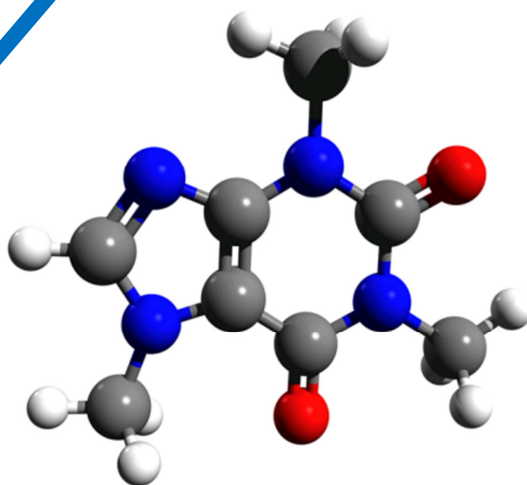


**DEGRADAR**



**INHIBIR**

**Estudi de les relacions  
entre els bacteris i la cafeïna**

Alumna: Anna Samarra Mas

Grup: 2n BAT

Curs: 2015-2016

Tutora: M<sup>a</sup> Agustina Mendoza

Centre: INS Joan Guinjoan i Gispert

*“La ciencia siempre vale la pena porque sus descubrimientos, tarde o temprano, siempre se aplican.”*

*“Mi consejo a los estudiantes de ciencia es que si desean ardientemente investigar, deberían hacerlo por todos los medios. Nada debería interponerse al deseo intenso de dedicar la vida a la Ciencia. Si tienes el anhelo de llevar a cabo investigación científica adquiere el aprendizaje preciso y por todos los medios: ¡hazlo! Difícilmente alguna otra cosa te dará tanta satisfacción y, sobre todo, tal sentido de logro”*

# ÍNDIX

1. PRÒLEG.....	3
2. INTRODUCCIÓ.....	5
3. <u>La cafeïna</u> .....	9
3.1. Origen i descobriment.....	10
3.2. Obtenció de la cafeïna.....	12
3.3. Composició molecular i propietats químiques.....	12
3.4. Característiques fisicoquímiques.....	13
3.5. Efectes positius i negatius en el cos humà.....	14
3.6. Consum de la cafeïna.....	15
3.7. Contaminació mediambiental.....	16
4. <u>Bacteris addictes a la cafeïna</u> .....	18
4.1. Introducció als bacteris procariotes.....	18
4.2. <i>Pseudomonas putida</i> .....	21
4.2.1. N-desmetilació.....	22
4.2.2. Base genètica per a la degradació de cafeïna.....	23
4.3. <i>Escherichia coli</i> .....	25
4.4. <i>E.coli</i> addicta a la cafeïna.....	27
4.4.1. Preparació de l'ADN per la seva clonació.....	28
4.4.2. Preparació del vector d'expressió.....	34
4.4.3. Unió del vector amb el gen.....	36
4.4.4. Introducció del vector amb el gen heteròleg a <i>E.coli</i> .....	36
4.4.5. Inducció de l'expressió del gen d'interès.....	37
4.4.6. Propagació del cultiu.....	37
4.4.7. Valoració de l'activitat en les cèl·lules transformades.....	40
4.4.8. Observació de proteïnes.....	40
4.4.9. Resultats.....	41
4.5. Aplicacions biotecnològiques.....	41
4.5.1. Descafeïnat biològic.....	41

4.5.2. Bioremediació ambiental.....	42
4.5.3. Producció química per a la indústria farmacèutica i cosmètica.....	43
4.5.4. Detecció de cafeïna.....	43
5. <u>Inhibició de bacteris en cafeïna</u> .....	44
5.1. Possibles causes de la inhibició bacteriana.....	44
5.2. Beneficis i aplicacions.....	46
5.3. Part pràctica.....	47
5.3.1. Pràctica Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).....	47
5.3.2. Pràctica Parc Científic de Barcelona (PCB).....	49
- PRÀCTICA 1: Creixement dels cultius bacterians.....	49
- PRÀCTICA 2: Preparació de les dilucions, lectura de la turbolesa i sembra.....	50
- PRÀCTICA 3: Comptatge de les UFC i preparació solucions amb cafeïna.....	54
- PRÀCTICA 4: Resultats.....	57
6. CONCLUSIONS.....	61
7. BIBLIOGRAFIA.....	63
8. WEBGRAFIA.....	65
9. AGRAÏMENTS.....	66

## ANNEXES

ANNEX I: Consum mundial de productes amb cafeïna

ANNEX II: Nutrició bacteriana

ANNEX III: Resultats inhibició de bacteris en cafeïna (UAB)

ANNEX IV: Taula de la relació de les UFC de cada densitat òptica de les dilucions

ANNEX V: Dades de la inhibició d'*E.coli* en cafeïna

ANNEX VI: Dades de la inhibició de la *P.fluorescens* en cafeïna

ANNEX VII: Webgrafia

# 1. PRÒLEG

La 1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6(3H,7H)-diona 1,3,7-trimetilxantina,  $C_8H_{10}N_4O_2$  o simplement cafeïna, descoberta al 1819, ens ha servit durant molts anys per començar cada matí una mica més actius.

Considerada com la substància psicoactiva més consumida arreu del món, és un potent estimulador del sistema nerviós central. És absorbida i passa ràpidament al cervell, evitant una acumulació en la sang i en l'organisme. Nosaltres no som biològicament dependents de la cafeïna, tot i que per molts, el cafè diari els permet continuar rendint a la feina. Aquesta reacció té una raó científica, ja que s'incrementen els nivells de dopamina, responsable de moltes funcions cognitives del cervell.

“Redbull et dona ales!”. Aquest eslògan es va convertir en un dels reclams de consum més importants en els últims anys. Tot i que finalment els hi va portar algun que altre maldecap, existeix una raó científica darrera. La ingesta de cafeïna, considerada com a substància dopant en les competicions esportives, provoca un augment dels nivells d'adrenalina afavorint un major rendiment muscular.

Així doncs, classificar la cafeïna com a una substància beneficiosa o perjudicial, és bastant difícil, això dependrà del punt de vista del consumidor.

El que s'ha d'assegurar la comunitat científica és la fiabilitat del seu consum. La EFSA<sup>1</sup>, organisme europeu que vetlla per la seguretat dels aliments, considera que la ingesta d'una dosi de fins a 200 mg de cafeïna o de begudes energètiques (amb contingut de 300–320, 4.000 i 2.400 mg/l de cafeïna, taurina i D-glucurono- $\gamma$ -lactone, respectivament) no donen lloc a problemes de salut en la població adulta sana.

El treball de l'Anna Samarra, aspirant a convertir-se en una brillant científica, que presenta a continuació, dóna una nova visió de la cafeïna tot repassant què és, la seva història, les virtuts i defectes i aportant una sèrie d'assajos científics amb bacteris que ens permetran conèixer una mica millor aquest combustible que ens fa aixecar cada matí.

David Ramos, European Toxicologist

Unitat de Toxicologia del Parc Científic de Barcelona

---

<sup>1</sup> EFSA Journal 2015;13(5):4102

L'experiència que tot just esteu apunt de llegir us portarà a un món microscòpic on viuen uns organismes especials que la humanitat ha utilitzat en el seu benefici (per obtenir productes de gran qualitat com el pa, iogurt, vins, cervesa) però que també han tingut un gran impacte negatiu, i de fet encara el tenen, en l'àmbit de la salut (pesta negra, tuberculosi, per no parlar dels agents submicroscòpics com els virus que estan darrera de la grip, SIDA, malaltia de l'èbola, dengue, entre d'altres).

Han passat més de tres segles des de que Anton van Leeuwenhoek va poder detectar aquest nou món i va descriure la presència "d'animàlculs" que encara a dia d'avui ens segueixen sorprenent. Aquest TR és un exemple de la versatilitat del seu metabolisme i del potencial de l'aprofitament de les eines biotecnològiques per obtenir microorganismes modificats que ens ajudin a millorar el nostre entorn.

Dra. Neus Ferrer Miralles  
Coordinadora científica de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB)  
Universitat Autònoma de Barcelona

## 2. INTRODUCCIÓ

El fet de poder crear allò que desitges, allò que necessites, o tan sols allò que suposes, és el que avui en dia mou a molts científics d'arreu del món. Poder aprofitar els avantatges d'una espècie per a una altra, poder millorar la vida d'un ésser viu, augmentar la producció d'un aliment escàs o produir un medicament nou són alguns dels exemples del que ens permet fer l'enginyeria genètica i la biotecnologia.

La biotecnologia és la ciència que estudia els éssers vius per tal d'obtenir-ne béns i beneficis per a les persones. És a dir, permet manipular, modificar i millorar la natura per extreure'n uns beneficis.

L'objectiu d'aquest treball de recerca es troba en la notícia apareguda en la publicació digital *elmundo.es*<sup>2</sup> on es cita textualment:

*“Bacterias en las máquinas Nespresso? Es una de las conclusiones a las que ha llegado un estudio realizado por científicos del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva de la Universitat de Valencia, que han analizado por primera vez la «colonización» de las famosas máquinas de café Nespresso por parte de bacterias. La conclusión, que muchas de ellas son patógenas y perjudiciales para el ser humano. Eso sí, en el café no hay ni rastro de ellas.*

*El artículo [...] revela por primera vez que **las comunidades de bacterias encontradas en la bandeja donde caen los restos del café son «potenciales conductoras de procesos relevantes biotecnológicamente, incluyendo el descafeinado y la biodescontaminación».** [...]*

*Pero, ¿por qué motivo estudiar las máquinas de café? El trabajo de estos científicos valencianos se centra en la microbiología aplicada y, más concretamente, en la bioprospección, una rama que consiste en la búsqueda de **bacterias con interés industrial.** Aquí es donde entran en juego los extremófilos, unos microorganismos que si por algo se caracterizan es por ser capaces de vivir en condiciones y ambientes extremos.*

*«Nos planteamos mirar comunidades microbianas que están en ambientes donde les va mal vivir», explica en declaraciones a este diario Manuel Porcar. ¿Y dónde no les gusta a los microorganismos vivir? En la cafeína, que además puede ser un **contaminante para el medio ambiente.** «De hecho, **la presencia de la cafeína en el medio natural es uno de los mejores indicadores de contaminación antropogénica**», esto es, causada por la huella humana, según recoge el artículo. [...]*

---

<sup>2</sup> Font: <http://www.elmundo.es/comunidadvalenciana/2015/11/23/56521a2b46163ff0798b4596.html>

«Hemos identificado **gran diversidad de bacterias** y de diferentes géneros, como *Pseudomonas* y *Enterococcus*, algunas de las cuales son patógenas», insiste Porcar. En la primera parte del experimento, por tanto, se observó una gran diversidad microbiana, es decir, de microbios.»

Així doncs, s'ha descobert que en les màquines que el George Clooney anuncia tot dient la mítica frase de: 'What else...?', hi ha alguna cosa més que cafè: bacteris, els quals són especials per dues raons. La primera, perquè són capaços de viure en un medi hostil. I la segona, perquè són capaços de degradar la cafeïna. Aquesta capacitat podria ser utilitzada en processos biotecnològics.

Per tant, ens plantegem **dos eixos** que estructurin el tema d'aquest treball de recerca. Per una banda, **els bacteris que per la seva pròpia naturalesa tenen la capacitat de degradar la cafeïna**. D'aquesta propietat, si es produeix un bacteri addicte a la cafeïna, és a dir, un bacteri al que se li transfereixen els gens que donen la propietat de degradació de cafeïna, podrem obtenir tot un seguit d'aplicacions biotecnològiques molts interessants que resoldrien els **problemes de contaminació que causa la cafeïna**, tal i com apunta la notícia.

Per l'altra banda, el fet que la majoria de bacteris són incapaços de viure en cafeïna (excepte els que la degraden), o sigui, **la propietat de la cafeïna d'inhibir el creixement bacterià**.

En aquest treball, doncs, es mostra com seria el procediment per a crear un bacteri addicte a la cafeïna i demostra, així com ho han dit diversos científics, que la cafeïna impedeix el creixement bacterià. Tot acompanyat d'una base teòrica absolutament necessària per a complementar la recerca.

## **ESTRUCTURA DEL TREBALL**

El tema principal d'aquest treball és presentar dues relacions que es poden establir entre els bacteris i la cafeïna: **la degradació de cafeïna per part de bacteris i la inhibició de bacteris per part de la cafeïna**.

En un primer apartat es presenta la molècula de la cafeïna: la seva història, les característiques i el consum d'aquesta arreu del món.

Seguidament es desenvolupa la primera relació: **bacteris addictes a la cafeïna**. Aquesta part està composta per una part teòrica sobre el tema, la qual



inclou la presentació dels bacteris involucrats en la creació d'un organisme transgènic que degradi la cafeïna (*E.coli* i *Pseudomonas putida* CBB5) i el procediment que es duu a terme per a formar aquest transgènic.

Aquest procediment està complementat amb la part pràctica que vaig dur a terme a principis d'estiu a la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) gràcies al Programa Argó, impulsat per aquesta mateixa universitat. Moltes de les pràctiques que vaig dur a terme allí són les mateixes que es fan per a crear un organisme transgènic.

I a continuació es presenta la segona relació: **la inhibició de bacteris en cafeïna**. Aquesta inclou una base teòrica sobre les possibles causes d'aquest fenomen i la part pràctica que demostra que els bacteris deixen de créixer en cafeïna a partir d'una certa concentració. Aquesta part pràctica la vaig dur a terme la primera setmana de setembre als laboratoris del Parc Científic de Barcelona (PCB) gràcies al programa Batx2lab.

## OBJECTIUS

**L'objectiu principal d'aquest treball de recerca és fer una demostració tant teòrica com pràctica de les dues relacions que es poden establir entre els bacteris i la cafeïna: degradar i inhibir.**

A nivell personal em vaig proposar poder gaudir de la realització d'aquest treball i aprendre el màxim d'ell.

L'experiència d'investigar als laboratoris de la Universitat Autònoma de Barcelona i del Parc Científic m'ha permès adquirir nous coneixements que de ben segur em seran útils en un futur.

Vull apuntar que poder assolir aquest objectiu d'una manera satisfactòria és la raó principal que em fa estar orgullosa del meu treball.

## METODOLOGIA

La metodologia emprada en la realització d'aquest treball consisteix en la recerca d'informació i recollida de dades d'internet. El fet és que tant una relació com l'altra engloben temes bastant recents, dels quals no hi ha cap cita

bibliogràfica. Així doncs, gran part de la informació ha estat extreta d'articles científics d'internet (la majoria en anglès).

Pel que fa a la part pràctica, la seva realització s'ha dut a terme en dos llocs diferents.

Vaig ser seleccionada per participar al Programa Argó 2015 impulsat per la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Gràcies a això, vaig tenir l'oportunitat d'estar durant dues setmanes als laboratoris de l'Institut de Biomedicina i Biotecnologia (IBB) de la UAB, sota la tutoria de la professora Neus Ferrer. La Neus i el seu equip d'investigació es centren en la producció de proteïnes recombinants.

Durant la meva estada vaig poder participar en les pràctiques i experiments que es duen a terme per a produir una proteïna recombinant, moltes de les quals, per no dir totes, són les mateixes que es duen a terme per produir un organisme transgènic, ja que una proteïna recombinant és una proteïna codificada per un gen que es troba en una cèl·lula hoste, és a dir, que ha estat transferida a una altra cèl·lula. A més a més, vaig poder tenir accés a la base de dades de la UAB per extreure tota la informació que em fos necessària.

Abans de saber que havia estat seleccionada per participar al Programa Argó vaig decidir presentar-me candidata al programa Batx2lab. Aquest programa està impulsat pel Parc Científic de Barcelona (PCB) i es basa en la realització de la part pràctica dels treballs de recerca que els candidats proposen. En els laboratoris del PCB vaig realitzar la part pràctica d'inhibició de bacteris en cafeïna, tutoritzada pel professor David Ramos.

La participació en aquests programes m'ha permès poder realitzar la part pràctica del meu treball i arribar a resoldre el meu plantejament inicial: **demostrar que hi ha un bacteri que degrada la cafeïna, aconseguint així reduir el factor contaminant d'aquesta i, per un altre costat, demostrar que la cafeïna inhibeix el creixement bacterià, del qual se'n poden extreure aplicacions biotecnològiques.**

### 3. La cafeïna

La cafeïna és un alcaloide derivat del grup de les xantines, de la família de les metil-xantines, les quals pertanyen a un grup de bases puríniques. Es caracteritza per ser cristal·lina, inodora, incolora i amarga.

La cafeïna és sintetitzada de forma natural per diverses plantes com la del cafè, el mate, el guaranà (paul·línia) o el cacau, entre d'altres.

La forma més directa que tenim les persones d'ingerir cafeïna és a través del cafè o el te.

La cafeïna estimula el sistema nerviós central humà i produeix certs canvis en el metabolisme dels greixos. Ben lluny de la tradició anglicana de prendre el te per berenar, es té la concepció que la cafeïna redueix la son i la fatiga i la població la consumeix com una via per incrementar el rendiment laboral i social durant el dia a dia, i per això és consumida en quasi totes les edats i en qualsevol classe socioeconòmica.

A més a més de considerar-se psicoestimulant, també es considera un fàrmac gràcies als seus efectes beneficiosos per la salut, els quals han estat provats, experimentats i acceptats per la comunitat científica<sup>3</sup>.

Tot i els seus beneficis, la cafeïna es considera una droga, depenent de l'ús que se'n faci. Aquest és un dels motius principals de polèmica en contra la cafeïna que ha fet que, al llarg dels anys, la producció i subministració d'aquesta patís certs entrebancs. La cafeïna es considera dopatge en l'esport.

Sigui com sigui, actualment la cafeïna és present en la vida diària de les persones, des del cafè que es pren de bon matí, el refresc que es beu quan es surt de festa fins la beguda energètica que es pren abans d'anar al gimnàs. En alguns casos es pren cafeïna indirectament perquè simplement és un compost que forma part del producte, i en d'altres la ingesta d'aquesta és essencial pel resultat i benefici que t'ha d'oferir el producte.

---

<sup>3</sup> LOZANO, Ricardo Pardo, et al. *Cafeïna: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso*. Adicciones: Revista de socidrogalcohol, 2007, vol. 19, no 3, p. 225-238.

Ara bé, sabent la importància i la gran presència de la cafeïna en la nostra societat, és lògic que els residus que la continguin provoquin una certa contaminació. Els compostos químics relacionats amb la cafeïna s'han convertit en importants agents contaminants de l'aigua, no només degut al consum generalitzat de cafè, sinó també a l'ús de medicaments que la contenen.

Així doncs veiem les dues cares de la cafeïna. Per una banda, el seu gran ús i benefici per la salut humana i, per l'altra banda, els perjudicis que l'ús d'aquesta pot causar a la societat i al medi ambient.

### 3.1. Origen i descobriment

La cafeïna ha estat consumida pels humans durant segles malgrat els intents de prohibir el seu ús per raons morals, econòmiques, mèdiques o polítiques. Va passar un llarg temps fins que no es va descobrir. S'ingeria a partir d'altres aliments, però se'n desconeixia l'existència.



Grams de cafè<sup>4</sup>

El que no se'n desconeixia eren les seves propietats estimulants. N'és un clar exemple el fet de que a l'Edat de Pedra els humans mastegaven fulles de baies, les quals contenen cafeïna, per alleujar el cansament i estimular el cos. Però ja des del Paleolític els humans consumien cafeïna a través del te de camèlia.

Pel que fa a la civilització olmeca, no és fins l'any 1000 aC que comencen a cultivar arbres de cacau i es fa el *xocolatl*, una selecta beguda maia.

Ja ben entrat el segle IX es descobreix el cafè a Aràbia, Àfrica i no és fins l'any 900 que s'expandeix i es cultiva per primer cop a Etiòpia. Al cap d'uns 200 anys van aparèixer les primeres plantacions de cafè al Japó.

Entre els anys 1400 i 1500 el cafè es propaga des d'Àfrica fins a l'Orient Mitjà gràcies al desenvolupament de la tècnica de moldre i torrar. Pel que fa a Espanya, es descobreix la xocolata de la mà dels asteques al 1519.

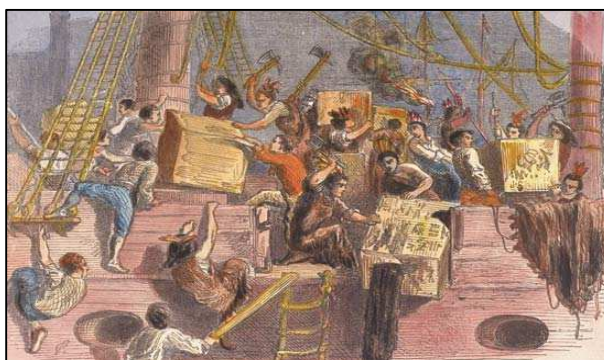
---

<sup>4</sup> Font: <http://barismollanero.blogspot.com.es/2015/07/el-cafe-en-la-historia.html>

El 1657 va ser l'any en que es va vendre per primer cop te a Anglaterra. A partir d'aquest moment el te es converteix en un símbol del Regne Unit i esdevé una tradició coneguda mundialment: l'hora del te.

A Amèrica el cafè no arriba fins al 1700 gràcies als colons.

Un fet històric important en el qual es relaciona el te directament és l'anomenat Boston Tea Party (El motí del te), en el qual els colons americans van protestar contra Gran Bretanya llençant al mar tot un carregament de te. Aquest fet és considerat un precedent de la Guerra d'Independència dels Estats Units.



*Boston Tea Party*<sup>5</sup>

A l'any 1819 el químic alemany Friedrich Runge descobreix el compost químic del cafè i l'anomena "cafeïna". Va realitzar aquest experiment a petició de Johann Wolfgang von Goethe.

L'estructura molecular de la cafeïna la va descobrir Hermann Emil Fischer a finals del s. XIX. Va ser el primer científic en sintetitzar la cafeïna totalment i va guanyar el Premi Nobel de química al 1902.

A partir d'aquí, el coneixement de la cafeïna ja era molt extens i per això el que es feia era experimentar amb ella. Es van començar a produir moltes begudes i refrescos.

Al 1926, Estats Units incauta 60 barrils de "Coca Cola" en camí des d'Atlanta (Georgia) fins a Chattanooga (Tennessee), considerant la "Coca Cola" com un producte adulterat per contenir cafeïna falsa i al·legant que era perjudicial per a la salut. Com a repercussió de la mala fama de les propietats incertes de la cafeïna, l'Administració de Drogues i Aliments dels Estats Units (FDA) va proposar eliminar la cafeïna de les begudes gasoses l'any 1980.




<sup>5</sup> Font: <http://global.britannica.com/event/Boston-Tea-Party>




Tot i així, al 1985 es llença al mercat “Jolt Cola”, una beguda refrescant que porta dues vegades més quantitat de cafeïna que un refresc comú, i pocs anys després, al 1987, es produeix la beguda energètica “Red Bull” a Àustria, la qual conté 80 mg de cafeïna cada 250 ml.

Actualment, la cafeïna és un component de determinats aliments i begudes i present a la vida diària de moltes persones.

### 3.2. Obtenció de la cafeïna

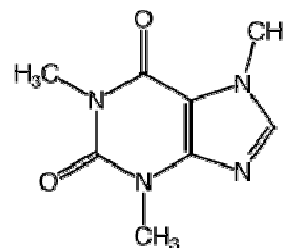
La cafeïna s’obté a partir de processos químics de síntesi o també s’extreu de forma natural. Apareix de forma natural en les fulles, llavors o fruits de més de 60 plantes. A continuació alguns exemples:

PLANTA	Planta del cafè	Planta del te	Cacau (arbre)
LOCALITZACIÓ	Llavors	Fulles	Llavors
FOTOGRAFIA			

PLANTA	Guaranà o paulínia	Herba mate	Cola
LOCALITZACIÓ	Fruit	Fulles	Llavors
FOTOGRAFIA <sup>6</sup>			

### 3.3. Composició molecular i propietats químiques

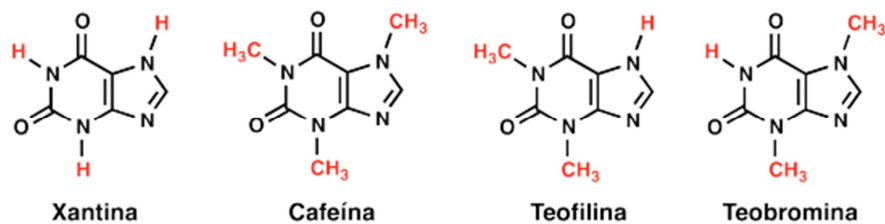
Com ja hem dit anteriorment, la cafeïna és un alcaloide de la família de les xantines, que també inclou els compostos teofil·lina (1,3-dimetilxantina) i teobromina (3,7-dimetilxantina). Les 3 són xantines metilades, per la qual cosa també són conegudes com a metilxantines.



Esquema molecular de la cafeïna<sup>7</sup>

<sup>6</sup> Font imatges: Google Imatges

<sup>7</sup> Font: <http://www.chw.net/foro/off-topic/234210-molecula-cafeina-compuesta.html>



Família de les metilxantines<sup>8</sup>

La fórmula molecular de la cafeïna és  $C_8H_{10}N_4O_2$  i té un pes molecular de 194,19 g/mol. El seu nom sistemàtic (IUPAC) és 1,3,7- trimetilxantina. També se l'anomena com 1,3,7-trimetil-2,6- dioxopurina o 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona. El seu valor nutritiu és molt baix perquè només la componen minerals (potassi, magnesi, calci i crom) i vitamines.

La cafeïna és la substància psicoactiva més consumida al món, i actua com a un estimulants metabòlic i del sistema nerviós central humà, activant l'estat d'alerta i de resistència al cansament. També provoca vasoconstricció i certs canvis en el metabolisme dels greixos.

Es caracteritza per provocar insomni i per ser una molècula amb propietats antioxidants. També és coneguda per ser digestiva, ja que en dosis baixes la cafeïna incrementa els suc digestius i biliars i millora la digestió.

La cafeïna és present en molts medicaments tant per les seves propietats estimulants com diürètiques (ajuda al cos a eliminar líquids com l'aigua i eritròcits a través de l'orina). També és present en medicaments com analgèsics (eliminen o redueixen el dolor), pastilles per a reduir els greixos corporals i medicaments pels refredats.

A més a més, es caracteritza per ser un pesticida natural perquè repel·leix llimacs, cargols, i diferents tipus d'insectes en moltes plantes, per això és present en molts cultius ecològics.

### 3.4. Característiques fisicoquímiques de la cafeïna

En el seu estat pur, la cafeïna és un sòlid cristal·lí blanc, inodor i amarg en forma d'agulles blanques o pols. També es pot cristal·litzar en forma de primes hexagonals.

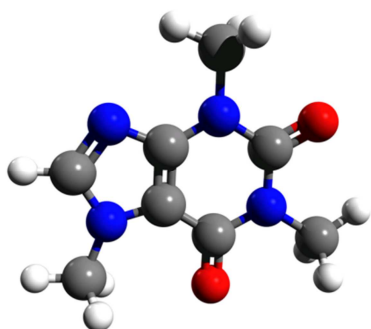
<sup>8</sup> Font: <https://isqch.files.wordpress.com/2013/12/xantinas2.png>



El seu punt de fusió és de 23°C i és eflorescent en contacte amb l'aire, és a dir, quan entra en contacte amb aquest es redueix a pols per ella mateixa per la pèrdua d'aigua i cristallització. El seu punt de sublimació (ebullició) és de 178°C i té una densitat de 1,23 g/mL.



*Cafeïna en pols, en estat pur<sup>9</sup>*



*Molècula de cafeïna en 3D<sup>10</sup>*

La cafeïna és soluble en aigua i la seva solubilitat augmenta a mesura que augmenta la temperatura, per tant, en aigua bullint és quan resulta més soluble. Tot i la seva solubilitat en aigua, té molta més afinitat amb certs dissolvents orgànics que són molt insolubles en aigua com el cloroform (CHCl<sub>3</sub>) i el diclorometà (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

### 3.5. Efectes positius i negatius en el cos humà

La cafeïna és un producte mundialment consumit pels seus efectes positius. Molta gent consumeix cafeïna a través del cafè, refrescos o begudes energètiques per aconseguir els seus efectes estimulants.

La següent taula mostra els principals efectes de la cafeïna sobre la salut. Els efectes positius estan mesurats fins a dues tasses de cafè al dia, i els negatius, fins a vuit tasses.

És important saber que aquests efectes poden donar-se de forma diferent segons el sexe i l'edat de la persona, la quantitat de cafeïna ingerida, la forma en que s'ingereix i si es pateix alguna malaltia greu o no.

<sup>9</sup> Font: <http://pulsoslp.com.mx/2015/09/01/advierten-que-cafeina-en-polvo-puede-ser-letal/>

<sup>10</sup> Font: <http://elastrolabiodeazarquiel.blogspot.com.es/2011/05/bacterias-adictas-al-cafe.html>



EFFECTES POSITIUS	EFFECTES NEGATIUS
-Augment del grau d'estat d'alerta	-Tremolors i mala coordinació
-Augment de la temperatura corporal i pressió sanguínia	-Mal de cap
-Producció d'orina	-Estat de nerviosisme
-Segregació d'àcids gàstrics	-Insomni
-Augment del rendiment mental i millora de l'estat d'ànim	-Problemes estomacals i diarrees
-Millora del rendiment físic: crema grassa enlloc de carbohidrats, la qual cosa augmenta la resistència.	-Taquicàrdia
-És antioxidant, per tant pot prevenir malalties cardiovasculars.	-Addicció
	-Augment de glucosa a la sang, perjudicial per als diabètics.
	-Afecta a la fertilitat
	-Visió borrosa
	-Sequedat bucal
	-Breu insuficiència respiratòria

### 3.6. Consum de la cafeïna

La producció de cafeïna mundial a l'any ronda al voltant dels 100.000/120.000 milions de tones, equivalent a la ingesta de 70 mg de cafeïna al dia per habitant.

El cafè, el te, la xocolata, els refrescos i begudes energètiques són els productes a partir dels quals es consumeix més quantitat de cafeïna i són els productes més consumits per la població.

PRODUCTE	QUANTITAT DE CAFEÏNA (aprox.)
Una tassa de cafè <i>expresso</i> de càpsules de 60 ml	63 mg
Una llauna d'una beguda energètica ( <i>Monster</i> )	145 mg
Una llauna de "Coca Cola" de 330 ml	41 mg
Una tassa de te	24 mg
Una barra de 40 g de xocolata negra	194 mg

El cafè contribueix en un 54% del consum mundial de la cafeïna, seguit d'un 43% del te. Als Estats Units i al Canadà el consum mitjà per una persona al dia és entre 210 i 238 mg mentre que al Regne Unit, Finlàndia i Suècia és de 400 mg. Els nens de 7 a 10 anys dels Estats Units prenen de 0,5 a 1,8 mg/kg de cafeïna diàriament procedent dels refrescos.

Pel que fa a Espanya, no es caracteritza per ser un país important en el consum de cafeïna, ja que aquesta es consumeix només a través de refrescos i cafè. Un 44% dels espanyols pren entre una i dos tasses de cafè al dia, i el 34% entre dos i tres tasses. La franja d'edat en la que s'ha registrat més consum de cafè, i per tant, cafeïna, a Espanya està entre els 46 i els 55 anys.

Les dades que aporta la taula que indica el consum de cafeïna segons diferents begudes en diversos països del món<sup>11</sup> corresponen a l'any 1995, però són útils per a fer-nos una lleugera idea de que si 10 anys enrere es consumia aquesta quantitat de cafeïna, actualment és molt probable que hagi augmentat a causa de l'aparició de noves begudes i de l'estrès de la vida quotidiana. Cal dir que com més ric i desenvolupat és un país, més cafeïna consumeix, i com més pobre i subdesenvolupat és, més en produeix i menys en consumeix.

La tradició d'un país és un factor que també afecta al consum de la cafeïna. Per exemple, el Regne Unit consumeix molt més te que els Estats Units per la seva tradició de "l'hora del te".

Per acabar, és important remarcar que no tot el consum de cafeïna prové de productes alimentaris, sinó que també una gran part es consumeix a través dels medicaments. La cafeïna es troba en molts medicaments pel mal de cap, per calmar el dolor, per controlar el desig de menjar, per mantenir-se despert, pels refredats, l'asma i la retenció de líquids. El contingut de cafeïna dels medicaments oscil·la entre 7 mg i 200 mg per pastilla. Alguns dels medicaments que contenen cafeïna són el Frenadol Complex, Durvitan i Cinfamar.

### 3.7. Contaminació mediambiental

El consum de cafeïna porta una sèrie de conseqüències, no sempre beneficioses, que afecten a la salut i al medi ambient. Per la salut comporta uns efectes negatius (insomni, mal de cap, nerviosisme, diarrees...) tal com hem anomenat anteriorment (pàgina 14-15).

Pel que fa al medi ambient, la principal conseqüència que comporta el consum de la cafeïna és la **contaminació**. El consum de cafeïna fa que es

---

<sup>11</sup> ANNEX I: Consum mundial de productes amb cafeïna

produeixin una gran quantitat de residus que la contenen, els quals acaben contaminant el medi ambient.

Segons l'article publicat per *vistaalmar.es*<sup>12</sup>, l'any 2012 diversos científics de la Washington State University van trobar nivells elevats de cafeïna a l'Oceà Pacífic, davant la costa d'Oregon, probablement procedents de derrames d'aigües residuals negres i fosses sèptiques. Van apuntar que la cafeïna afecta negativament la vida de la fauna marina, tot i que les concentracions de cafeïna siguin baixes.

Altres estudis previs van trobar cafeïna en aigües d'altres llocs del món, com al Mar del Nord, al Mediterrani, al port de Boston i a la Bahía de Sarasota, Florida. Com més a prop està una gran ciutat del mar, més contaminada de cafeïna està la seva costa.

L'excés de cafeïna en aigües residuals i oceàniques provoca un efecte negatiu sobre els ecosistemes marins, afectant el metabolisme de les espècies marines i actuant com un agent tòxic. Els peixos i animals aquàtics són incapaços d'acceptar la cafeïna com a un nutrient i degradar-la, i quan aquesta s'acumula, pateixen un desequilibri en el seu metabolisme i moren.

Per tant, la cafeïna és un contaminant present en moltes aigües residuals, i la causa d'això és l'extens consum d'aquesta que provoca grans quantitats de residus que van a parar a rius i oceans.

Igual com amb qualsevol contaminant, és necessari **trobar una solució** a aquest problema per evitar que la cafeïna segueixi afectant als ecosistemes marítims en que es troba acumulada.

---

<sup>12</sup> Font de la informació: <http://www.vistaalmar.es/medio-ambiente/contaminacion/2588-descubren-oceano-pacifico-contiene-altos-nivelescafeina.html>

## 4. Bacteris addictes a la cafeïna

Després d'una presentació de la molècula de la cafeïna, és hora de parlar del què en fem d'ella. Però anirem més enllà d'un cafè descafeïnat, de màquina o de sobre. És més, no es tracta de buscar una nova propietat o aplicació a la cafeïna, sinó de solucionar els problemes mediambientals que causa: la contaminació en aigües residuals i oceàniques. I com ho farem? Amb l'ajuda dels bacteris.

### 4.1. Introducció als bacteris

Els organismes cel·lulars presents sobre la Terra es poden dividir en dos grans grups: els organismes eucariotes i els organismes procariotes. Per una banda, els organismes eucariotes són aquells que tenen el material genètic delimitat per una estructura membranosa, el nucli, el qual el separa del citosol. Aquests organismes són animals, vegetals, fongs i protists.

Per l'altra banda, els organismes procariotes no tenen el material genètic delimitat per una membrana nuclear i per tant, el seu ADN es troba escampat pel citoplasma, reunit al nucleoide. A més a més, a diferència dels eucariotes, aquests no presenten en el seu citoplasma orgànuls cel·lulars. Els organismes procariotes principals són bacteris i cianobacteris.

Els bacteris són organismes d'estructura senzilla, microscòpics i predominantment unicel·lulars que es reproduïxen asexualment o parasexualment<sup>13</sup>.

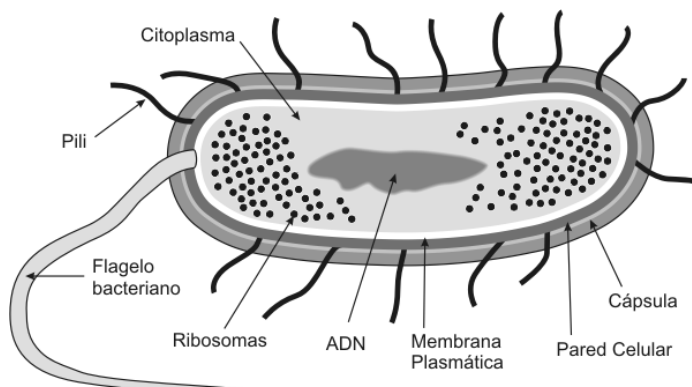
Les parts principals d'una cèl·lula procariota bacteriana són la membrana plasmàtica, envoltada per una coberta gruixuda i rígida anomenada paret bacteriana, i el citoplasma, el qual conté ribosomes, encarregats de la síntesi de proteïnes. També poden tenir una capa de polisacàrids, la càpsula. A més a més,

---

<sup>13</sup> En la reproducció asexual la cèl·lula bacteriana es divideix en dos a partir d'una prèvia divisió del material genètic i una posterior divisió del citoplasma. En la reproducció parasexual es produeix un intercanvi d'ADN entre bacteris.

les cèl·lules procariotes tenen una sola fibra d'ADN o cromosoma que es troba al nucleoide, on no es distingeixen nuclèols.

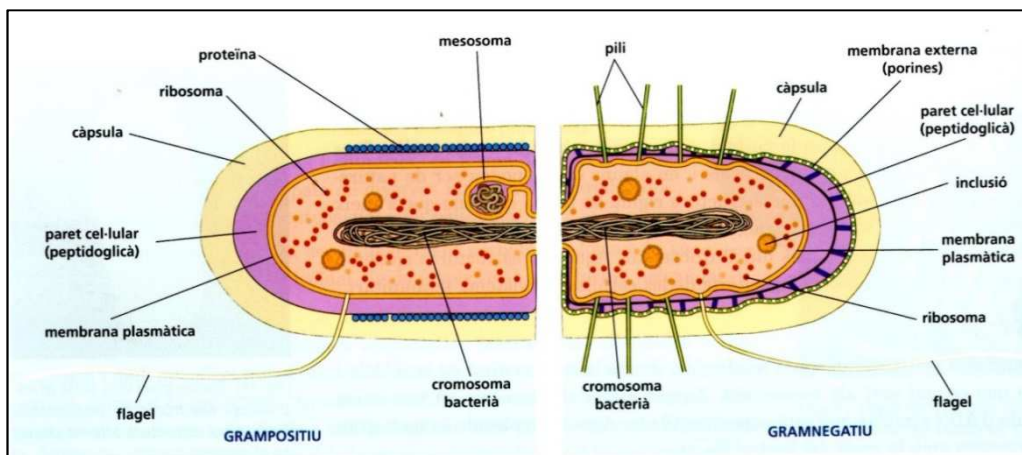
Per tal de fer possible el moviment, els bacteris poden tenir flagels, fimbries o pili. Aquests dos últims participen en la transferència de material genètic entre bacteris.



La cèl·lula bacteriana i les seves parts<sup>14</sup>

Referent a l'estructura de la paret bacteriana podem classificar els bacteris en grampositius i gramnegatius. Els grampositius són aquells que retenen el cristall violeta durant el procés de tinció de Gram, de manera que quan s'observen al microscopi òptic es veuen de color blau o violeta. Això és degut a que tenen una paret bacteriana gruixuda (de 10 a 80 nm) i formada per diversos tipus d'àcids i peptidoglicans que donen rigidesa i forma a la cèl·lula.

En canvi, els bacteris gramnegatius tenen una paret bacteriana formada també per peptidoglicans però més prima i no retenen el cristall violeta en la tinció de Gram, per això apareixen de color rosa quan s'observen al microscopi òptic.



Estructura de la paret bacteriana de bacteris gramnegatius i de bacteris grampositius<sup>15</sup>

<sup>14</sup> Font: <https://biologiaosalpes.wordpress.com/category/celula/>

Un altre tipus de classificació bacteriana és segons la morfologia, i es classifiquen en: cocs, bacils, espirils i vibrions.



Morfología dels bacteris<sup>16</sup>

A més a més, cal diferenciar els bacteris inofensius i beneficiosos per a alguns animals i persones dels bacteris patògens, els quals provoquen malalties infeccioses com la tuberculosi, la diftèria i la lepra, entre d'altres.

Sigui com sigui, els bacteris destaquen pel seu ràpid creixement i divisió en una àmplia varietat de medis de cultiu, per la seva reduïda mida i per la seva disponibilitat i fàcil manipulació. És tot això el que ha fet que els bacteris s'hagin fet servir molt extensament com a model biològic per respondre qualsevol tipus de qüestions sobre biologia.

Degut a l'extens nombre d'espècies i de soques, cada bacteri té desenvolupada una propietat característica que el fa diferir de la resta i de la qual se n'han pogut beneficiar les persones gràcies a la biotecnologia.

I vet aquí un petit i innovador exemple: a un bacteri que per la seva pròpia naturalesa és capaç de no tan sols de viure en cafeïna, sinó també de degradar-la, li extraïem els gens que li permeten fer aquesta funció i els introduïm a un altre bacteri molt més manipulable, disponible i de més ràpid creixement. Les raons d'això no són ni més ni menys que fer servir la biotecnologia per acabar gaudint dels beneficis que ens portarà aquest nou individu modificat genèticament. Uns beneficis que ajudaran a millorar la vida humana i a cuidar el medi ambient.

Aquests dos bacteris protagonistes són la *Pseudomonas putida* CBB5, la descomposadora de cafeïna, i l'*Escherichia coli*, la multiús.

<sup>15</sup> ESTELLER, A.; FERNÁNDEZ, M.Á.; LABRADOR, E.; LÓPEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.; REGUEIRO, J.R.; TORRES.,M.D.; VILLENA, A.J. *Biología-2*. Primera edició. Ediciones Vicens vives, S.A.

<sup>16</sup> Font: <https://jazzoria14.files.wordpress.com/2015/03/monera.gif>

## 4.2. *Pseudomonas putida*

El bacteri *Pseudomonas putida* CBB5 és una soca de l'espècie *Pseudomonas putida* caracteritzada principalment per la seva propietat de descomposar la cafeïna.

És un bacteri molt comú no patògen amb forma de bacil recte, gramnegatiu, fluorescent i incapaç de crear formes esporulades (espores).

CLASSIFICACIÓ CIENTÍFICA	
Regne	Bacteris
Domini	Eubacteria
Fílum	Proteobacteria
Classe	Gamma Proteobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Família	Pseudomonadaceae
Gènere	<i>Pseudomonas</i>
Espècie	<i>P.putida</i>

Viu en el sòl i, fins i tot, en aigua dolça, i es mou gràcies a l'ajuda d'un o més flagels propers a la superfície. És un microorganisme mesòfil, és a dir, capaç de créixer en uns valors de temperatura i humitat mitjans (entre 15°C i 35°C). En el seu hàbitat hi ha de ser present l'oxigen, ja que és un bacteri aeròbic estricte.

Referent a la seva nutrició, la *Pseudomonas putida* és un bacteri saprofític (s'alimenta de matèria orgànica en descomposició) i pot degradar i trencar tota mena d'hidrocarburs alifàtics i aromàtics, i la CBB5 en especial, la cafeïna.

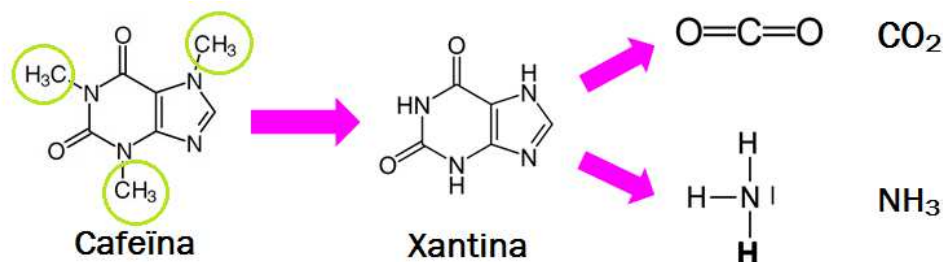
Tenint en compte la classificació dels bacteris segons la seva nutrició<sup>17</sup> i sabent que el bacteri en qüestió és capaç de degradar compostos orgànics i hidrocarburs però incapaç de degradar la glucosa, que posseeix dioxigenases per a degradar els hidrocarburs a partir de reaccions d'oxidació-reducció i, que al ser un bacteri aeròbic estricte, posseeix una molècula inorgànica com a font d'electrons, es considera la *Pseudomonas putida* CBB5 com un organisme **quimiolitoheteròtrof**.

La *Pseudomonas putida* CBB5 va ser descoberta a principis de l'any 2011 per l'estudiant de doctorat d'enginyeria química i bioquímica de la Universitat de Iowa (EUA) Ryan Summers al votant d'un jardí amb flors proper al laboratori d'investigació on ell treballava.

Ell i un equip d'investigadors van observar la propietat del bacteri de degradar cafeïna i van identificar la seqüència de gens que permet al bacteri executar aquesta propietat. Van descobrir que utilitza cinc proteïnes digestives, també anomenades enzims, per trencar la cafeïna en xantina i després en diòxid de

<sup>17</sup> ANNEX II: Nutrició bacteriana

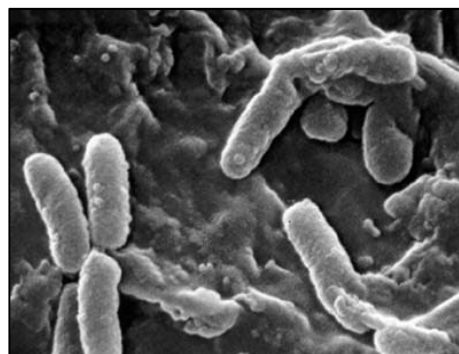
carboni (CO<sub>2</sub>) i amoníac (NH<sub>3</sub>), els quals utilitzarà com a única font de carboni i hidrogen. El procés pel qual es fa aquesta degradació s'anomena N-desmetil·lació i es basa en l'eliminació dels grups metil de la molècula.



Reacció química de la degradació de la cafeïna o N-desmetil·lació<sup>18</sup>

Ràpidament van veure que aquestes proteïnes podrien tenir moltes aplicacions biotecnològiques. D'ençà d'aquest descobriment, Summers i molts d'altres investigadors entesos no han deixat d'investigar sobre la propietat tan interessant d'aquest microorganisme.

Així doncs, la *CBB5* destaca per la seva capacitat de degradació de cafeïna. Aquesta propietat podria tenir efectes positius de llarg abast en la lluita per netejar el món d'una de les toxines que l'home més consumeix i que per tant, més residus hi ha: la cafeïna.



*Pseudomonas putida* CBB5<sup>19</sup>

### 4.2.1. N-desmetil·lació

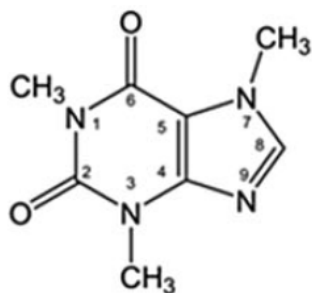
La *Pseudomonas putida* CBB5 degrada la cafeïna a partir d'un procés anomenat N-desmetil·lació, el qual es basa en l'eliminació dels grups metil de la molècula de cafeïna per anar-la descomposant fins a convertir-la en una xantina, i després, en CO<sub>2</sub> i NH<sub>3</sub>.

Cal dir que hi ha un altre procés que duen a terme altres bacteris per degradar cafeïna anomenat C-8 oxidació, però se sap que un 80% dels bacteris que degraden ho fan a partir de N-desmetil·lació, i la *P.putida* CBB5 n'és un d'ells.

<sup>18</sup> Font: dibuix realitzat amb el programa Paint

<sup>19</sup> Font: <http://es.globedia.com/descubren-bacteria-vive-cafeina>



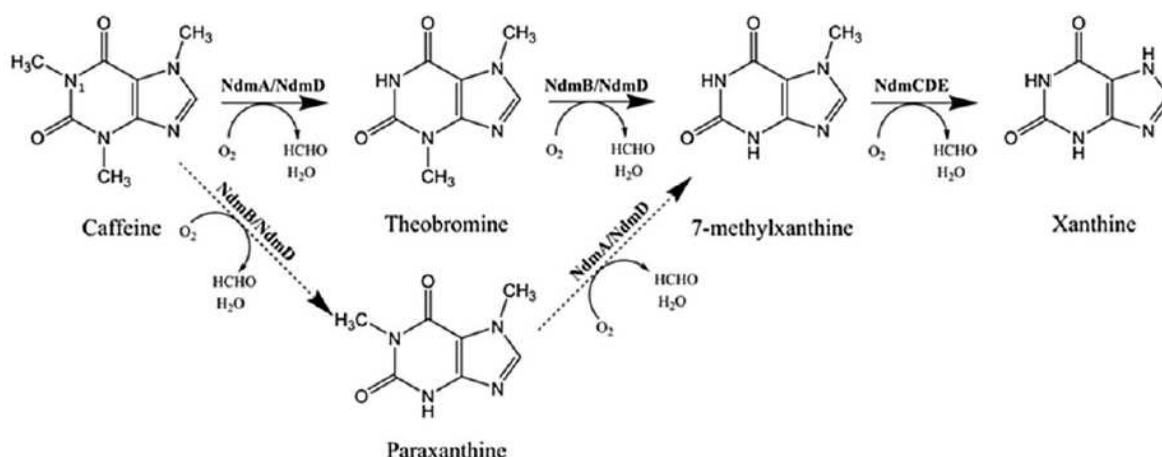


Molècula de cafeïna<sup>20</sup>

Així doncs, durant la N-desmetil·lació, cada un dels tres grups metil (CH<sub>3</sub>) de la molècula de cafeïna són eliminats amb la incorporació d'una molècula d'oxigen (O<sub>2</sub>) per produir un formaldehid (CH<sub>2</sub>O o HCHO) i una molècula d'aigua (H<sub>2</sub>O) per reacció.

En la primera etapa del procés, depenent dels gens que actuïn i de quin grup metil eliminin, la teobromina o la paraxantina són els principals metabòlits formats.

El següent pas és la N<sub>3</sub>-desmetil·lació de la teobromina o la N<sub>1</sub>-desmetil·lació de la paraxantina, el qual acaba formant el metabòlit 7-metilxantina. Els subíndexs 3 i 1 indiquen la posició de la molècula en què es troba el grup metil que s'eliminarà. Finalment, la 7-metilxantina és N<sub>7</sub>-desmetilada per a formar la xantina.



N-desmetil·lació de la cafeïna<sup>21</sup>

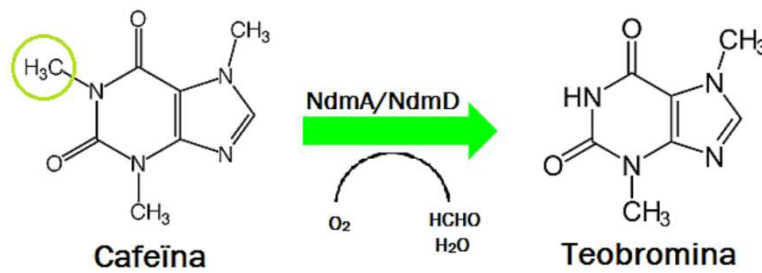
## 4.2.2. Base genètica per a la degradació de cafeïna

Els cinc enzims responsables de la degradació de la cafeïna per N-desmetil·lació en la *P.putida* CBB5 han sigut recentment seqüenciats, purificats i caracteritzats. Es tracta de la seqüència de gens **ndmABCDE**, els quals estan ja dipositats a la base de dades GenBank.

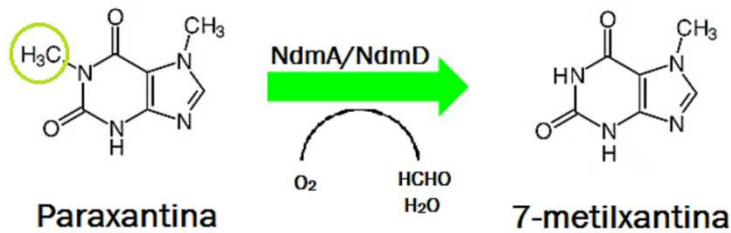
El gen *ndmA* elimina el grup metil 1 (N<sub>1</sub>-desmetil·lació) de la cafeïna i de la paraxantina per formar teobromina i 7-metilxantina, respectivament.

<sup>20</sup> Font: <http://www.cookbooklaboratory.com/?p=4985>

<sup>21</sup> Font: SUMMERS, Ryan M., et al. *Genetic characterization of caffeine degradation by bacteria and its potential applications*. Microbial biotechnology, 2015, vol. 8, no 3, p. 369-378.

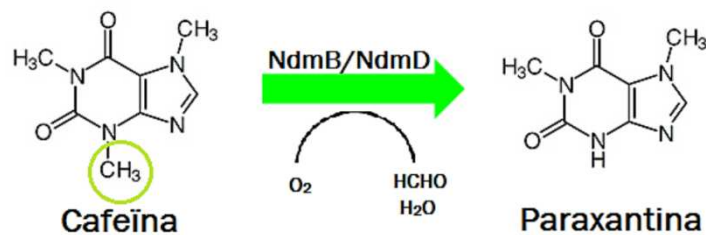


Actuació del gen *ndmA* per formar la teobromina a partir de la cafeïna

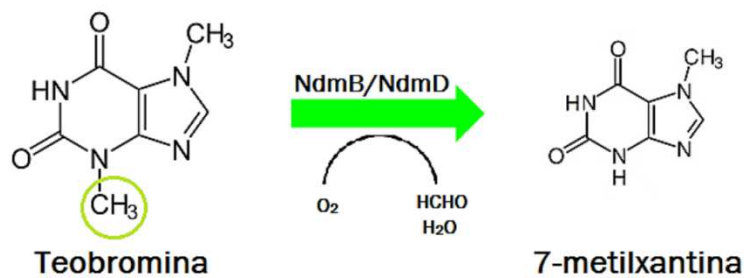


Actuació del gen *ndmA* per formar la 7-metilxantina a partir de la paraxantina

De manera similar, el gen *ndmB* és un enzim N<sub>3</sub>-desmetilasa que converteix la cafeïna i la teobromina en paraxantina i 7-metilxantina, respectivament.



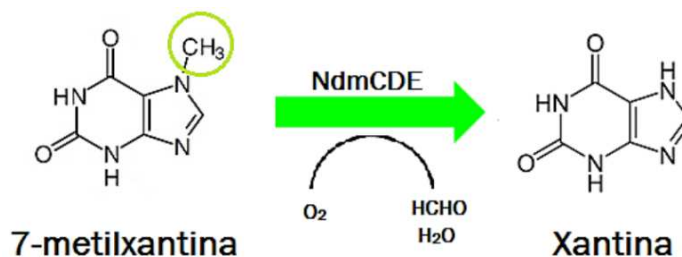
Actuació del gen *ndmB* per formar la paraxantina a partir de la cafeïna



Actuació del gen *ndmB* per formar la 7-metilxantina a partir de la teobromina

Tant el gen *ndmA* com el *ndmB* són totalment dependents del gen *ndmD*, el qual és una reductasa que transfereix electrons per potenciar la reacció.

Quan el gen *ndmD* s'uneix als gens *ndmC* i *ndmE*, formen una proteïna llarga i complexa que catalitza la reacció de N<sub>7</sub>-desmetilació de la 7-metilxantina a xantina. El *ndmE* és un gen que codifica un enzim amb el paper estructural d'alinear l'agrupació *ndmCDE* per catalitzar l'última N-desmetilació.



Actuació dels gens *ndmCDE* per formar la xantina a partir de la 7-metilxantina

A partir dels gens *ndmABCDE* que catalitzen el procés de N-desmetilació, el bacteri *Pseudomonas putida CBB5* és capaç per si sol de degradar la cafeïna i convertir-la en xantina, és a dir, destoxicar-la i, pel camí, produir indirectament alguns subproductes interessants per la indústria costosos de fabricar en laboratoris.

Tot i així, la *P.putida CBB5* no és un dels bacteris més òptims en reproducció i manipulació, per això és interessant la idea d'introduir els gens *ndmABCDE* a un altre bacteri molt més fàcil de manipular i que es reproduïx molt més ràpidament, com l'*E.coli*.<sup>22</sup>

### 4.3. *Escherichia coli*

L'*Escherichia coli*, també coneguda amb l'abreviatura *E.coli*, és un bacteri molt comú present per la seva naturalesa en el tracte gastrointestinal dels animals de sang calenta (endotèrmics), tot i que degut a les seves nombroses soques actualment es pot trobar en qualsevol hàbitat.

Va ser descoberta el 1885 per Theodor Escherich, un doctor alemany especialitzat en l'estudi de malalties infeccioses que afectaven els infants. Primerament el va batejar amb el nom de *Bacterium coli comune*, però al 1919 es va proposar el nom *Escherichia coli*, tot i que no es va acceptar fins l'any 1958.

CLASSIFICACIÓ CIENTÍFICA	
Regne	<i>Bacteris</i>
Domini	<i>Eubacteria</i>
Fílum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Família	<i>Enterobacteriaceae</i>
Gènere	<i>Escherichia</i>
Espècie	<i>E.coli</i>

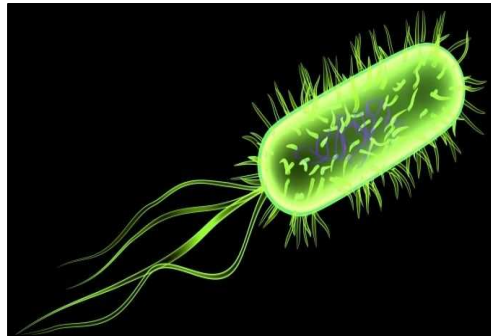
Es tracta d'un bacteri gramnegatiu, no generador d'espores, mòbil gràcies als flagels que envolten la seva estructura i anaerobi facultatiu, és a dir, que pot

<sup>22</sup> Tots els esquemes d'aquest apartat han estat dibuixats amb el programa *Paint*.

créixer i desenvolupar-se tant en presència com en absència d'oxigen. En altres paraules, pot dur a terme la respiració o la fermentació.

És capaç de fermentar la glucosa i la lactosa i destaca per tenir la capacitat de produir la vitamina B i la vitamina K.

Pot sintetitzar tots els components cel·lulars necessaris a partir de diferents fonts de carboni (sucres, aminoàcids i àcids orgànics). És un bacteri fàcilment cultivable que pot créixer en una àmplia varietat de medis de cultiu. La seva temperatura òptima de creixement és de 37°C i en condicions òptimes pot arribar a dividir-se cada 20 min.



*Escherichia coli* <sup>23</sup>

Degut als centenars de soques que té aquest bacteri, resulta difícil poder parlar d'un model d'*E.coli* generalitzat ja que cada soca té les seves característiques pròpies, des de les soques que són totalment inofensives per l'ésser humà i que s'utilitzen sense cap tipus de risc en laboratoris, fins a les soques patogèniques que podrien causar infeccions gastrointestinals de diferents nivells de gravetat si qualsevol persona hi estigués en contacte, i per això la seva manipulació al laboratori ha de ser més segura.

Tot i així, l'*E.coli* és un bacteri que des de fa molt anys s'utilitza com a model en les ciències biològiques gràcies al seu fàcil creixement, divisió, manipulació i disponibilitat.

El fet que els mecanismes d'intercanvi genètic entre bacteris, com el procés de transferència de plasmidis (conjugació) o el procediment pel qual es transfereix l'ADN d'un bacteri a un altre (transducció), tinguessin lloc de manera eficient en *Escherichia coli* va ser determinant perquè posteriorment s'utilitzés com a model definitiu tant en laboratoris de recerca bàsica com aplicada.

Només cal dir que el primer clonatge d'una molècula d'ADN recombinant en un organisme es va fer en una *E.coli* l'any 1974 i que, a partir d'aquets fet, la

---

<sup>23</sup> Font: <http://www.analitica.com/bienestar/salud/e-coli-la-bacteria-peligrosa/>

facilitat amb la qual és possible moure i eliminar gens en aquest bacteri ha permès estudiar la funció d'un elevat nombre de gens presents al seu genoma.

Una altra utilitat rellevant de l'*E.coli* en els laboratoris d'investigació és l'ús per a l'expressió heteròloga de proteïnes, és a dir, la producció de proteïnes codificades en gens que han estat anteriorment introduïts a *E.coli* mitjançant enginyeria genètica.

A més a més, a banda de la seva utilització en enginyeria genètica, l'*Escherichia coli* és també utilitzada en aplicacions biotecnològiques: es fa servir per la producció industrial de metabòlits, com ara aminoàcids i proteïnes, i en els camps relacionats amb la purificació d'aigua i tractament d'aigües residuals.

#### 4.4. *E.coli* addicta a la cafeïna

Coneixent el bacteri capaç de degradar cafeïna i el bacteri més utilitzat en laboratoris d'arreu del món, necessitem utilitzar la biotecnologia i l'enginyeria genètica per tal de produir un producte final que serveixi com a aplicació beneficiosa per al medi ambient i l'ésser humà.

Per tant, procedim a conèixer el procés per dur a terme una clonació de gens, és a dir, introduir els gens *ndmABCDE* de la *P.putida* CBB5 encarregats de la degradació de la cafeïna a l'*E.coli*, per tal que aquest nou organisme modificat genèticament expressi aquesta propietat i produeixi a gran escala les proteïnes que codifiquen aquests gens.

Alguns dels passos per dur a terme aquest procés el vaig poder realitzar personalment. Vaig tenir l'oportunitat de participar al Programa Argó 2015, gràcies al qual vaig estar durant dues setmanes col·laborant als laboratoris de l'Institut de Biomedicina i Biotecnologia (IBB) de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la tutoria de la professora Neus Ferrer Miralles i l'ajuda del seu equip d'investigació, que s'encarreguen principalment de la producció de proteïnes recombinants. Vaig poder realitzar algunes de les pràctiques que es duen a terme als laboratoris de l'IBB, les quals són les mateixes que es duen a terme per a crear un organisme modificat genèticament, ja que per obtenir proteïnes recombinants, s'ha de clonar un gen d'un organisme a un altre organisme.

L'objectiu principal de la meua estada no era la creació d'un organisme transgènic, ni molt menys utilitzant la *Pseudomonas fluorescens* CBB5 per la seva complexitat de realització i especificitat. Però sí que l'objectiu principal era poder justificar la meua recerca teòrica i complementar-la a partir d'un apropament al laboratori i realització de les pràctiques que es durien a terme en el procés de transferir el gen d'un organisme a un altre.

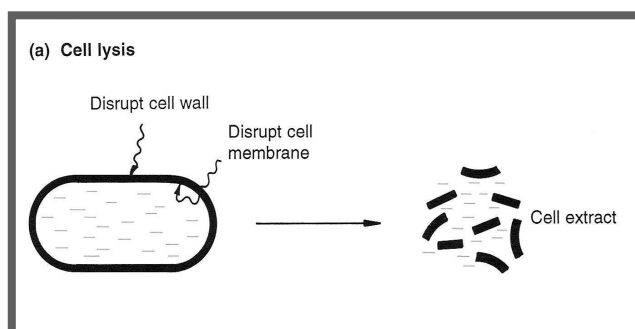
Per tant, paral·lelament als processos de font teòrica s'hi troben les pràctiques que vaig poder dur a terme. Els passos a realitzar i realitzats són els que segueixen a continuació.

#### 4.4.1. Preparació de l'ADN per la seva clonació

El primer pas és la preparació de l'ADN que es desitja que sigui clonat a una cèl·lula hoste, en el nostre cas, el gen d'interès de la *P.putida* CBB5 contingut en el seu genoma que serà transferit a l'*E.coli*. Per això haurem d'aïllar l'ADN del bacteri CBB5, haurem de fer un gran nombre de còpies del gen o gens a partir de la PCR (reacció en cadena de la polimerasa) i finalment s'haurà d'aïllar el gen que ens interessa clonar.

##### - Aïllament de l'ADN de la *Pseudomonas putida* CBB5<sup>(24)</sup>

Per aïllar l'ADN és necessari eliminar tot tipus de restes cel·lulars, com per exemple, membranes i orgànuls. El primer pas serà fer una **lisi cel·lular**, que consisteix en el trencament de la paret i la membrana cel·lular aplicant mètodes físics i químics.

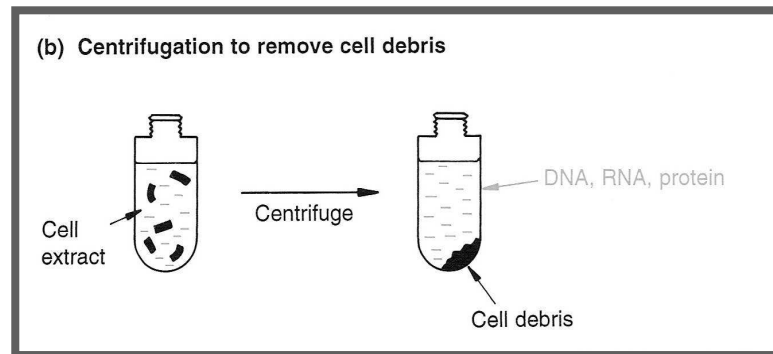


En quant als mètodes físics un del més utilitzats és la sonicació, la qual consisteix en convertir un senyal elèctric en una vibració física que pot ser dirigida a una substància i que permet separar molècules i trencar cèl·lules.

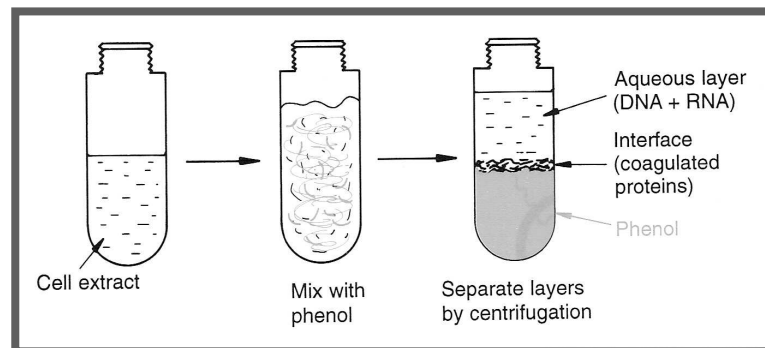
<sup>24</sup> Font imatges: <https://ezoraya.files.wordpress.com/2010/06/purificacion-dna.pptx>

En mètodes químics s'utilitzen principalment detergents que trenquen la barrera lipídica solubilitzant les proteïnes i interrompent les interaccions entre lípids i proteïnes de la membrana.

Un cop realitzada la lisi, se centrifuga la solució per fer precipitar les restes cel·lulars que posteriorment s'eliminaran de la solució.



El següent pas és l'**extracció orgànica**, la qual permet eliminar les proteïnes amb que està barrejat l'ADN. S'afegeix fenol o fenol-cloroform aconseguint que les proteïnes i els enzims es concentrin a la interfase formant una capa blanca. S'extreu la zona aquosa de la solució, on hi ha l'ADN.

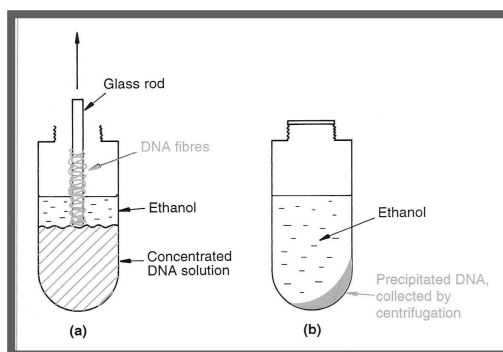


És possible que hi hagi un excés de proteïnes i enzims que no s'hagin pogut trencar i eliminar amb el fenol. Llavors, cal aplicar enzims (proteases) a la solució per tal que hidrolitzin les proteïnes a través de reaccions d'hidròlisi (reacció química on un dels reactius és l'aigua), i un cop fet aquest procediment, es podrà tornar a afegir fenol per fer l'extracció de l'ADN.

A més a més, cal eliminar l'ARN que també queda a la fase soluble durant l'extracció amb fenol utilitzant ribonucleases que degraden l'ARN.



Seguidament afegim etanol que fa precipitar l'ADN degut a que és insoluble en la seva presència.



L'últim pas és comprovar la qualitat de l'ADN obtingut. Per una banda es determina la seva puresa fent una mesura de la solució en relació a la seva absorbància en un espectrofotòmetre. Depenent dels valors obtinguts, es podrà determinar si queden restes de proteïnes o no. Per últim, es determina la integritat de l'ADN mitjançant l'electroforesi en gel d'agarosa.

### - Observació ADN per electroforesi

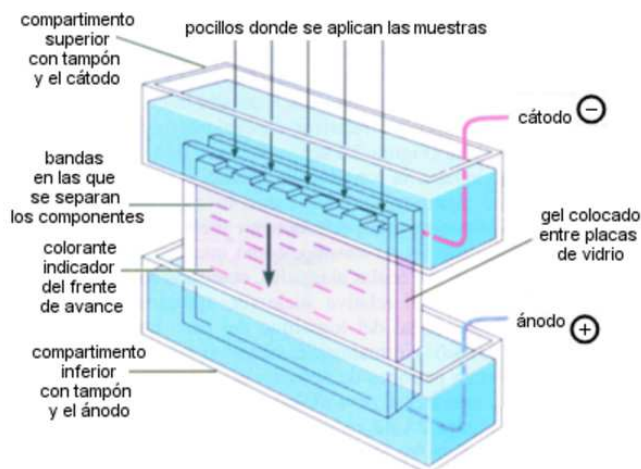
Aquesta pràctica la vaig realitzar als laboratoris de l'IBB.

#### Objectiu

Observar i determinar la integritat de l'ADN mitjançant l'electroforesi en gel d'agarosa i identificar el fragment d'ADN que ens interessa.

#### Conceptes principals

L'electroforesi en gel és un conjunt de tècniques utilitzades per aïllar molècules presents en mescles. S'utilitza generalment amb propòsits analítics, tot i que pot ser una tècnica emprada per purificar parcialment molècules abans d'aplicar, PCR, espectrofotometria, clonació o seqüenciació d'ADN.



Cubeta d'electroforesi<sup>25</sup>

<sup>25</sup> Font: <http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>



En l'electroforesi les molècules es mouen horitzontalment o verticalment per efecte d'un camp elèctric. L'ADN té càrrega negativa, per tant, es mourà del pol negatiu al pol positiu.

En el nostre cas, utilitzarem un gel d'agarosa ja que és el més adient per les nostres molècules d'àcids nucleic grans (ADN).

És un procés en el qual s'ha de tenir molta cura de la seguretat ja que es treballa amb productes altament perillosos i contaminants.

### **Procediment**

En primer lloc, és necessari preparar el gel d'agarosa. Un cop preparat, es posa la solució en un porta gels que servirà com a motlle i es col·loca una pinta per a fer els pous on es dipositarà la mostra. Mentre el gel es solidifica, preparem les mostres que s'afegiran al gel d'agarosa. Prepararem en tubs eppendorfs de 1,5 ml 4 solucions de 10 µl d'ADN purificat.

Seguidament afegim una petita quantitat de la solució tampó de càrrega, la qual augmenta la densitat de la mostra i així aquesta es manté als pous i tenyeix la mostra de color blau per a una millor identificació de l'ADN durant l'electroforesi.

Un cop solidificat el gel, retirem la pinta i s'introdueix a una cubeta d'electroforesi, on ha de quedar cobert per una solució tampó d'electroforesi (TBE), la qual permet l'establiment del corrent elèctric.

A continuació introduïm 6 µl de cada una de les quatre mostres als pous formats al gel d'agarosa i establim corrent elèctric a la cubeta d'electroforesi, de manera que l'ADN es desplaçarà del pol negatiu al pot positiu donat que té càrrega negativa.

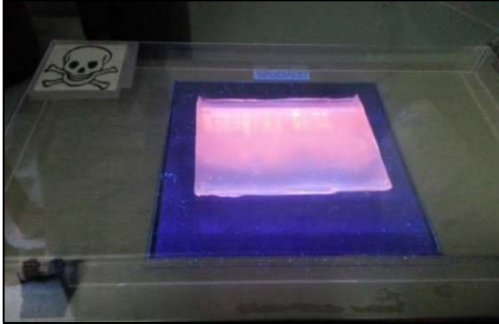


*Introducció de les mostres als pous del gel d'agarosa<sup>26</sup>*

---

<sup>26</sup> Font: fotografia de l'autora

Un cop s'ha completat la separació, és necessari tenyir el gel amb un colorant que s'adhereixi a l'ADN de manera que es puguin visualitzar els fragments separats. Així doncs, s'afegeix bromur d'etidi, un producte químic bastant perillós que emet fluorescència quan és il·luminat amb llum ultraviolada. Després de 15-20



minuts de tinció ja es pot il·luminar el gel amb llum ultraviolada per tal que el bromur d'etidi emeti fluorescència i sigui possible determinar els fragments d'ADN separats. Finalment podem observar les bandes d'ADN separades.

Bandes d'ADN separades il·luminades amb llum ultraviolada<sup>27</sup>

### - Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

La tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) permet amplificar un fragment d'ADN milers de milions de vegades en unes hores. Es fonamenta en l'ús de polimerases per replicar molècules d'ADN a partir de petits fragments complementaris.

Per fer la PCR es necessita: el fragment d'ADN que es vol replicar (en el nostre cas, el genoma que conté el gen/gens de la *P.putida CBB5* que es vulguin replicar); ADN polimerases, encarregades de fer les còpies de l'ADN; encebadors, que permetran localitzar les còpies; nucleòtids i un tampó de reacció.

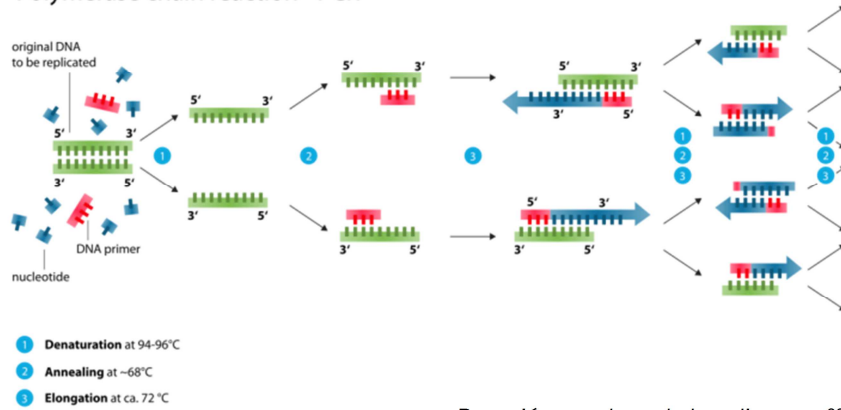
Es barregen aquests elements i es posen a una cubeta per introduir-ho al termociclador, el qual fa tres passos:

1. **Desnaturalització:** s'augmenta la temperatura de 40°C a 100°C per tal que les cadenes del fragment d'ADN que volem amplificar se separin.
2. **Hibridació:** es fa a uns 50°C i permet la complementarietat dels encebadors amb el fragment d'ADN que es vol amplificar.
3. **Elongació:** a uns 70°C s'activa l'ADN polimerasa i es comencen a sintetitzar les noves cadenes d'ADN allà on s'hagin unit els encebadors.

---

<sup>27</sup> Font: fotografia de l'autora

### Polymerase chain reaction - PCR



Reacció en cadena de la polimerasa<sup>28</sup>

Un cop aplicada la PCR és necessari fer una altra electroforesi en gel d'agarosa per tal de comprovar que apareix la banda d'ADN que s'ha amplificat amb la PCR.

### - Aïllament del gen d'interès

Un cop hem observat el fragment d'ADN aïllat i amplificat correctament, procedim a l'extracció del gen d'interès.

Per extreure el gen que ens interessa, es concentra l'ADN i s'incuba (a temperatura constant) amb els enzims de restricció que tallaran el nostre fragment d'ADN per on ens interessa, és a dir, per on es troba el nostre gen d'interès, deixant uns extrems cohesius seleccionats.

Un cop tenim l'ADN fragmentat, s'aïlla el gen d'interès mitjançant centrifugació o cromatografia líquida.

Com que necessitem que el nostre gen s'expressi a la nova cèl·lula, li afegim elements reguladors de l'expressió gènica que asseguraran el lligament preferent de les proteïnes d'unió a l'ADN per tal d'assegurar l'expressió gènica.



29

<sup>28</sup> Font: [https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase\\_chain\\_reaction](https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction)

<sup>29</sup> Font: fotografia de l'autora

## 4.4.2. Preparació del vector d'expressió

Aquest procés consisteix en l'extracció de l'ADN plasmidial de l'*E.coli*, el qual servirà com a vector per a poder introduir el gen d'interès de la *P.putida CBB5* a *E.coli*.

### - Purificació ADN plasmidial

Aquesta pràctica la vaig dur a terme als laboratoris de l'IBB.

#### Objectiu

Aquesta pràctica consisteix en l'extracció del plasmidi<sup>30</sup> d'un bacteri gramnegatiu, en aquest cas, l'*E.coli*. Aquest plasmidi serà posteriorment utilitzat com a vector d'expressió en la clonació de gens.

#### Procediment

Primer de tot, agafem el reinòcul<sup>31</sup> de cèl·lules d'*E.coli* que ha estat incubant a 37°C en agitació a 250 rpm (revolucions per minut) tota la nit (over night o O/N) i el centrifuguem a 6000 rpm durant 30 minuts. Un cop acabada la centrifugació, les cèl·lules bacterianes precipiten formant un pellet i extraiem el sobrenedant amb una pipeta.

A aquest pellet de cèl·lules d'*E.coli* hi anirem afegint dissolucions tampó<sup>32</sup> per tal d'anar trencant les parets i les membranes de les cèl·lules. Utilitzarem en total un conjunt de sis tampons diferents, els quals anomenarem amb l'ordre: P1, P2, P3, FWB2, ER i QBT.



Pellet de cèl·lules<sup>33</sup>

<sup>30</sup> Material genètic extra cromosòmic propi dels organismes procariotes (bacteris). És circular i solen ser els responsables de la resistència als antibiòtics.

<sup>31</sup> Cultiu de cèl·lules en un medi nutritiu LB.

<sup>32</sup> Solució de sals minerals que mantenen el pH intern d'un ésser viu constant. Les variacions de pH que poden provocar diferents dissolucions tampó provoquen el trencament de capes. També s'anomena "buffer" en anglès.

<sup>33</sup> Petita porció de material amuntegat. En el nostre cas, de cèl·lules o restes cel·lulars. Font: fotografia de l'autora.

Comencem afegint 100 ml del tampó P1 al pellet de cèl·lules i centrifuguem fins que el pellet es dissolgui tot. En total s'han d'afegir 125 ml de tampó, però utilitzem els 25 ml restants per netejar si queden restes de pellet.



34

Un cop el pellet de cèl·lules estigui dissolt del tot, afegim 125 ml del tampó P2 i ho deixem reposar a temperatura ambient durant 5 minuts. Seguidament afegirem 125 ml del tercer tampó, el P3, i també ho deixarem reposar 10 minuts a temperatura ambient. En aquest moment de la pràctica es pot observar com comencen a precipitar les restes cel·lulars amb plasmidis i queden flotant les restes de parets cel·lulars.

A continuació, es filtren al buit les restes cel·lulars amb plasmidis i afegim 50 ml del tampó FWB2 i tornem a filtrar al buit per acabar d'eliminar les restes cel·lulars.

Un cop filtrat, afegim 30 ml del tampó ER, agitem i ho deixem reposar durant 30 minuts amb gel. Abans d'esgotar els 30 minuts afegim 75 ml de l'últim tampó, el QBT.

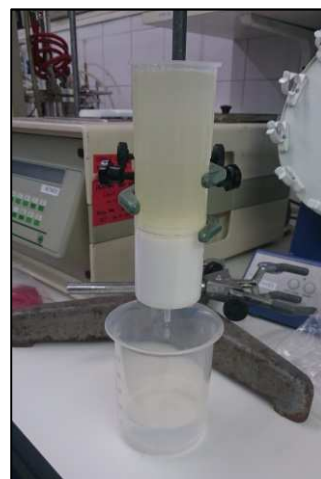


*Filtració al buit<sup>35</sup>*

<sup>34</sup> D'esquerra a dreta: solucions tampó, centrifugació i pellet dissolt. Font: fotografies de l'autora

<sup>35</sup> Font: fotografia de l'autora

El següent pas és el rentat de la solució on es filtra el líquid amb plasmidis. Un cop es tenen els plasmidis filtrats, es renta l'ADN amb una solució tampó específica, es fa precipitar afegint-hi isopropanol i es centrifuga. Després de la centrifugació els plasmidis precipitaran i s'haurà d'eliminar el sobrenedant amb una pipeta. Seguidament tornarem a repetir el procés de rentat i es tornarà a eliminar el sobrenedant sense perjudicar al pellet.



Rentat de la solució<sup>36</sup>



Espectrofotòmetre<sup>37</sup>

Finalment, dissolem el pellet de plasmidis en aigua MiliQ estèril i es quantifica el resultat amb un espectrofotòmetre, és a dir, es calcula la quantitat d'ADN plasmídic extret, tenint en compte que l'absorbància a 260 nm d'una suspensió d'ADN a 50 µg/ml és igual a 1.

### 4.4.3. Unió del vector amb el gen

S'incuba el fragment d'ADN que conté el gen o gens d'interès de la *Pseudomonas putida CBB5* amb l'ADN plasmídic o vector procedent de l'*E.Coli*.

S'afegeix una ADN lligasa que catalitza la unió covalent de les dues cadenes de les molècules d'ADN de la reacció.

### 4.4.4. Introducció del vector amb el gen heteròleg a *E.coli*

S'introdueix el vector d'expressió al bacteri *E.coli* per transformació. La transformació és un procés físico-químic en el que es produeix una variació en la permeabilitat de la membrana, moment en que poden entrar dins la cèl·lula fragments d'ADN recombinants (vectors).

<sup>36</sup> Font: fotografia de l'autora

<sup>37</sup> Aparell per la quantificació de substàncies i microorganismes. Font: fotografia de l'autora



Posteriorment s'incuben les cèl·lules amb LB durant 45 minuts per a que aquestes es recuperin del xoc tèrmic i puguin expressar el gen de resistència a antibiòtics.

Finalment s'aïllen els bacteris recombinants per selecció amb antibiòtic del qual és resistent i se sembren en un medi que contingui l'antibiòtic indicat i s'incuben a 37°C durant una nit. Les colònies que apareixen corresponen a aquelles que provenen de cèl·lules que contenen el plasmidi.

#### **4.4.5. Inducció de l'expressió del gen d'interès**

Per fer una prova de detecció i selecció dels gens recombinants es torna a fer una ressembla en un medi nutritiu LB i antibiòtic i es van controlant, per absorbància del cultiu a 550 nm amb un espectrofotòmetre, les fases de la corba de creixement del bacteri fins arribar a la fase exponencial. Quan el valor es troba entre 0,6 i 0,8 es procedeix a afegir l'inductor de l'expressió gènica. L'inductor és una molècula que activa el promotor i que fa que s'iniciï la transcripció d'un gen, i per tant, fa que comenci la síntesi de la proteïna d'interès.

Gràcies a aquest procés ens assegurem que els gens s'expressin correctament a la cèl·lula hoste.

#### **4.4.6. Propagació del cultiu**

Aquesta pràctica ha estat realitzada als laboratoris de l'IBB.

##### **Objectiu**

Propagació d'un cultiu de cèl·lules per la seva posterior utilització com a aplicació biotecnològica o anàlisi de proteïnes.

Vàrem utilitzar una soca d'*E.coli* modificada genèticament per tal que produís una proteïna específica.

##### **Conceptes principals**

###### Cinètica del creixement bacterià

És necessari parlar del creixement bacterià degut a la directa relació amb la propagació d'un cultiu de cèl·lules.

En un medi de cultiu amb les condicions nutricionals i ambientals adequades, una població bacteriana creix amb un ritme propi i característic. Quan es comença el cultiu s'inicia la fase de latència durant la qual es van acumulant els nutrients necessaris per a que les cèl·lules puguin començar a fer la divisió. A partir d'aquí, comença la fase exponencial i la cèl·lula es divideix en dues parts. És la fase on el metabolisme de la cèl·lula està més actiu.

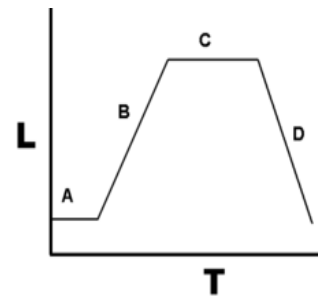
Totes les fases del creixement d'un bacteri són:

**A: Fase de latència.** Les cèl·lules s'adapten al medi i es preparen per multiplicar-se exponencialment. En aquesta fase no hi ha increment en el nombre de cèl·lules.

**B: Fase exponencial.** Les cèl·lules estan totalment adaptades al medi i gràcies a nutrients i a unes condicions ambientals òptimes, es comencen a multiplicar exponencialment.

**C: Fase estacionària.** Al ser un medi tancat i que no es renova, els nutrients s'esgoten i les cèl·lules deixen de créixer exponencialment.

**D: Fase de mort.** Els nutrients estan totalment esgotats i fins i tot hi ha molècules tòxiques al medi, fet que provoca la mort de les cèl·lules.



Fases del creixement bacterià<sup>38</sup>

### - Emmagatzematge del cultiu cel·lular en crioboles

Les crioboles són petites boles estèrils que conserven soques bacterianes. Són molt útils perquè no ocupen espai i poden conservar qualsevol tipus de bacteri a  $-80^{\circ}\text{C}$ , així quan es necessita fer un cultiu de bacteris només cal agafar una criobola del congelador i començar la preparació del cultiu.

Per preparar aquestes crioboles s'han d'agafar les cèl·lules bacterianes sembrades en una placa de petri amb una nansa de Kolle tot lliscant suaument, i quan ja has recollit una quantitat considerable de cèl·lules s'ha de ficar dins del tub de crioboles.



Crioboles<sup>39</sup>

<sup>38</sup> Font: [https://ca.wikipedia.org/wiki/Proliferaci%C3%B3\\_bacteriana](https://ca.wikipedia.org/wiki/Proliferaci%C3%B3_bacteriana)



Seguidament traiem el líquid sobrenedant del tub de crioboles amb una micropipeta, etiquetem el tub amb el nom dels bacteris, el dia de la preparació de la criobola i el nom de qui ho prepara, i ho guardem al congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  per poder-ho conservar i utilitzar quan ens sigui necessari.

### - Propagació del cultiu

Agafem una criobola congelada amb cèl·lules d'una soca d'*E.coli* a la qual se li ha introduït un gen anteriorment i la posem en un medi nutritiu de LB<sup>40</sup>, al qual hi afegim antibiòtics que permeten eliminar microorganismes contaminants i mantenir vius els plasmidis amb aquella resistència antibiòtica.

Es deixa incubar tota la nit (O/N) a 200 rpm i  $37^{\circ}\text{C}$ , i l'endemà s'obté el cultiu de bacteris que ha crescut. Amb aquest cultiu es prepara un de fresc fent una dilució en medi fresc per iniciar la fase de latència del creixement bacterià.

Seguidament, amb un altre medi LB de 500 ml i sabent que volem una densitat òptica<sup>41</sup> de 0,1, es calcula amb l'espectrofotòmetre el volum de bacteris que necessitem. Per fer-ho, primer calculem la densitat òptica d'1 ml d'un blanc de LB, la qual dona 6,5. Sabent doncs que 1 ml d'un blanc de LB té una OD de 6,5 i que la OD que volem és de 0,1, també en 1 ml, calculem:

$$500 \text{ ml} \cdot \frac{0,1 \text{ OD}}{1 \text{ ml}} \cdot \frac{1 \text{ ml}}{6,5 \text{ OD}} = 7,69 \text{ ml}$$

Per tant, per cada solució de 500 ml de medi de LB s'han d'afegir 7,69 ml de bacteris. Afegim aquest volum de bacteris als cinc matrassos d'Erlenmeyer amb 500 ml de LB amb una micropipeta. També afegim els antibiòtics corresponents.



Mesura de la OD amb un espectrofotòmetre<sup>42</sup>

<sup>39</sup> Font: fotografia de l'autora

<sup>40</sup> Medi nutritiu favorable per al creixement bacterià.

<sup>41</sup> Es basa en la mesura de la terbolesa que provoquen els microorganismes en el medi de cultiu. La seva abreviatura és OD.

<sup>42</sup> Font: fotografia de l'autora

Finalment es porten els matrassos a la incubadora durant 1 hora i mitja perquè la densitat òptica passi de 0,1 a 0,5 degut al moviment i al pas d'aire, és a dir, que els bacteris es multipliquin (se sap que cada 30 minuts les *E.coli* es dupliquen). Aquesta és la fase exponencial del creixement bacterià.



Matrassos amb cultiu de bacteris<sup>43</sup>

#### 4.4.7. Valoració de l'activitat en les cèl·lules transformades

Aquest últim procés determina l'efectivitat de tota la feina feta. Comprovar que l'*E.coli* degrada cafeïna és totalment necessari per afirmar i donar per bo l'experiment i poder procedir a idear futures aplicacions biotecnològiques.

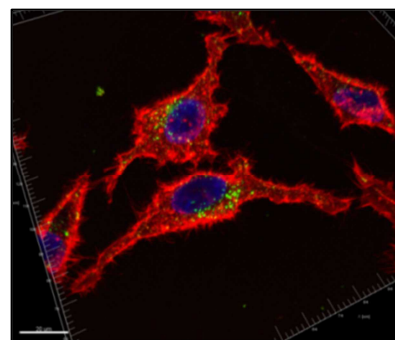
Una forma de valorar l'activitat de l'*E.coli* modificada genèticament seria preparant un medi ric en nutrients i amb presència de cafeïna, cultivar-hi els nous bacteris transformats i anar mesurant en diferents intervals de temps la concentració de cafeïna.

#### 4.4.8. Observació de proteïnes

Aquesta pràctica la vaig realitzar a les instal·lacions de microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

##### Objectiu

Observació d'una proteïna recombinant (codificada pel gen d'un organisme modificat genèticament) a través d'un microscopi confocal.



Imatge d'una proteïna<sup>44</sup>

##### Procediment

En aquesta pràctica degut a la dificultat de manipulació que té un microscopi confocal, només vaig poder observar com s'utilitza el confocal i la proteïna que s'hi estava projectant. Es necessiten estudis superiors per a poder manipular un microscopi confocal.

<sup>43</sup> Font: fotografia de l'autora

<sup>44</sup> Un microscopi confocal és molt semblant al microscopi de fluorescència que permet obtenir imatges de microorganismes o partícules com cèl·lules en tres dimensions. Imatge proporcionada pel servei de microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

#### 4.4.9. Resultats

La part pràctica realitzada no té uns resultats concrets, però després d'una feina curiosa i molt específica podem afirmar que les pràctiques realitzades han tingut un resultat satisfactori perquè en totes s'han complert els objectius proposats. La valoració general de la realització de totes les pràctiques també es qualifica com a favorable ja que m'ha permès fer-me una idea de com serien algunes parts del procés de creació d'un organisme transgènic.

#### 4.5. Aplicacions biotecnològiques

Com hem dit des d'un principi, els éssers humans utilitzem l'enginy per beneficiar-nos de les propietats de molts bacteris. Ara que ja sabem que la *P.putida* CBB5 degrada la cafeïna, coneixem el procés de N-desmetilació i sabem com clonar els seus gens a l'*E.Coli*, és hora de plantejar les aplicacions que pot tenir aquesta troballa. Unes aplicacions que tenen com a finalitat principal el benefici mediambiental.

##### 4.5.1. Descafeïnat biològic

Tot i que la *Pseudomonas putida* CBB5 no és l'únic bacteri capaç de degradar cafeïna, se sap que el procés de N-desmetilació que duu a terme és molt més eficient que qualsevol altre procés de degradació donat que pot degradar molta més cafeïna en un període de temps molt més curt.

La CBB5 és capaç de descafeïnar extractes de restes de residus de te i de cafè completament, però l'ús de cèl·lules bacterianes per al descafeïnat biològic no resulta factible a causa de la possibilitat d'un alliberament d'endotoxines durant el procés, la qual cosa provocaria contaminació al medi.

L'alternativa per solucionar els problemes amb l'alliberament d'endotoxines seria l'ús d'enzims purificats que degraden la cafeïna enlloc de cèl·lules bacterianes. Els gens *ndmABCDE*, que com ja sabem són els encarregats de la N-desmetilació en la CBB5, podrien ser clonats a *E.coli* per a una producció a gran escala d'enzims recombinats que poguessin dur a terme el descafeïnat biològic de begudes.

Una altra aplicació seria el descafeïnat biològic de restes residuals de te i cafè. Durant el procés de producció d'aquests i també degut al seu gran consum, es generen grans quantitats de residus que s'acumulen al mar o en aigües residuals i que cada any són traduïts en milions de tones. Aquests residus tenen un alt contingut nutricional, incloent-hi un contingut d'un 45-60% de carbohidrats.

Desafortunadament, una concentració de cafeïna superior a l'1% és el que fa inadequat que aquests residus puguin servir com a alimentació animal o com a matèria primera en la producció de biocombustibles. És per això que tractar els residus de cafè i te amb microorganismes que degradin la cafeïna és una forma de transformar els residus en un subproducte valuós.

En aquesta aplicació es podria utilitzar directament el bacteri CBB5, tot i que utilitzar l'*E.coli* modificada genèticament és una opció interessant donada la seva fàcil propagació i manipulació.

#### **4.5.2. Bioremediació ambiental**

La bioremediació és l'aplicació de microorganismes biològics a un medi contaminat per tal que degradin els residus contaminants.

Hi ha moltes vies en que la cafeïna entra al medi ambient, ja sigui per les fulles caigudes, tiges i llavors d'un camp de te i cafè que es descomponen i fan que gran quantitat de cafeïna entri al sòl; residus líquids i sòlids de te i cafè que a més a més d'entrar a la terra, també poden arribar fins a aigües subterrànies; o residus de begudes, fàrmacs i menjar que contenen cafeïna.

Aquesta contaminació causada bàsicament per l'extens consum humà de productes amb cafeïna es podria solucionar com el descafeïnat biològic: aplicant els organismes que degraden la cafeïna, ja sigui la *Pseudomonas putida* CBB5 o l'*E.coli* modificada genèticament.

#### **4.5.3. Producció química per a la indústria farmacèutica i cosmètica**

La cafeïna no és una molècula cara, però els metabòlits extrets d'aquesta per N-desmetilació (paraxantina, teobromina, 7-metilxantina i xantina) sí que ho són

i tenen un gran valor per la seva importància en la indústria farmacèutica i cosmètica. El fet és que molts d'aquests metabòlits són complicats de sintetitzar químicament perquè és difícil aconseguir les molècules que els componen, per això la seva producció és molt costosa.

És per això que gràcies al descobriment dels gens responsables de la N-desmetilació és més fàcil aconseguir aquests productes. Si es clonen els gens *ndmA* i *ndmB* al bacteri *E.coli*, en resulta una soca de bacteris capaç de convertir la cafeïna en teobromina. De la mateixa manera, si clonem els gens *ndmB* i *ndmD* es crearia una soca d'*E.coli* capaç de convertir la teobromina en 7-metilxantina.

Així doncs, l'enginy humà i la clonació de gens farien possible la creació de noves soques d'*E.coli* capaces de degradar la cafeïna o els subproductes d'aquesta per a una futura utilització en farmàcia i cosmètica.

#### 4.5.4. Detecció de cafeïna

Degut a la introducció de la cafeïna al menjar i begudes hi ha una demanda d'una prova per poder detectar la concentració de cafeïna a casa. De fet, ja s'ha desenvolupat un test (*Cdhenzyme-based colorimètric test*) que quan detecta cafeïna en begudes, refrescs o llet materna apareix una llum amb color brillant.

Però per detectar concentracions de cafeïna en laboratoris es podria utilitzar una cèl·lula sencera com a biosensor. Aquesta cèl·lula seria l'*E.coli* transformada. Es clonen els gens *ndmABCDE* a una *E.coli* determinada per crear una soca addicta a la cafeïna. Per créixer, l'*E.coli* haurà de convertir la cafeïna en xantina, per tant, si no prolifera, indicarà l'absència de cafeïna.

## 5. Inhibició de bacteris en cafeïna

Per sorpresa de molts, i pot ser no tanta per altres, diversos estudis apunten i afirmen que la cafeïna té propietats antibacterianes. És a dir, que els bacteris davant d'una certa concentració de cafeïna són incapaços de dur a terme el seu creixement correctament, i per això es diu que la cafeïna inhibeix la seva propagació.

Tot i no ser un tema de gran popularitat arreu del món, diversos investigadors han centrat part dels seus coneixements en l'estudi de les propietats antibacterianes de la cafeïna<sup>45</sup>.

Actualment s'ha demostrat que qualsevol cultiu de bacteris en un medi amb una elevada concentració de cafeïna és incapaç de propagar-se. El que no se sap encara amb certesa són els mecanismes d'actuació pels quals la cafeïna és capaç d'inhibir el creixement d'uns microorganismes tan importants i abundants al nostre món.

Tot i així, gràcies a l'ampli coneixement de la cafeïna, se sap que aquesta té algunes característiques i propietats que podrien apuntar a la causa per la qual inhibeix el creixement bacterià.

### 5.1. Possibles causes de la inhibició bacteriana

#### - Activitat mutagènica

Es coneix que tant el cafè com la cafeïna són mutàgens a altes concentracions en sistemes bacterians cultivats in vitro.

Un mutagen és un agent físic o químic que canvia el material genètic d'un organisme, la qual cosa incrementa la freqüència de mutació. Ens alguns casos les mutacions són beneficioses i passen a la descendència, però en d'altres poden causar la mort cel·lular. La modificació de l'ADN causada en bacteris per la cafeïna podria causar la mort d'aquests.

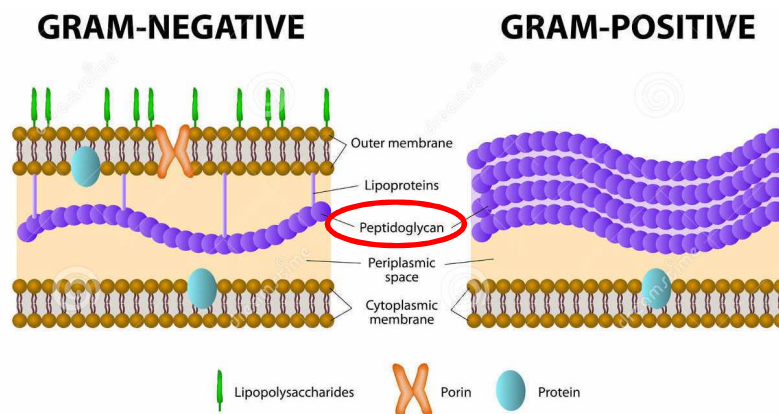
---

<sup>45</sup> RAMANAVIČIENĖ, Almira, et al. *Anti-bacterial effect of caffeine on Escherichia coli and Pseudomonas fluorescens*. Acta Medica Lituanica, 2003, vol. 10, p. 185-188.

## - Reforç de l'activitat del lisozim

El lisozim és un enzim capaç de destruir la paret cel·lular de certs bacteris grampositius catalitzant la hidròlisi (reacció química on un dels reactius és aigua) de les unions entre les molècules que formen el peptidoglicà (component principal de la paret bacteriana). El resultat d'aquesta hidròlisi és la penetració d'aigua a la cèl·lula, la qual s'infla i acaba esclatant, en un fenomen anomenat lisis.

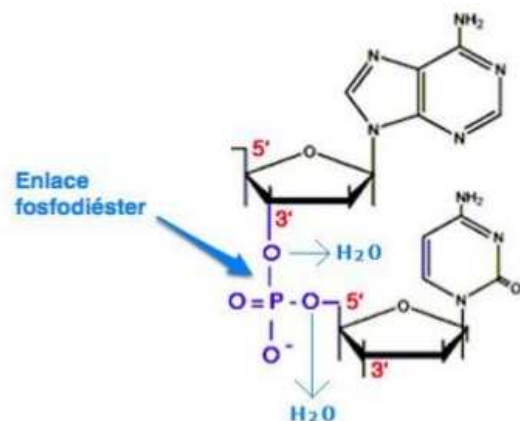
Per tant, si la cafeïna propicia l'activitat d'aquest enzim, quan el bacteri es posa en contacte amb cafeïna és sotmès a un desequilibri metabòlic que l'acabarà portant a la mort.



Estructura de la paret bacteriana (peptidoglicà)<sup>46</sup>

## - Inhibeix les fosfodiesterases

Les fosfodiesterases són enzims hidrolases (actuen en reaccions d'hidròlisi) que catalitzen el trencament d'enllaços fosfodièsters, com per exemple els que s'estableixen en els àcids nucleics entre la pentosa d'un nucleòtid i el grup fosfat de l'altre. Els enllaços fosfodièster són essencials per la vida, donat que són els responsables de l'esquelet de l'ADN i l'ARN.



Enllaç fosfodièster<sup>47</sup>

<sup>46</sup> Font: <http://www.dreamstime.com/stock-illustration-gram-positive-gram-negative-bacteria-difference-bacterial-image45337024>

<sup>47</sup> Font: <http://www.slideshare.net/Signo7/tema11biomoleculas-2013>

Així doncs, una altra possible causa de la mort cel·lular bacteriana podria ser aquesta ja que s'inhibeix l'activitat d'uns enzims amb un paper molt important en la reparació de seqüències d'ADN.

### - Afecta directament a la concentració de calci dins de les cèl·lules

El calci juga un paper molt important en la biologia de la cèl·lula donat que pot unir-se a un gran nombre de proteïnes i alterar-ne la seva activitat biològica. També és considerat un missatger intracel·lular.

Per això, les variacions de concentració de calci que podria provocar la cafeïna afectarien al metabolisme cel·lular.

## 5.2. Beneficis i aplicacions

L'efecte antibacterià de la cafeïna pot tenir un impacte positiu al medi ambient i a la salut humana. Cal dir que els possibles beneficis i aplicacions no són més que prediccions, extrets de la informació cercada i del que diuen alguns entesos, encara ningú ha aprofundit en aquest tema per afirmar que el que segueix a continuació és del tot cert.

Pel que fa a la salut humana, aquesta propietat tindria un efecte curatiu a nivell patogènic ja que inhibiria el creixement de bacteris patògens i per tant, es podrien evitar propagacions d'aquests.

Una possible aplicació en medicina seria la presència d'aquesta en medicaments per a malalties causades per a bacteris patògens. La presència de cafeïna en unes concentracions determinades podria permetre controlar la propagació del bacteri patògen fins al punt d'inhibir el seu creixement per complet.

Això no significa que una tassa de cafè et podria curar o prevenir d'una pneumònia bacteriana, ja que el menjar que ingerim és metabolitzat al nostre aparell digestiu i un cop la cafeïna és metabolitzada, perd les seves propietats.

I pel que fa al medi ambient, igual que per la salut humana, el fet que la cafeïna inhibeix el creixement de bacteris patògens també seria útil per evitar la propagació d'aquests i evitar epidèmies.



Des de sempre, com a remei casolà s'han tirat grans de cafè a les plantes per a repel·lir els insectes. Ara es podria ruixar la planta amb una certa quantitat de cafeïna per a repel·lir els bacteris, i així evitar la propagació d'aquests en la planta i el dany que podrien causar.

### 5.3. Part pràctica

Aquesta part pràctica ha tingut dues realitzacions. Una durant l'estada a la Universitat Autònoma de Barcelona gràcies al Programa Argó i l'altra durant l'estada al Parc Científic de Barcelona gràcies al programa Batx2lab.

Durant l'estada al Programa Argó, a part de realitzar les pràctiques sintetitzades anteriorment sobre clonació, també vaig tenir l'oportunitat de comprovar la inhibició de bacteris en cafeïna. Els resultats, com veureu a continuació, no van ser satisfactoris.

En la participació al programa Batx2lab, impulsat pel Parc Científic de Barcelona, vaig estar durant una setmana al laboratori de toxicologia del David Ramos al PCB fent la part pràctica de la inhibició de bacteris en cafeïna.

L'objectiu d'aquesta part pràctica ha estat des d'un principi poder demostrar la certesa de la informació donada a la part teòrica, o si més no, apropar-me al màxim a la realització pràctica d'aquesta.

#### 5.3.1. Pràctica Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

##### Procediment

Agafem les crioboles amb les cèl·lules dels respectius bacteris (mirar taula) i les fem amb LB a incubar tota la nit a 200rpm i 37°C

Escampem els bacteris que han estat O/N en plaques. Fem dues rèpliques per a cada bacteri

Seguidament tirem el contingut d'una càpsula de cafeïna (300 mg) i ho dissolem en 90 mL d'aigua MiliQ.

BACTERIS
<i>Bacillus cereus</i>
<i>Bacillus licheniformes</i>
<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Salmonella LT2</i>
<i>E. coli DH5α</i>

**CONCENTRACIÓ INICIAL:**  $\frac{300 \text{ mg}}{90 \text{ ml}} = 3,33 \text{ mg/ml}$

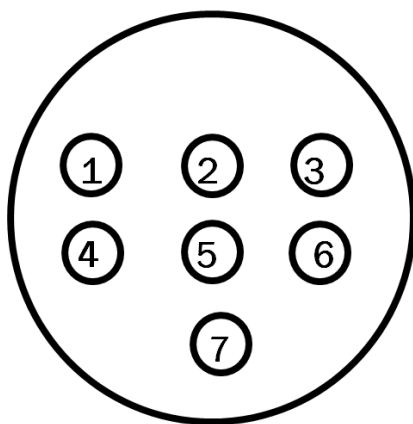
Un cop dissolta la cafeïna es fan 3 dilucions: es fiquen 900 µl d'aigua en 4 "erlenmeyers" i afegim al primer 100 µl de la cafeïna dissolta en aigua MQ. Per fer la dilució, agafem 100 µl de la primera solució i ho aboquem a la segona, i en aquesta obtindrem una concentració de 0,33 mg/ml.



*Preparació de les dilucions de cafeïna<sup>48</sup>*

Fem el mateix amb les altres dues: agafem 100 µl de la segona solució de concentració 0,33 mg/ml i ho aboquem a la tercera solució, aconseguint així la concentració de 0,033 mg/ml, i tornem a repetir el procés per la tercera i la quarta solució per aconseguir la solució de 0,0033 mg/ml.

Un cop estan les dilucions fetes, tallem sis papers de filtre rodons per a cada placa i els col·loquem amb una pinça a cada cultiu de bacteris amb la disposició següent:



TRACTAMENTS	
1	Antibiòtic- CONTROL POSITIU
2	LB- CONTROL NEGATIU
3	Lleixiu
4	3,33 mg/ml
5	0,33 mg/ml
6	0,033 mg/ml
7	0,0033 mg/ml

Com que hem fet dues plaques per a cada tipus de bacteri, a una placa de cada rèplica hi posarem els trossos de paper de filtre i a l'altra no.

Un cop fet això, adjudiquem una posició per a cada concentració de cafeïna, pel control positiu i negatiu, i una posició per el lleixiu. El control positiu permet establir i observar quan els bacteris no creixeran, en aquest cas es fica un

<sup>48</sup> Font: fotografia de l'autora

antibiòtic, i el control negatiu correspon a un medi, en aquest cas el medi nutritiu LB, en el qual els bacteris creixeran sense cap tipus de problema.

Finalment fem 7 µl de cada tractament al paper de filtre que li correspon i deixem les plaques incubar tota la nit (O/N).

## - Resultats

Els resultats obtinguts<sup>49</sup> van mostrar que els bacteris havien pogut créixer en tots els medis i concentracions de cafeïna excepte a la posició tres, que pertany al lleixiu. Això indica algun error en l'execució de l'experiment ja que a la posició 1, l'antibiòtic, tampoc haurien d'haver crescut els bacteris.

Per tant, les conclusions que podem extreure d'aquesta pràctica no són satisfactòries donat que no va ser possible demostrar que els bacteris són inhibits en cafeïna.

### 5.3.2. Pràctica Parc Científic de Barcelona (PCB)

Es va comprovar la inhibició en cafeïna dos tipus de bacteris, *E.coli* i *P.fluorescens*, i així vam poder contrastar i comparar els resultats de la inhibició en cadascun.

Aquest experiment consta de 4 pràctiques, les quals segueixen a continuació.

#### - PRÀCTICA 1: Creixement dels cultius bacterians

##### Objectiu

Semrar una alíquota de la soca *E.coli* WP2 i una de *Pseudomonas fluorescens* en un matràs Erlenmeyer cada una per fer créixer els cultius.

##### Procediment

Primer de tot, afegim 50 ml de medi nutritiu NB<sup>50</sup> en cada un dels dos matrassos Erlenmeyer, el qual és un medi ric necessari per que els bacteris creixin.

---

<sup>49</sup> ANNEX III: Resultats inhibició de bacteris en cafeïna (UAB)

<sup>50</sup> Medi nutritiu favorable per al creixement bacterià.

Obtenim amb una nansa de cultiu els bacteris *P.fluorescens* sembrats en una placa de Petri i ho afegim en un Erlenmeyer. Repetim el procediment amb els bacteris *E.coli*, els quals es rasquen d'un criotub.



Obtenció dels bacteris amb una nansa de Kolle<sup>51</sup>

Finalment deixem els dos cultius O/N (overnight) a 37°C i a 190 rpm (revolucions per minut), per tal que el seu creixement sigui òptim<sup>52</sup>.



Cultius de *E.coli* i *P.fluorescens* en O/N<sup>53</sup>

## - Pràctica 2: Preparació de les dilucions, lectura de la terbolesa i sembra

### Objectiu

Es vol establir una relació directa entre la terbolesa d'un cultiu bacterià en suspensió amb les unitats formadores de colònies (UFC) per tal d'obtenir un mètode ràpid i efectiu per a comptar el número de bacteris en un cultiu de creixement.

Es fa una preparació de les dilucions bacterianes per fer una sembra en plaques de NB sòlid per fer un recompte de les UFC (unitats formadores de colònies). Per fer aquest comptatge es fa una lectura de la terbolesa dels cultius de bacteris per determinar quin valor de colònies correspondrà al número d'UFC crescudes.

---

<sup>51</sup> Font: fotografia de l'autora

<sup>52</sup> *P.fluorescens* no va créixer a 37°C ja que la seva temperatura de creixement òptima és de 20-25°C.

<sup>53</sup> Font: fotografia de l'autora

D'aquesta manera només mesurant la densitat òptica d'un cultiu bacterià podem determinar el número de UFC disponibles i sembrar una proporció òptima en els estudis posteriors.

Dividim aquesta pràctica en tres fases:

1. Preparació de les dilucions bacterianes i lectura de terbolesa.
2. Preparació del banc de dilucions bacterianes per la posterior sembra.
3. Sembrar de les solucions bacterianes en plaques de medi NB sòlid.



Cultiu d'*E.coli*<sup>54</sup>

### Procediment

Aquesta pràctica només es dur a terme amb *E.coli* i es van prendre les dades d'aquesta perquè el cultiu de *P.fluorescens* que vam deixar O/N a 37°C no va créixer donat que la temperatura òptima de creixement d'aquest bacteri és de 30°C. Per tant, les dades obtingudes de l'*E.coli* seran després utilitzades també per la *P.fluorescens*, assumint que la variació per aquesta soca no serà gaire significativa.

#### - Preparació de les dilucions bacterianes i lectura terbolesa

DILUCIÓ	VOLUM DE MEDI (µl)	VOLUM DE BACTERIS (µl)	VOLUM TOTAL (µl)
1:1	-	2000	2000
1:2	1000	1000	2000
1:5	1600	400	2000
1:10	1800	200	2000
1:15	1866,67	133,33	2000
1:25	1920	80	2000

Tenint ja preparat el cultiu de bacteris, se'n fan sis dilucions de 2 ml (2000 µl) cada una. Com més nombre de microorganismes s'esperen trobar, més dilucions es fan.

<sup>54</sup> Font: fotografia de l'autora

Un cop tenim les dilucions fetes, posem 1000 µl (1 ml) de cada una en una cubeta d'espectrofotòmetre diferent per anar a mesurar la seva densitat òptica (OD) a l'espectrofotòmetre. Aquest sistema es basa en la diferencia de llum emesa amb la que captura el sensor del aparell. L'espectrofotòmetre emet una certa intensitat de llum a través de la cubeta. L'usuari marca quina longitud d'ona ha de captar el sensor. Degut a que la turbolesa del medi bacterià absorbirà part de la llum a 540 nm, la intensitat amb que arriba el sensor serà menor. Mitjançant un sistema electrònic l'aparell pot determinar quina és aquesta diferència.

També preparem una cubeta que servirà com a blanc que només portarà 1 ml de medi nutritiu i és del primer que en mesurarem la OD, així l'espectrofotòmetre sap la turbolesa del medi i la resta directament de lab de les dilucions de cada cubeta, donant com a resultat la densitat òptica dels bacteris sense tenir en compte el medi.



*Preparació de les dilucions<sup>55</sup>*

La longitud d'ona que travessarà cada cubeta per mesurar l'absorbància del medi és de 540 nm. Les densitats òptiques obtingudes de cada dilució són les següents:

DILUCIÓ	DENSITAT ÒPTICA
1:1 <sup>(56)</sup>	2.21
1:2	1.68
1:5	0.8
1:10	0.4
1:15	0.27
1:25	0.14

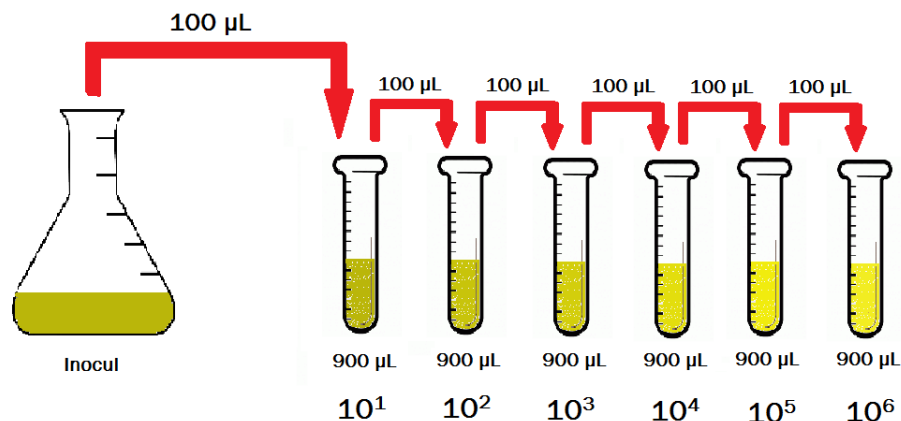
<sup>55</sup> Font: fotografia de l'autora

<sup>56</sup> Vam decidir descartar la dilució 1:1 perquè hi ha molts bacteris crescuts i que es troben ja en la fase estacional del seu creixement, és a dir, no hi ha suficient medi nutritiu perquè continuïn creixent.

**- Preparació del banc de dilucions bacterianes per la posterior sembra**

Fem una dilució en sèrie de cada una de les dilucions anteriors fins a arribar al factor de dilució  $10^6$ . Es fa aquesta dilució tan extrema perquè es pretén reduir la concentració de bacteris per tal de sembrar-los en una placa, sinó creixerien un nombre molt elevat de colònies en cada placa.

Totes les dilucions tenen el mateix volum de medi, el que variarà és el volum de bacteris. Començarem afegint 100 µl de l'inòcul<sup>57</sup> a la dilució 1. D'aquesta dilució, agafarem 100 µl i els afegirem a la dilució 2, de la qual agafarem 100 µl que s'afegiran a la dilució 3, i així fins a arribar a la dilució 6, que serà la més diluïda de totes.



*Procediment per fer dilucions<sup>58</sup>*

	DILUCIÓ	VOLUM DE MEDI (µl)	VOLUM BACTERIS (µl)
<b>D1</b>	1:10	900	100 de inocul
<b>D2</b>	1:100	900	100 de D1
<b>D3</b>	1:1000	900	100 de D2
<b>D4</b>	1:10000	900	100 de D3
<b>D5</b>	1:100000	900	100 de D4
<b>D6</b>	1:1000000	900	100 de D5

<sup>57</sup> Població de microorganismes desenvolupada en un medi de cultiu.

<sup>58</sup> Font: dibuix realitzat amb el programa Paint

### - Sembra de les solucions bacterianes en plaques de medi NB sòlid

Un cop fetes les dilucions fins a arribar a  $10^6$ , agafem 100  $\mu\text{l}$  de cada dilució  $10^6$  i ho afegim a una placa de medi NB sòlid i ho escampem. Fem una rèplica per a cada sembra, és a dir, dos plaques sembrades per la mateixa concentració bacteriana.

Per acabar, es deixen les plaques sembrades amb diferents concentracions d'*E.coli* incubant a  $37^\circ\text{C}$  durant tota la nit per tal que creixin els bacteris i es formin colònies i poder-les comptar a la següent pràctica.



Sembra de les solucions bacterianes<sup>59</sup>

### - PRÀCTICA 3: Comptatge de les UFC i preparació solucions amb cafeïna

#### Objectiu

Comptatge de les UFC crescudes a les plaques per establir una relació entre aquestes i les densitats òptiques mesurades a la pràctica anterior i preparació de les solucions amb diferents concentracions de cafeïna i una determinada OD de bacteris.

#### Procediment

Es compten les colònies de les plaques on vam sembrar *E.coli* a diferents concentracions amb un comptador de colònies, aparell que compta les colònies de bacteris que creixen en una placa d'agar (medi nutritiu sòlid) mitjançant la identificació de les àrees individuals de llum i fosc.

Tal com esperàvem, l'*E.Coli* ha crescut de tal manera que en els cultius on hi havia més concentració s'han format més colònies que els cultius que hi havia menys concentració, és a dir, on la dilució era més alta.



Comptador de colònies<sup>60</sup>

<sup>59</sup> Font: fotografia de l'autora



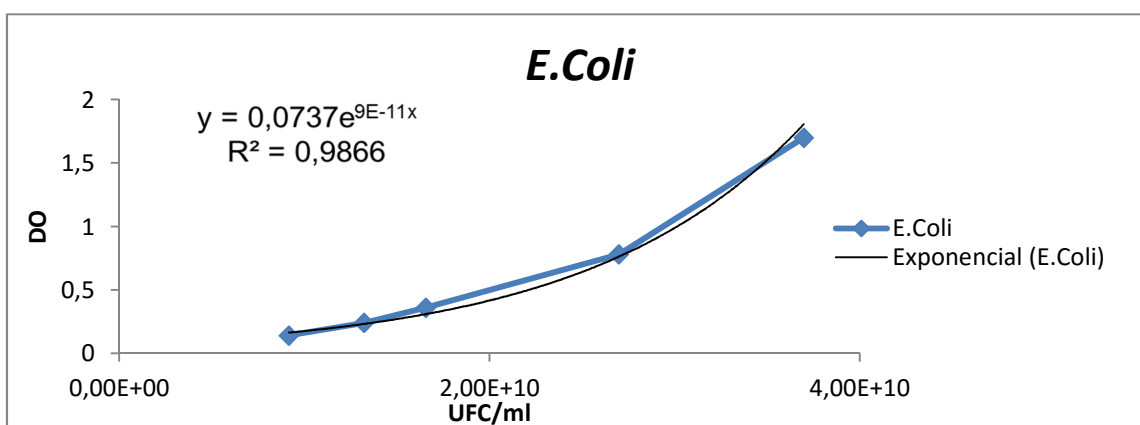
Establím un nombre de UFC per cada OD calculada en la pràctica anterior:

DILUCIÓ INICIAL	DENSITAT ÒPTICA	UFC COMPTADES
1:1	2,2	-
		-
1:2	1,7	3475
		3922
1:5	0,78	2972
		2427
1:10	0,36	1403
		1911
1:15	0,24	1331
		1316
1:25	0,14	958
		875

Tenint ja les densitats òptiques calculades de cada dilució i les UFC comptades de les plaques amb una dilució acumulada de  $10^6$ , calculem el nombre de UFC que correspon a cada densitat òptica, i després en fem la mitjana per cada dilució, tot confeccionant una taula<sup>61</sup>. La fórmula per fer-ho és la següent:

**CFU/ml = nombre de colònies / dilució acumulada x volum inòcul aplicat**

La gràfica següent estableix que l'eix de les Y correspon a la densitat òptica i l'eix de les X a les UFC/ml i indica la relació entre aquests durant el creixement de l'*E.coli*. S'ajusta la línia de tendència a una equació exponencial, degut a que el creixement bacterià segueix aquest tipus d'equació.

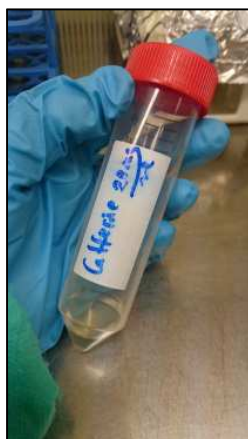


<sup>60</sup> Font: fotografia de l'autora

<sup>61</sup> ANNEX IV: Taula de la relació de les UFC de cada densitat òptica de les dilucions

El següent pas es basa en la preparació dels tractaments amb diferents concentracions de cafeïna i medi NB, on posteriorment aplicarem els bacteris. Hi haurà un total de sis concentracions de cafeïna diferents, és a dir, sis dilucions, per cada una de les quals es faran dues solucions, una per cada un dels bacteris, *E.coli* i *P.fluorescens*.

CONCENTRACIÓ (µl/ml)	VOLUM CAFEÏNA (µl)	VOLUM MEDI NB (µl)	VOLUM FINAL (µl)
10000	2500,00	2500,00	5000,00
5000	1250,00	3750,00	5000,00
1581,14	395,28	4604,72	5000,00
500	125,00	4875,00	5000,00
158,11	39,53	4960,47	5000,00
50	12,500	4987,50	5000,00



Preparació de les dilucions de cafeïna<sup>62</sup>

Seguidament es prepara una dilució de *E.coli* i *P.fluorescens*<sup>63</sup> amb una OD determinada.

Mirant la relació establerta entre les UFC i les densitats òptiques calculades anteriorment, s'estableix la fórmula que permet, en funció de X o de Y, calcular la densitat òptica per un número determinat de UFC o calcular les UFC per una determinada densitat òptica. La fórmula és:  $y = 0,0737e^{9E-11x}$

Escollim la densitat òptica de 0,4 perquè volem una concentració final en cada tub de  $2 \times 10^9$  UFC, el contingut bacterià suficient per observar resultats.

<sup>62</sup> Font: fotografies de l'autora

<sup>63</sup> Cultiu preparat el dia anterior

Aplicant la fórmula, sabem que en una solució a 0,4 tenim  $2 \times 10^{10}$  UFC i que en 1 ml estan a una densitat òptica de 0,4, per tant, si cada cop per fer les dilucions amb cafeïna agafem 10 vegades menys (100  $\mu$ l) tindrem en cada tub  $2 \times 10^9$  UFC.

Per l'*E.coli*, la dilució és de 1:11 on 76  $\mu$ l són bacteris i 924  $\mu$ l medi nutritiu NB, i per la *Pseudomonas fluorescens*, la dilució és 1:8, on 125  $\mu$ l són bacteris i 875  $\mu$ l correspon al medi.



Dilucions de cafeïna<sup>64</sup>

Un cop fetes les dilucions i comprovada que la seva densitat òptica és 0,4, es repeteix la dilució pels dos bacteris ja que s'han de preparar en condicions estèrils per a poder aplicar a les solucions de treball. És important apuntar bé quina concentració i a quin bacteris correspon cada tub d'assaig.

Finalment es pot procedir a afegir 100  $\mu$ l d'aquestes a cada una de les solucions preparades anteriorment amb diferents concentracions de cafeïna.

Per avaluar la viabilitat del cultiu en cafeïna es deixen els tubs de les solucions d'*E.coli* durant tota la nit a 37°C en agitació i les de *P.fluorescens* a temperatura ambient, condicions que afavoreixen el seu creixement.

## - PRÀCTICA 4: Resultats

### Objectiu

Lectura de les densitats òptiques de tots els tractaments i síntesi dels resultats.

### Procediment

Mesurem la densitat òptica dels controls negatius, els qual indiquen el màxim que poden créixer els bacteris, és a dir, el 100% de creixement.

---

<sup>64</sup> Font: fotografia de l'autora

Seguidament, mesurem les densitats òptiques de cada una de les solucions de bacteris amb cafeïna i les anotem.

<b>E.coli</b>						
<b>CN</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>	<b>C6</b>
2,11	0	1,13	1,7	1,89	1,96	2,02
2,07	0	1,12	1,59	1,71	1,96	2

<b>P.fluorescens</b>						
<b>CN</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>	<b>C6</b>
1,76	0	1,2	1,6	1,72	1,7	1,71
1,78	0	1,2	1,63	1,67	1,69	1,74

### - Resultats

Un cop es tenen recollides totes les dades, es procedeix a efectuar els càlculs que permetin extrapolar i establir uns resultats i conclusions en quant a la inhibició de bacteris en cafeïna.

Un dels paràmetres que calculem és el nombre de UFC segons cada una de les rèpliques de cada tractament utilitzant la fórmula esmentada anteriorment.

També és interessant calcular les mitjanes de les densitats òptiques i les UFC formades per a cada bacteri i la seva desviació estàndard per tenir una idea general dels resultats i utilitzar aquestes dades per calcular la viabilitat i l'efecte en tant per cent de les densitats òptiques i les UFC formades. És a dir, calcular quin tant per cent de OD no presenta toxicitat i quin sí.

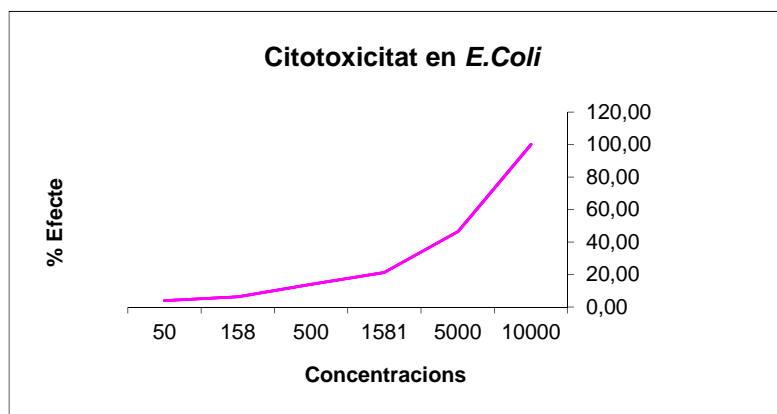
#### **Dades de la inhibició d'*E.coli* en cafeïna<sup>65</sup>**

Interpretant les dades obtingudes i anotades, veiem que la cafeïna ha resultat ser tòxica a partir d'una concentració de 5000 µg/ml, inhibint el creixement d'un quasi 50% de bacteris (46,17%) en quant a la OD i que el tractament amb el màxim de concentració de cafeïna, el C1 amb 100000 µg/ml, inhibeix el creixement total de tots els bacteris.

<sup>65</sup> ANNEX V: Dades de la inhibició d'*E.coli* en cafeïna

Per tant, queda demostrat que la cafeïna inhibeix totalment el creixement del bacteri *E.coli* a partir d'una concentració de 10000 µg/ml de cafeïna i que presenta una toxicitat important en nivells inferiors fins a 5000 µg/ml.

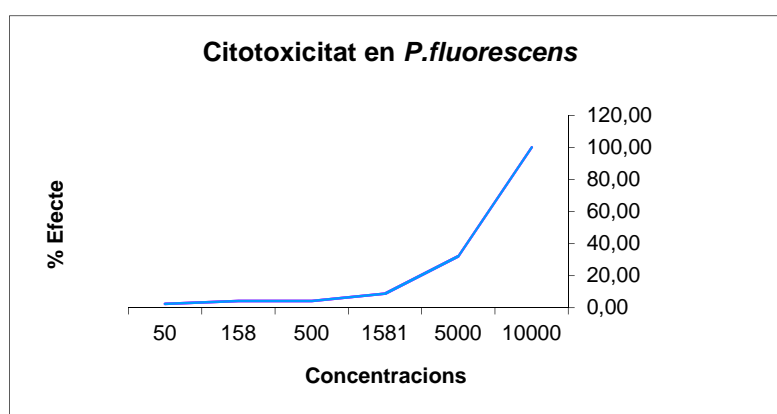
La següent gràfica mostra com en funció de l'increment de la concentració de cafeïna augmenta l'efecte de toxicitat, és a dir, la inhibició.



#### **Dades de la inhibició de la *P.fluorescens* en cafeïna<sup>66</sup>**

Analitzant les dades obtingudes, s'observa clarament com la cafeïna ha inhibit el creixement de la *P.fluorescens* en un 100% a una concentració de 10000 µg/ml. També presenta una lleugera inhibició en valors més baixos, però en valors inferiors a 5000 µg/ml de concentració (els tractaments C3, C4, C5, i C6) no es considera que hi hagi hagut toxicitat ja que la mortalitat bacteriana oscil·la inferior al 10%, exceptuant a 5000 µg/ml que l'efecte de la cafeïna ha resultat ser un 32,30%, segons la densitat òptica.

A la gràfica següent es mostra clarament l'efecte de la cafeïna en la *P.fluorescens* i els nivells en que l'efecte augmenta al augmentar la concentració:

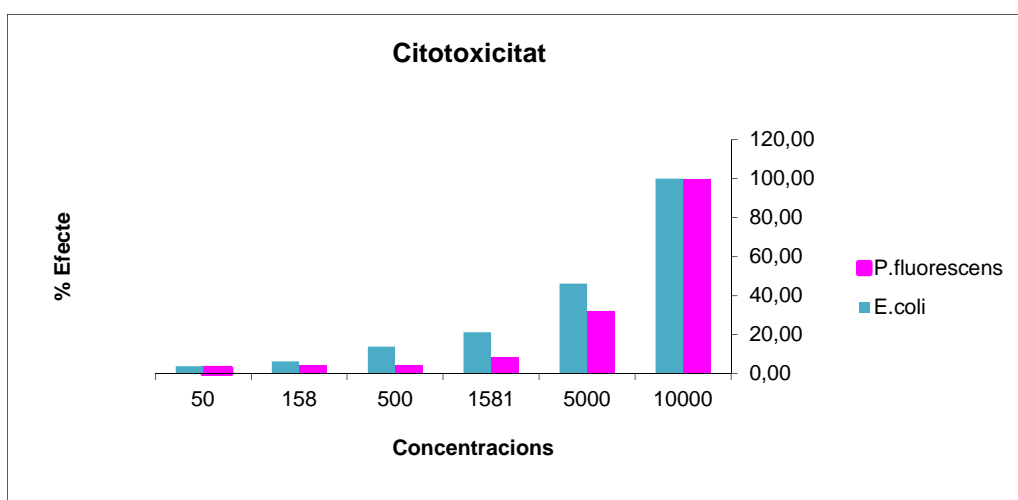
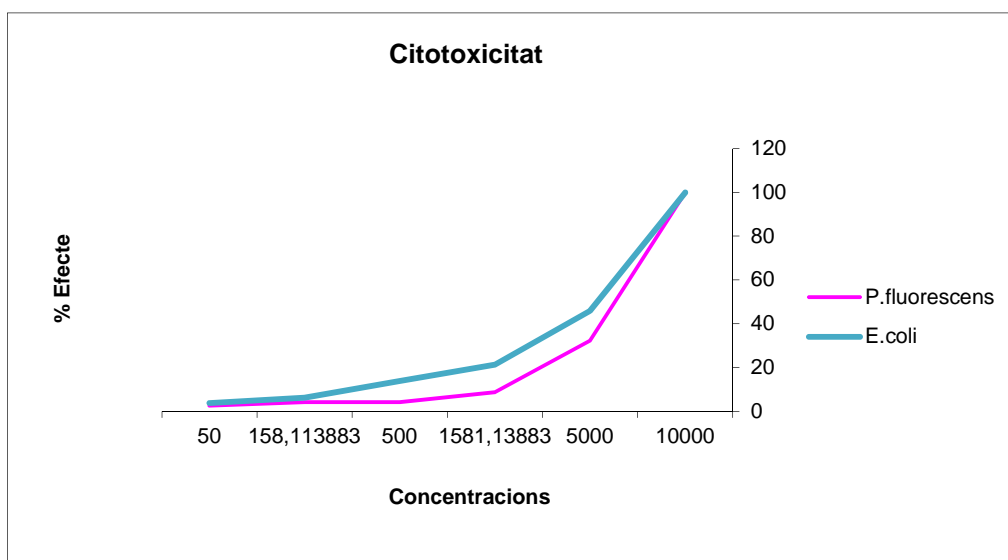


<sup>66</sup> ANNEX VI: Dades de la inhibició de la *P.fluorescens* en cafeïna

### Comparació inhibició entre *E.coli* i *P.fluorescens*

Després d'observar la inhibició de la cafeïna en cada un dels bacteris emprats, és interessant establir una relació de comparació entre els resultats.

Tant en *E.coli* com en *P.fluorescens*, la cafeïna ha resultat inhibir el creixement totalment a 10000 µg/ml de concentració. Tot i així, a 5000 µg/ml l'*E.coli* resulta ser més sensible a la toxicitat de la cafeïna que la *P.fluorescens*, ja que presenta un efecte en la densitat òptica d'un 46,17%, i la *P.fluorescens* d'un 32,20%. Això es repeteix en valors de concentració més inferiors. Per tant, afirmem que l'*E.coli* és més sensible a la propietat inhibidora de la cafeïna que la *P.fluorescens*.



## 6. CONCLUSIONS

La cafeïna és present en la vida humana des de fa molts segles, i ja llavors es coneixien les seves propietats estimulants. Tant els seus efectes com la seva fàcil obtenció han permès que sigui present en molts aliments, un dels més abundants, el cafè, del qual és el component principal. El fet que estigui present en moltes begudes fa que el seu consum sigui elevat degut a la popularitat actual del cafè i de les begudes energètiques.

Aquest consum porta, doncs, a una sèrie de residus amb alt contingut de cafeïna que acaben en aigües residuals i que provoquen contaminació (cal recordar que la cafeïna és tòxica).

Per solucionar aquesta contaminació d'una forma biològica, hem presentat un bacteri que degrada la cafeïna, la *Pseudomonas putida* CBB5. Si els gens d'aquest bacteri, els *ndmABDCE*, fossin clonats a un altre bacteri molt més fàcil de manipular i de fer propagar (*Escherichia coli*), tindríem una forma per a eliminar la cafeïna present en aigües residuals.

Aquest bacteri no només tindria una finalitat de bioremediació ambiental, sinó que seria útil per dur a terme processos de descafeïnat biològic, per sintetitzar metabòlits útils per a la indústria farmacèutica que són difícils d'aconseguir, i fins i tot per a detectar, com un biosensor, la cafeïna present en begudes i aliments.

S'ha explicat el procés de clonació d'un gen a una cèl·lula hoste i he realitzat gran part de les pràctiques que es durien a terme als laboratoris de l'IBB gràcies al Programa Argó. La realització d'aquestes pràctiques m'ha permès entendre i conèixer com es realitzaria un procés de clonació, així com endinsar-me per primer cop al món de la recerca i adquirir nous coneixements sobre tècniques i instruments utilitzats en un laboratori d'investigació.

Altrament, després d'una recerca bibliogràfica, vaig descobrir que la cafeïna presenta propietats antimicrobianes, és a dir, que impossibilita el creixement dels bacteris. Aquests, si no són capaços de degradar-la com un nutrient (com ho faria la *Pseudomonas putida* CBB5), al ingerir-la pateixen un desequilibri en el seu metabolisme i acaben morint.

S'han extret algunes conclusions que apunten les causes per les quals els bacteris són incapaços de créixer a una certa concentració de cafeïna. La font d'aquesta informació han sigut articles científics. És un tema que encara no s'ha estudiat amb profunditat, per això no són més que possibles causes. Malgrat això, el coneixement d'aquestes causes m'ha permès conèixer nous conceptes.

No obstant, s'ha pogut comprovar que, tant en *Escherichia coli* com en *Pseudomonas fluorescens*, la cafeïna inhibeix totalment el creixement bacterià a una concentració de 10000 µg/ml.

Aquests resultats ens permeten demostrar que, tot i no saber amb exactitud la causa, la cafeïna té propietats antibacterianes, la qual cosa podria ser útil en diverses aplicacions, com la presència en medicaments o la utilització d'aquesta com a pesticida.

La pràctica es va dur a terme als laboratoris del Parc Científic de Barcelona gràcies al programa Batx2lab. L'experiència al laboratori va ser del tot satisfactòria, afegint que era una pràctica proposada per mi i que els resultats van ser com els que esperàvem.

I fins aquí, les dues relacions bacteris-cafeïna que estructuraven el treball. Per una banda, la relació d'addició dels bacteris a la cafeïna, i per l'altra, la inhibició de bacteris en cafeïna. Dues relacions el coneixement i estudi de les quals ens porten a possibles aplicacions biotecnològiques que milloren la vida humana i el medi ambient.

L'aprofitament de les eines biotecnològiques i de l'enginyeria genètica ens permeten treure profit de tot allò que ens envolta per extreure beneficis. Només és qüestió d'investigar, informar-te bé sobre el tema en qüestió, i tenir una mica d'enginyer per a poder dissenyar una bona aplicació.

El treball finalitza aquí, però a la ciència encara li queda molt a fer en aquestes relacions entre la cafeïna i els bacteris, les possibles aplicacions i, sobretot, queda molt per descobrir en biotecnologia.



## 7. BIBLIOGRAFIA

Les definicions dels conceptes estan extretes de l'enciclopèdia virtual *enciclopèdia.cat*.

Les taules i gràfiques s'han confeccionat amb el programa *Excel*.

### MONOGRAFIES

- SUMMERS, Ryan M., et al. *Genetic characterization of caffeine degradation by bacteria and its potential applications*. *Microbial biotechnology*, 2015, vol. 8, no 3, p. 369-378.
- SUMMERS, Ryan M., et al. *Caffeine junkie: an unprecedented glutathione S-transferase-dependent oxygenase required for caffeine degradation by Pseudomonas putida CBB5*. *Journal of bacteriology*, 2013, vol. 195, no 17, p. 3933-3939.
- SUMMERS, Ryan M., et al. *Characterization of a broad-specificity non-haem iron N-demethylase from Pseudomonas putida CBB5 capable of utilizing several purine alkaloids as sole carbon and nitrogen source*. *Microbiology*, 2011, vol. 157, no 2, p. 583-592.
- SUMMERS, Ryan, et al. *New genetic insights to consider coffee waste as feedstock for fuel, feed, and chemicals*. *Open Chemistry*, 2014, vol. 12, no 12, p. 1271-1279.
- SUMMERS, Ryan M., et al. *Novel, highly specific N-demethylases enable bacteria to live on caffeine and related purine alkaloids*. *Journal of bacteriology*, 2012, vol. 194, no 8, p. 2041-2049.
- GARCÍA, José, et al. *Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en Escherichia coli*. *Vaccimonitor*, 2013, vol. 22, no 2, p. 30-39.
- GAMBOA, Ramsés A.; TRUJILLO-ROLDÁN, Mauricio A. *Un acercamiento a la producción de proteínas recombinantes terapéuticas de uso humano*. *Acta Ortopédica Mexicana*, 2009, vol. 4, no 3, p. 87-91.

- QUANDT, Erik M., et al. *Decaffeination and measurement of caffeine content by addicted Escherichia coli with a refactored N-demethylation operon from Pseudomonas putida CBB5*. ACS synthetic biology, 2013, vol. 2, no 6, p. 301-307.
- BALSALOBRE, Carlos. *Escherichia coli, un petit gran organisme*. Treballs de la Societat Catalana de Biologia, 2011, p. 31-43.
- AL-JANABI, Ali Abdul Hussein S. *Potential activity of the purine compounds caffeine and aminophylline on bacteria*. Journal of global infectious diseases, 2011, vol. 3, no 2, p. 133.
- HASHIMOTO, Takashi, et al. *Caffeine inhibits cell proliferation by G0/G1 phase arrest in JB6 cells*. Cancer research, 2004, vol. 64, no 9, p. 3344-3349.
- LOZANO, Ricardo Pardo, et al. *Cafeïna: un nutriente, un fàrmaco, o una droga de abuso*. Adicciones: Revista de sociodrogalcohol, 2007, vol. 19, no 3, p. 225-238.
- RAMANAVIČIENĖ, Almira, et al. *Anti-bacterial effect of caffeine on Escherichia coli and Pseudomonas fluorescens*. Acta Medica Lituanica, 2003, vol. 10, p. 185-188.
- NEHLIG, Astrid; DAVAL, Jean-Luc; DEBRY, Gérard. *Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects*. Brain Research Reviews, 1992, vol. 17, no 2, p. 139-170.
- GILBERT, R. M. *Caffeine consumption*. Progress in clinical and biological research, 1983, vol. 158, p. 185-213.

## 8. WEBGRAFIA<sup>(67)</sup>

- o <http://www.cafeina.com.es/>
- o <http://www.encyclopedia.cat/EC-GEC-0223456.xml>
- o <http://www.botanical-online.com/cafeina.htm>
- o <http://mx.tuhistory.com/content/la-gran-historia-de-la-cafeina>
- o <https://www.cosmos.com.mx/wiki/43qd/cafeina>
- o <http://www.soymaratonista.com/20969/cafeina-caracteristicas-y-efectos-sobre-la-salud>
- o [http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir3619/20131120\\_infocafeina\\_a\\_acsa.pdf](http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir3619/20131120_infocafeina_a_acsa.pdf)
- o <https://www.elblogdelasalud.info/cafeina-efectos-positivos-y-negativos-para-la-salud/4295>
- o <http://www.caffeineinformer.com/caffeine-what-the-world-drinks>
- o <http://blocs.xtec.cat/pgarcia7/2008/07/14/transferencia-dadn-clonacio-de-gens/>
- o <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades&note=151>
- o [http://www.microbial-systems.com/web/docs/Newsletter\\_Microbial\\_03.pdf](http://www.microbial-systems.com/web/docs/Newsletter_Microbial_03.pdf)
- o <http://www.quiminet.com/articulos/conozca-el-proceso-de-purificacion-del-adn-2678216.htm>
- o <http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>
- o <http://www.xtec.cat/~mmonlleo/lis/bacteris.html>
- o <http://es.slideshare.net/gfreixed/qu-sn-els-bacteris>
- o [http://web.mst.edu/~microbio/bio221\\_2007/P\\_putida.htm](http://web.mst.edu/~microbio/bio221_2007/P_putida.htm)
- o [http://mocoloridopseudomona.blogspot.com.es/2011\\_10\\_01\\_archive.html](http://mocoloridopseudomona.blogspot.com.es/2011_10_01_archive.html)
- o <http://www.madrimasd.org/blogs/remtavares/2013/05/27/131895>
- o <http://www.uv.mx/personal/sbonilla/files/2011/06/Escherichia-coli-l.pdf>
- o <http://cbtis253escherichiacoli.blogspot.com.es/p/caracteristicas-generales.html>
- o [http://www.revistasan.org.ar/pdf\\_files/trabajos/vol\\_14/num\\_4/RSAN\\_14\\_4\\_314.pdf](http://www.revistasan.org.ar/pdf_files/trabajos/vol_14/num_4/RSAN_14_4_314.pdf)
- o <http://www.ivu.org/spanish/trans/vsuk-calcium.html>

---

<sup>67</sup> La webgrafia completa i correctament redactada es troba a l'ANNEX VII.

## 9. AGRAÏMENTS

La realització d'aquest treball no hauria estat possible sense l'ajuda i col·laboració d'un seguit de persones que esmentaré a continuació.

En primer lloc, agraeixo el suport de la tutora d'aquest treball, la M<sup>o</sup> Agustina Mendoza. Per l'ajuda en la tria del tema, els consells i totes les correccions, i sobretot per la confiança i la serenitat que m'ha transmès en els moments de més estrès i angouxa. Tina, has sigut fonamental en la realització d'aquest treball.

Agraeixo al Programa Argó per haver-me donat la possibilitat de fer una estada a les instal·lacions de la Universitat Autònoma de Barcelona, sense les quals no hagués estat possible realitzar gran part de la part pràctica. Vull agrair especialment a la Neus Ferrer per acollir-me durant dues setmanes als laboratoris de l'IBB i per l'ajuda i correccions rebudes posteriorment.

He d'agrair també al Programa Batx2lab el fet de donar-me l'oportunitat de dur a terme la part pràctica d'inhibició de bacteris en cafeïna al Parc Científic de Barcelona, especialment al David Ramos, per tutoritzar les pràctiques i pel suport i ajuda en tota la realització del treball.

A tots els que m'han acompanyat durant les meves estades a Barcelona. La Carla, l'Alba i el Luis, per les rialles constants i per la seva amistat. I al Luís, per l'humor constant entre la meva cafeïna i el seu pH.

Moltes gràcies a tots els amics que m'han fet costat durant aquesta etapa. A l'Alicia, per ser-hi sempre present; a la Marta, per la tendresa, complicitat i confiança, per escoltar-me tant i per fer-me gaudir cada tarda amb ella; a l'Iris, la Marina i la Laia, pel seu suport incondicional, per la seva preocupació i per ser unes amigues immillorables; i a la Glòria i la Mireia per la confiança tan especial que em transmeten.

Finalment agraeixo el suport de la meva família. Als iaïos, a la tieta i l'àvia, pel suport i motivació cada cop que s'obria una nova porta. Al meus pares, per acompanyar-me en tot moment, recolzar-me en totes les meves decisions i aconsellar-me. I a la lluca, per ser-ho tot.

## ANNEXES






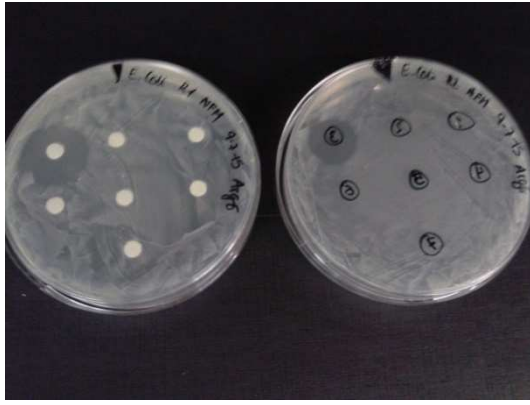
### ANNEX I: Consum mundial de productes amb cafeïna

PAÏS	CAFEÏNA DEL CAFÈ (mg/dia)	CAFEÏNA DEL TE (mg/dia)	CAFEÏNA DEL MATE (mg/dia)	CAFEÏNA DEL COCOA (mg/dia)	SUMA DE TOTES LES FONTS (mg/dia)
Algèria	79	5	0	1	85
Argentina	43	1	52	5	100
Austràlia	202	29	0	0	232
Austria	276	8	0	16	300
Brasil	26	1	10	4	40
Canadà	180	18	0	12	210
Xina	2	14	0	0	16
Colòmbia	126	0	0	9	136
Dinamarca	354	15	0	21	390
Egipte	5	53	0	1	58
Finlàndia	322	6	0	1	329
França	215	8	0	16	239
Alemanya	292	9	0	12	313
Hondures	160	-	0	2	162
Hongria	138	3	0	9	150
Índia	1	26	0	0	27
Irlanda	81	127	0	5	213
Itàlia	198	3	0	8	210
Polònia	100	33	0	8	141
Rússia	26	40	0	7	72
Sud Àfrica	15	23	0	1	40
Suècia	388	12	0	7	407
Regne Unit	92	96	0	14	202
Estats Units	143	12	0	12	168

## ANNEX II: Nutrició bacteriana

NUTRICIÓ BACTERIANA		
FONT D'ENERGIA	<b>QUIMIÒTROF</b>	Obté l'energia a partir de reaccions d'oxidació-reducció de compostos inorgànics.
	<b>FOTÒTROF</b>	Obtenen l'energia a partir dels fotons de la llum del Sol, és a dir, fan la fotosíntesis.
FONT D'ELECTRONS (reductora)	<b>ORGANÒTROF</b>	Utilitza substrats orgànics com a fonts d'electrons o d'hidrogen.
	<b>LITÒTROF</b>	Utilitza substrats inorgànics com a fonts d'electrons o d'hidrogen.
FONT DE CARBONI	<b>AUTÒTROF</b>	Utilitzen com a font de carboni una molècula inorgànica (CO <sub>2</sub> ).
	<b>HETERÒTROF</b>	Utilitza com a font de carboni una molècula orgànica sintetitzada per un altre organisme.

### ANNEX III: Resultats inhibició de bacteris en cafeïna (UAB)

<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus licheniformes</i>
 <p>Two petri dishes showing the growth of <i>Bacillus cereus</i>. The left dish shows a control with a large, dark, circular zone of inhibition. The right dish shows a control with a large, dark, circular zone of inhibition and several smaller, dark, circular zones of inhibition.</p>	 <p>Two petri dishes showing the growth of <i>Bacillus licheniformes</i>. The left dish shows a control with a large, dark, circular zone of inhibition. The right dish shows a control with a large, dark, circular zone of inhibition and several smaller, dark, circular zones of inhibition.</p>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
 <p>Two petri dishes showing the growth of <i>Bacillus subtilis</i>. The left dish shows a control with a large, dark, circular zone of inhibition. The right dish shows a control with a large, dark, circular zone of inhibition and several smaller, dark, circular zones of inhibition.</p>	 <p>Two petri dishes showing the growth of <i>Pseudomonas fluorescens</i>. The left dish shows a control with a large, dark, circular zone of inhibition. The right dish shows a control with a large, dark, circular zone of inhibition and several smaller, dark, circular zones of inhibition.</p>
<i>Salmonella LT2</i>	<i>E. coli DH5αE</i>
 <p>Two petri dishes showing the growth of <i>Salmonella LT2</i>. The left dish shows a control with a large, dark, circular zone of inhibition. The right dish shows a control with a large, dark, circular zone of inhibition and several smaller, dark, circular zones of inhibition.</p>	 <p>Two petri dishes showing the growth of <i>E. coli DH5αE</i>. The left dish shows a control with a large, dark, circular zone of inhibition. The right dish shows a control with a large, dark, circular zone of inhibition and several smaller, dark, circular zones of inhibition.</p>

## ANNEX IV: Taula de la relació de les UFC de cada densitat òptica de les dilucions

DILUCIÓ INICIAL	DENSITAT ÒPTICA	DILUCIÓ ACUMULADA	INOCUL APLICAT (µl)	UFC COMPTADES	UFC/ml	Mitjana UFC/ml
1:1	2,2	10 <sup>6</sup>	0,1	no	-	-
		10 <sup>6</sup>	0,1	no	-	
1:2	1,7	10 <sup>6</sup>	0,1	3475	3,48 x 10 <sup>10</sup>	<b>3,70 x 10<sup>10</sup></b>
		10 <sup>6</sup>	0,1	3922	3,29 x 10 <sup>10</sup>	
1:5	0,78	10 <sup>6</sup>	0,1	2972	2,97 x 10 <sup>10</sup>	<b>2,70 x 10<sup>10</sup></b>
		10 <sup>6</sup>	0,1	2472	2,43 x 10 <sup>10</sup>	
1:10	0,36	10 <sup>6</sup>	0,1	1403	1,40 x 10 <sup>10</sup>	<b>1,66 x 10<sup>10</sup></b>
		10 <sup>6</sup>	0,1	1911	1,91 x 10 <sup>10</sup>	
1:15	0,24	10 <sup>6</sup>	0,1	1331	1,33 x 10 <sup>10</sup>	<b>1,32 x 10<sup>9</sup></b>
		10 <sup>6</sup>	0,1	1316	1,32 x 10 <sup>10</sup>	
1:25	0,14	10 <sup>6</sup>	0,1	958	9,58 x 10 <sup>9</sup>	<b>9,17 x 10<sup>9</sup></b>
		10 <sup>6</sup>	0,1	875	8,75 x 10 <sup>9</sup>	



## ANNEX V: Dades de la inhibició d'*E.coli* en cafeïna

	<b>E.COLI</b>						
<b>Tractament</b>	<b>CN</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>	<b>C6</b>
<b>DO1</b>	2,11	0	1,13	1,7	1,89	1,96	2,02
<b>DO2</b>	2,07	0	1,12	1,59	1,71	1,96	2
<b>UFC/ml</b>	3,73x10 <sup>10</sup>	-	3,03x10 <sup>10</sup>	3,49x10 <sup>10</sup>	3,60x10 <sup>10</sup>	3,65x10 <sup>10</sup>	3,68x10 <sup>10</sup>
<b>UFC/ml</b>	3,71x10 <sup>10</sup>	-	3,02x10 <sup>10</sup>	3,41x10 <sup>10</sup>	3,49x10 <sup>10</sup>	3,65x10 <sup>10</sup>	3,67x10 <sup>10</sup>
<b>Conc. cafeïna (µg/ml)</b>	Medi	10 <sup>4</sup>	5000	1581	500	158	50

<b>Mitjana OD</b>	2,09	0,00	1,13	1,65	1,80	1,96	2,01
<b>Desv. Estàndard</b>	0,03	0,00	0,01	0,08	0,13	0,00	0,01

<b>Mitjana UFC/ml</b>	3,72x10 <sup>10</sup>	-	3,03x10 <sup>10</sup>	3,45x10 <sup>10</sup>	3,55x10 <sup>10</sup>	3,65x10 <sup>10</sup>	3,67x10 <sup>10</sup>
<b>Desv. Estàndard</b>	1,50x10 <sup>8</sup>	-	6,98x10 <sup>7</sup>	5,26x10 <sup>8</sup>	7,86x10 <sup>8</sup>	0,00	7,82x10 <sup>7</sup>

<b>Viabilitat (%) OD</b>	100	0,00	53,83	78,71	86,12	93,78	96,17
<b>Efecte (%) OD</b>	0,00	100	46,17	21,29	13,88	6,22	3,83

<b>Viabilitat (%) UFC</b>	100	-	81,48	92,83	95,50	98,08	98,83
<b>Viabilitat (%) UFC</b>	0,00	-	18,52	7,17	4,50	1,92	1,17

## ANNEX VI: Dades de la inhibició de la *P.fluorescens* en cafeïna

Tractament	<b>P.FLUORESCENS</b>						
	CN	C1	C2	C3	C4	C5	C6
D01	1,76	0	1,2	1,6	1,72	1,7	1,71
D02	1,78	0	1,2	1,63	1,67	1,69	1,74
UFC/ml	3,53x10 <sup>10</sup>	-	3,10x10 <sup>10</sup>	3,42x10 <sup>10</sup>	3,50x10 <sup>10</sup>	3,49x10 <sup>10</sup>	3,49x10 <sup>10</sup>
UFC/ml	3,54x10 <sup>10</sup>	-	3,10x10 <sup>10</sup>	3,44x10 <sup>10</sup>	3,47x10 <sup>10</sup>	3,48x10 <sup>10</sup>	3,51x10 <sup>10</sup>
Conc. cafeïna (µg/ml)	Medi	10 <sup>4</sup>	5000	1581	500	158	50

Mitjana OD	1,77	0,00	1,2	1,62	1,70	1,70	1,73
Desv. Estàndard	0,01	0,00	0,00	0,02	0,04	0,01	0,02
Mitjana UFC/ml	3,53x10 <sup>10</sup>	-	3,10x10 <sup>10</sup>	3,43x10 <sup>10</sup>	3,48x10 <sup>10</sup>	3,48x10 <sup>10</sup>	3,50x10 <sup>10</sup>
Desv. Estàndard	8,88x10 <sup>7</sup>	-	0,00	1,46x10 <sup>8</sup>	2,32x10 <sup>8</sup>	4,64x10 <sup>7</sup>	1,37x10 <sup>8</sup>

Viabilitat (%) OD	100	0,00	67,80	91,24	95,76	95,76	97,46
Efecte (%) OD	0,00	100	32,20	8,76	4,24	4,24	2,54

Viabilitat (%) UFC	100	-	87,77	97,12	98,63	98,64	99,19
Efecte (%) UFC	0,00	-	12,23	2,88	1,37	1,36	0,18

## ANNEX VII: Webgrafia

Fotografies de la portada:

- <http://thumbs.dreamstime.com/z/mol%C3%A9cula-del-cafe%C3%ADna-con-los-granos-de-caf%C3%A9-22717917.jpg>
- <http://previews.123rf.com/images/knorre/knorre0904/knorre090400017/4732446-3d-rendered-bacteria-isolated-on-white-Stock-Photo-bacteria-coli-escherichia.jpg>

- SOLAS, JAVIER; GARCIA POSTADO, JOSE LUÍS. *Cafeïna*. [En línia].

<http://www.cafeina.com.es/> [Consulta: 14 juny 2015]

- *Cafeïna*. Enciclipèdia catalana. [En línia].

<http://www.enciclopedia.cat/EC-GEC-0223456.xml> [Consulta: 14 juny 2015]

- *Cafeïna*. Botanical online. [En línia].

<http://www.botanical-online.com/cafeina.htm> [Consulta: 14 juny 2015]

- *Cafeïna*. History. [En línia].

<http://mx.tuhistory.com/content/la-gran-historia-de-la-cafeina> [Consulta: 14 juny 2015]

- *Información Técnica y Comercial de la Cafeïna*. Cosmos. [En línia].

<https://www.cosmos.com.mx/wiki/43qd/cafeina> [Consulta: 14 juny 2015]

- SUÁREZ, SANDRA. *Cafeïna: características y efectos sobre la salud*. [En línia].

<http://www.soymaratonista.com/20969/cafeina-caracteristicas-y-efectos-sobre-la-salud> [Consulta: 14 juny 2015]

- *La seguretat de la cafeïna en l'alimentació*. Generalitat de Catalunya. Agència de Salut Pública de Catalunya. [En línia].

[http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir3619/20131120\\_infocafeina\\_acsa.pdf](http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir3619/20131120_infocafeina_acsa.pdf) [Consulta: 14 juny 2015]

- *Cafeïna: Efectos positivos y negativos para la salud*. Blog de la salud. [En línia].

<https://www.elblogdelasalud.info/cafeina-efectos-positivos-y-negativos-para-la-salud/4295> [Consulta: 14 juny 2015]

- *Caffeine (Coffee) Consumption By Country*. Caffeine informer. [En línia].  
<http://www.caffeineinformer.com/caffeine-what-the-world-drinks> [Consulta: 14 juny 2015]
- GARCIA, PILAR. *Transferència d'ADN. Clonació de gens*. Biologia i Geologia. [En línia].  
<http://blocs.xtec.cat/pgarcia7/2008/07/14/transferencia-dadn-clonacio-de-gens/>  
[Consulta: 14 juliol 2015]
- *ADN recombinante o clonación celular*. Ministerio de educación. [En línia].  
<http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/2bachillerato/biotec/contenidos3.htm> [Consulta: 14 juliol 2015]
- *La ingeniería genética*. ArgenBio. [En línia].  
<http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades&note=151> [Consulta: 14 juliol 2015]
- *La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR. Mitos y realidades*. Newsletter microbial. [En línia].  
[http://www.microbial-systems.com/web/docs/Newsletter\\_Microbial\\_03.pdf](http://www.microbial-systems.com/web/docs/Newsletter_Microbial_03.pdf)  
[Consulta: 16 juliol 2015]
- *El proceso de purificación del ADN*. [En línia].  
<http://www.quiminet.com/articulos/conozca-el-proceso-de-purificacion-del-adn-2678216.htm> [Consulta: 16 juliol 2015]
- *Electroforesis de proteínas y de ácidos nucleicos*. [En línia].  
<http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>. [Consulta: 20 juliol 2015]
- *Els bacteris*. IES L'olivera. [En línia].  
<http://www.xtec.cat/~mmonlleo/lis/bacteris.html> [Consulta: 24 juliol 2015]
- *Què és un bacteri?*. Slideshare. [En línia].  
<http://es.slideshare.net/gfreixed/qu-sn-els-bacteris> [Consulta: 24 juliol 2015]
- HAMILTON, KRIS. *Pseudomonas putida*. [En línia].  
[http://web.mst.edu/~microbio/bio221\\_2007/P\\_putida.htm](http://web.mst.edu/~microbio/bio221_2007/P_putida.htm) [Consulta: 20 agost 2015]

- TANGO, ESTELA. *Pseudomonas*. Slideshare. [En línia].  
<http://es.slideshare.net/diegomaier/pseudomonas-14807341> [Consulta: 20 agost 2015]
  
- *Pseudomonas putida*. [En línia].  
[http://mocoloridopseudomona.blogspot.com.es/2011\\_10\\_01\\_archive.html](http://mocoloridopseudomona.blogspot.com.es/2011_10_01_archive.html)  
[Consulta: 20 agost 2015]
  
- *La ingeniería genética puede resolver problemas de contaminación*. Madrimasd. 27 de maig de 2013. [En línia].  
<http://www.madrimasd.org/blogs/remtavares/2013/05/27/131895> [Consulta: 20 agost 2015]
  
- ARANA, NOEMÍ. *Escherichia coli, características generales, taxonomía y cepas virulentas*. Un lugar ecológico. [En línia].  
<http://www.unlugarecologico.com/2012/09/escherichia-coli-caracteristicas.html>  
[Consulta: 22 agost 2015]
  
- RAMÍREZ REYES, ABIGAIL. *Escherichia coli*. Microbiología general. [En línia].  
<http://www.uv.mx/personal/sbonilla/files/2011/06/Escherichia-coli-l.pdf>  
[Consulta: 22 agost 2015]
  
- *Escherichia coli*. [En línia].  
<http://cbtis253escherichiacoli.blogspot.com.es/p/caracteristicas-generales.html>  
[Consulta: 22 agost 2015]
  
- CARRILLO, WILMAN. *Lysozyme: Antibacterial Activity and Allergenicity*. [En línia].  
[http://www.revistasan.org.ar/pdf\\_files/trabajos/vol\\_14/num\\_4/RSAN\\_14\\_4\\_314.pdf](http://www.revistasan.org.ar/pdf_files/trabajos/vol_14/num_4/RSAN_14_4_314.pdf) [Consulta: 7 setembre 2015]
  
- *El calcio*. The vegetarian society UK. [En línia].  
<http://www.ivu.org/spanish/trans/vsuk-calcium.html> [Consulta: 7 setembre 2015]