplicón y tiempo de elongación empleada en cada reacción de PCR

Oligonucleótidos	T _m (°C)	Amplicón (pb)	Tiempo elongación (minutos: segundos)
lsp1F/lsp1R	58	333	0:25
pcp1F/pcp1R	58	493	0:40
znprot1F/znprot1R	58	1151	1:15
pcon1-1F/pcon1-1R	60	1357	1:30
pcon6-1F/pcon6-1R	60	1168	1:15
pcon7-1F/pcon7-3R	60	927	1:00
pcon9-1F/pcon9-1R	60	1162	1:15
pcon10-1F/pcon10-2R	58	792	0:50

Las PCR se realizaron siguiendo este orden:

- PCRs con oligonucleótidos de genes de proteasas utilizando como ADN molde una dilución 1/100 de ADN genómico de *Ps. fluorescens*.
- PCRs aumentando un grado centígrado la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos con el fin de evitar amplificaciones inespecíficas.
- PCRs con oligonucleótidos de proteasas utilizando como ADN molde diluciones 1/10, 1/50, 1/100 y 1/200 de ADN genómico de *Ps. fluorescens*.
- PCRs con oligonucleótidos de proteasas utilizando como ADN molde diluciones 1/10, 1/50, 1/100 y 1/200 de ADN genómico de una nueva extracción de *Ps. fluorescens*.

Los resultados obtenidos con las anteriores reacciones de PCR se muestran en la figura 19.

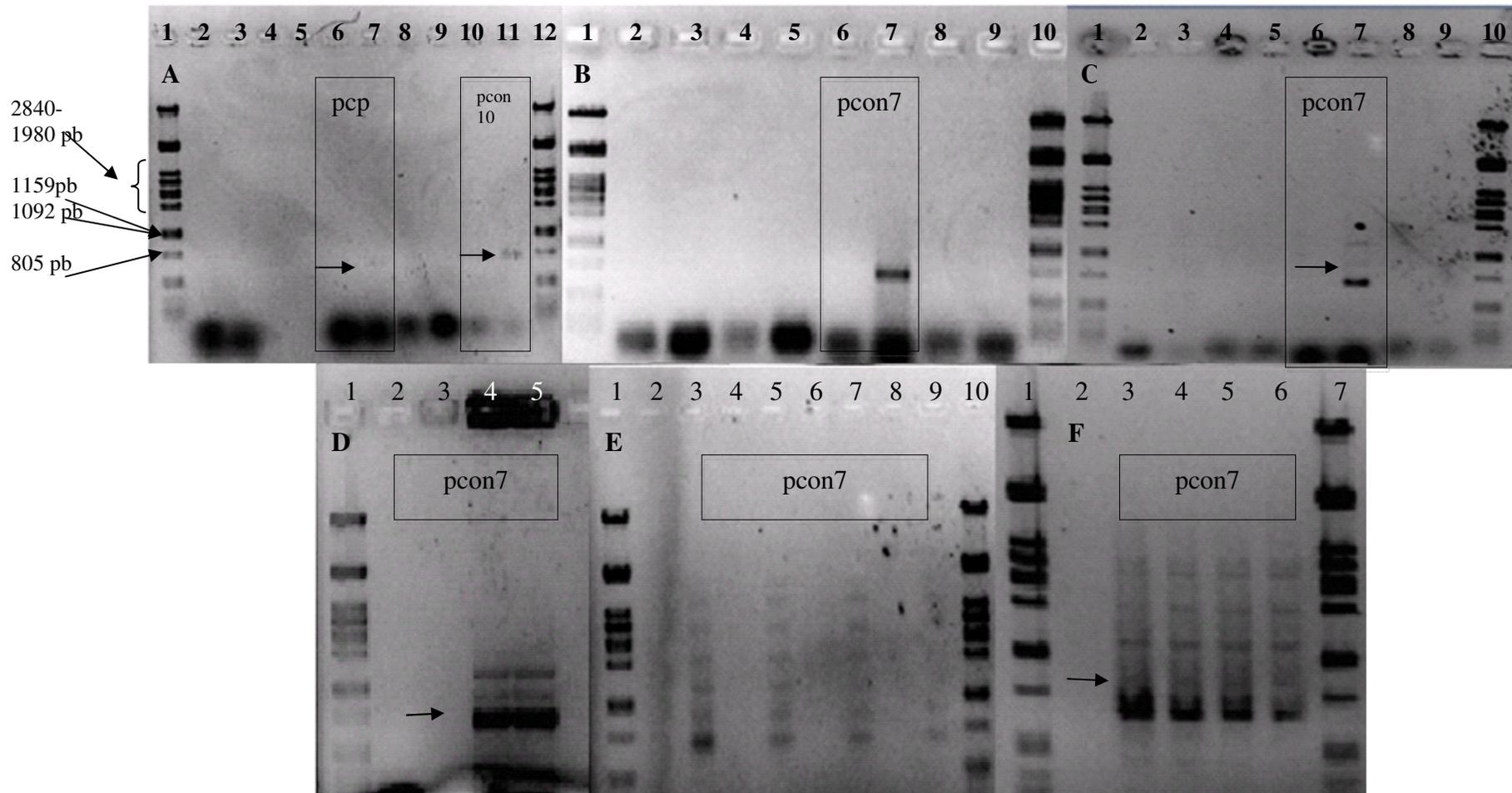


Figura 19. Fotografías de los geles de agarosa de las electroforesis de los productos de PCR.

A) PCR con dilución 1/100 del ADN cromosómico de *Ps. fluorescens* aislada en la muestra LA1, como molde. En la primera calle y en la última: Marcador de tamaños en pb (fago λ , digerido con PstI). Calles 2 y 3: PCR con iniciadores lsp1F/1R, control negativo (conteniendo agua destilada estéril en lugar de ADN) y muestra, respectivamente no se observó amplificación. Calles 4 y 5: sin muestra, Calles 6 y 7: PCR con iniciadores pcp 1F/1R, control negativo y muestra respectivamente, se observa una banda muy tenue pero de tamaño distinto al esperado. Calles 8 y 9: PCR con iniciadores znprot1F/1R, control negativo y muestra, respectivamente, no se observó amplificación, Calles 10 y 11: PCR con iniciadores pcon10-1F/2R, control negativo y muestra. Se observa una banda leve del tamaño esperado 792 pb.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

B) PCR utilizando dilución 1/100 del ADN cromosómico de *Ps. fluorescens* aislada en la muestra LA1, como molde. En la primera calle y en la última: marcador. Calles 2 y 3: PCR con iniciadores pcon1-1F/1R, control negativo y muestra, no se observó amplificación. Calles 4 y 5: PCR con iniciadores pcon6-1F/1R, control negativo y muestra, no se observó amplificación. Calles 6 y 7: PCR con iniciadores pcon7-1F/R, control negativo y muestra, se observa una banda única muy marcada pero de tamaño distinto al esperado (927 pb). Calles 8 y 9: PCR con iniciadores pcon9-1F/1R, control negativo y muestra, no se observó amplificación.

C) Repetición de la PCR anterior, se insistió en ella aunque no fue del tamaño esperado porque en definitiva no se sabe con certeza la longitud exacta del amplicón que se puede obtener a partir del ADN de la cepa aislada. Sólo hubo amplificación con los cebadores pcon7-1F/3R, esta vez se obtiene un bandedo. La banda intermedia se aproxima más al tamaño esperado: 927 pb, aunque ésta fue muy débil.

D) PCR utilizando dilución 1/100 del ADN cromosómico de *Ps. fluorescens* aislada en la muestra LA1, como molde, y cebadores pcon7-1F/3R. Se realizó en un volumen de reacción 50 µl para su secuenciación posterior. Dado que se obtuvo bandedo se realiza esta PCR y esta electroforesis para recortar la banda en el gel y purificarlas (se recortó la banda más marcada). Calle 1: marcador, Calle 2: control negativo, Calle 3: nada, Calle 4 y 5 (pocillos unidos): productos de la PCR. Se observa el mismo bandedo que en la PCR anterior.

E) PCR utilizando diluciones 1/10, 1/50, 1/100 y 1/200 del ADN cromosómico de *Ps. fluorescens* aislada en la muestra LA1 y cebadores pcon7-1F/3R. Calle 1 y 10: marcador Calle 2 y 3: control negativo y muestra, dilución 1/10, Calle 4 y 5: control negativo y muestra, dilución 1/50, Calles 6 y 7: control negativo y muestra dilución 1/100, Calles 8 y 9: control negativo y muestra dilución 1/200. Se observan las mismas bandas que en el caso anterior y algunas de tamaño superior. Se observa el efecto de las diluciones en la intensidad de las bandas. Ante este resultado se pensó que el ADN podría estar degradado o contaminado, por lo que se extrajo de nuevo ADN de las células conservadas en glicerol.

F) PCR utilizando diluciones 1/10, 1/50, 1/100 y 1/200 de una nueva extracción de ADN cromosómico de *Ps. fluorescens* aislada en la muestra LA1 y con cebadores pcon7-1F/3R. Calle 1 y 7: marcador, calle2: control negativo, calles 3-6: muestra, diluciones 1/10, 1/50, 1/100, 1/200, respectivamente. Se observó el mismo bandedo que en la PCR anterior aunque con bandas más marcadas, quizá porque se obtuvo más ADN en esta extracción. Se repetirá la PCR en volumen de reacción 50 µl para recortar las bandas del gel. La flecha indica una posible banda del tamaño adecuado: 927 pb (se observa débil, por encima de la banda más marcada).

La PCR con la dilución 1/100 de ADN genómico de *Ps. fluorescens* aislada de la muestra de leche, proporcionó una sola banda del tamaño adecuado, cuando se usó la pareja de cebadores pcon10 (figura 19 A), pero esta banda fue muy débil, incluso en PCRs posteriores por lo que no se pudo secuenciar.

Por otro lado con los oligonucleótidos pcon7, se obtuvo primero una única banda pero de tamaño inferior al esperado (figura 19 B). Este producto de PCR no se pudo secuenciar porque al ser de PCR de *screening* no se realizó en un volumen como para tener suficiente concentración de ADN. Además, dado que no se conoce ciertamente donde anillan los cebadores en el gen de la cepa objeto de estudio, se repitió, pero a partir de aquí siempre se obtuvieron varios fragmentos (figura 19 C) por lo que, para secuenciar, se decidió recortar los productos de PCR del gel y purificarlos según el protocolo descrito en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos. La figura 19 D muestra el gel de donde se recortó la banda de tamaño cercano a 805 pb. Posteriormente el fragmento purificado se envió a secuenciar pero no se obtuvo un cromatograma válido.

En base a los resultados negativos de la secuenciación, las PCRs se realizaron a una temperatura un grado centígrado superior, para aumentar la especificidad, pero no se obtuvo amplificación en ningún caso. Por ello, se repitieron de nuevo las PCRs con una escala más amplia de diluciones de ADN genómico, de 1/10 a 1/200 pero se obtuvieron múltiples bandas (figura 19 E). Se pensó que el ADN podría estar degradado o contaminado, por lo que se extrajo de nuevo el ADN genómico a partir de la cepa de *Ps. fluorescens* conservada en glicerol siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2 de Materiales y Métodos.

Se repitieron las PCRs con los iniciadores pcon7 y se utilizaron las distintas diluciones del nuevo ADN pero como se observa en la figura 19 F, no mejoró la especificidad.

Entonces se decidió recurrir a la clonación de los productos de PCR purificados del gel para secuenciar el inserto con cebadores universales del vector, para aumentar la probabilidad de éxito en la reacción de secuenciación.

4.3 Amplificación por PCR, clonación y secuenciación

Se realizó la PCR con oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia consenso 7 de genes de proteasas, añadiendo sitios de reconocimiento para los enzimas de restricción XbaI (en el extremo 5' del oligonucleótido *forward*) y EcoRI (en el extremo 5' del oligonucleótido *reverse*) (ver tabla 14), utilizando como molde ADN genómico de la cepa de *Ps. fluorescens* aislada en la muestra de leche. Este amplicón se insertó en un vector de clonación digerido con los mismos enzimas, para posteriormente secuenciarlo.

Tabla 14. Oligonucleótidos con secuencias diana para enzimas de restricción

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
pcon7-1F XbaI	ag <u>ctctaga</u> TGTATGACCGTGGCGGCAAC
pcon7-3R EcoRI	cg <u>gaattc</u> ACGCCCTTGGCGATGGACAC

Los nucleótidos añadidos en el extremo 3' de los cebadores de muestran en minúscula. Los sitios de reconocimiento de XbaI y EcoRI se indican en negrilla y subrayados.

La figura 20 A muestra el gel de agarosa de la electroforesis de los productos de PCR con los oligonucleótidos pcon7 con sitios de restricción, a partir del cual se purificaron dos bandas para su clonación, la banda superior de tamaño entre 1159 y 1700 pb (banda P1) y la banda de tamaño algo inferior a 805 pb (banda P2). La eficacia de la purificación se comprobó por electroforesis en gel de agarosa y se pudo demostrar que se había realizado correctamente (figura 20 B). Por ello se procedió a la clonación de cada banda por separado siguiendo el protocolo del apartado 3.8 de Materiales y Métodos.

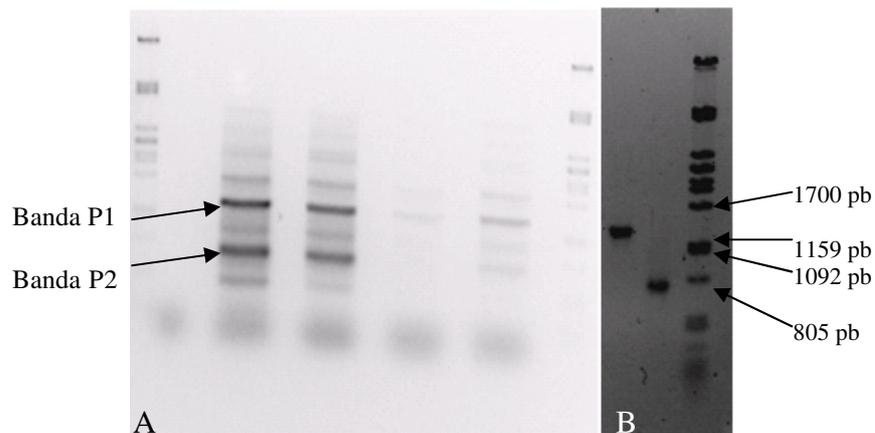


Figura 20. A) Gel de agarosa de la electroforesis de los productos de PCR obtenidos con los cebadores pcon7-1F/3R con sitios de restricción con diluciones de ADN genómico de *Ps. fluorescens*. B) Gel de agarosa de la electroforesis de las dos bandas recortadas del gel y purificadas.

Tras extraer el plásmido con el inserto siguiendo el procedimiento de miniprep (apartado 3.8 de Materiales y Métodos), se digirió con XbaI y EcoRI, para comprobar que poseía el inserto adecuado. No fue así, por lo que se repitió el proceso.

A partir de 10 colonias blancas de *E. coli*, obtenidas en la transformación con la mezcla de ligación, se extrajo ADN plasmídico, siguiendo el procedimiento 3.8 de Materiales y Métodos, y se digirió con XbaI y EcoRI para rescatar los insertos. Como se observa en la figura 21, en un caso el inserto adquirido por el vector coincide con el tamaño esperado para la banda P1. Sin embargo, la secuenciación de este fragmento no permitió su asignación a un gen *aprX*.

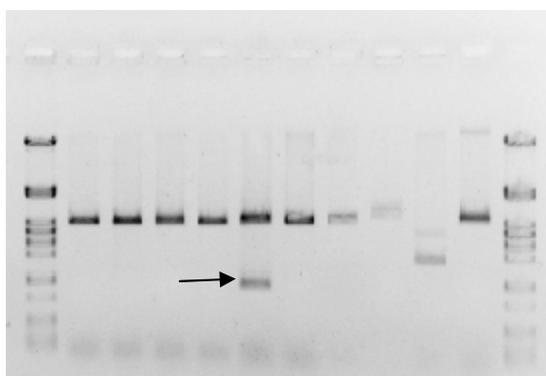


Figura 21. Digestión con XbaI y EcoRI de plásmidos extraídos de colonias blancas de *E. coli* obtenidas en el experimento de clonación. La banda señalada con la flecha se corresponde con el tamaño esperado para P1 (entre 1159 y 1700 pb) y la banda de encima se corresponde con el tamaño del vector (2982 pb). En las demás calles el vector de tamaño adecuado o de menor tamaño (artefacto) no presenta inserción.

A la vista del resultado anterior, se procedió a la clonación de los todos los productos de PCR obtenidos mediante amplificación con los oligonucleótidos pcon7-1F-XbaI/pcon7-3R-EcoRI (figura 22 A) sin recortar las bandas del gel, ya que la posible presencia de restos de agarosa podía interferir con la secuenciación.

La digestión de los plásmidos recombinantes obtenidos en este segundo experimento de clonación (24 en total) se muestra en la figura 22.

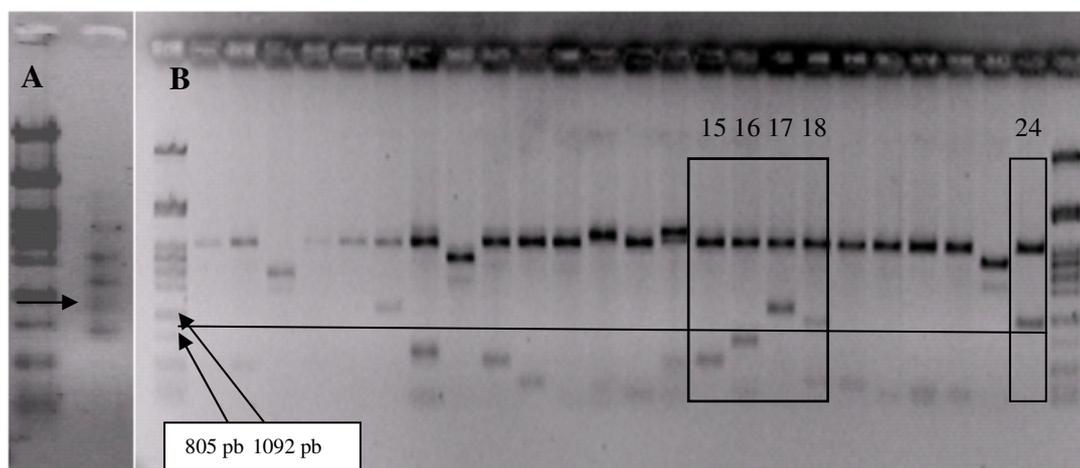


Figura 22. A) Productos de PCR que se utilizaron para la clonación (calle 2). B) Digestión con XbaI y EcoRI de los plásmidos obtenidos en el experimento de clonación. Se escogen para secuenciar los plásmidos recombinantes que se muestran encuadrados, ya que las inserciones se aproximan al tamaño esperado (la línea negra marca aproximadamente el tamaño esperado de 927 pb).

Los plásmidos recombinantes 15, 16, 17, 18 y 24 se secuenciaron mediante los oligonucleótidos universales que anillan con el vector. En este caso se obtuvieron buenos cromatogramas, pero al comparar las secuencias obtenidas con las depositadas en bases de datos mediante BLAST ninguna presentó homología con genes *aprX*. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Inseto del plásmido 15: fragmento del gen succinato semialdehído deshidrogenasa de *Ps. fluorescens* SBW25 (91% de homología).
- Inseto del plásmido 16: fragmento del gen sarcosina oxidasa, subunidad delta de *Ps. fluorescens* SBW25 (91% de homología).
- Inseto del plásmido 17: fragmento del gen succinato semialdehído deshidrogenasa de *Ps. fluorescens* SBW25 (85% de homología).y de *Ps. protegens* Pf-5 (94% de homología).
- Inseto del plásmido 18: se obtuvo una secuencia del vector de clonación.
- Inseto del plásmido 24: fragmento del gen del receptor de la membrana externa dependiente de TonB de *Ps. fluorescens* SBW25 (85% de homología).y de *Ps. protegens* Pf-5 (90% de homología).

Estas cepas de *Ps. fluorescens* se han encontrado en plantas y suelo (Silby *et al*, 2009).

La succinato semialdehido deshidrogenasa es un enzima presente en la mayoría de seres vivos. Pertenece a la familia de las oxidorreductasas. Utiliza el succinato semialdehido, NAD⁺ y H₂O para dar succinato, NADH y H⁺. Este enzima participa en el metabolismo del glutamato y del butirato. Participa en la degradación del ácido gamma aminobutírico (GABA). El GABA es un aminoácido que se sintetiza principalmente a partir de otro, el ácido glutámico. Se degrada transformándose en succínico semialdehido que se oxida mediante la succínico semialdehido deshidrogenasa, formando ácido succínico que entra en el ciclo de Krebs.

La sarcosina oxidasa cataliza la oximetilación de la sarcosina también llamada n-metil glicina, con O₂ y H₂O para dar glicina, formaldehido y H₂O₂. Algunas bacterias utilizan la sarcosina como fuente de carbono si está presente en el medio, por ejemplo, *Corynebacterium* spp. Puede ser utilizada para determinar creatinina (compuesto resultante de la degradación de creatina, molécula energética del músculo esquelético, se excreta por la orina) en el laboratorio clínico.

El receptor dependiente de TonB es un tipo de receptor transmembrana situado en la membrana externa de bacterias Gram negativas que participa en la captación de hierro, mediante la unión a sideróforos. Este receptor depende de un grupo de proteínas, entre las que se encuentra TonB, que actúan como transductores de energía desde la membrana citoplasmática a la membrana externa.

A la vista de estos resultados se puede deducir que dada la alta variabilidad que presenta el gen *aprX* fue imposible obtener un anillamiento específico de los oligonucleótidos y por lo tanto una amplificación específica del gen *aprX*.

4.4 Amplificación por PCR y secuenciación de genes de proteasas y peptidasas de cepas de colección de *Ps. fluorescens*

Teniendo en cuenta la imposibilidad de identificar el gen de la proteasa presente en la cepa de *Ps. fluorescens* del lote de leche alterada, se utilizaron todos los oligonucleótidos diseñados con una cepa de colección perteneciente a la misma especie. Esto permitió evaluar la validez de la estrategia empleada.

La amplificación por PCR del gen *lsp* con los cebadores *lsp1F/1R* dio una banda única del tamaño esperado (333 pb) al utilizar como molde el ADN de la cepa de

colección de *Ps. fluorescens* (figura 23) por lo que este producto de PCR se purificó y secuenció. Con los demás oligonucleótidos se obtuvieron fragmentos inespecíficos (no mostrados), coincidiendo con los resultados correspondientes a la cepa procedente de la leche alterada y de acuerdo con la elevada variabilidad de genes *aprX*.

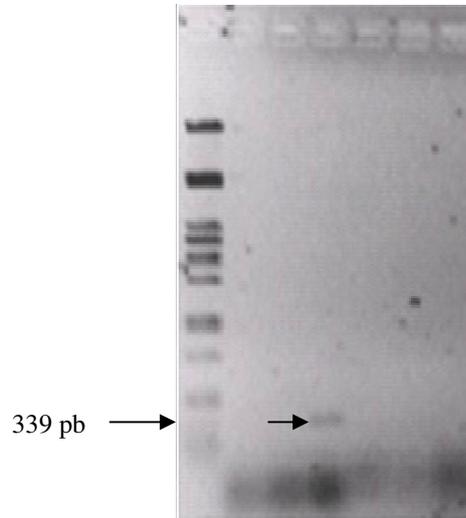


Figura 23. PCR con los oligonucleótidos *lsp1F/1R* utilizando como molde ADN genómico de una cepa de colección de *Ps. fluorescens*. Se observa un único producto de PCR de tamaño esperado (333 pb), indicado con flecha (calle 3).

Como resultado de la secuenciación del fragmento *lsp* de la cepa de colección se obtuvo el cromatograma de la figura 24.

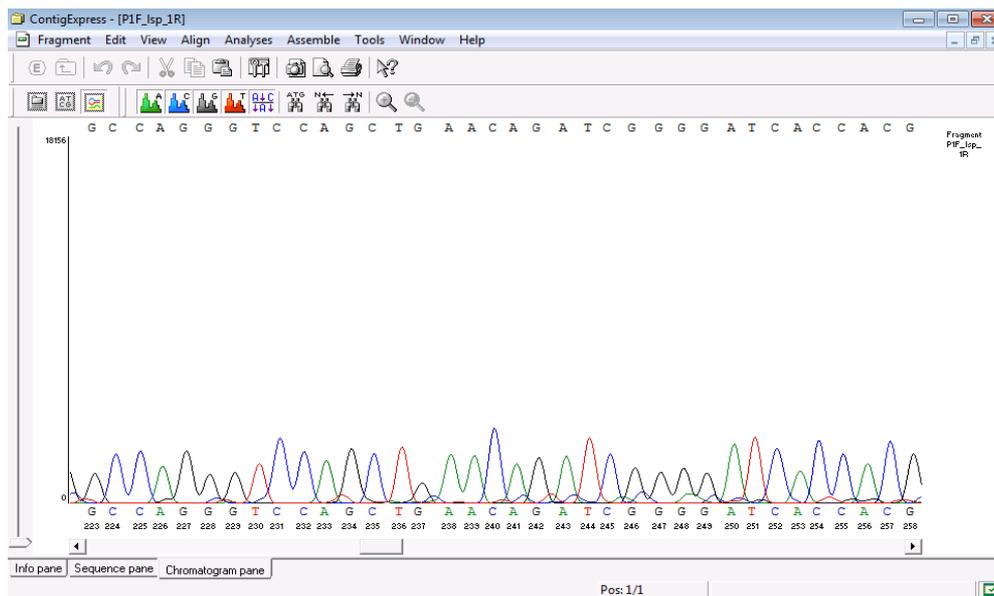


Figura 24. Cromatograma resultado de la secuenciación del amplicón de 333 pb obtenido con los cebadores *lsp 1F/1R*, utilizando como molde ADN de la cepa de colección de *Ps. fluorescens*

Esta secuencia se comparó con las depositadas en las bases de datos, utilizando el programa BLAST. De acuerdo con lo esperado se obtuvo, homología con genes de peptidasa señal de lipoproteína, tanto de *Ps. aeruginosa* (98% de homología) como de *Ps. fluorescens* (85%) (figura 25). Así, se confirma la amplificación del fragmento correspondiente al gen de interés.

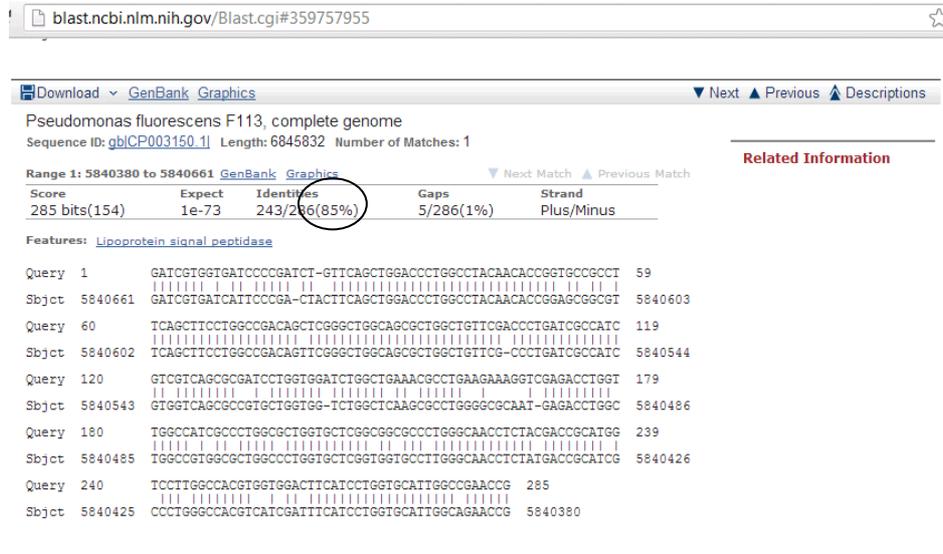


Figura 25. Resultado de la alineación de la secuencia del amplicón de *lsp* utilizando BLAST. “Query” es la secuencia que se ha introducido en el programa y “subject” es la secuencia depositada en la base de datos con la que presenta homología (85%), que en este caso corresponde al gen que codifica una peptidasa señal de lipoproteína de la cepa *Ps. fluorescens* F113.

Dados los resultados descritos, se resume que fue imposible la identificación del gen *aprX* u otros genes de proteasas extracelulares que por homología hubieran podido hibridar con los oligonucleótidos diseñados. Se pudo comprobar que un único producto de PCR tras purificarse directamente dio buen resultado en la secuenciación. Sin embargo, cuando los productos de PCR se purificaron del gel de agarosa, la secuenciación no funcionó. Probablemente el kit de purificación usado dejaba restos de agarosa que interferían en la secuenciación. Se intentó finalmente la clonación de los diferentes productos de una PCR, lo cual permitió una secuenciación exitosa de los insertos, pero se pudo comprobar que el ADN clonado no perteneció a ninguna proteasa extracelular.

CONCLUSIONES

1. Se diseñaron 8 parejas de oligonucleótidos basados en la alineación de secuencias de proteasas descritas en la bibliografía. La mayoría de estas secuencias pertenecieron al gen *aprX*, codificante de una metaloproteasa alcalina extracelular típicamente encontrada en leche alterada.
2. A pesar de numerosos intentos, utilizando técnicas de amplificación/secuenciación y de amplificación/clonación/secuenciación, no se consiguió identificar el gen *aprX* u otros genes de proteasas extracelulares que, por homología, pudieran haber hibridado con los oligonucleótidos diseñados. De acuerdo con la información disponible, esto puede ser debido a la gran variabilidad de estos genes en cepas de *Ps. fluorescens* alterantes de leche.
3. Si bien la identificación del gen no es condición necesaria para poner de manifiesto la actividad proteolítica, sí que impide el desarrollo de técnicas eficaces de detección basadas, por ejemplo, en PCR a tiempo real. En el futuro se pretende identificar el gen mediante clonación a partir de una genoteca de la cepa de *Ps. fluorescens* alterante de la leche, seguida de selección funcional.

ABREVIATURAS

A.	<i>Alcaligenes</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Alt.	<i>Alteromonas</i>
a_w	actividad de agua
B.	<i>Bacillus</i>
Cat	catalasa
C.	<i>Clostridium</i>
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
DDJB	DNA databank of Japan
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
E.	<i>Escherichia</i>
F.	<i>Flavobacterium</i>
GABA	<i>Gamma-amino-butyric acid</i>
IFST	Institute of Food Science and Technology
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactósido
HTST	<i>High Temperature Short Time</i>
LA	<i>Luria-Bertani Agar</i>
LA1	Leche alterada 1
LA2	Leche alterada 2
LB	<i>Luria-Bertani Broth</i>
LTH	<i>Low Temperature Holding</i>
M.	<i>Micrococcus</i>
MFGM	<i>Milk Fat Globular Membrane</i>
MOPS	<i>3-(N-morpholino) propanesulfonic acid</i>
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato
NCBI	National Center for Biotechnology Information
P.	<i>Penicillium</i>
Pa.	<i>Pantoea</i>
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Ps.	<i>Pseudomonas</i>

RDP	Ribosomal Database Project
RIDOM	Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms
rpm	revoluciones por minuto
SC	Secuencia Consenso
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
sn	sin nombre
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
T.	<i>Toluopsis</i>
Tm	<i>Temperature of melting</i>
Ufc	Unidades formadoras de colonias
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, J. H., J. G. Pan and J. S. Rhee** (1999). "Identification of the tliDEF ABC transporter specific for lipase in *Pseudomonas fluorescens* SIK W1." J Bacteriol **181** (6): 1847-1852.
- Alais, Ch.** (1985). "Ciencia de la leche". Editorial Reverté, Barcelona.
- Alichanidis, JHM Wrathall, AT Andrews.** (1986). "Heat stability of plasmin (milk protease) and plasminogen". J.Dairy Res.**53**; 259-269
- Anderson, L. M., V. O. Stockwell and J. E. Loper** (2004). "An Extracellular Protease of *Pseudomonas fluorescens* inactivates Antibiotics of *Pantoea agglomerans*." Phytopathology **94** (11): 1228-1234.
- Andrewes, P., A. Baldwin, A. Broome, B. Hill, R. Holland, O. Mills and D. Newstead** (2007). "Detection of lipase in skim and whole milk powders using triheptanoin as a substrate." International dairy journal **17** (6): 587-595.
- Angulo A, J., L. Mahecha L and M. Olivera A** (2009). "Síntesis, composición y modificación de la grasa de la leche bovina: Un nutriente valioso para la salud humana." Revista MVZ Córdoba **14**: 1856-1866.
- Arslan, S., A. Eyi and F. Ozdemir** (2011). "Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses." J Dairy Sci **94** (12): 5851-5856.
- Azzara, C. D. and P. S. Dimick** (1985). "Lipoprotein lipase activity of milk from cows with prolonged subclinical mastitis." J Dairy Sci **68** (12): 3171-3175.
- Bach, H. J., A. Hartmann, M. Schloter and J. C. Munch** (2001). "PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil." J Microbiol Methods **44** (2): 173-182.
- Barbano**, 1992; DM Barbano; Raw milk quality: Milk quality improvement in the United States. Aust. J. Dairy Technol., **47** (1992), pp. 89–90
- Borgström, B. and H. L. Brockman** (1984). Lipases, Elsevier Science Publishers BV.

Chabeaud, P., A. de Groot, W. Bitter, J. Tommassen, T. Heulin and W. Achouak (2001). "Phase-variable expression of an operon encoding extracellular alkaline protease, a serine protease homolog, and lipase in *Pseudomonas brassicacearum*." J Bacteriol **183** (6): 2117-2120.

Chavez, M. S., L. M. Negri, M. A. Taverna and A. Cuatrin (2004). "Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability." J Dairy Res **71** (2): 201-206.

Craven, H. and B. Macauley (1992). "Microorganisms in pasteurised milk after refrigerated storage 1. Identification of types." Australian Journal of Dairy Technology **47** (1): 38-45.

García, V. (2011). "Identificación y caracterización de bacterias presentes en una leche comercial sensorialmente alterada". Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Oviedo.

Gilmour, A. and MT Rowe, 1990. "Microorganisms associated with milk" In: Robinson, RK (Eds.), The Microbiology of Milk, vol. I, Dairy Microbiology, Second Ed. Elsevier Applied Science, London, pp: 37-75.

Decreto 2484/1967, de 21 de Septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español. BOE núm. 248, de 17 de octubre de 1967, páginas 14180 a 14187

Deeth, H. C., T. Khusniati, N. Datta and R. B. Wallace (2002). "Spoilage patterns of skim and whole milks." J Dairy Res **69** (2): 227-241.

Deletoile, A., D. Decre, S. Courant, V. Passet, J. Audo, P. Grimont, G. Arlet and S. Brisse (2009). "Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing." J Clin Microbiol **47** (2): 300-310

Dieckelmann, M., L. A. Johnson and I. R. Beacham (1998). "The diversity of lipases from psychrotrophic strains of *Pseudomonas*: a novel lipase from a highly lipolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*." J Appl Microbiol **85**(3): 527-536.

Directiva 96/23/CE del Consejo de 29 de abril de 1996 relativa las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE

- Dufour, D., M. Nicodeme, C. Perrin, A. Driou, E. Brusseau, G. Humbert, J. L. Gaillard and A. Dary** (2008). "Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them." Int J Food Microbiol **125**(2): 188-196.
- Duong, F., E. Bonnet, V. Geli, A. Lazdunski, M. Murgier and A. Filloux** (2001). "The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system." Gene **262**(1-2): 147-153.
- Forsythe, S.J.** (2000). "Alimentos seguros: microbiología". Zaragoza. Editorial Acribia.
- Fromm, H. I. and K. J. Boor** (2004). "Characterization of Pasteurized Fluid Milk Shelf-life Attributes." Journal of Food Science **69**(8): M207-M214.
- Gebre-Egziabher, A.; Humbert, E. S.; Blankenagel, G.** (1980) "Hydrolysis of milk proteins by microbial enzymes". Journal of Food Protection. **43** (9): 709-712.
- Grieve, P. A. and B. J. Kitchen** (1985). "Proteolysis in milk: the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocyte, bacterial and natural milk proteinases on casein." J Dairy Res **52** (1): 101-112.
- Gonzales, T. and J. Robert-Baudouy** (1994). "Characterization of the pcp gene of *Pseudomonas fluorescens* and of its product, pyrrolidone carboxyl peptidase (Pcp)." J Bacteriol **176** (9): 2569-2576.
- Gonzalez, A. J., A. M. Fernandez, M. San Jose, G. Gonzalez-Varela and M. R. Rodicio** (2012). "A *Pseudomonas viridiflava*-related bacterium causes a dark-reddish spot disease in *Glycine max*." Appl Environ Microbiol **78** (10): 3756-3758.
- Hantsis-Zacharov, E. and M. Halpern** (2007). "Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits." Appl Environ Microbiol **73** (22): 7162-7168.

Hattemer, A., A. Hauser, M. Diaz, M. Scheetz, N. Shah, J. P. Allen, J. Porhomayon and A. A. El-Solh (2013). "Bacterial and clinical characteristics of healthcare and community-acquired blood stream infections due to *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **57** (8): 3969-75.

Heinisch, J. J. (1993). "PFK2, ISP42, ERG2 and RAD14 are located on the right arm of chromosome XIII." Yeast **9** (10): 1103-1105.

IFST (1993) "Shelf life of foods. Guidelines for its determination and prediction". London: Institute of Food Science & Technology.

Isaki, L., R. Beers and H. C. Wu (1990). "Nucleotide sequence of the *Pseudomonas fluorescens* signal peptidase II gene (*lsp*) and flanking genes." J Bacteriol **172** (11): 6512-6517.

Jaeger, K. E. and T. Eggert (2002). "Lipases for biotechnology." Curr Opin Biotechnol **13** (4): 390-397.

Kalisz, H. M. (1988). "Microbial proteinases." Adv Biochem Eng Biotechnol **36**: 1-65.

Kawai, E., A. Idei, H. Kumura, K. Shimazaki, H. Akatsuka and K. Omori (1999). "The ABC-exporter genes involved in the lipase secretion are clustered with the genes for lipase, alkaline protease, and serine protease homologues in *Pseudomonas fluorescens* no. 33." Biochim Biophys Acta **1446** (3): 377-382.

Kumeta, H., T. Hoshino, T. Goda, T. Okayama, T. Shimada, S. Ohgiya, H. Matsuyama and K. Ishizaki (1999). "Identification of a member of the serralyisin family isolated from a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas fluorescens* 114." Biosci Biotechnol Biochem **63** (7): 1165-1170.

Kumura, H., S. Hirose, H. Sakurai, K. Mikawa, F. Tomita and K. Shimazaki (1998). "Molecular cloning and analysis of a lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* No. 33." Biosci Biotechnol Biochem **62** (11): 2233-2235.

Kumura, H., K. Mikawa and Z. Saito (1993). "Influence of milk proteins on the thermostability of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* 33." J Dairy Sci **76** (8): 2164-2167.

- Kumura, H., S. Murata, T. Hoshino, K. Mikawa and K. Shimazaki** (1999). "Autolysis of the proteinase from *Pseudomonas fluorescens*." J Dairy Sci **82** (10): 2078-2083.
- Liao, C. H. and D. E. McCallus** (1998). "Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091." Appl Environ Microbiol **64** (3): 914-921.
- Liu, M., H. Wang and M. W. Griffiths** (2007). "Regulation of alkaline metalloprotease promoter by N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens*." J Appl Microbiol **103** (6): 2174-2184.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, L., Darnell, J.** "Biología Molecular y Celular". 5ª Edición
- Ma, Y., C. Ryan, D. M. Barbano, D. M. Galton, M. A. Rudan and K. J. Boor** (2000). "Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk." J Dairy Sci **83** (2): 264-274.
- Marchand, S., K. Heylen, W. Messens, K. Coudijzer, P. De Vos, K. Dewettinck, L. Herman, J. De Block and M. Heyndrickx** (2009). "Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples." Environ Microbiol **11** (2): 467-482.
- Marchand, S., G. Vandriesche, A. Coorevits, K. Coudijzer, V. De Jonghe, K. Dewettinck, P. De Vos, B. Devreese, M. Heyndrickx and J. De Block** (2009). "Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species." Int J Food Microbiol **133** (1-2): 68-77.
- Martins, M. L., C. L. O. Pinto, R. B. Rocha, E. F. de Araújo and M. C. D. Vanetti** (2006). "Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk." International Journal of Food Microbiology **111** (2): 144-148.

McCarthy, C. N., R. G. Woods and I. R. Beacham (2004). "Regulation of the aprX-lipA operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: differential regulation of the proximal and distal genes, encoding protease and lipase, by ompR-envZ." FEMS Microbiol Lett **241**(2): 243-248.

McKellar, R.C. (1989) "Regulation and control of synthesis". In *Enzymes of Psychrophiles in Raw Foods* ed. McKellar, R.C. pp. 153–172. Boca Raton, FL: CRC Press 2584-2589.

Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge and V. V. Deshpande (1998). "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases." Microbiol Mol Biol Rev **62**(3): 597-635.

Real Decreto 1728/2007, de 21 de diciembre, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo y se modifica el Real Decreto 217/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche. BOE núm. 15, de 17 de enero de 2008, páginas 3508 a 3519

Real Decreto 460/2002, de 24 de mayo, por el que se establecen ayudas a la financiación de acciones de asesoramiento para la mejora de la calidad de la leche producida y recogida en las explotaciones.

Reglamento (CE) 2074/2005, de 5 de Diciembre de 2005, por el que se establecen medidas de aplicación para determinados productos con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) no 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y para la organización de controles oficiales con arreglo a lo dispuesto en los Reglamentos (CE) nº 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, se introducen excepciones a lo dispuesto en el Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y se modifican los Reglamentos (CE) no 853/2004 y (CE) no 854/2004.

Reglamento (CE) 2073/2005, de 15 de Noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Reglamento (CE) 852/2004, de 29 de Abril de 2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la higiene de los productos alimenticios.

Reglamento (CE) 853/2004, de 29 de Abril de 2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.

Reglamento (CE) 854/2004, de 29 de Abril de 2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano.

Rico, A., S. L. McCraw and G. M. Preston (2011). "The metabolic interface between *Pseudomonas syringae* and plant cells." Curr Opin Microbiol **14**(1): 31-38.

Riffon, R., K. Sayasith, H. Khalil, P. Dubreuil, M. Drolet and J. Lagace (2001). "Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR." J Clin Microbiol **39**(7):

Sambrook J. and Russel D.W. (2001). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Silby, M. W., A. M. Cerdeno-Tarraga, G. S. Vernikos, S. R. Giddens, R. W. Jackson, G. M. Preston, X. X. Zhang, C. D. Moon, S. M. Gehrig, S. A. Godfrey, C. G. Knight, J. G. Malone, Z. Robinson, A. J. Spiers, S. Harris, G. L. Challis, A. M. Yaxley, D. Harris, K. Seeger, L. Murphy, S. Rutter, R. Squares, M. A. Quail, E. Saunders, K. Mavromatis, T. S. Brettin, S. D. Bentley, J. Hotherhall, E. Stephens, C. M. Thomas, J. Parkhill, S. B. Levy, P. B. Rainey and N. R. Thomson (2009). "Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*." Genome Biol **10** (5): R51

Sørhaug, T. and L. Stepaniak (1997). "Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects." Trends in Food Science & Technology **8** (2): 35-41.

Verdi, R. J., D. M. Barbano, M. E. Dellavalle and G. F. Senyk (1987). "Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks." J Dairy Sci **70** (2): 230-242.

Woods, R. G., M. Burger, C. A. Beven and I. R. Beacham (2001). "The aprX-lipA operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: a molecular analysis of metalloprotease and lipase production." Microbiology **147** (Pt 2): 345-354.

blast.ncbi.nlm.nih.gov

ben.upc.es

idibam.blogspot.com.es

www.aesan.msc.es

www.analesranf.com

www.argenbio.org

www.codexalimentarius.com

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.quorumtech.com

www.sigmaaldrich.com

APÉNDICE

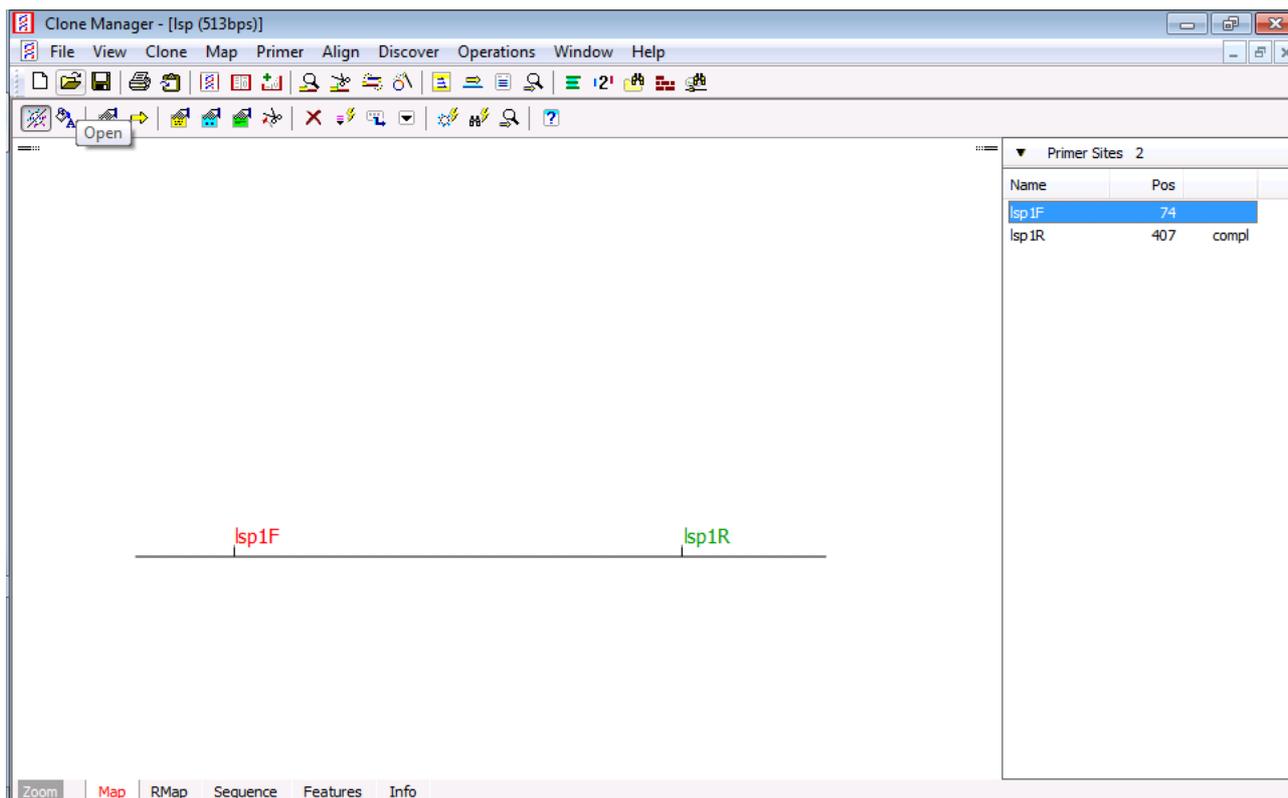


Figura 26. Gen *lsp* de *Ps fluorescens* NCIB 10586 (N° acceso M35366). Oligonucleótidos: lsp1F/lsp1R.

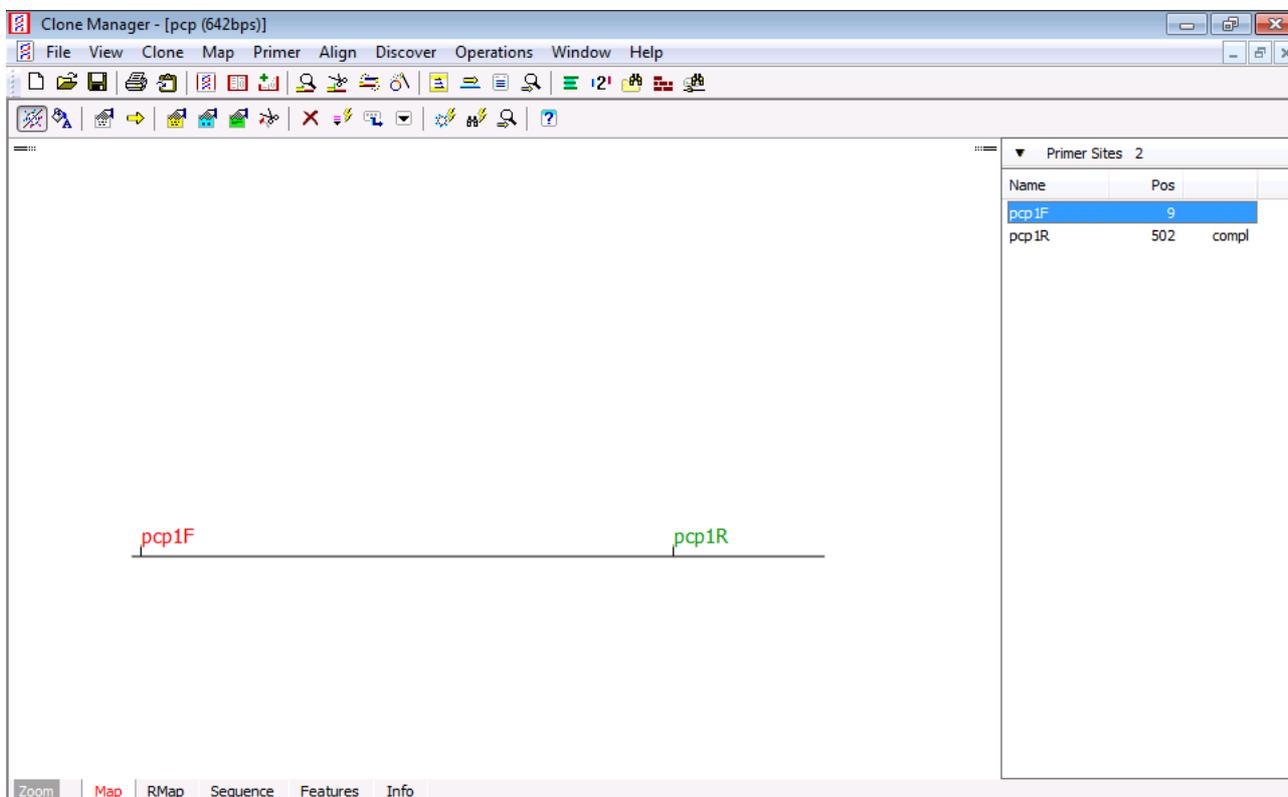


Figura 27. Gen *pcp* de *Ps fluorescens* MFO (N° acceso X75919). Oligonucleótidos pcp1F/pcp1R.

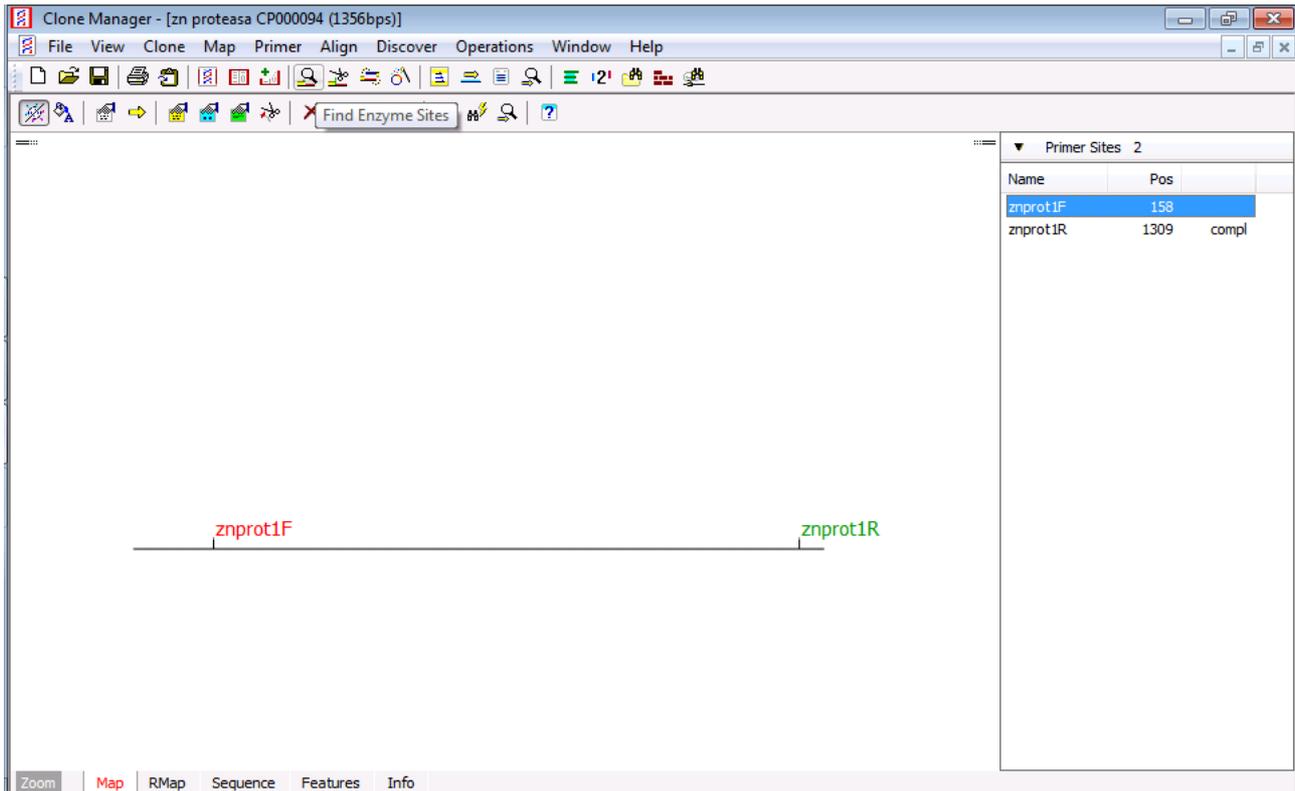


Figura 28. Gen codificante de una zinc metaloproteasa de *Ps fluorescens* Pf-0 (N° acceso CP000094). Oligonucleótidos znprot1F/znprot1R

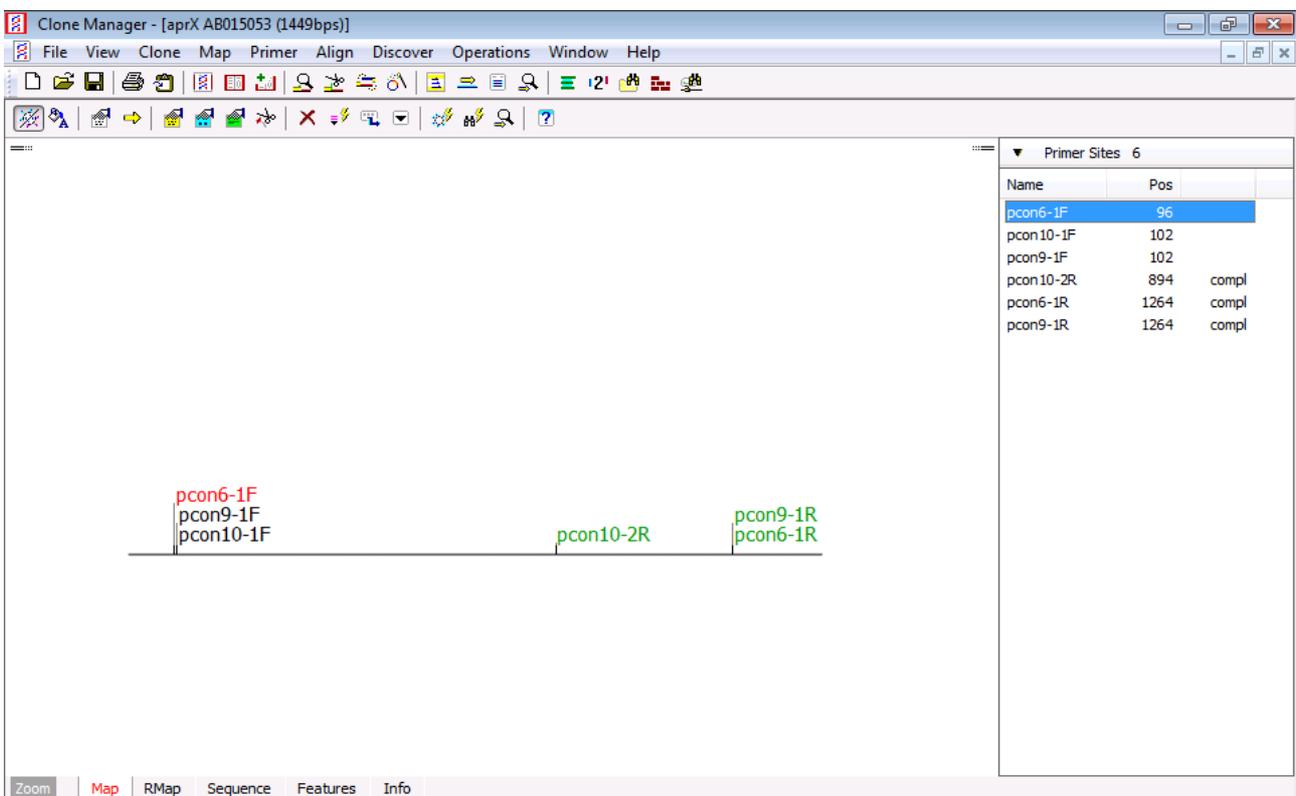


Figura 29. Gen *aprAPF33* de *Ps fluorescens* N°33 (N° acceso AB015053). Oligonucleótidos: pcon6-1F, pcon9-1F, pcon10-1F/pcon6-1R, pcon9-1R, pcon10-2R

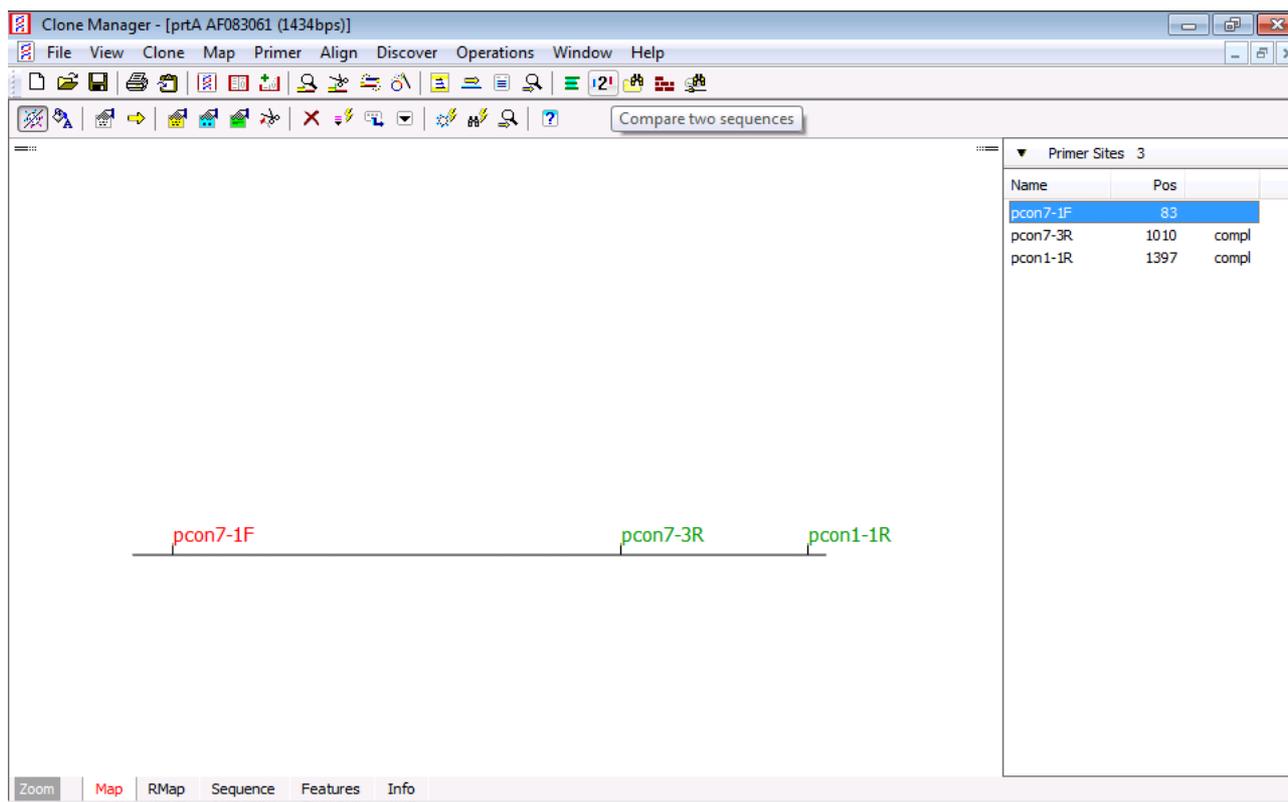


Figura 30. Gen *prtA* de *Ps. fluorescens SIKW1* (Nº acceso AF083061). Oligonucleótidos pcon1-1F, pcon7-1F/pcon1-1R, pcon7-3R. El oligonucleótido pcon1F-1F no anilla con la secuencia por poseer 4 diferencias respecto a la misma. El programa informático no lo admite.

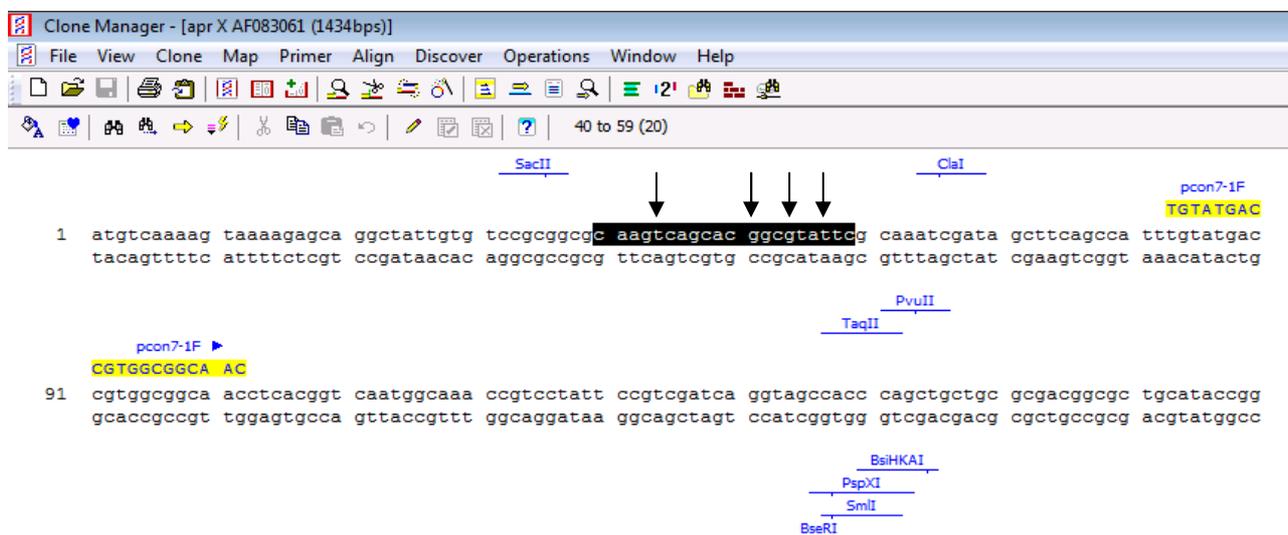


Figura 31. Gen *prtA* de *Ps. fluorescens SIKW1* (Nº de acceso AF083061) desde el nucleótido 1 hasta el 180. Se muestra resaltada en negro la secuencia de ADN molde donde hibridaría el oligonucleótido pcon1-1F (CAAGcCAGCACcGcTAcTC) en la posición 40. Véanse las 4 diferencias en las posiciones: 44,51, 54 y 57. El ADN molde tiene T, G, G, T, y el oligonucleótido C, C, T, C.

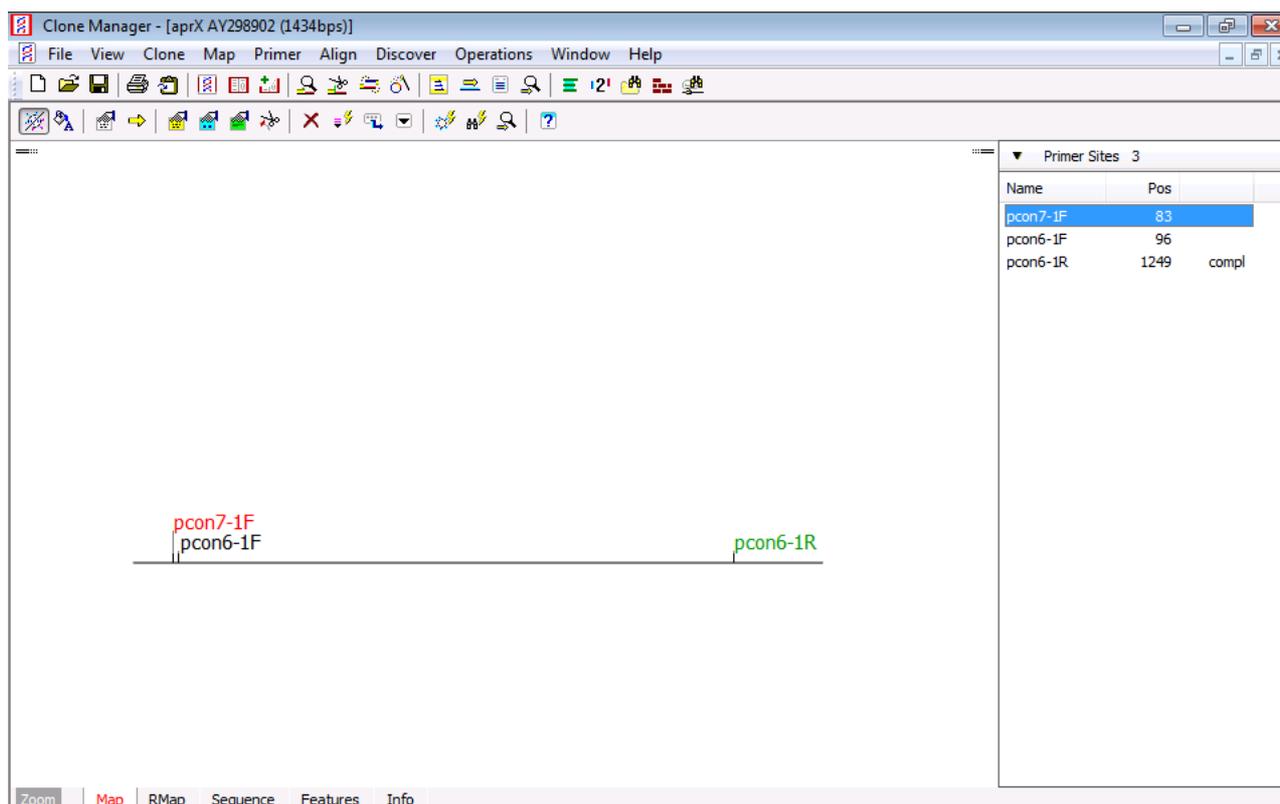


Figura 32. Gen *aprX* de *Ps fluorescens* A506 (N° acceso AY298902). Oligonucleótidos pcon6-1F, pcon7-1F/pcon6-1R, pcon7-3R. El oligonucleótido pcon7-3R no hibrida con la secuencia porque tiene una diferencia respecto a la misma.

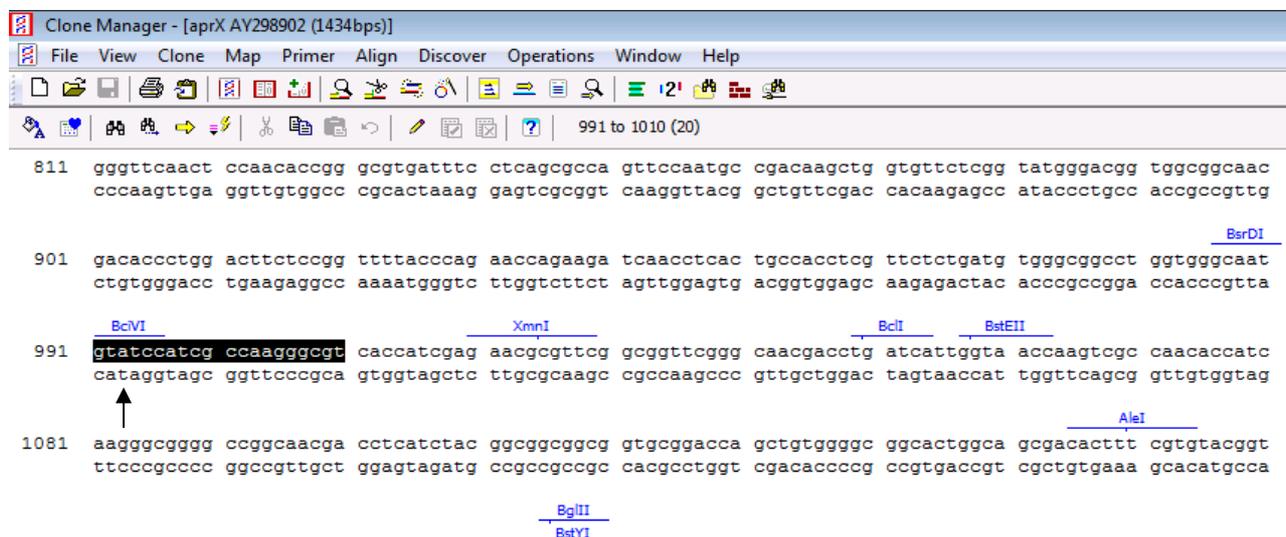


Figura 33. Gen *aprX* de *Ps. fluorescens* A506 (N°acceso AY298902) desde el nucleótido 811 hasta el 1170. Se muestra resaltada en negro la secuencia de ADN molde donde hibridaría el oligonucleótido pcon7-3R (ACGCCCTTGGCGATGGAcAC), en la posición 1010. La secuencia marcada es la directa en sentido 5'-3', se ha de atender a la secuencia complementaria, desde el extremo derecho al izquierdo, sentido 5'-3'. Véase la diferencia en la posición 993, el ADN molde tiene una T y el oligonucleótido tiene una C.

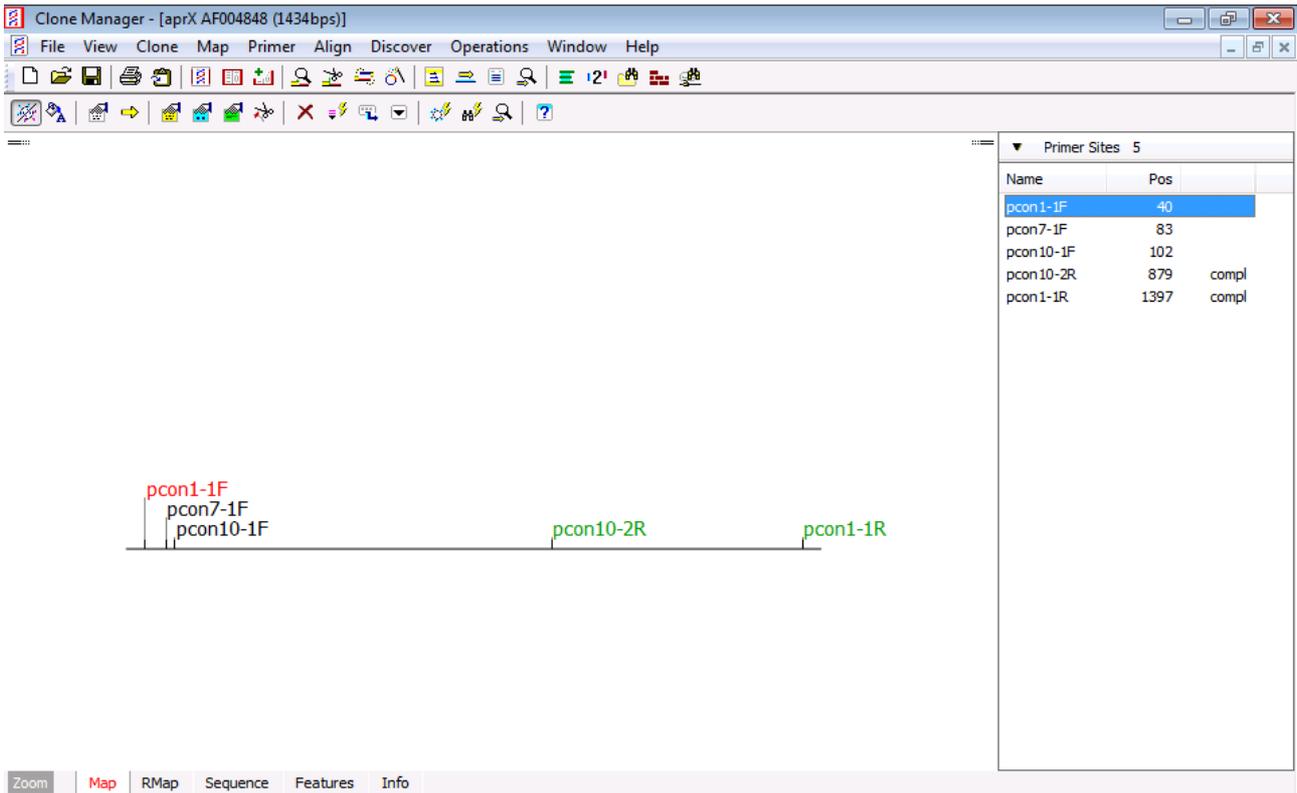


Figura 34. Gen *aprX* de *Ps fluorescens* CY091 (N° acceso AF 004848). Oligonucleótidos pcon1-1F, pcon7-1F, pcon10-1F/pcon1-1R, pcon7-3R, pcon10-2R. El oligonucleótido pcon7-3R no hibrida con la secuencia por tener una diferencia respecto a la misma.

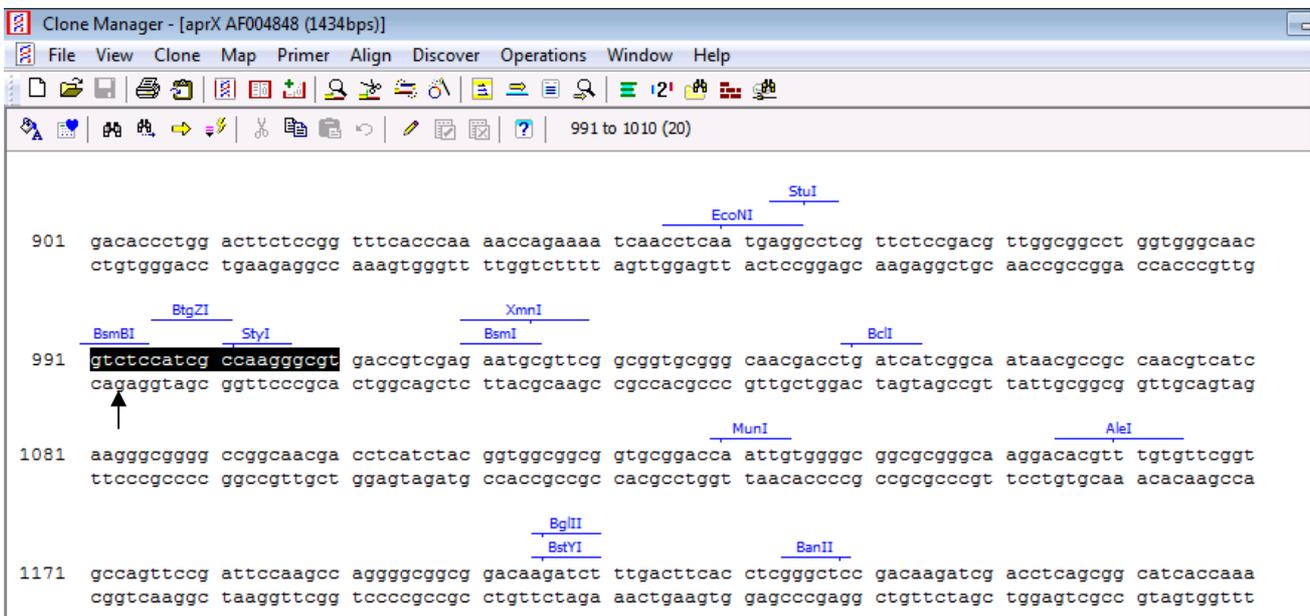


Figura 35. Gen *aprX* de *Ps. fluorescens* CY091 (N°acceso AF004848) desde el nucleótido 901 hasta el 1260. Se muestra resaltada en negro la secuencia de ADN molde donde hibridaría el oligonucleótido pcon7-3R (ACGCCCTTGCGGATGGAcAC), en la posición 1010. La secuencia marcada es la directa en sentido 5'-3', se ha de atender a la secuencia complementaria, desde el extremo derecho al izquierdo, sentido 5'-3'. Véase la diferencia en la posición 993, el ADN molde tiene una G y el oligonucleótido tiene una C.

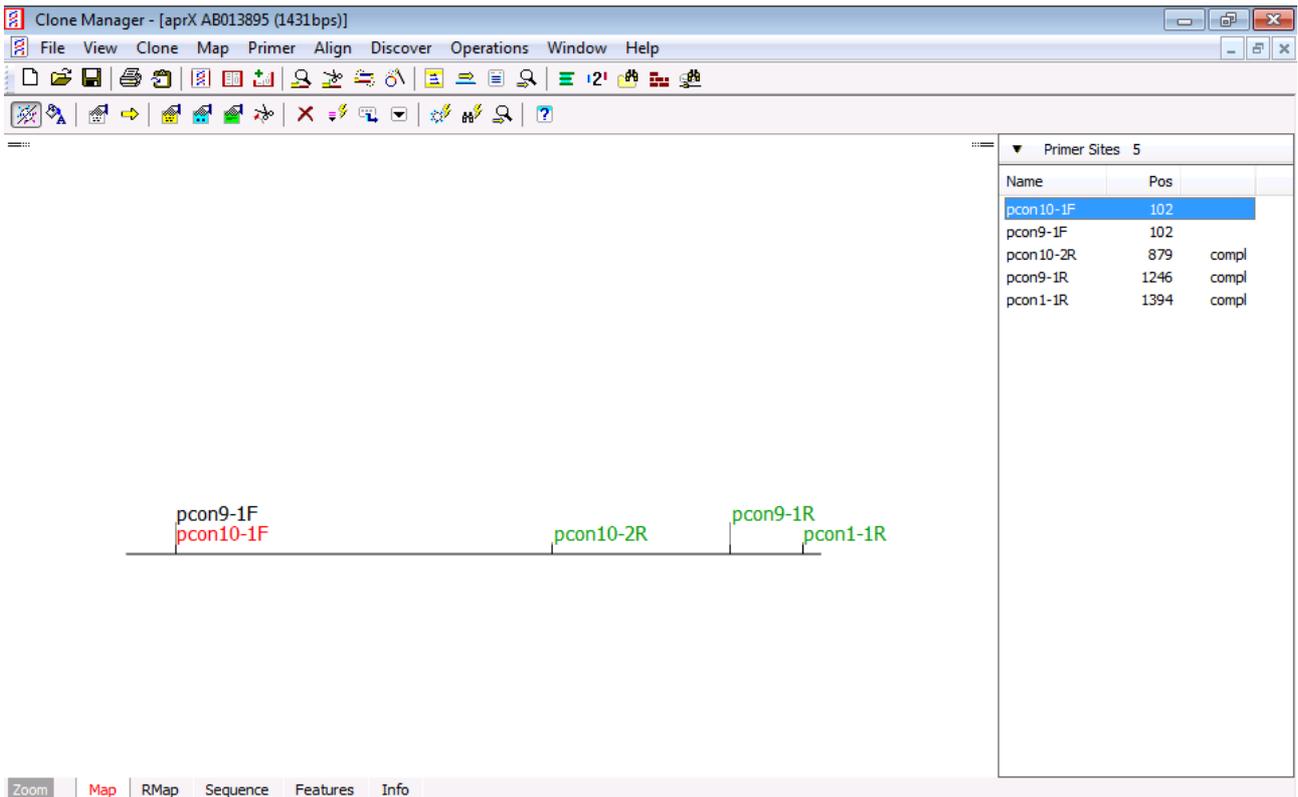


Figura 36. Gen homólogo a *aprX* de *Ps. fluorescens* N°114 (N° acceso AB013895). Oligonucleótidos pcon1-1F, pcon9-1F, pcon10-1F/pcon1-1R, pcon9-1R, pcon10-2R. El oligonucleótido pcon1-1F no hibrida con la secuencia por tener una diferencia respecto a la misma.

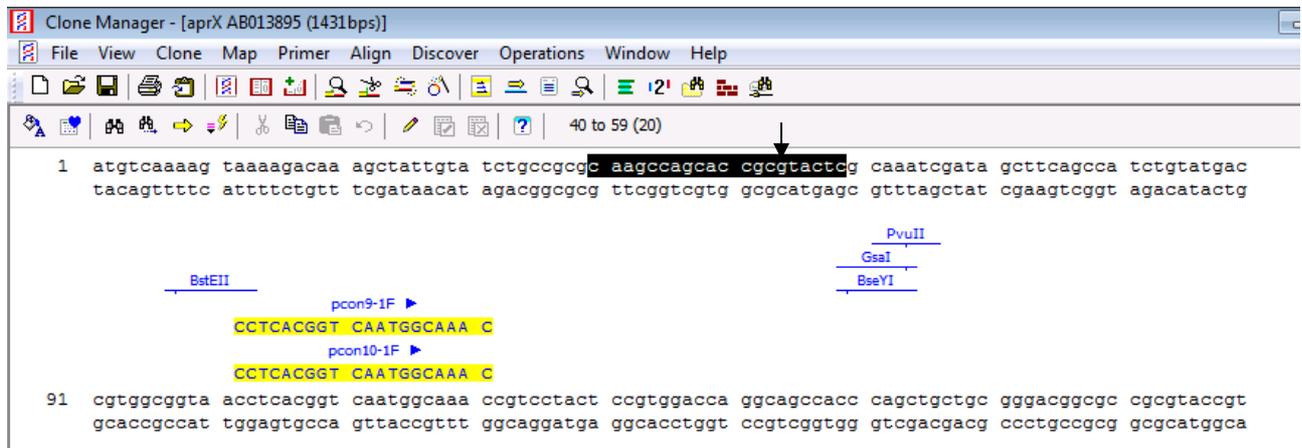


Figura 37. Gen homólogo de *aprX* de *Ps. fluorescens* No114 (N° de acceso AB013895) desde el nucleótido 1 hasta el 180. Se muestra resaltada en negro la secuencia de ADN molde donde hibridaría el oligonucleótido pcon1-1F (CAAGCCAGCACCGCtTACTC) en la posición 40. Véase la diferencia en la posiciones 54: el oligonucleótido tiene T y el ADN molde tiene G.

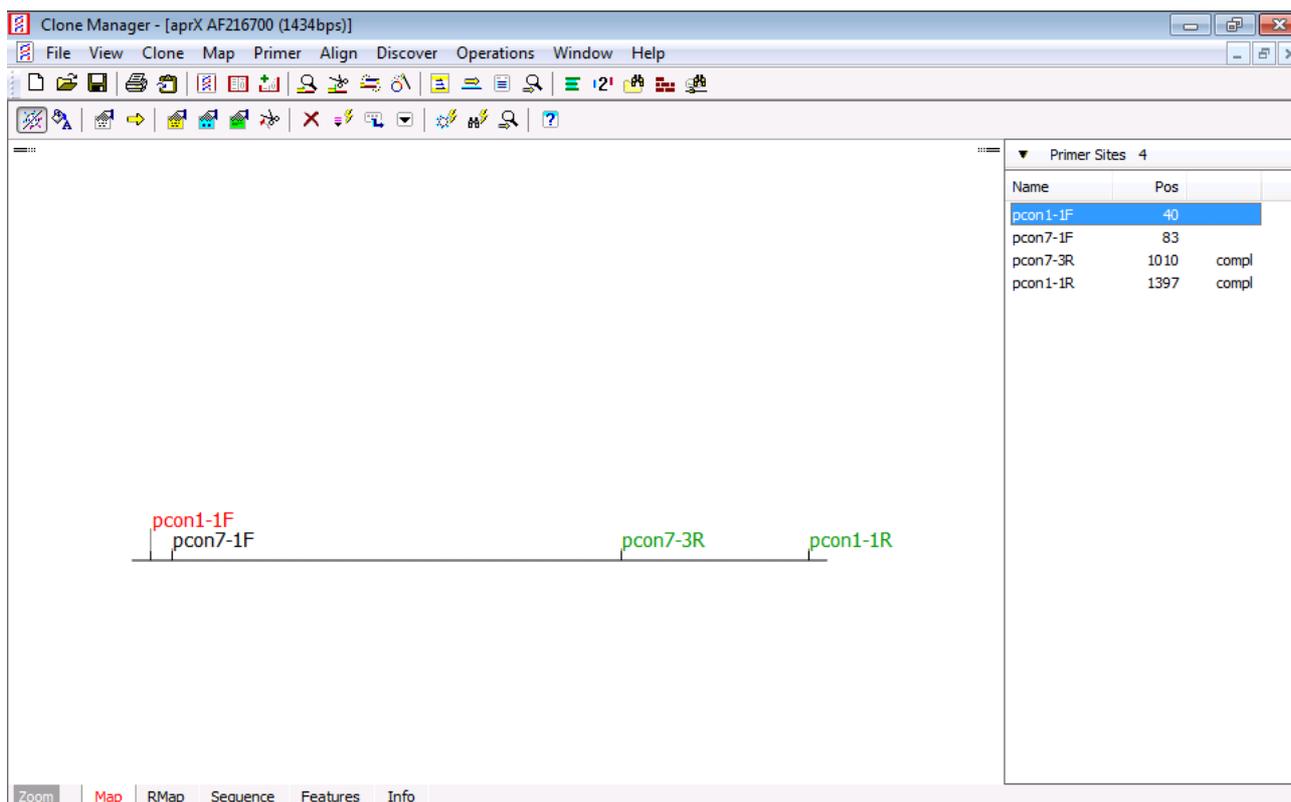


Figura 38. Gen *aprX* de *Ps. fluorescens* B52 (Nº acceso AF216700). Oligonucleótidos pcon1-1F, pcon7-1F/pcon1-1R, pcon7-3R.

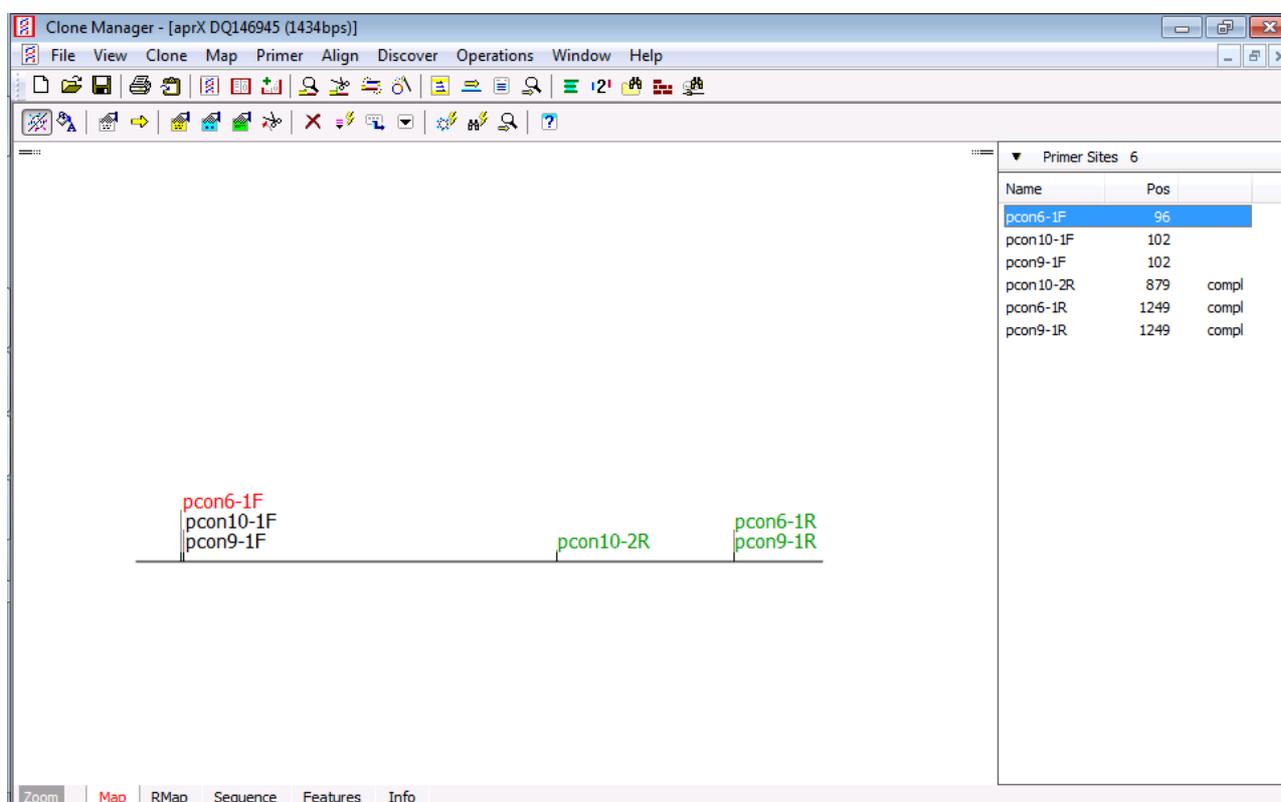


Figura 39. Gen *aprX* de *Ps. fluorescens* F (Nº acceso DQ146945). Oligonucleótidos pcon6-1F, pcon9-1F, pcon10-1F/pcon61R, pcon9-1R, pcon10-2R

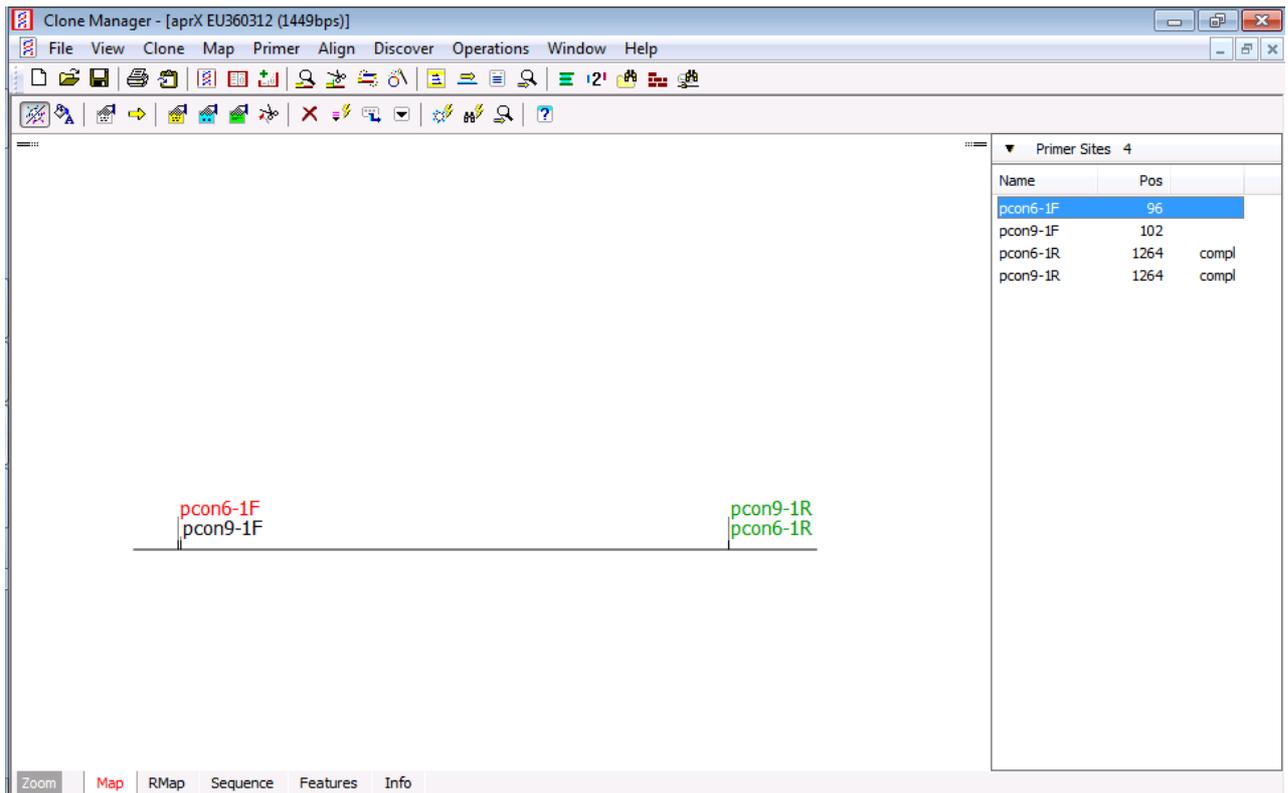


Figura 40. Gen *aprX* de *Ps. fluorescens* ATCC17400 (N° acceso EU360312). Oligonucleótidos pcon6-1F, pcon9-1F/pcon6-1R, pcon9-1R.

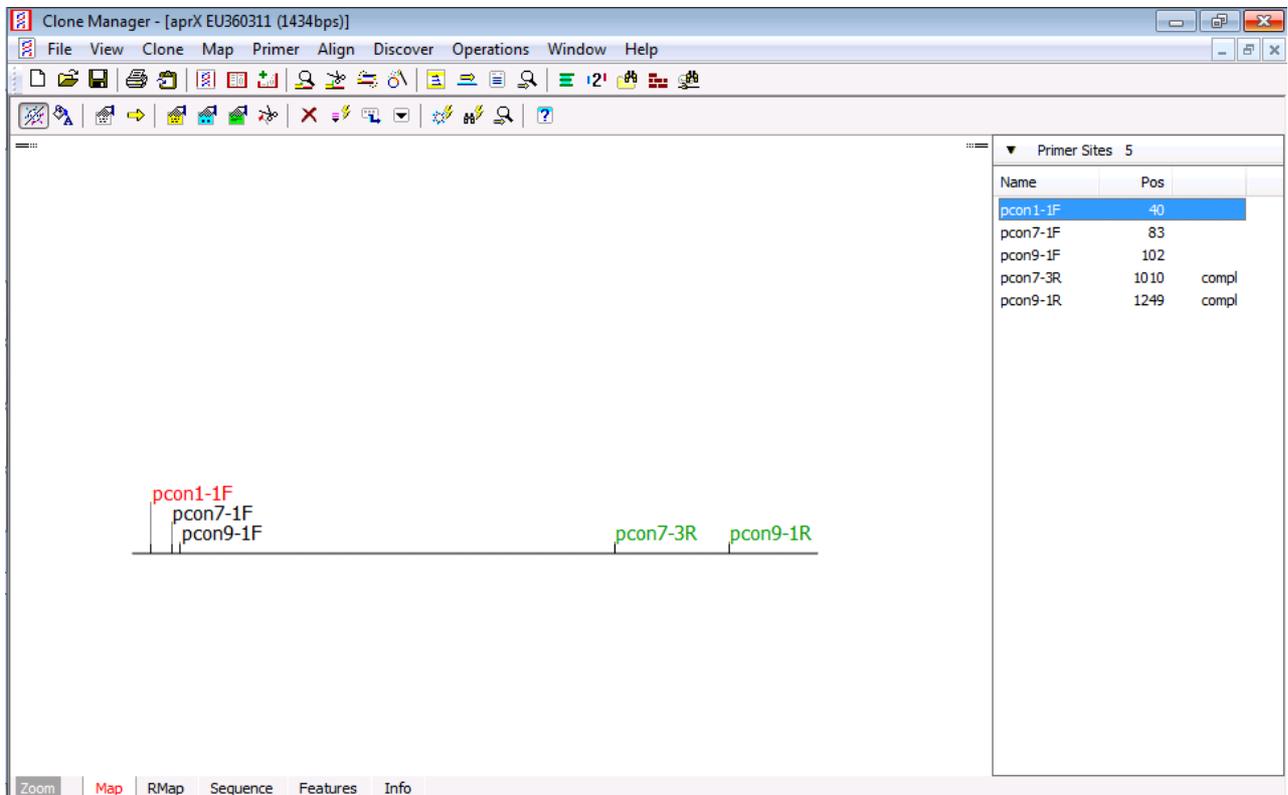


Figura 41. Gen *aprX* de *Ps. fluorescens* CIP7325 (N° acceso EU360311). Oligonucleótidos pcon1-1F, pcon7-1F, pcon9-1F/pcon1-1R, pcon7-3R, pcon9-1R. El oligonucleótido pcon1-1R, no se muestra porque el programa no permite hibridarlo con la secuencia porque posee una diferencia respecto a ésta.



Figura 42. Gen *aprX* de *Ps. fluorescens* CIP7325 (N° acceso EU360311) desde 991 hasta 1434 .Se muestra resaltada en negro la secuencia de ADN molde donde hibridaría el oligonucleótido pcon1-1R (GTGGTGACGAGGAAATCCGC), en la posición 1397. La secuencia marcada es la directa en sentido 5'-3', se ha de atender a la secuencia complementaria, desde el extremo derecho al izquierdo, sentido 5'-3'. Véase la diferencia en la posición 1383, el ADN molde tiene una G y el oligonucleótido tiene una A.

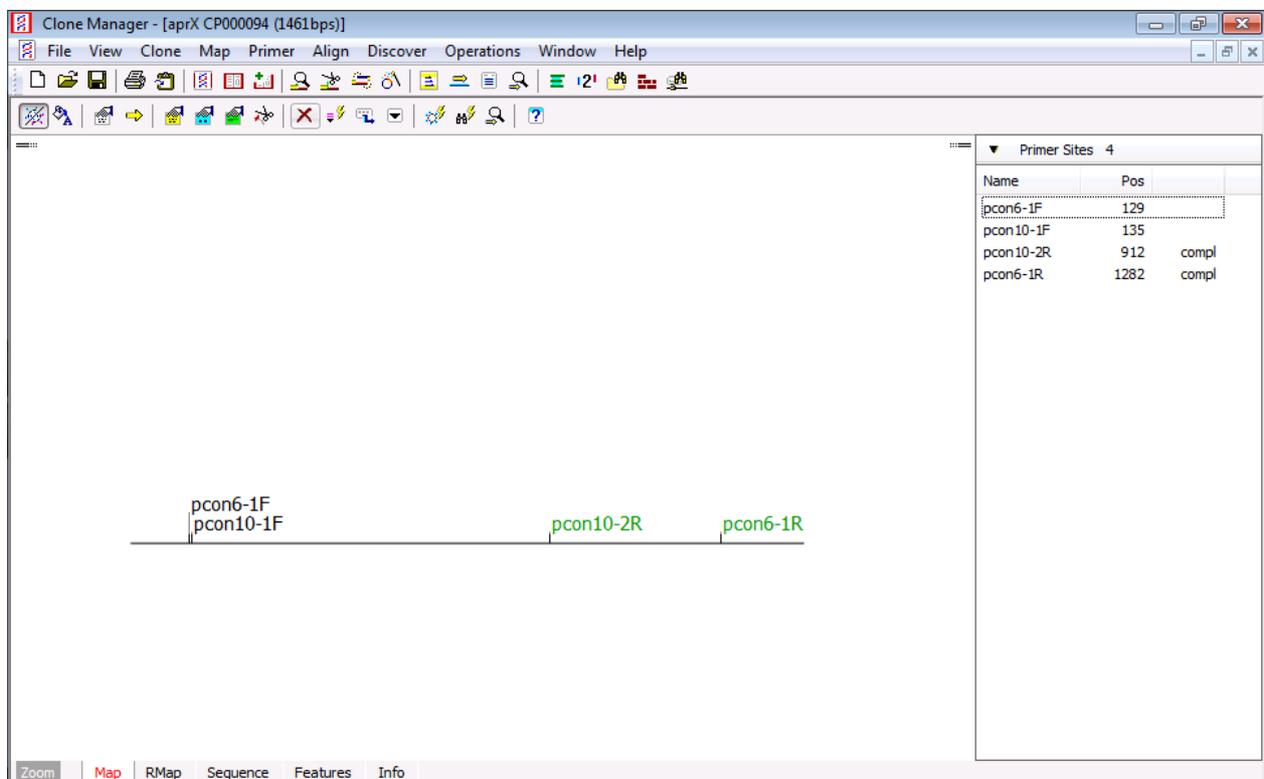


Figura 43. Gen homólogo de *aprX* de *Ps. fluorescens* Pf-01 (N° acceso CP000094). Oligonucleótidos pcon6-1F, pcon9-1F, pcon10-1F/pcon6-1R, pcon9-1R, pcon10-2R

