

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos



**PRODUCCIÓN INDUCIBLE DE LACTOCOCINA A,
PEDIOCINA PA-1, COLICINA V E INTERLEUQUINA-2
EN CEPAS DE *Lactococcus lactis*
PRODUCTORAS DE NISINA**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Antonio Fernández Dumont

Bajo la dirección del Doctor:

Juan Miguel Rodríguez Gómez

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2678-X

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**PRODUCCIÓN INDUCIBLE DE LACTOCOCINA A, PEDIOCINA
PA-1, COLICINA V E INTERLEUQUINA-2 EN CEPAS DE
Lactococcus lactis PRODUCTORAS DE NISINA**

Memoria que para optar al grado de
Doctor, con mención honorífica
“*Doctorado Europeo*”, presenta el
Licenciado Antonio Fernández Dumont

Madrid, abril de 2004

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DPTO. DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID

JUAN MIGUEL RODRÍGUEZ GÓMEZ, PROFESOR TITULAR DE NUTRICIÓN
Y BROMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Producción inducible de lactococina A, pediocina PA-1, colicina V e interleuquina-2 en cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina**”, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria Antonio Fernández Dumont, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo mi dirección, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor con mención honorífica “*Doctorado Europeo*”.

Madrid, 16 de abril de 2004

Fdo.: Juan Miguel Rodríguez Gómez

Quiero dedicar este trabajo a las dos personas que más me han llenado hasta la fecha. Pero no solo este trabajo, sino todos mis años de estudio que, en gran parte, han sido posibles gracias a ellas, que han logrado que este mundo sea un poquito mejor. Quería darles un beso y un abrazo muy fuerte a las dos, Sofía y Marcelina, que me estarán viendo desde algún sitio y que, si pudieran estar aquí, serían las personas más felices y orgullosas del mundo viendo que su nieto ha conseguido el título más alto que concede la Universidad.

Nunca os olvidaré, nunca olvidaré de donde vengo ni quien soy. Ni nadie lo deberíamos hacer.

A mis abuelas Sofía y Marcelina

AGRADECIMIENTOS

Quería, en primer lugar, agradecer a todas las personas en general que han hecho posible la realización de este trabajo.

A Lorenzo de la Hoz, por acogerme en el Departamento que dirige.

A Juan Miguel Rodríguez, director de la Tesis Doctoral. Muchas gracias por darme la oportunidad de realizar este trabajo, e iniciarme en el apasionante mundo de la investigación. Gracias por tu dedicación y las miles de horas que has dedicado a la culminación de esta tesis. Al igual que la oportunidad que me brindaste para salir al extranjero. Esta ha sido la experiencia más bonita que he vivido nunca y ha sido posible gracias a ti.

A Nikki Horn, quien si no fuera por un impedimento legal, sería codirectora de esta Tesis. Por la cantidad de conocimientos que me ha aportado y que van mucho más allá de los que aportan los libros, desde tus 20 años de trabajo de laboratorio. Creo que ha sido mi gran referencia en el laboratorio, dándole un poco de orden a mi trabajo, que no hubiera sido posible sin ella. (*Thanks a lot Nikki; this work couldn't have been performed without you. I would like to thank you for the knowledge that I acquired during my time with you and for all the hours that you spent explaining the work, with the difficulty of the language. Thanks for your patience, your honesty, your laboratory skills, your good advices, and your sweet heart with everybody*).

A Arjan Narrad y Helen Dodd por la supervisión de mi trabajo en Inglaterra. Y, en general, a todos los miembros del Dpto. de Genética y Microbiología del “*Food Research*” de Norwich.

A todos mis compañeros de laboratorio por su ayuda y a los demás compañeros del Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de Alimentos por los buenos momentos que me han hecho pasar. En este apartado me gustaría destacar a Maribel por su ternura y tremenda ayuda

antes de mi viaje a Inglaterra y a Susana, compañera inicial de trabajo y con quien tengo una gran amistad y un gran cariño. Un beso muy grande.

Al Departamento de Puleva Biotech S.A., (Granada) y especialmente a Mónica Olivares y Jordi Xaus, por su colaboración en los experimentos que requerían el empleo de cultivos celulares.

Quería igualmente expresar mi agradecimiento a la Universidad Complutense de Madrid por la concesión de la beca de investigación que he disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral.

A todos mis amigos, del barrio, de la guardería, del colegio, del instituto, de la universidad, de Valdeverdeja y a la gente tan especial que conocí en Inglaterra. Y, en general, a todo el mundo que me quiere y que desea lo mejor para mí.

El mayor de los agradecimientos es para mis padres Antonio y Angelines, quienes dan su vida entera para que sea quien soy y como soy, a cambio de nada.

Finalmente, quería dedicar las últimas líneas a mis dos pequeñas: mi hermana Virginia y mi novia Fede. A mi hermana, a quien quiero con locura, me gustaría decirle que, aunque ahora esté un poco más distanciado físicamente, la he hecho mucho de menos. A Fede de quien estoy enamorado infinitamente y quien ha cambiado mi vida para siempre. Una persona maravillosa, que conocí gracias a mis estancias en el extranjero, y que hace que cada mañana me despierte con una sonrisa.

RESUMEN

La posibilidad de intercambiar tanto los líderes como los sistemas de secreción y procesado que intervienen en la biosíntesis de diversas bacteriocinas puede ser explotada para conseguir la producción heteróloga de estos péptidos antimicrobianos. En este trabajo se ha conseguido la producción de las bacteriocinas lactococina A, pediocina PA-1 y colicina V en *Lactococcus lactis*. Además, se ha conseguido la producción de una proteína eucariota, la citoquina interleuquina-2 en esa misma especie. Para ello, ha sido necesaria la introducción de tres genes: (a) un gen estructural híbrido con la fusión, en un mismo marco de lectura, de las secuencias que codifican el líder de la lactococina A y el propéptido de interés (prolactococina A, propediocina PA-1, procolicina V o prointerleuquina-2) y (b) los genes *lcnC* y *lcnD*, que codifican el sistema de secreción y procesado de la lactococina A.

Los genes estructurales híbridos se construyeron de tal modo que su expresión estuviera controlada por el promotor inducible de la nisina (P_{nisA}). El proceso de autoregulación de la biosíntesis de nisina se ha aplicado con éxito para la producción heteróloga de péptidos en diversas especies y géneros de bacterias lácticas. Para ello, se requieren tres elementos esenciales: (a) una cepa que contenga los genes *nisRK*; (b) la adición de nisina como molécula inductora; y (c) que el gen de interés esté controlado por el promotor P_{nisA} . Las cepas empleadas como hospedadoras fueron *L. lactis* FI5876, una cepa productora de nisina, y *L. lactis* FI7847, una cepa no bacteriocinogénica. Las dos cepas contienen el transposón Tn5301, que porta la agrupación de genes de la nisina, incluidos los genes *nisRK*. En el caso de *L. lactis* FI7847, el gen estructural de la nisina (*nisA*) ha sufrido una delección que impide su expresión y, en consecuencia, la producción de esta bacteriocina.

La introducción de dos plásmidos compatibles (un derivado de pTG262 con el gen estructural híbrido correspondiente y un derivado de pIL277 con los genes *lcnCD*) en *L. lactis* FI7847 y FI5876 condujo a la obtención de nuevas

cepas productoras de lactococina A, pediocina PA-1, colicina V o interleuquina-2. En el caso de los derivados de FI7847, era necesario que los cultivos fueran inducidos previamente con cantidades subinhibitorias de nisina. Los derivados de *L. lactis* FI5876 mantuvieron intacta la capacidad de producir nisina de la cepa parental. En consecuencia, se obtuvieron derivados de *L. lactis* FI5876 coproductores de lactococina A y nisina, pediocina PA-1 y nisina, colicina V y nisina e interleuquina-2 y nisina.

La productividad de lactococina A y pediocina PA-1 superó notablemente a la obtenida previamente (Martínez, 1999) en sistemas afines de producción heteróloga que no utilizan el promotor inducible de la nisina. En el caso de la coproducción de colicina V y nisina, se trata de las primeras bacterias lácticas capaces de coproducir una bacteriocina que afecta a bacterias Gram-positivas (nisina) y otra que afecta a Gram-negativas (colicina V). Ninguno de los sobrenadantes obtenidos a partir de los lactococos recombinantes productores de bacteriocinas afectó a la proliferación de las células intestinales HT-29. Finalmente, la interleuquina-2 producida por los derivados de *L. lactis* FI7847 y FI5876 manifestó actividad biológica ya que inducía la proliferación de células CTLL-2.

SUMMARY

Class II bacteriocins share a number of features that allow their heterologous production by interchanging genetic determinants between certain members of this group of antimicrobial compounds. The ability of *Lactococcus lactis* to produce and secrete the bacteriocins lactococcin A, pediocin PA-1 and colicin V, and the eukaryotic protein interleukine-2 has been demonstrated by the introduction of three genes: (a) a chimeric structural gene, composed of the in-frame fusion of sequences encoding the leader of lactococcin A and the respective propeptide (prolactococcin A, propedocin PA-1, procolicin V or prointerleukine-2) and (b) the lactococcin A-dedicated translocatory function genes, *lcnC* and *lcnD*.

In this work, the expresión of the structural genes were placed under the control of the inducible nisin promoter (P_{nisA}). To exploit the advantages that such promoter offers for heterologous production of peptides, three elements are required: (a) a host strain containing the *nisRK* genes; (b) the presence of nisin in the cultures; and (c) the presence of P_{nisA} controlling the expression of the structural gene. The strains used as hosts were *L. lactis* FI5876, a nisin-producing strain, and *L. lactis* FI7847, a non-bacteriocinogenic strain. Both strains contain Tn5301, a transposon carrying the nisin gene cluster including the *nisRK* genes. However, in FI7847, the nisin structural gene (*nisA*) has a deletion and, as a result, it can not be expressed.

The introduction of two compatible plasmids (a pTG262-derivative carrying the hybrid structural gene and a pIL277-derivative carrying the *lcnC* and *lcnD* genes) in *L. lactis* FI7847 y FI5876 led to new strains producing lactococcin A, pediocin PA-1, colicin V or interleukine-2. In the case of FI7847 derivatives, addition of subinhibitory levels of nisin to the cultures was required. FI5976 derivatives kept the nisin-producing ability of the host strain. As a result, FI5976 derivatives coproducing lactococcin A and nisin, pediocin PA-1 and nisin, colicin V and nisin or interleukine-2 and nisin were obtained.

The productivity of lactococcin A and pediocin PA-1 was greater than the obtained previously (Martínez, 1999) using a similar heterologous expression system in which the structural genes were controlled by the lactococcin A promoter instead of the nisin promoter. Regarding colicin V and nisin coproduction, this represents the first example of lactic acid bacteria strains with the ability to coproduce a bacteriocin with activity against Gram-positive bacteria (nisin) and another affecting Gram-negative bacteria (colicin V). None of the supernatants obtained from the cultures of the bacteriocin-producing recombinant lactococci had a negative effect on the proliferation of HT-29 cells. Finally, the interleukine-2 produced by *L. lactis* FI7847 and FI5876 derivatives showed biological activity since it induced the proliferation of CTLL-2 cells. The results of this PhD Thesis represent a significant improvement in the expression and secretion of heterologous bacteriocins by lactococci.

ÍNDICE

I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR	1
II. INTRODUCCIÓN	6
II.1. Cultivos iniciadores funcionales	7
II.1.1. Evolución de los cultivos iniciadores.....	7
II.1.2. Las bacterias lácticas como cultivos iniciadores funcionales.....	10
II.2. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas.....	13
II.2.1. Definición y espectro de actividad.....	14
II.2.2. Clasificación y estructura general.....	16
II.3. Biosíntesis de la lactococina A.....	19
II.3.1. Genes implicados en la biosíntesis de la lactococina A.....	20
II.3.2. Secreción y procesado de la lactococina A.....	23
II.4. Biosíntesis de la Pediocina PA-1.....	29
II.4.1. El operón de la pediocina PA-1.....	35
II.4.2. Secreción y procesado de la pediocina PA-1.....	37
II.5. Biosíntesis de la colicina V.....	38
II.5.1. Genes implicados en la biosíntesis de la colicina V.....	39
II.5.2. Secreción y procesado de la colicina V.....	41
II.6. Biosíntesis de la nisina.....	43
II.6.1. Localización del gen <i>nisA</i>	45
II.6.2. Identificación de los transposones Tn5301 y Tn5276...	48
II.6.3. Organización de la agrupación de genes de la nisina...	49
II.6.4. Inducción de la biosíntesis de nisina.....	53
II.6.5. Los sistemas NICE.....	55
II.7. Producción heteróloga de bacteriocinas de bacterias lácticas...	57
II.7.1. Utilidad de los sistemas de producción heteróloga de péptidos.....	57
II.7.2. Hospedadores heterólogos.....	58
II.7.3. Producción heteróloga de bacteriocinas basada en la expresión de los genes nativos.....	60
II.7.3.1. Bacteriocinas de la Clase I.....	61

II.7.3.2. Bacteriocinas de la Clase II.....	63
II.7.3.3. Bacteriocinas de la Clase III.....	66
II.7.4. Producción heteróloga de bacteriocinas mediante intercambio de líderes y/o de sistemas de secreción del tipo ABC.....	66
II.7.5. Producción heteróloga de bacteriocinas mediante la adición de péptidos señal reconocidos por los sistemas SEC.....	74
II.7.6. Tendencias futuras en la producción heteróloga de bacteriocinas.....	79
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	81
III.1. MATERIAL.....	82
III.1.1. Material biológico.....	82
III.1.1.1. Microorganismos y medios de cultivo.....	82
III.1.1.2. Vectores.....	86
III.1.1.3. Anticuerpos anti-peptídicos frente a la colicina V.....	86
III.1.1.4. Cultivos celulares.....	88
III.1.2. Material de laboratorio.....	88
III.1.3. Productos y reactivos.....	91
III.2. MÉTODOS.....	92
III.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico.....	92
III.2.1.1. A partir de cultivos de <i>L. lactis</i>	92
III.2.1.2. A partir de cultivos de <i>E. coli</i>	94
III.2.1.3. Visualización de los plásmidos.....	94
III.2.2. Producción inducible de lactococina A en <i>L. lactis</i>	95
III.2.2.1. Construcción del fragmento <i>PnisA-lcnA-lciA</i> ..	95
III.2.2.2. Clonación del fragmento <i>PnisA-lcnA-lciA</i> en el plásmido pCR2.1.....	98
III.2.2.3. Transformación de <i>E. coli</i> MC1022 con pFI2400.....	99
III.2.2.4. Secuenciación del fragmento <i>PnisA-lcnA-lciA</i>	100

III.2.2.5. Subclonación del fragmento <i>PnisA-lcnA-lciA</i> en el plásmido pTG262.....	101
III.2.2.5.1. Obtención del inserto.....	102
III.2.2.5.2. Obtención del vector.....	103
III.2.2.5.3. Ligación.....	103
III.2.2.6. Transformación de <i>L. lactis</i> FI5876 y FI7847 con la mezcla de ligación.....	104
III.2.2.7. Transformación de <i>E. coli</i> MC1022 con pFI2396 y pFI2397.....	105
III.2.2.8. Análisis de la producción de lactococina A y/o nisina A.....	105
III.2.3. Producción inducible de pediocina PA-1 en <i>L. lactis</i> ...	107
III.2.3.1. Construcción del fragmento <i>PnisA-lcnA/pedA</i>	107
III.2.3.2. Clonación del fragmento <i>PnisA-lcnA/pedA</i> y transformación de <i>E. coli</i> MC1022 y <i>L. lactis</i> FI5876 y FI7847.....	108
III.2.3.3. Análisis de la producción de pediocina PA-1 y/o nisina A.....	110
III.2.3.3.1. Pruebas de difusión en agar.....	110
III.2.3.3.2. Pruebas de inhibición en placas microtituladoras.....	111
III.2.3.3.3. Pruebas de inhibición en tubos....	111
III.2.3.3.4. Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA-IC).....	112
III.2.4. Producción inducible de colicina V en <i>L. lactis</i>	112
III.2.4.1. Construcción del fragmento <i>PnisA-lcnA/crac</i>	112
III.2.4.2. Clonación del fragmento <i>PnisA-lcnA/cvaC</i> y transformación de <i>E. coli</i> MC1022 y <i>L. lactis</i> FI5876 y FI7847.....	113
III.2.4.3. Análisis de la producción de colicina V y/o nisina A.....	115

III.2.4.3.1. Pruebas de difusión en agar.....	115
III.2.4.3.2. Pruebas de inhibición en placas microtituladoras	116
III.2.4.3.3. Ensayos inmunoenzimáticos: <i>dot-blot</i>	117
III.2.5. Producción inducible de interleuquina-2 murina en <i>L. lactis</i>	118
III.2.5.1. Construcción del fragmento <i>PnisA-lcnA/il2m</i>	118
III.2.5.2. Clonación del fragmento <i>PnisA-lcnA/il2m</i> y transformación de <i>E. coli</i> MC1022, <i>L. lactis</i> FI5876 y <i>L. lactis</i> FI7847.....	122
III.2.5.3. Análisis de la producción de IL-2m y/o nisina A.....	123
III.2.5.3.1. Pruebas de difusión en agar.....	123
III.2.5.3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con Tris y glicina (Tris-G-PAGE).....	123
III.2.5.3.3. Ensayos <i>Western blotting</i> y <i>slot-blotting</i>	124
III.2.5.3.4. ELISA sándwich.....	126
III.2.5.4. Actividad biológica de la IL-2m.....	129
III.2.6. Efecto de la producción heteróloga de lactococina A, pediocina PA-1, colicina V e IL-2m en la proliferación de células HAT-29.....	130
IV. RESULTADOS.....	132
IV.1. Producción inducible de lactococina A en <i>L. lactis</i> empleando el sistema de secreción <i>LcnC-LcnD</i>	133
IV.1.1. Construcción y clonación del fragmento <i>PnisA-lcnA-lciA</i>	133
IV.1.2. Producción de lactococina A en los derivados de <i>L. lactis</i> FI7847.....	134

IV.1.3. Coproducción de lactococina A y nisina A en los derivados de <i>L. lactis</i> FI5876.....	134
IV.2. Producción inducible de pediocina PA-1 en <i>L. lactis</i> empleando el sistema de secreción LcnC-LcnD.....	135
IV.2.1. Construcción y clonación del fragmento <i>PnisA-IlcnA/PedA</i>	135
IV.2.2. Producción de pediocina PA-1 en los derivados de <i>L. lactis</i> FI7847.....	136
IV.2.3. Coproducción de pediocina PA-1 y nisina A en los derivados de <i>L. lactis</i> FI5876.....	141
IV.3. Producción inducible de colicina V en <i>L. lactis</i> empleando el sistema de secreción LcnC-LcnD.....	146
IV.3.1. Construcción y clonación del fragmento <i>PnisA-IlcnA/cvaC</i>	146
IV.3.2. Producción de colicina V en los derivados de <i>L. lactis</i> FI7847 y FI5876.....	149
IV.4. Producción inducible de interleuquina-2 (IL-2m) en <i>L. lactis</i> empleando el sistema de secreción LcnC-LcnD.....	155
IV.4.1. Construcción y clonación del fragmento <i>PnisA-IlcnA/il2m</i>	155
IV.4.2. Producción de IL-2m y, en su caso, nisina A en los derivados de <i>L. lactis</i> FI7847 y FI5876.....	156
IV.4.3. Actividad biológica de la IL-2m producida por los derivados de <i>L. lactis</i> FI7847 y FI5876.....	158
IV.5. Efecto de la producción heteróloga de lactococina A, pediocina PA-1 y colicina V en la proliferación de células HAT-29.....	161
V. DISCUSIÓN.....	163
V.1. Sistemas para la producción heteróloga de proteínas en <i>L. lactis</i>	164
V.2. Producción inducible de lactococina A en <i>L. lactis</i>	166
V.3. Producción heteróloga de pediocina PA-1 en <i>L. lactis</i>	169
V.4. Producción heteróloga de colicina V en <i>L. lactis</i>	178

V.5. Producción heteróloga de IL-2 en <i>L. lactis</i>	180
V.6. Efectos toxicológicos de las bacteriocinas.....	183
VI. CONCLUSIONES.....	187
VII. TRABAJO FUTURO.....	190
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	193

Capítulo I

EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

Las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas de origen alimentario poseen un gran interés como agentes bioconservantes por tres razones fundamentales:

(a) Son sustancias producidas por microorganismos reconocidos generalmente como seguros (*GRAS*).

(b) Debido a su naturaleza peptídica son degradadas e inactivadas en el tracto digestivo, por lo que no afectan a la microbiota intestinal ni originan problemas de tipo alérgico en los consumidores.

(c) Actúan sinérgicamente con otros sistemas de conservación pudiendo contribuir a un menor empleo de ciertos aditivos químicos y/o a la suavización de algunos tratamientos tecnológicos.

El interés por sistemas de conservación más “naturales” se ha acentuado en los últimos años como consecuencia del creciente conocimiento que tienen los consumidores sobre las relaciones entre la alimentación y la salud. Por este motivo, la combinación de bacteriocinas con otros sistemas de control microbiológico constituye un procedimiento atractivo para mejorar la calidad microbiológica de los alimentos. La adopción de un sistema de barreras es especialmente interesante para evitar el crecimiento en los alimentos de microorganismos que, como *Listeria monocytogenes*, son difíciles de controlar mediante algunos sistemas de conservación clásicos (p. e., la acidificación o la refrigeración). *L. monocytogenes* es el agente causal de la listeriosis, la toxiinfección alimentaria con mayor tasa de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados.

Este microorganismo representa un peligro relevante para la industria láctea ya que se han producido diversos brotes de listeriosis asociados al consumo de quesos contaminados. *L. monocytogenes* es un agente etiológico de mastitis asintomáticas o subclínicas en vacas, ovejas y cabras; este hecho, junto con su ubicuidad ambiental y las manipulaciones inadecuadas, explica porqué la contaminación de la leche con este microorganismo es relativamente frecuente. Obviamente, los quesos elaborados con leche cruda, insuficientemente tratada y/o recontaminada son los que plantean un mayor riesgo de transmisión de este patógeno.

En una Tesis Doctoral previa (Martínez, 1999), se logró que algunas cepas de *Lactococcus lactis* produjeran pediocina PA-1, una bacteriocina de la clase II con una potente actividad anti-*Listeria*. Salvo algunas excepciones, la pediocina PA-1 es producida por cepas de *Pediococcus acidilactici*, un organismo normalmente asociado a productos vegetales y cárnicos pero cuyas propiedades metabólicas y tecnológicas son inadecuadas para su inclusión en productos lácteos. Por lo tanto, la producción de esta bacteriocina por microorganismos de origen lácteo, como *Lactococcus lactis*, es un logro relevante.

En la citada Tesis Doctoral, la producción de pediocina (y, en su caso, la coproducción de pediocina PA-1 y nisina A) en *L. lactis* se consiguió aprovechando el elevado grado de homología existente tanto entre los líderes como entre los transportadores de diversas bacteriocinas de la clase II. Más concretamente, el sistema de producción heteróloga de pediocina PA-1 se basaba en tres genes: un gen híbrido con una fusión entre las secuencias que codifican el líder de la lactococina A y la propediocina PA-1 y los genes *lcnC* y *lcnD*. Estos dos últimos codifican el sistema de transporte y procesado de la lactococina A, que reconocería al líder de la lactococina A, lo procesaría y, de este modo, se obtendría pediocina PA-1 exocelular.

A pesar de su eficacia, el sistema descrito tiene la limitación de que el gen híbrido se halla bajo control del promotor de la lactococina A, que es constitutivo y relativamente débil; en consecuencia, el nivel de expresión de dicho gen es susceptible de ser aumentado considerablemente. Por este motivo, el **primer objetivo** de esta Tesis Doctoral fue la mejora de este sistema mediante la sustitución del promotor de la lactococina A por el promotor inducible de la nisina. Tal aproximación se aplicaría a la lactococina A, a la pediocina PA-1 y a la colicina V, una bacteriocina producida por ciertas cepas de *Escherichia coli*. La aplicación de esta estrategia a cepas de *L. lactis* productoras de nisina podría tener una ventaja adicional: la coproducción sincronizada (y en concentraciones elevadas) de nisina y lactococina A, nisina y pediocina PA-1, o nisina y colicina V, ya que los respectivos genes estructurales estarían controlados por el mismo promotor inducible.

Conviene recordar que el empleo de una bacteriocina para inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables puede conllevar la selección de una población resistente al agente antimicrobiano y que la resistencia puede ser extensible a otras bacteriocinas de una misma clase. En este sentido, la coproducción de nisina y pediocina PA-1 resulta una combinación atractiva para evitar la aparición de resistencias ya que son dos bacteriocinas de clases distintas, con espectros y modos de acción diferentes y, además, ejercen un efecto sinérgico. Por otra parte, se trata de las dos únicas bacteriocinas comercializadas hasta la fecha. Aunque la Tesis de la Dra. Martínez supuso un primer paso en la coproducción de nisina y pediocina PA-1, el nivel de producción de pediocina PA-1 fue muy bajo, hecho que se puede atribuir, al menos parcialmente, al empleo del promotor de la lactococina A para controlar el gen estructural híbrido. En el caso de la coproducción de nisina y colicina V, sería la primera vez que una misma cepa produjera una bacteriocina (nisina) activa frente a bacterias Gram-positivas y otra (colicina V) activa frente a Gram-negativas.

Dadas las homologías existentes entre los líderes y los transportadores de la lactococina A, la pediocina PA-1 y la colicina V, era de esperar que, una vez construidos los correspondientes genes estructurales híbridos, el sistema permitiera la producción heteróloga de esas bacteriocinas. Por ello, el **segundo objetivo** de esta Tesis fue la evaluación de la versatilidad del sistema para la producción heteróloga de péptidos en *L. lactis*, incluyendo aquéllos cuyas estructuras y funciones biológicas no están relacionadas con las de las bacteriocinas de la clase II. Para ello, se eligió como modelo un péptido eucariótico que actúa como mediador en el sistema inmunológico: la interleuquina-2 (IL-2). La elección de esta citoquina se debió a dos razones: (a) tiene una importante actividad biológica en la modulación de la respuesta del sistema inmunitario y (b) su molécula no contiene modificaciones post-traduccionales.

Capítulo II

INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

II.1. CULTIVOS INICIADORES FUNCIONALES

II.1.1. Evolución de los cultivos iniciadores

Tradicionalmente, la obtención de alimentos fermentados se ha basado en la actividad metabólica de la microbiota natural o contaminante existente en las propias materias primas. En consecuencia, la composición microbiana del material de partida ejercía una influencia determinante en la calidad del producto final. Estas fermentaciones “espontáneas” se mejoraron mediante el procedimiento conocido como “*back-slopping*”, o lo que es lo mismo, mediante la inoculación de la materia prima con una pequeña cantidad del producto obtenido en una fermentación previa. Se trata de una práctica que favorece el predominio de las cepas con mejores propiedades tecnológicas ya que las fuentes del inóculo suelen ser productos que reúnen las características deseadas por el productor y/o el consumidor. De hecho, supone una selección inconsciente de ciertos microorganismos con el propósito de acortar el tiempo de fermentación y reducir el riesgo de un fracaso fermentativo. Actualmente, las fermentaciones espontáneas y el *back-slopping* siguen siendo utilizadas para la obtención de bebidas y alimentos fermentados en países poco desarrollados y, en menor medida, en los países desarrollados, especialmente en fermentaciones a pequeña escala y/o en el ámbito rural (Harris, 1998).

La situación es distinta cuando se analiza la producción a gran escala de productos fermentados, un sector muy importante de la industria alimentaria en los países occidentales (Leroy y De Vuyst, 2004). El descubrimiento de que las bacterias lácticas eran vitales para las fermentaciones lácteas (Orla-Jensen, 1919) supuso la base para su aislamiento, caracterización y explotación industrial (Stanley, 1998). De este modo nació la industria de cultivos iniciadores, que posteriormente se extendería a otros tipos de alimentos fermentados. La adición

directa de cultivos iniciadores selectos representó todo un hito para este sector ya que permitía un mejor control del proceso fermentativo y, además, favorecía la estandarización de los productos finales. Ambas ventajas no sólo siguen vigentes en la actualidad sino que gozan de una importancia industrial indudable. Las cepas “industriales” se han ido aislando tanto de materias primas como de productos fermentados con éxito, y se han ido seleccionado de acuerdo con criterios que han evolucionado con el tiempo (Oberman y Libudzisz, 1998). Stanley (1998) estima que para las aproximadamente 14 millones de toneladas de queso que se producen anualmente en el mundo, se emplean alrededor de 10^{21} bacterias lácticas como cultivos iniciadores.

Sin embargo, el empleo de cultivos iniciadores comerciales también plantea ciertos inconvenientes, en muchos casos derivados de que los criterios originales de selección no son exactamente los mismos que los que priman hoy en día. De hecho, tradicionalmente sólo se solían valorar dos propiedades en un cultivo iniciador: capacidad de acidificación rápida y resistencia a fagos (Oberman y Libudzisz, 1988). Este criterio de selección, unido al escaso grado de innovación que durante mucho tiempo ha prevalecido entre las empresas dedicadas a la comercialización de cultivos, ha impedido o retrasado el empleo de cepas con otras propiedades que resultan tanto o más atractivas para el mercado actual. Para entender la evolución en los criterios de selección, hay que tener en cuenta que en las últimas décadas se han producido avances espectaculares tanto en la tecnología de los procesos fermentativos como en el conocimiento de los principales microorganismos involucrados (taxonomía, metabolismo, genética, ecología, etc.).

Por otra parte, los cultivos industriales originales solían ser mezclas no bien definidas de diversos microorganismos que se tenían que mantener mediante propagación diaria. Parece indudable que esta práctica debió conducir al predominio de ciertas cepas y a la desaparición de otras antes de la generalización a escala industrial de otras formas de conservación de cultivos,

como la congelación o la liofilización (Sandine, 1996). Además, existen propiedades metabólicas muy importantes para el desarrollo de los procesos fermentativos que están codificadas en plásmidos y que se pueden perder al someter a las cepas a subcultivos sistemáticos o al emplearlas en alimentos a los que no están adaptadas (Leroy y De Vuyst, 2004). Todo ello ha conducido a una disminución en la biodiversidad de los cultivos iniciadores y, en consecuencia, a una pérdida de las características originales de diversos productos fermentados (Caplice y Fitzgerald, 1999).

En contraste, las fermentaciones tradicionales o “artesanas” están frecuentemente promovidas por microorganismos silvestres que proceden de las materias primas, los equipos de procesado y/o del medio ambiente, y que inician el proceso fermentativo en ausencia de un cultivo iniciador comercial (Weerkamp y col., 1996). Además, muchos productos que se elaboran con cultivos iniciadores obtienen parte de sus propiedades organolépticas gracias a la actividad de microorganismos que no forman parte de dichos cultivos, sino que se desarrollan como una flora secundaria, especialmente durante el período de maduración (Beresford y col., 2001).

En general, los microorganismos aislados de ecosistemas tan complejos como los alimentos fermentados tradicionales exhiben una gama de actividades metabólicas que difiere enormemente de la que poseen los cultivos industriales (Klijn y col., 1995). Las diferencias más notables se suelen centrar en el comportamiento en presencia de una microbiota competitiva, en la adaptación a ciertos sustratos alimenticios, en las propiedades antimicrobianas y/o en los atributos de calidad que confieren al producto final (Leroy y De Vuyst, 2004). En este sentido, las cepas salvajes necesitan competir con otros microorganismos para sobrevivir en ambientes naturales hostiles, lo que explica que la producción de sustancias antimicrobianas sea un fenotipo frecuente entre este tipo de microorganismos (Ayad y col., 2002). Además, las cepas salvajes dependen más de su propia capacidad biosintética que las que forman parte de cultivos

industriales. Así, y a modo de ejemplo, suelen ser más ricas en enzimas convertidoras de aminoácidos que juegan un papel clave en la formación del flavor típico de muchos alimentos fermentados (Ayad y col., 1999). Conviene subrayar que muchos de estos productos están sujetos a denominaciones de origen u otras marcas de calidad que juegan un papel muy importante en la supervivencia de plantas de fermentación a pequeña escala en un mundo en creciente globalización. En este contexto, existe una tendencia reciente que aboga por el aislamiento de cepas salvajes a partir de productos tradicionales para ser utilizadas como cultivos iniciadores en la fermentación de alimentos y bebidas (Hébert y col, 2000).

II.1.2. Las bacterias lácticas como cultivos iniciadores funcionales

Las bacterias lácticas ocupan un papel central en los fenómenos fermentativos (Wood, 1997); por una parte, provocan una acidificación rápida de las materias primas mediante la producción de ácidos orgánicos, entre los que destacan el ácido láctico y, en menor medida, el ácido acético. Por otra, producen otros compuestos importantes como etanol, compuestos aromáticos, bacteriocinas y otras sustancias antimicrobianas, exopolisacáridos y diversas enzimas. De esta manera, la vida útil, la seguridad microbiológica y la calidad organoléptica de los productos finales suelen aumentar notablemente en comparación con las de las materias primas de partida. Otro aspecto positivo es que prácticamente todas las cepas que forman parte de la microbiota natural de alimentos fermentados poseen un largo historial de consumo seguro (Caplice y Fitzgerald, 1999; Wood y Holzapfel, 1995). Las bacterias lácticas y los productos de su metabolismo han sido consumidos desde tiempos inmemoriales a través de alimentos fermentados, hecho que, salvo excepciones puntuales, ha conducido a su consideración como bacterias “seguras” o GRAS (“*Generally Recognized As Safe*”).

Actualmente los consumidores prestan mucha atención a la relación entre la alimentación y la salud. Como consecuencia, el mercado de alimentos con propiedades beneficiosas para la salud (alimentos funcionales) ha crecido rápidamente en pocos años (Nutrition Business Journal, 2002). En contraposición con los aditivos químicos, los consumidores perciben las bacterias lácticas como algo “natural” y “beneficioso para la salud”, por lo que su empleo en la conservación de los alimentos goza de gran aceptabilidad. En este sentido, Aymerich y Hugas (1998) consideran que si por bioconservación se entiende la extensión de la vida útil e incremento de la seguridad sanitaria de los alimentos mediante la microflora natural o sus metabolitos, entonces las bacterias lácticas son los candidatos ideales para su selección como cultivos bioprotectores. Así, no es de extrañar que se haya llegado a definir bioconservación como el empleo de bacterias lácticas, sus productos metabólicos o ambos para mejorar o asegurar la seguridad y calidad de los alimentos (Montville y Winkowski, 1997).

No obstante, los aditivos siguen siendo necesarios para conservar los alimentos y/o mejorar sus características organolépticas a pesar de que su uso se suele considerar, a menudo injustificadamente, como una práctica artificial y peligrosa. La creciente demanda de alimentos menos procesados y con menos aditivos parece en cierta forma contradictoria con el deseo de alimentos cada vez más seguros. En la industria quesera, por ejemplo, el empleo de leche cruda permite la obtención de quesos artesanos muy apreciados pero lleva consigo ciertos peligros, como el crecimiento de *Listeria monocytogenes* u otros patógenos. Por otra parte, la pasteurización de la leche da lugar a productos finales que son percibidos por el consumidor como menos atractivos o “aburridos” (Law, 2001). Estas tendencias de mercado suponen una fuerte presión para que las industrias busquen alternativas adecuadas. En el caso de los alimentos fermentados, los cultivos iniciadores constituyen uno de los puntos clave sobre los que se puede intervenir (Leroy y De Vuyst, 2004). Aunque hasta el momento, la disponibilidad comercial de nuevas cepas ha sido muy limitada, el creciente conocimiento de la genómica, la proteómica y el metabolismo de los

microorganismos de interés industrial abre nuevas perspectivas para la mejora de los cultivos iniciadores. De hecho, la biología molecular permite actualmente la expresión de ciertas propiedades deseables y la supresión de algunas indeseables en cepas que forman parte de cultivos iniciadores (Delcour y col., 1999; Law, 2001; Mogensen, 1993).

En los últimos años, se está explorando el empleo de cultivos iniciadores funcionales en las industrias de fermentados (De Vuyst, 2000). Se trata de cultivos que poseen al menos una propiedad funcional inherente que contribuye a la seguridad del alimento u ofrece ventajas organolépticas, tecnológicas y/o nutricionales. La aplicación de cepas cuidadosamente seleccionadas como cultivos iniciadores o adjuntos en los procesos fermentativos puede conducir al desarrollo *in situ* de la propiedad deseada en un producto que sigue siendo perfectamente natural y saludable (Ross y col., 2000). Se puede citar, como ejemplos, cepas de bacterias lácticas productoras de sustancias antimicrobianas (Hugas y col., 1995; McAuliffe y col., 1999; Ruíz-Barba y col., 1994; Rodríguez y col., 1998), de exopolisacáridos (Ruas-Madiedo y col., 2002; De Vuyst y col., 2001), de ciertas enzimas (Mogensen, 1993; Wouters y col., 2002) o de sustancias con propiedades nutracéuticas (Hugenholtz y Kleerebezem, 1999; Meisel y Bockelman, 1999). Tales cepas podrían permitir la sustitución (total o parcial) de algunos aditivos químicos por compuestos naturales, al mismo tiempo que se ofrecen nuevos alimentos atractivos para el consumidor actual (Thomas y col., 2000). Por sus especiales connotaciones, las bacterias probióticas, es decir, con propiedades beneficiosas para la salud del consumidor, no se consideran en esta Tesis Doctoral.

El proceso de selección racional de las cepas más adecuadas resulta crucial para que realmente tengan éxito industrial. En este sentido, las cepas tienen que estar adaptadas tanto a los factores intrínsecos que prevalezcan en el alimento en cuestión como a las condiciones del procesado. Además, hay que tener en cuenta que algunas bacterias lácticas pueden inducir defectos o

alteraciones en los productos finales (Wouters y col., 2002) o, incluso, originar sustancias peligrosas, como las aminas biógenas (Ten Brink y col., 1990); en consecuencia, tales cepas deben ser descartadas durante el proceso de selección. Alternativamente, en el caso de cepas particularmente valiosas, se pueden seleccionar mutantes que carezcan de la propiedad indeseable (Joosten y col., 1995).

Las tendencias de mercado y el marco legislativo actual confieren un gran atractivo a la aplicación industrial de cepas aisladas de alimentos naturales y convenientemente seleccionadas por su(s) propiedad(es) funcional(es). Por el contrario, el empleo de microorganismos genéticamente modificados despierta la hostilidad de unos consumidores que no han sido convenientemente informados sobre el proceso de obtención de tales organismos y los beneficios que pueden reportar (Grunert y col., 2000). No obstante, el espectacular avance de la biología molecular ofrece inmensas posibilidades para la construcción de cultivos de grado alimentario “hechos a medida” (de Vos, 2001; Law, 2001; Klaenhammer y Kullen, 1999)

II.2. LAS BACTERIOCINAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

La actividad antimicrobiana exhibida por algunas bacterias lácticas puede contribuir a inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y/o alterantes en los alimentos y, por lo tanto, representa una alternativa a conservantes químicos tan utilizados como los nitritos, los sulfitos o los ácidos propiónico, sórbico y benzoico (Smith, 1993). En este sentido, las bacterias lácticas producen de forma natural diversas sustancias con propiedades antimicrobianas, entre las que se incluyen ácidos orgánicos (p.e.: ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido fenil-láctico, ácido caproico), dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, diacetilo, etanol, reuterina, reuteriicina o bacteriocinas. Estas últimas han

recibido una especial atención, tanto por parte de la comunidad científica como de las industrias alimentarias (Cleveland y col., 2001; Dodd y col., 1995; Jack y col., 1995). Este interés se debe a que algunas bacteriocinas inhiben bacterias alterantes y patógenas que son recalcitrantes a métodos de conservación tradicionales y a que son compuestos atractivos desde un punto de vista tecnológico.

Aunque es indudable que las bacteriocinas de las bacterias lácticas desempeñan de forma natural un papel importante en la seguridad de los alimentos fermentados, únicamente la nisina y la pediocina PA-1 han encontrado aplicaciones comerciales en la industria alimentaria. La nisina es la única bacteriocina autorizada como aditivo alimentario (E-234), especialmente por su actividad frente a los clostridios, mientras que la pediocina PA-1 es el principal componente de *Alta 2341*, un fermentado de *P. acidilactici* desarrollado por la empresa canadiense *Quest* y que se añade a los alimentos listos para comer para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

II.2.1. Definición y espectro de actividad

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos que se sintetizan a nivel ribosómico y que, posteriormente, pueden sufrir modificaciones postraduccionales. Tagg y col. (1976), definieron las bacteriocinas como sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica y activas frente a bacterias que guardan una estrecha relación taxonómica con la especie productora. Sin embargo, esta definición estaba muy influida por los estudios sobre las colicinas de *E. coli*, las primeras bacteriocinas descritas (Gratia, 1925) y las más conocidas en aquel momento. Actualmente se sabe que, si bien esta definición es válida para algunas bacteriocinas de las producidas por las bacterias lácticas, existen otras con actividad bactericida frente a microorganismos taxonómicamente distantes de la especie bacteriocinogénica. Por este motivo, las definiciones

posteriores del término *bacteriocina* han sido más generales. Koninsky (1982) las definió como agentes antimicrobianos de naturaleza peptídica cuya síntesis no es letal para la célula productora y Klaenhammer (1988) como un grupo heterogéneo de compuestos antibacterianos de naturaleza peptídica que varían en su espectro de actividad, modo de acción, peso molecular, determinantes genéticos y características bioquímicas.

En condiciones normales, las bacteriocinas de las bacterias lácticas son activas únicamente frente a otras bacterias Gram-positivas. La amplitud del espectro de especies y cepas inhibidas depende de cada bacteriocina y oscila entre aquellas con un espectro muy reducido, limitado a ciertas cepas muy relacionadas taxonómicamente con la productora (p.e.: lactococina A), y las que poseen un amplio espectro que incluye microorganismos alterantes y patógenos, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* o *Clostridium perfringens* (p.e: nisina, pediocina PA-1). Además, las concentraciones inhibitorias mínimas para las células vegetativas y las esporas sensibles varían ostensiblemente dependiendo de la cepa productora, el tipo de muestra y las condiciones del ensayo de actividad antimicrobiana (Blom y col., 1997). Asimismo, conviene señalar que dentro de una especie generalmente sensible a una bacteriocina pueden existir cepas resistentes, e incluso se pueden seleccionar células resistentes entre la población de una cepa sensible.

La estructura y composición de las membranas externas de las bacterias Gram-negativas, mohos y levaduras impiden el acceso de las bacteriocinas de las bacterias lácticas a su lugar de acción, las membranas plasmáticas. Sin embargo, aunque estos microorganismos no resulten afectados por las bacteriocinas en condiciones fisiológicas, se pueden sensibilizar si se les somete a tratamientos subletales que alteren la permeabilidad de sus membranas externas, como la congelación, el calentamiento suave, la exposición a ácido láctico y EDTA o la presión hidrostática (Arqués y col., 2003; Kalchayanand y col., 1992; Kalchayanand y col., 1998).

II.2.2. Clasificación y estructura general

Desde que, a finales de los años 20 y principio de los 30, el descubrimiento de la nisina iniciara las investigaciones en el campo de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (Rogers, 1928), se han identificado y caracterizado un gran número de estos polipéptidos antimicrobianos, particularmente durante la última década. Desde un punto de vista científico, las bacteriocinas de las bacterias lácticas se pueden clasificar en tres grandes clases (Cleveland y col., 2001; Nes y Holo, 2000):

- Clase I (*lantibióticos*): péptidos pequeños (<5 kDa), termoestables y con aminoácidos modificados, de los que los más comunes son la deshidroalanina (DHA) y la deshidrobutirina (DHB), originados por deshidratación postraduccional de la serina y la treonina, respectivamente. La condensación de los residuos DHA y DHB con el grupo sulfhidrilo de las cisteínas presentes en la molécula origina los aminoácidos lantionina y β -metil-lantionina, respectivamente (de Vos y col., 1995). Los lantibióticos de tipo A son péptidos formadores de poros, catiónicos y elongados que, en algunos casos, como el de la lacticina 3147, constan de dos componentes. El prototipo de esta clase es la nisina, la bacteriocina de las bacterias lácticas más estudiada hasta la fecha (Delves-Broughton, 1990; Delves-Broughton y col., 1996). Los lantibióticos de tipo B son péptidos globulares con actividad inmunológica que actúan como inhibidores enzimáticos.
- Clase II: péptidos pequeños (<10 kDa), termoestables y sin aminoácidos modificados en su estructura primaria. A su vez, se pueden clasificar en tres subclases.

Las bacteriocinas de la subclase IIa poseen entre 37 y 58 aminoácidos y se caracterizan por ser particularmente activas frente a los microorganismos del género *Listeria* (Muriana, 1996). Sus secuencias aminoacídicas muestran un elevado grado de homología (40-70%), que es mucho más pronunciado en la parte N-terminal de los péptidos (Aymerich y col., 1996). Todos los miembros de esta subclase comparten el motivo conservado N-terminal **YYGNGVXCXKXXCXVD/NWG/A** (o secuencia consenso), en el que los aminoácidos resaltados en negrita muestran prácticamente un 100% de conservación (Nes y Holo, 2000) (Fig. II.1). Otra característica de esta subclase, a excepción de la acidocina A, es la presencia de dos Cys que forman un puente disulfuro en la parte N-terminal de la molécula (Cleveland y col., 2001). La subclase IIa también se conoce como “familia pediocina”, en alusión a la bacteriocina más estudiada de este grupo, la pediocina PA-1. Aunque la mayor parte de sus miembros se secretan mediante transportadores específicos de tipo ABC, la enterocina P lo hace utilizando un sistema *sec*-dependiente (Cintas y col., 1997). Esta subclase es la más estudiada dentro de las bacteriocinas de la clase II.

La subclase IIb contiene bacteriocinas cuya actividad depende de la acción complementaria de dos péptidos, como las lactococinas MN y G, la lactacina F o las plantaricinas EF, JK y S.

La subclase IIc engloba a las bacteriocinas de la clase II que, como sucede con la lactococina A, la enterocina B, la carnobacteriocina A o las enterocinas L50, no se pueden clasificar en ninguno de los subgrupos anteriores.

- Clase III: proteínas de más de 30 kDa, termolábiles y sin aminoácidos modificados en su estructura primaria, como la helveticina J. Estas bacteriocinas son las que poseen un menor interés industrial en la actualidad.

Bacteriocinas de la subclase IIa	Acidocina A	KTYYG T NGVH C TKKSLWGWKVRLLKNVIPGTL C RKQSLPIKQDLKILLGWATGAFGKTFH
	Bacteriocina 31	ATYYG N GLY C NKQ K CWVDW N KASREIGKII V NGWVQHGPWAPR
	Bavaricina A	KYYG N GVH C GGK H S C TVDWGTAIGNIGNNAAANWATGGNAG
	Bavaricina MN	TKYYG N GVY C NSK K CWVDW G QAAGGIGQTVV X GWLGGAIPGK
	Bifidocina B	KYYG N GV T C N LHDCRVDRGKATCGI I INNGGMWGDIG
	Carnobacteriocina B2	VNYG N GV S CSK T K C SVNW G QAFQERYTAGINSFVSGVASGAGSIGRRP
	Carnobacteriocina BM1	AISY G NGVY C NKE K CWVN K AENKQAITGIVIGGWASLAGMGH
	Coagulina	KYYG N GV T CGK H SC S VDWGKATTCI I INNGAMAWATGGHQGTHKC
	Curvacina A	ARSY G NGVY C NN K K C WVNRGEATQSI I GGMISGWASGLAGM
	Divercina V41	TKYYG N GVY C NSK K CWVDW G QASGCI G QTVVGGWLGGAIPGKC
	Enterocina A	TTHSGKY Y NGVY C TK N K C TVDWAKATTCI A IGMSIGGFLGGAI P GK C
	Enterocina P	ATRSY G NGVY C NN S K C WVNWGEAKENIAGIVISGWASLAGMGH
	Leucocina A	KYYG N GVH C TK S G C SVNWGEAFSAGVHRLANGGNGFW
	Mesentericina Y105	KYYG N GVH C TK S G C SVNWGEAASAGI H RLANGGNGFW
	Mundticina	KYYG N GV S C N KK G C S VDWGKAIGI I GNNSAANLATGGAAGWSK
	Pediocina PA-1	KYYG N GV T CGK H SC S VDWGKATTCI I INNGAMAWATGGHQGNH K C
	Piscicolina 126	KYYG N GV S C N K N G C TVDWSKAIGI I GNNAAANLTTGGAAGWN K G
	Plantaricina 423	KYYG N GV T CGK H SC S VNW G QAFSCSVSHLANFGHG K C
	Plantaricina C19	KYYG N GL S CSK K G C TVNW G QAFSCGVNRVATAG H G K
Sakacina P	KYYG N GVH C GGK H S C TVDWGTAIGNIGNNAAANWATGGNAGW N K	
Consenso	<u>Y</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>.</u> <u>C</u> <u>.</u> <u>K</u> <u>.</u> <u>C</u> <u>.</u> <u>V</u> <u>.</u> <u>W</u> <u>.</u> <u>A</u> <u>.</u> <u>I</u>	
Lactococina A	KLTFIQSTAAGDLYNNTNTHKYVYQQTQNAFGAAANTIVNGWMGGAAGGFGLHH	
Colicina V	ASGRDIAMAIGTLSGQFVAGGIGAAAGGVAGGAIYDYASTHKPNPAMSPSGLGGTIKQKPEGIP SEAWNYAAGRLCNWSPNNLSDVCL	
Nisina A	ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCHCSIHVSK	

Fig. II.1. Secuencias aminoacídicas de las bacteriocinas de la subclase IIa, de la lactococina A, de la colicina V y de la nisina A, y alineamiento de las de la subclase IIa. En la secuencia consenso de la subclase IIa, los residuos 100% conservados están subrayados. Fuentes: Håvarstein y col. (1994), Eijsink *et al.* (1998), Nes y Holo(2000), Van Reenen y col. (2003).

Finalmente, existen algunas bacteriocinas que no pueden clasificarse en ninguna de las clases citadas, como la enterocina AS-48.

Las bacteriocinas de las clases I y II (especialmente IIa) son las que han recibido mayor atención científica debido, en parte, a que son las que poseen mayor interés industrial. En general, se trata de péptidos catiónicos y anfipáticos compuestos por entre 12 y 45 aminoácidos. Sus moléculas no suelen estar estructuradas en soluciones acuosas, pero poseen una propensión a formar estructuras α -helicales cuando se exponen a solventes como el trifluoroetanol o cuando se mezclan con membranas compuestas por fosfolípidos aniónicos. Algunas bacteriocinas poseen ciertas restricciones estructurales debido a la presencia de puentes disulfuro (p.e., pediocina PA-1) o anillos tioéter (nisina) intramoleculares.

Dado que para la realización de esta tesis Doctoral ha sido necesario emplear elementos genéticos necesarios para la producción de las bacteriocinas lactococina A, pediocina PA-1, colicina V y nisina, a continuación se describe más detalladamente el proceso de biosíntesis de las mismas.

II. 3. BIOSÍNTESIS DE LA LACTOCOCINA A

La lactococina A (Fig. II.1) es una bacteriocina producida por ciertas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* aisladas de leche y productos lácteos en diversas partes del mundo. Hasta la fecha no se ha descrito su producción natural por parte de ninguna cepa que no pertenezca al género *Lactococcus*. Una de las propiedades de esta bacteriocina es que su espectro de acción es muy reducido y se limita a cepas de lactococos, sin que se haya detectado hasta la fecha ninguna cepa sensible perteneciente a otro género. Un análisis de la actividad de la lactococina A frente a 120 lactococos distintos reveló que, aunque

la concentración inhibitoria mínima oscilaba más de 2.500 veces entre el lactococo más sensible y el más resistente, ninguna cepa era completamente insensible a esta bacteriocina (Holo y col., 1991). De hecho, la lactococina A está considerada como una bacteriocina de gran actividad frente a los lactococos, a diferencia de las lactococinas MN (actividad baja) y B (actividad intermedia). Esta peculiaridad se debe a las diferencias existentes en las secuencias que codifican las respectivas prolactococinas dado que tanto las secuencias que se encuentran por delante de sus genes estructurales (incluyendo los promotores) como las que codifican los correspondientes líderes son prácticamente idénticas (van Belkum y col., 1992).

II.3.1. Genes implicados en la biosíntesis de la lactococina A.

En un estudio sobre la actividad antimicrobiana de 280 lactococos, Geis y col. (1983) detectaron 16 cepas productoras de bacteriocinas. Neve y col. (1984) observaron que cuatro de ellas producían bacteriocinas que se podía transferir mediante conjugación a *L. lactis* IL1403, una cepa libre de plásmidos. Una de esas cepas, *L. lactis* subsp. *cremoris* 9B4, contenía un plásmido conjugativo (p9B4-6) de 60 kb. Posteriormente, van Belkum y col. (1989) digirieron este plásmido, clonaron los fragmentos e introdujeron los plásmidos resultantes en *L. lactis*. Esta estrategia permitió la identificación inicial de dos regiones de p9B4-6 que contenían información relacionada con la producción de dos bacteriocinas distintas.

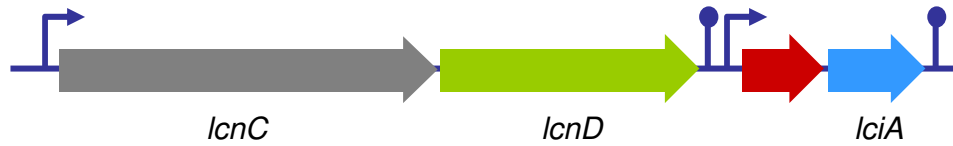
Posteriormente, van Belkum y col., (1991) secuenciaron y analizaron ambas regiones. En la primera, localizada en un fragmento *Scal-ClaI* de 1,8 kb, se identificó un operón integrado por tres genes. Los dos primeros genes, *lcnM* y *lcnN*, codificaban la lactococina MN, una bacteriocina compuesta por dos péptidos, de 69 y 77 aminoácidos, respectivamente. El tercer gen (*lciM*) confería inmunidad frente a dicha bacteriocina. En la segunda región, situada en un

fragmento *Scal-HindIII* de 1,3 kb, se identificó otro operón con dos genes que codificaban péptidos de 75 y 98 aminoácidos, respectivamente. El primer gen (*lcnA*) constituía el gen estructural de otra bacteriocina, la lactococina A, mientras que el segundo (*lciA*) era su correspondiente gen de inmunidad (Fig II.2a). Por detrás del gen *lciA* se identificaron dos repeticiones inversas que actuaban como terminadores *rho*-independientes (Fig II.2a). Más tarde, van Belkum y col. (1992) descubrieron que existía otro operón detrás del de la lactococina A. Dicho operón también estaba integrado por dos genes. El primero (*lcnB*, 68 codones) era el gen estructural de una tercera bacteriocina, la lactococina B, mientras que el segundo (*lciB*, 91 codones) era responsable de la inmunidad.

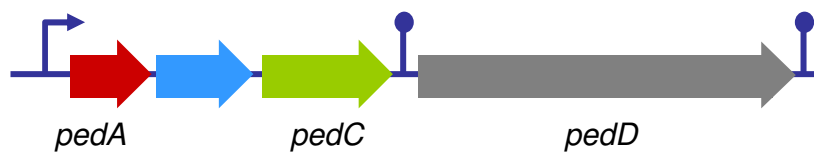
Paralelamente, otro grupo de investigación había asociado la actividad bacteriocinogénica de *L. lactis* WM4 con un plásmido de 131 kb denominado pNP2 (Scherwitz y col., 1983). Mediante experimentos de clonación, Scherwitz-Harmon y McKay (1987) pudieron situar los determinantes genéticos de la bacteriocina en una región de 18,4 kb. Posteriormente, Stoddard y col. (1992) comprobaron no sólo que dicha región contenía los genes *lcnA* y *lciA*, sino que *L. lactis* WM4 también contenía otros dos operones con los determinantes genéticos de las lactococinas MN y B, respectivamente.

No obstante, fueron los estudios de Holo y col. (1991) los que confirmaron, con absoluta certeza, que *lcnA* era el gen estructural de la lactococina A. Estos investigadores purificaron una bacteriocina producida por *L. lactis* subsp. *cremoris* LMG2130 y diseñaron una sonda a partir de su secuencia N-terminal. La sonda hibridó con una región de un plásmido de 55 kb y, tras la clonación y secuenciación del fragmento de interés, se observó que contenía un gen con una secuencia nucleotídica idéntica a la de *lcnA*. La comparación de la secuencia aminoacídica obtenida a partir de la bacteriocina purificada con la que se podía deducir del gen estructural permitió conocer que la expresión del gen *lcnA* daba lugar a un precursor de 75 aminoácidos (la pre-lactococina A), que contenía una extensión N-terminal de 21 aminoácidos (líder). El procesado de este precursor

(A) Lactococina A:



(B) Pediocina PA-1:



(C) Colicina V:

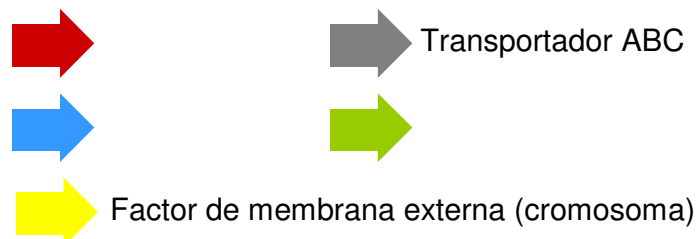


Fig. II.2. Organización de los determinantes genéticos de la biosíntesis de las bacteriocinas lactococina A (A), pediocina PA-1 (B) y colicina V (C).

tenía lugar justo detrás de dos residuos de glicina situados en las posiciones -1 y -2 con respecto al lugar de corte (Fig. II.3). De hecho, la lactococina A fue la primera bacteriocina en la que se detectó el motivo “doble glicina”, una característica común entre los líderes de numerosas bacteriocinas, particularmente de la clase II (Håvarstein y col., 1994; 1995).

Tanto la citada extensión N-terminal (o secuencia líder) como el lugar de procesado no se ajustaban a las reglas establecidas por Von Heijne (1983) para los péptidos señal requeridos para la exportación de péptidos y proteínas sec-dependientes, lo que sugería que la pre-lactococina A debía necesitar un sistema de transporte que reconociese específicamente a su líder. El sistema fue descubierto por Stoddard y col. (1992) cuando observaron que la biosíntesis de lactococina A en *L. lactis* WM4 requería dos genes adicionales a los ya conocidos *lcnA* y *lciA*. Dichos genes, denominados *lcnC* y *lcnD*, se disponían en un operón independiente situado inmediatamente por delante del operón con los genes *lcnA* y *lciA* (Fig II.2a). Ambos operones poseían orientaciones opuestas, de tal manera que el promotor de los genes *lcnCD* se encontraba prácticamente contiguo al promotor de los genes *lcnA* y *lciA*. La inserción de *Tn5* en *lcnC* o en *lcnD* conducía a la pérdida de la producción de la bacteriocina sin que la inmunidad resultase afectada. Pronto se comprobó que el sistema codificado en *lcnCD* sirve para el transporte y procesado no sólo de la lactococina A, sino también de las lactococinas MN y B. De hecho, existe otra copia idéntica de estos genes delante del operón de la lactococina MN (Venema, 1995).

II.3.2. Secreción y procesado de la lactococina A

Inicialmente, la comparación de las secuencias de LcnC (716 aminoácidos) y LcnD (474 aminoácidos) con las de otras proteínas existentes en las bases de datos reveló que mostraban similitudes significativas con proteínas implicadas en rutas de secreción sec-independientes de bacterias Gram-

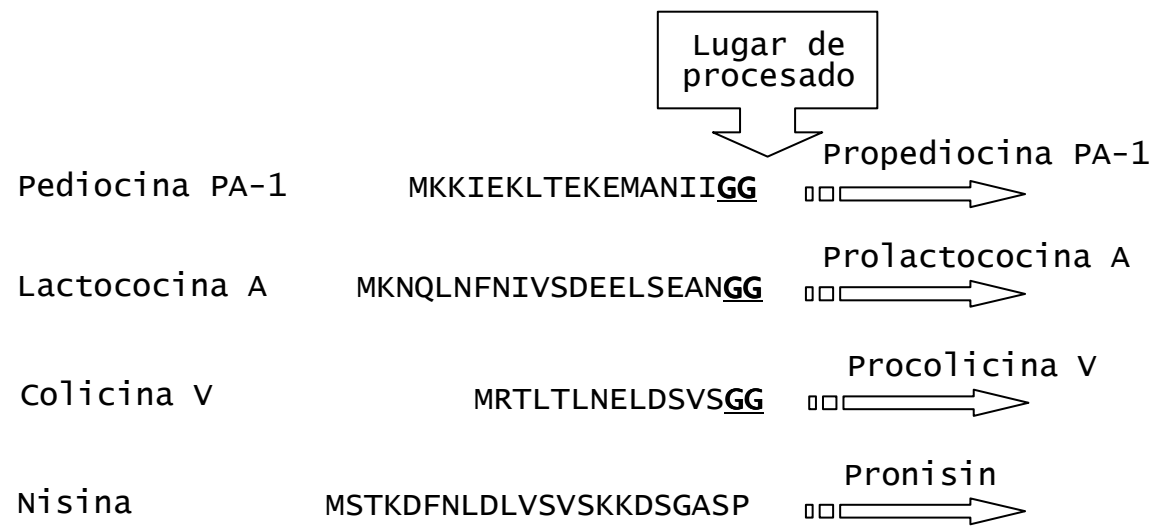


Fig. II.3. Secuencias aminoacídicas de los líderes de la pediocina PA-1, la lactococina A y la nisina. Las dos glicinas adyacentes al lugar de procesado, típicas de los líderes de las bacteriocinas de la clase II (líderes “doble glicina”) se muestran subrayadas.

negativas, especialmente con las que forman el sistema de secreción de la hemolisina α (HylA) de *E. coli* (Stoddard y col., 1992). Más concretamente, estos autores observaron que LcnC es un transportador del tipo ABC (del inglés, ATP-Binding Cassette) de la familia HylB (el transportador ABC de HylA). Por su parte, LcnD formaba parte de la familia de proteínas accesorias (o proteínas de fusión de membrana) y poseía grandes homologías estructurales con HylD, la proteína accesoria de la citada hemolisina.

En consecuencia, los procesos de secreción y maduración de la lactococina A dependen de las proteínas de membrana LcnC y LcnD que, juntas, forman un sistema de secreción de tipo I (Salmond y Reeves, 1993). En estos sistemas *sec*-independientes, el substrato se secreta directamente desde el citoplasma al medio exocelular a través de una maquinaria especializada que consta de un transportador de tipo ABC (en este caso, LcnC) y una proteína accesoria, también denominada proteína de fusión de membrana (LcnD). En general, se trata de sistemas específicos para el transporte de la proteína codificada en el gen estructural, por lo que, a menudo, se les denomina sistemas de transporte “*dedicados*”.

Todos los transportadores de tipo ABC son homodímeros. Cada componente del homodímero contiene, a su vez, dos dominios bien diferenciados: un dominio hidrofóbico integrado en la membrana y un dominio citoplasmático que capta moléculas de ATP. Sin embargo, los transportadores ABC dedicados a la secreción de bacteriocinas que, como la lactococina A, poseen un líder con el motivo doble glicina tienen una característica diferencial (Franke, 1998). La diferencia consiste en que poseen una extensión N-terminal citoplasmática que constituye el dominio proteolítico encargado de escindir el líder de la bacteriocina por el extremo C-terminal del motivo Gly-Gly (Håvarstein y col., 1995) (Fig. II.4a). En este extremo N-terminal, se han identificado dos motivos conservados: el motivo “*cisteína*” (QX₄D/ECX₂AX₃MX₄Y/FGX₄I/L) y el

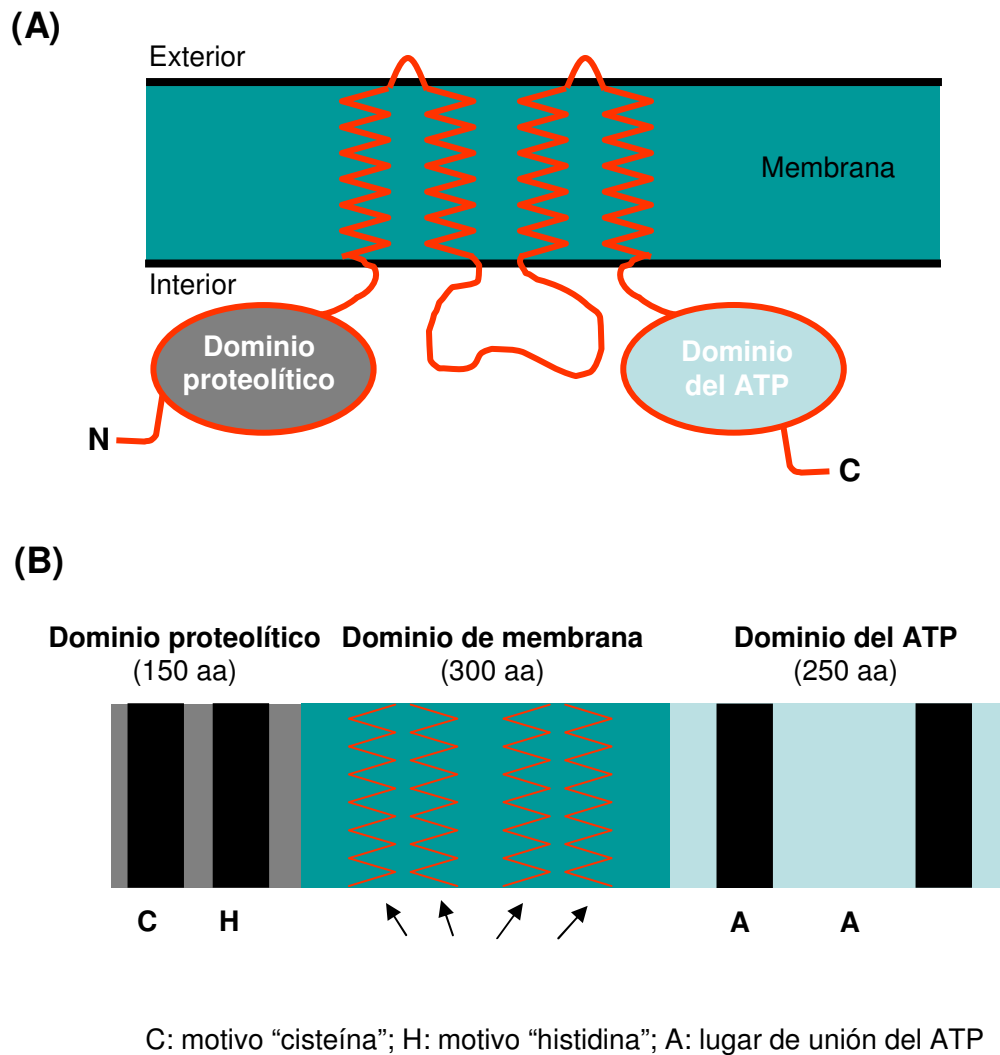


Fig. II.4. Modelo de transportador ABC de bacteriocinas de la clase II con líderes "doble glicina". (A) Localización presumible de los dominios en relación con la membrana citoplasmática. (B) Organización de los dominios del transportador. Basado en Nes *et al.* (1996) y Franke (1998).

motivo “*histidina*” (HY/FY/VVX₁₀I/LXDP) (Håvarstein y col., 1995) (Fig. II.4b). Más concretamente, la secuencia de la extensión N-terminal de LcnC manifiesta importantes homologías con las de los correspondientes dominios de los transportadores ABC de otras bacteriocinas implicadas en el trabajo de esta Tesis, como el de la pediocina PA-1 (PedD) o el de la colicina V (CvaB) (Håvarstein y col., 1995) (Fig. II.5).

El trabajo de Håvarstein y col. (1995) con el péptido α de la lactococina G, demostró que la secreción de ésta y otras bacteriocinas, entre las que se incluye la lactococina A, es un proceso bifásico; en primer lugar, el dominio proteolítico de LcnC se une a la prepediocina y, posteriormente, la hidrólisis del ATP induce cambios conformacionales en el transportador que resultan en un proceso integrado de eliminación de la secuencia líder y transporte de la bacteriocina a través de la membrana citoplasmática. La topología de membrana de los transportadores de estas bacteriocinas es otro aspecto en el que parecen desviarse de los transportadores ABC clásicos (Franke, 1998). Por ejemplo, existen datos experimentales que indican que la proteína LcnC posee únicamente cuatro segmentos transmembránicos, en vez de los seis típicos (Franke y col., 1996) (Fig. II.4b).

Por lo que respecta a la proteína LcnD, la topología de su membrana sigue el modelo general de las proteínas accesorias de los sistemas de transporte de tipo I (Salmond y Reeves, 1993): una proteína bitópica con un pequeño extremo N-terminal citoplasmático, un segmento transmembránico y una región C-terminal (que representa la mayor parte de la proteína) en la cara extracelular de la membrana citoplasmática (Franke, 1998). Por analogía con la función de la proteína accesoria HlyD, que se extiende entre las dos membranas de *E. coli* formando un canal para la secreción de la hemolisina A (Schüle y col., 1992), Franke (1998) sugirió que la LcnD estaría involucrada en la formación de canales

```

1                                                                                               105
LcnC  IELSIKENEKLTIVG MSGSGKSTLVKLLVN FFQP--TSGTITLGG IDLQQFDKHQLRRLI NYLPQQPYIFTGSIL DNLLL----GANENA SQEEILKAVELAEIR
PedD  VSLTIPHHQKITIVG MSGSGKSTLLAKLLVG FFEPQEQHGEIQINH HNISDISRTILRQYI NYVPQEPFIFSGSVL ENLLL----GSRPGV TQQMIDQACSFAEIK
CvaB  LLSVAPGESVAITG ASGAGKTTLMKVLCG LFEP--DSGRVLING IDIRQIGINNYHRMI ACVMQDDRLFSGSIR ENICG----FAEEM DEEWMVECARASHIH
NisT  INLSFEKGELTAIVG KNGSGKSTLVKIISG LYQP--TMGIQYDK MRSSLMPEEFYQKNI SVLFQDFVKYELTIR ENIGLSDLSSQWEDE KIIKVLNGLGLDFLK
Cons  --LS----E---IVG -SGSGKSTL-K---G ---P---G-I---- -----I ----Q-----I- EN--L-----E--- -----

106                                                                                               190
LcnC  ADIEQMQLGYQTELS SDASSLSGGQQRIA IARALLSPAK--ILI LDEATSNLDMITEKK ILKNLLPL---DKTI IFIAHRLSVA
PedD  TDIENLPQGYHTRLS ESGFNLSGGQQRLS IARALLSPAQ--CFI FDESTSNLDTITEHK IVSKLLFMK--DKTI IFVAHRLNIA
CvaB  DVIMNMPMGYETLIG ELGEGLSGGQQRIF IARALYRKPG--ILF MDEATSALDSESEHF VNVAIKNM---NITR VIIAHRETTL
NisT  TNNQYVLDTQLGNWF QRGHQLSGGQWQKIA LARTFFKKAS--IYI LDEPSAALDPVAEKE IFDYFVAL-SENNIS IFISHSLNAA
Cons  -----GY-T--- -----LSGGQQRIA IARAL-----I-I -DE-TS-LD---E-- I-----I-IAHRL----

```

Fig. II.5. Alineamiento de las secuencias de los transportadores ABC de la lactococina A (LcnC; aminoácidos 501-679), pediocina PA-1 (PedD; aminoácidos 505-686), colicina V (CvaB; aminoácidos 512-689) y nisina (NisT ; aminoácidos 371-555). En negrita se muestran los aminoácidos conservados, de acuerdo con la secuencia consenso (Cons) de los transportadores ABC. Basado en Fath y Kolter (1993).

entre la membrana plasmática y la pared celular de las células productoras de lactococina A.

El gen *lcnD* contiene en su interior un lugar de inicio de la traducción, alternativo al del gen *lcnD* íntegro. Esta característica peculiar posee relevancia funcional ya que conduce a la expresión de una versión de LcnD que está truncada en su extremo N-terminal (LcnD*) y que carece del segmento transmembránico N-terminal (Franke, 1998). En consecuencia, LcnD* se sitúa en el citoplasma de los lactococos productores de lactococina A. Lo mismo sucede con CvaA, la proteína accesoria del sistema de secreción de la colicina V en *E. coli*. Aunque la correspondiente CvaA* no es esencial para la secreción de colicina V, su ausencia conduce a una disminución de la actividad antimicrobiana, ya que CvaA es más estable en presencia de CvaA* (Hwang y col., 1997).

Con los datos obtenidos hasta la fecha sobre la secreción y procesado de la lactococina A se ha confeccionado la Fig. II.6, que muestra una representación esquemática del sistema de secreción y procesado de esta bacteriocina. Por otra parte, en la Fig II.7 se comparan los sistemas de secreción de las bacteriocinas de la clase II con los sistemas homólogos más comunes en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.

II.4. BIOSÍNTESIS DE LA PEDIOCINA PA-1

En los años 80, Gonzalez y Kunka (1987) observaron que *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, una cepa de origen cárnico, contenía un plásmido (pSRQ11) que portaba los determinantes genéticos de la biosíntesis de la bacteriocina pediocina PA-1. Paralelamente, Bhunia y col. (1988) habían aislado otra cepa de origen cárnico, *P. acidilactici* H, productora de una bacteriocina que, poco después, denominaron pediocina Ach. La caracterización molecular de los operones de las pediocinas PA-1 y Ach, junto con la obtención de sus

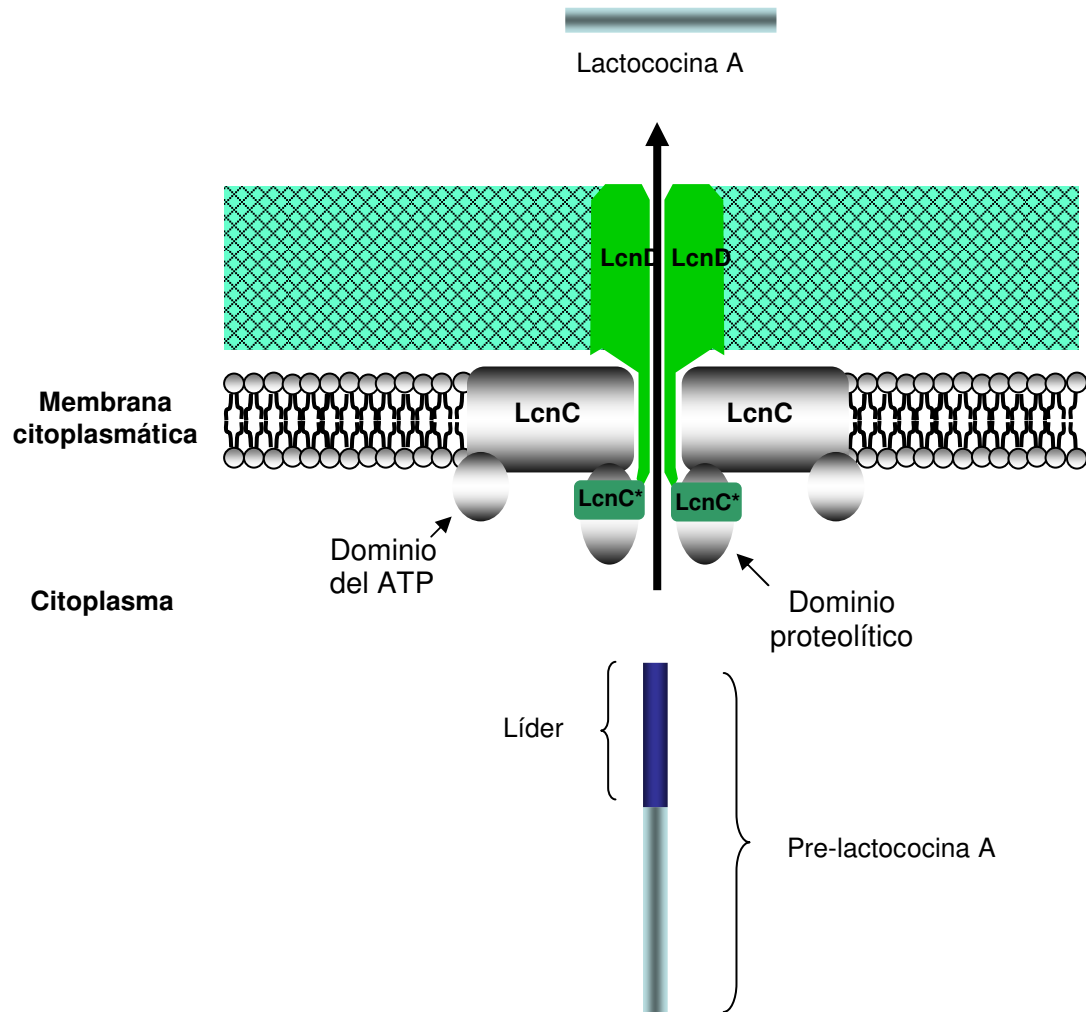
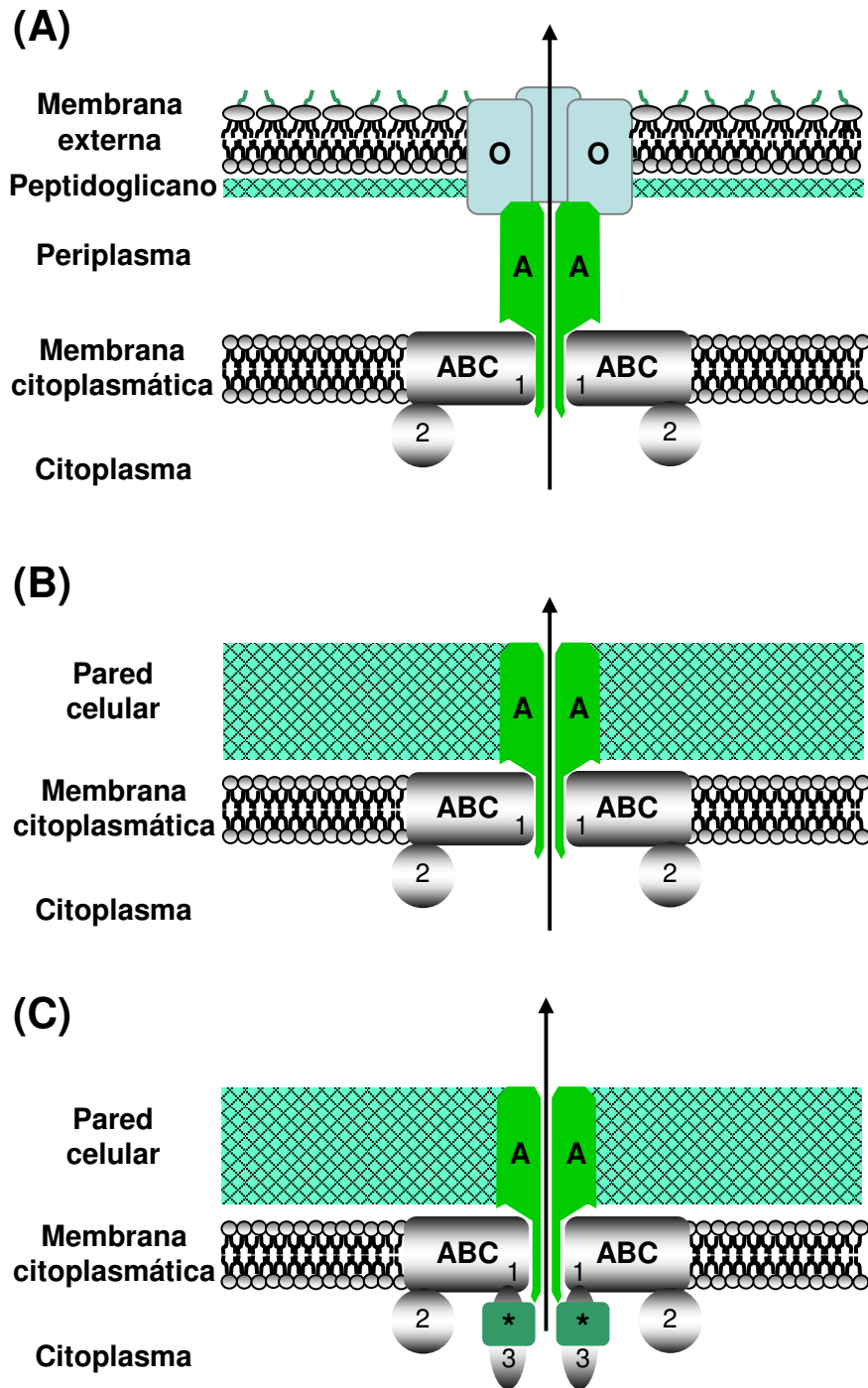


Fig. II.6. Representación esquemática del sistema de secreción de la lactococina A. Adaptado de Franke (1998).



secuencias aminoacídicas (Henderson y col., 1992; Marugg y col., 1992; Motlagh y col., 1992; Nieto Lozano y col., 1992), permitieron establecer que ambas eran realmente la misma bacteriocina. Por ello, y siguiendo las recomendaciones de Jack y col. (1995), en adelante, se utilizará exclusivamente el término más extendido en la actualidad (pediocina PA-1), con el fin de uniformar y evitar confusiones. Posteriormente se ha ido descubriendo que las bacteriocinas producidas por diversas cepas *P. acidilactici* (Christensen y Hutkins, 1992; Daba y col., 1994; Hoover y col., 1988; Luchansky y col., 1992; Ray y Hoover, 1993; Rodríguez y col., 1997; Schved y col., 1993), *P. parvulus* ATO34 y ATO 77 (Bennik y col., 1997) y *Lactobacillus plantarum* WHE92 (Ennahar y col., 1996) también son idénticas a la pediocina PA-1. El hecho de que se hayan aislado bacterias lácticas productoras de pediocina PA-1 a partir de diversos alimentos (productos cárnicos, lácteos y vegetales) y en lugares muy distantes geográficamente (p.e.: EE.UU., España, Noruega o Israel) da una idea del grado de conservación y difusión de esta propiedad.

La pediocina PA-1 es un péptido de 44 aminoácidos sin modificaciones postraduccionales (Henderson y col., 1992; Nieto Lozano y col., 1992; Marugg y col., 1992; Motlagh y col., 1992) (Fig. II.1). De hecho, la secuencia primaria conocida parece suficiente para inducir un efecto tóxico en las células sensibles, ya que la pediocina PA-1 obtenida por síntesis química posee una actividad específica comparable a la de la forma natural (Fimland y col., 1996). La titulación de residuos de cisteína libres con el reactivo de Ellman, el análisis de los fragmentos resultantes de la digestión de la pediocina PA-1 con tripsina, los datos obtenidos por espectrometría de masas y la reducción de esta bacteriocina en presencia de ditiotreitól han demostrado la existencia de dos enlaces disulfuro, uno entre los residuos Cys9 y Cys14, y el segundo entre los residuos Cys24 y Cys44 (Chikindas y col., 1993; Henderson y col., 1992; Eijsink y col., 1998). Los dos enlaces disulfuro se forman espontáneamente tanto en la pediocina PA-1 natural como en la obtenida mediante síntesis química (Fimland y col., 1996). Los análisis de espectrometría de masas han revelado una masa molecular

experimental de 4.623 Da, lo que confirma que los cuatro residuos de Cys están oxidados y unidos, dos a dos, mediante enlaces disulfuro (Fimland y col., 1996).

La secuencia de la pediocina PA-1 muestra entre un 40 y un 60% de similitud con las de las restantes bacteriocinas de la clase IIa (Fig. II.1). Las estructuras primarias sugieren la existencia de, al menos, dos módulos funcionales: la mitad N-terminal, relativamente bien conservada y de carácter hidrofílico, y la mitad C-terminal, mucho más diversa y de naturaleza hidrofóbica o anfifílica (Fimland y col., 1998).

La pediocina PA-1 es activa frente a un amplio espectro de bacterias Gram-positivas (Tabla II.1), muchas de ellas alterantes de los alimentos o responsables de intoxicaciones o toxiinfecciones alimentarias. Un estudio que comparaba la actividad antimicrobiana de diversas bacteriocinas puras de la clase IIa en un amplio espectro de microorganismos indicadores reveló que la pediocina PA-1 y la enterocina A eran las que inhibían un mayor número de cepas y las que tenían valores de CIM más bajos (Eijsink y col., 1998). No obstante, la mayor parte de los estudios dedicados a la pediocina PA-1 se han centrado en su destacada actividad frente a *Listeria monocytogenes* (Muriana, 1996). Por otra parte, se trata de una bacteriocina inactiva frente a diversas especies que frecuentemente forman parte de cultivos iniciadores, como las del género *Lactococcus*. La pediocina PA-1 no se adsorben a las bacterias Gram-negativas (Bhunja y col., 1991). La presencia de ácido lipoteicoico en la pared celular de las bacterias Gram-positivas y su ausencia en la de las Gram-negativas podría explicar por qué esta bacteriocina únicamente es activa *per se* frente a cepas Gram-positivas.

Por otra parte, la pediocina PA-1 actúa sinérgicamente con bacteriocinas de la clase I (nisina, lacticina 481), la subclase IIb (lactacina F) y la clase III (lactacina B) (Hanlin y col., 1993; Mulet-Powell y col., 1998). Curiosamente, la lacticina 48, que muestra un marcado carácter sinérgico cuando se combina con

Tabla II.1. Espectro antimicrobiano de la pediocina PA-1^a

Bacterias Gram-positivas		Bacterias Gram-negativas ^b
Células vegetativas	Esporos	
<i>Lactobacillus leichmanni</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Aeromonas hydrophila.</i>
<i>Lactobacillus viridescens</i>	<i>Clostridium botulinum</i> tipo E	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Lactobacillus bif fermentum</i>	<i>Clostridium laramiae</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Lactobacillus casei</i>		<i>Escherichia coli</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>		<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		<i>Salmonella anatum</i>
<i>Pediococcus acidilacticus</i> ^c		<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>		
<i>Enterococcus faecium</i>		
<i>Enterococcus faecalis</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Listeria monocytogenes</i>		
<i>Listeria innocua</i>		
<i>Listeria ivanovii</i>		
<i>Bacillus cereus</i>		
<i>Clostridium perfringens</i>		
<i>Clostridium botulinum</i>		
<i>Clostridium laramiae</i>		

^aEl listado no es completamente exhaustivo y ciertas cepas pertenecientes a las especies citadas pueden ser resistentes

^bTras ser sometidas a tratamientos subletales

^cCepas no productoras de pediocina PA-1

Fuentes: Ray (1994), Martínez (1999)

la pediocina PA-1, interacciona antagónicamente con el resto de las bacteriocinas citadas. Por otra parte, no se han observado efectos sinérgicos entre la pediocina PA-1 y otras bacteriocinas de la subclase IIa, como la enterocina A, la curvacina A y la sakacina P (Eijsink y col., 1998). Este resultado es lógico ya que todas las bacteriocinas de dicha subclase tienen grandes similitudes en cuanto a sus estructuras y modo de acción.

II.4.1. El operón de la pediocina PA-1

En todas las cepas naturalmente productoras de pediocina PA-1 descritas hasta el momento, los determinantes genéticos de la biosíntesis de la bacteriocina se localizan en plásmidos cuyo tamaño oscila entre 8,9 y 11 kb (Bhunja y col., 1994; Ennahar y col., 1996; Gonzalez y Kunka, 1987; Hoover y col., 1988; Jager y Harlander, 1992; Motlagh y col., 1992a; Ray y col., 1989; Rodríguez y col., 1997). En estos plásmidos, los determinantes genéticos de la pediocina PA-1 ocupan un fragmento de aproximadamente 3,5 kb (Fig. II.2b) que contiene 4 marcos abiertos de lectura, correspondientes a los genes *pedA*, *pedB*, *pedC* y *pedD* (Marugg y col., 1992). Todos los marcos de lectura comienzan con el codon de iniciación ATG (a excepción del *pedB* que lo hace con el TTG) y finalizan con el codon de terminación TAG. Los cuatro genes están dispuestos dentro de un mismo operón, gobernado por el promotor situado delante del gen *pedA*. Las secuencias -35 (TTGACA) y -10 (TAGAAT) del promotor se ajustan a las secuencias consenso de los promotores de las bacterias Gram-positivas. La transcripción del operón de la pediocina, iniciada por la unión de la RNA polimerasa al promotor, origina dos tipos de transcriptos (moléculas de RNAm). El primero y más abundante (1,2 kb) cubre los genes *pedABC*, mientras que el segundo (3,5 kb) abarca los cuatro genes del operón (*pedABCD*). Detrás del gen *pedD* existe un terminador transcripcional *rho*-independiente (Motlagh y col., 1994; Venema y col., 1995).

El gen *pedA* codifica un prepropéptido de 64 aminoácidos biológicamente inactivo, la prepediocina PA-1. Los 14 residuos aminoterminales de la prepediocina constituyen la secuencia líder o péptido señal que, aunque es imprescindible para la secreción de la pediocina al medio exocelular, se debe escindir para originar la bacteriocina activa. Por lo tanto, la pediocina PA-1 está formada por los 44 aminoácidos carboxiterminales de la prepediocina.

Originalmente, Marugg y col. (1992) sugirieron que la proteína de 112 aminoácidos codificada en el gen *pedB* estaría involucrada en la inmunidad de las células productoras. Por una parte, se había observado previamente que, en la lactococina A, el gen de inmunidad estaba asociado al gen estructural (van Belkum y col., 1991). Por otra, la inactivación mutacional del gen *pedB* no impedía la producción de pediocina PA-1 en *E. coli*, un microorganismo insensible a la pediocina PA-1. Posteriormente, Venema y col. (1995) confirmaron esta hipótesis ya que la pediocina no era activa frente a un microorganismo sensible (*P. pentosaceus* PPE1.2) al que se le había introducido el gen *pedB*. La cepa resultante era incluso más insensible a la pediocina que la propia cepa productora, debido a que el vector con el gen *pedB* (pMC113dc) tiene un número de copias mayor que el plásmido pSRQ11 presente en las células de *P. acidilactici* PAC 1.0. Además, en el plásmido pMC113dc, el gen *pedB* estaba bajo control de un promotor fuerte (P32). Sin embargo, hasta el momento no se ha dilucidado el mecanismo por el que la proteína PedB confiere inmunidad frente a la pediocina PA-1.

El gen *pedC* codifica una proteína de 174 aminoácidos (PedC), perteneciente al grupo de proteínas accesorias requeridas en los procesos de traslación asociados a transportadores de tipo ABC. Venema y col. (1995) demostraron que la PedC es esencial para la secreción de la pediocina PA-1, tanto en pediococos como en *E. coli*. La estructura de la PedC es similar a la de la HlyD, una proteína requerida para la secreción de la hemolisina A de *E. coli*, y a la de la proteína LcnD.

El gen *pedD* codifica una proteína (PedD) de 724 aminoácidos, perteneciente al grupo de transportadores de tipo ABC y que, por lo tanto, interviene en el transporte de la bacteriocina a través de membrana citoplasmática de las células productoras. Marugg y col. (1992) observaron que las células de *E. coli* que contenían el operón de la pediocina eran capaces de secretar bacteriocina activa. Sin embargo, la inactivación por delección o mutación del gen *pedD* provocaba la pérdida total de la actividad antimicrobiana. La secuencia de la PedD manifiesta un elevado grado de homología con las secuencias de muchos otros transportadores de tipo ABC (Håvarstein y col., 1995).

II.4.2. Secreción y procesado de la pediocina PA-1

Los procesos de secreción y procesado de la pediocina PA-1 dependen de las proteínas de membrana PedC y PedD que, como sucedía con LcnC y LcnD, constituyen un sistema de secreción de tipo I. Por lo tanto, la prepediocina PA-1 se secreta y procesa mediante una maquinaria especializada que consta de un transportador de tipo ABC (en este caso, PedD) (Fig. II.5) y de una proteína accesoria (PedC), de la forma descrita para la prelactococina A. De hecho, la representación de la biosíntesis de la lactococina A mostrada en la Fig. II.6 es completamente transpolable a la producción de pediocina PA-1.

Al igual que en el caso de LcnC, PedD también posee una extensión N-terminal citoplasmática que conforma el dominio proteolítico encargado de separar el líder de la bacteriocina por el lugar adyacente al motivo Gly-Gly (Fig. II.3). El proceso bifásico para la secreción de la pediocina PA-1 es prácticamente idéntico al expuesto para la lactococina A. Venema y col. (1995) clonaron la parte del gen *pedD* que codifica el extremo N-terminal conjuntamente con el gen *pedA* y observaron una activación proteolítica e intracelular de la bacteriocina. Este

estudio confirmó que el procesado de la prepediocina es mucho más eficiente en presencia de un gen *pedD* íntegro, es decir cuando la escisión del líder se realiza de forma concomitante con la secreción de la bacteriocina. La topología de membrana de PedD también parece similar a la de LcnC, con cuatro segmentos transmembránicos (Franke y col., 1996), mientras que la topología de membrana de PedC sigue el modelo general de las proteínas accesorias de los sistemas de transporte de tipo I previamente indicado para LcnD. Venema y col. (1995) especularon que la PedC estaría involucrada en la formación de canales entre la membrana plasmática y la pared celular de las células productoras de pediocina PA-1.

II.5. BIOSÍNTESIS DE LA COLICINA V

En 1925, Gratia describió el primer caso de actividad antimicrobiana debida a la producción de un compuesto de naturaleza proteica. Dado que la cepa responsable de dicha actividad era *E. coli* V, la sustancia recibió el nombre de colicina V. Aunque desde entonces se han descubierto muchas otras bacteriocinas producidas por *E. coli* (Hardy, 1975; Koniski, 1982; Pugsley, 1984), la colicina V muestra diversas propiedades que la distinguen del resto de las colicinas conocidas. Por ejemplo, el tamaño de la colicina V es de aproximadamente 4 kDa, mientras que el de otras colicinas oscila entre 27 y 80 kb. Por otra parte, y a diferencia de otras sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica producidas por *E. coli*, la síntesis de la colicina V no se induce mediante señales que desencadenan respuestas del tipo SOS; finalmente, la secreción de la colicina V al medio exocelular se efectúa directamente a través de un sistema de transporte y procesado específico, mientras que la liberación del resto de colicinas requiere la acción previa de proteínas líticas.

Debido a las diferencias descritas, Yang y Konisky (1984) sugirieron que la colicina V no debería clasificarse como una colicina sino como una microcina. Sin embargo, el término “*microcina*” se utiliza para agrupar a los polipéptidos antimicrobianos modificados postraduccionalmente producidos por cepas de *E. coli*; en este sentido, la colicina V tampoco encaja con dicha definición ya que se trata de un péptido que no contiene modificaciones postraduccionales (Fath y Kolter, 1993). Más recientemente, Håvarstein y col. (1994) observaron que la colicina V mostraba grandes similitudes con diversas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (particularmente de la clase II) y, en consecuencia, manifestaron que deberían incluirse dentro de esta familia de péptidos antimicrobianos. Actualmente, esta opinión es ampliamente aceptada.

La colicina V (Fig. II.1) es una bacteriocina producida por ciertas cepas de *E. coli* y también por algunos otros miembros de la Familia *Enterobacteriaceae* (Waters y Crosa, 1991), bacterias que definen igualmente su espectro de inhibición. Desde un punto de vista higiénico-sanitario hay que destacar que esta colicina inhibe el crecimiento de algunas cepas de *E. coli* del serotipo O157:H7 (Bradley y col., 1991; Murinda y col., 1996).

II.5.1. Genes implicados en la biosíntesis de la colicina V

En las cepas productoras, los determinantes genéticos para la biosíntesis de la colicina V se encuentran en plásmidos de elevado tamaño y bajo número de copias. Los genes involucrados se clonaron y secuenciaron, por primera vez, a partir del plásmido pCoIV-K30 (Gilson y col., 1987; 1990). Más concretamente, se identificaron cuatro genes: *cvaC*, *cvj*, *cvaA* y *cvaB*.

El gen *cvaC* es el gen estructural y codifica un precursor de 103 aminoácidos (la precolicina V), en el que los 15 aminoácidos N-terminales constituyen la secuencia líder y los 88 C-terminales la procolicina V. El gen *cvj*

codifica un péptido de 78 aminoácidos responsable de la inmunidad a la bacteriocina. Ambos genes conforman un operón (Fig. II.2c).

La precolicina V comparte numerosas características con la prelactococina A y la prepediocina PA-1: (a) todas poseen una secuencia líder N-terminal de entre 15 y 21 aminoácidos, que se escinde durante el proceso de secreción; (b) la mayor parte de la secuencia de dichos líderes muestra una estructura en forma de hélice α ; (c) el centro de las secuencias líder está cargado negativamente; (d) el lugar de procesado se sitúa adyacente al doblete Gly₋₂-Gly₋₁ del líder (Fig. II.3); (e) existe un giro β que se inicia entre el primer y el tercer aminoácido anterior al lugar de procesado; (f) el inicio de la secuencia N-terminal de las respectivas bacteriocinas maduras es Met-(Lys/Arg); y (g) las bacteriocinas maduras son péptidos de pequeño tamaño (entre 44 y 88 aminoácidos).

El gen *cvaB* codifica una proteína (CvaB) de 698 aminoácidos, perteneciente al grupo de transportadores de tipo ABC, mientras que el *cvaA* codifica una proteína de 413 aminoácidos (CvaA), perteneciente al grupo de proteínas accesorias asociadas a transportadores de tipo ABC. Estos dos genes configuran un segundo operón que se localiza inmediatamente por detrás del anterior y en orientación contraria (Fig. II.2c).

A diferencia de bacteriocinas de las bacterias lácticas como la lactococina A o la pediocina PA-1, la biosíntesis de la colicina V necesita una proteína adicional (TolC) que se localiza en la membrana externa (Fig. II.7a). TolC es el producto de expresión de un gen cromosómico que no tiene ninguna relación con los otros genes involucrados en la producción de esta bacteriocina (Gilson y col., 1990). Como se comentará posteriormente, TolC participa junto con CvaA y CvaB en la secreción de la colicina V.

II.5.2. Secreción y procesado de la colicina V

El aparato de secreción y procesado de la colicina V está formado por las proteínas CvaB (transportador de tipo ABC), CvaA (proteína accesoria) y TolC (factor de membrana externa) (Figs. II.2c y II.7a). Cuando se realizan mutaciones en los genes *cvaA*, *cvaB* o *tolC*, no se obtiene colicina V libre en el periplasma de las células productoras (Fath y Kolter, 1993). A continuación se describe el papel de cada una de estas proteínas.

CvaB y CvaA conforman un sistema de secreción de tipo I, similar a los de la lactococina A (LcnC y LcnD) o la pediocina PA-1 (PedC y PedD). Actualmente se sabe que la maquinaria CvaB-CvaA reconoce específicamente al líder de la colicina V (Håvarstein y col., 1994). Previamente, Gilson y col. (1990) realizaron fusiones génicas *cvaC-phoA* y mutaciones puntuales en el gen *cvaC* y observaron que los 39 aminoácidos N-terminales eran esenciales para su secreción. Las mutaciones puntuales que afectaban a dichos aminoácidos conducían a una disminución drástica de la bacteriocina en el medio exocelular pero no alteraban su concentración intracelular. Posteriormente, Fath y col. (1994) confirmaron que los 21 aminoácidos C-terminales no participaban en este proceso ya que no existía ninguna dificultad para la secreción de ColV-1, un mutante que carecía de esos residuos.

La secuencia del transportador CvaB muestra un elevado grado de homología con las de LcnC y PedD (Fig. II.5), y, como ellas, también posee una extensión N-terminal citoplasmática encargada de procesar el líder de la bacteriocina. Por su parte, el gen *cvaA* contiene en su interior un lugar de inicio de la traducción, alternativo al que existe por delante del propio gen *cvaA*. Esta peculiaridad conduce a la coexistencia de CvaA y de una versión de CvaA que está truncada en su extremo N-terminal (CvaA*) y que, en consecuencia, carece del segmento transmembránico N-terminal. CvaA* no es esencial para la secreción de colicina V pero contribuye a la estabilidad de CvaA, motivo por el

que su ausencia conduce a una disminución de la actividad antimicrobiana (Hwang y col., 1997).

El papel de TolC en el proceso de secreción de la colicina V se inicia después de que el sistema CvaB-CvaA consigue que la bacteriocina atraviese la membrana plasmática. Concretamente, la participación de TolC es necesaria para que la colicina V pueda atravesar la membrana externa de las cepas de *E. coli* que la producen. Conviene recordar que *E. coli* es un microorganismo Gram-negativo y que la membrana externa es una estructura exclusiva de este tipo de bacterias (Fig. II.7a). Por lo tanto, TolC permite que la colicina V alcance el medio exocelular y no se acumule en el espacio periplásmico. Los sistemas dedicados al transporte de bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas, como los de la lactococina A o la pediocina PA-1, no requieren la intervención de proteínas como TolC o similares porque las células productoras carecen de membrana externa y, por lo tanto, es una barrera que no tienen que superar (Fig. II.7c).

En conclusión, el sistema de secreción y procesado de la colicina V (CvaB-CvaA-TolC) constituye un mecanismo de transporte muy eficaz que posibilita el paso de esta bacteriocina por las distintas membranas que tiene que atravesar desde el citoplasma hasta el medio exocelular. Esta es una de las razones que puede explicar porqué la colicina V utiliza un aparato de secreción específico en vez de emplear la ruta Sec. Se ha observado que cuando OmpA (un péptido señal del sistema Sec) se fusiona con la procolicina V, la bacteriocina atraviesa la membrana plasmática pero queda atrapada en el periplasma y no alcanza el medio exocelular (Fath y Kolter, 1993). En contraste, el sistema Sec de *E. coli* requiere la participación de más de 15 proteínas para que se puedan transportar ciertas proteínas (p.e.: pululanasa) a través de la membrana externa (Pugsley, 1993). Este hecho refuerza la consideración de CvaB-CvaA-TolC como un sistema simple y eficaz.

II.6. BIOSÍNTESIS DE LA NISINA

La nisina, un acrónimo de **N**-Streptococci **I**nhibitory **S**ubstance (Mattick y Hirsch, 1947), es la bacteriocina más estudiada hasta la fecha entre las producidas por bacterias lácticas. Las cepas que producen este lantibiótico pertenecen a la especie *Lactococcus lactis*. Se trata de una bacteriocina activa frente a un amplio espectro de bacterias Gram-positivas, incluyendo microorganismos alterantes y patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* o *Clostridium botulinum* (Rodríguez, 1996) (Tabla II.2). También puede afectar a bacterias Gram-negativas cuando sus membranas externas se debilitan previamente mediante tratamiento subletales (Kalchayanand y col., 1992; Stevens y col., 1991; Stevens y col., 1992).

La actividad antimicrobiana asociada a la nisina fue originalmente descrita por Rogers (1928) al observar que la contaminación de la leche con ciertas cepas de *Lactococcus lactis* (entonces denominados *Streptococcus lactis*) provocaba la inhibición de los cultivos iniciadores empleados en la elaboración de quesos. Inicialmente, el interés por la nisina se centró en su potencial como agente terapéutico en medicina humana debido a la necesidad de agentes antimicrobianos provocada por la II Guerra Mundial. Sin embargo, pronto se reveló inadecuada para este propósito debido, entre otros factores, a su insolubilidad e inestabilidad en los fluidos corporales y a su inactivación por las proteasas digestivas (Hurst, 1981). Hirsch y col. (1951) y McClintok y col. (1952) sugirieron, por primera vez, su aplicación en la conservación de alimentos, concretamente para prevenir la germinación y proliferación de clostridios formadores de gas en los quesos.

La nisina se empezó a utilizar comercialmente desde 1953. Desde entonces, su uso se fue extendiendo progresivamente y actualmente se aplica industrialmente en más de 50 países (Delves-Broughton y col., 1996). La nisina

Tabla II.2. Espectro antimicrobiano de la nisina^a

Bacterias Gram-positivas		Bacterias Gram-negativas ^b
Células vegetativas	Células vegetativas y esporos	
<i>Lactococcus lactis</i> ^c	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Neisseria</i> spp.
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Hafnia</i> spp.
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Flavobacterium</i> spp.
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacteroides</i> spp.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Actinobacillus</i> spp.
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Klebsiella</i> spp.
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Aeromonas</i> spp.
<i>Oenococcus</i> spp.	<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Clostridium bifermentum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Pediococcus damnosus</i>	<i>Clostridium pasteurinum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	
<i>Streptococcus agalactiae</i>		
<i>Streptococcus pyogenes</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Micrococcus luteus</i>		
<i>Listeria monocytogenes</i>		
<i>Listeria ivanovii</i>		

^aEl listado no es completamente exhaustivo y ciertas cepas pertenecientes a las especies citadas pueden ser resistentes

^bTras ser sometidas a tratamientos subletales

^cCepas no productoras de nisina

Fuente: Rodríguez (1996)

está considerada como conservante alimentario seguro por la OMS y posee la condición GRAS (U.S. Food and Drug Administration, 1988). Al contrario de lo que se suele pensar, la aprobación de la nisina como sustancia GRAS no se basó en una historia de consumo seguro sino en datos científicos *in vitro* e *in vivo* sobre su seguridad (Frazer y col., 1962; U.S. Food and Drug Administration, 1988). La nisina también se incluye en la lista positiva de aditivos autorizados en marco de la UE (E-234) y puede etiquetarse como “conservante natural”.

II.6.1. Localización del gen *nisA*

Los primeros estudios sobre los aspectos genéticos de la nisina fueron realizados por Kozak y col. (1974), quienes observaron que la aplicación de técnicas de curado de plásmidos en cepas productoras de este lantibiótico conducía frecuentemente a la pérdida de la bacteriocinogenicidad y, en consecuencia, especularon que los genes responsables de esta propiedad estarían localizados en un plásmido. No obstante, conviene señalar que en aquel momento no se disponía de información sobre la influencia de las técnicas de curado en la estabilidad de elementos genéticos de localización cromosómica. Posteriormente, otros autores demostraron que dicha pérdida iba siempre acompañada de la pérdida de la capacidad para fermentar la sacarosa y que ambos fenotipos se podían cotransferir mediante conjugación (Gasson, 1984; Gonzalez y Kunka, 1985; Steele y McKay, 1986). Estos experimentos proporcionaron las primeras evidencias de la existencia de elementos conjugativos “nisina-sacarosa” pero no permitieron identificar su localización genética.

Poco después, tres equipos independientes consiguieron clonar y secuenciar el gen estructural de la nisina (*nisA*) a partir de tres cepas de *L. lactis* (Buchman y col., 1988; Dodd y col., 1990; Kaletta y Entian, 1989). La secuencia de dicho gen era idéntica en las tres cepas. La estrategia de los tres grupos se

basaba en el empleo de oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de la secuencia aminoacídica de la pronisina propuesta por Ingram (1970). Este autor había observado que aunque la serina, la treonina y la cisteína se incorporaban a la cadena peptídica durante el proceso de traducción de la prenisina, estos aminoácidos no aparecían en la nisina madura. A partir de estos resultados formuló una hipótesis sobre la secuencia de la pronisina en la que postuló que los aminoácidos citados estarían presentes en un péptido precursor que posteriormente sufriría modificaciones postraduccionales. Concretamente, la deshidratación de los residuos de Ser (posiciones 3, 5 y 33) y de Thr (posiciones 2, 8, 13, 23 y 25) daría lugar a la formación de los aminoácidos deshidroalanina y deshidrobutirina, respectivamente. Por su parte, las cisteínas (posiciones 7, 11, 19, 26 y 28) reaccionarían con los residuos vecinos de deshidroalanina (posición 3) y deshidrobutirina (posiciones 8, 13, 23, 25), originando los anillos lantionina y β -metil-lantionina (Fig. II.8).

El precursor de la nisina deducido de la secuencia nucleotídica del gen *nisA* era un péptido de 57 aminoácidos totalmente coincidente con el modelo propuesto por Ingram. Los 34 aminoácidos C-terminales constituyen la pronisina o, lo que es lo mismo, la parte que después de las correspondientes modificaciones postraduccionales se convertirá en la nisina madura (Figs. II.1 y II.8). Los restantes aminoácidos N-terminales conforman la secuencia líder necesaria para el transporte del lantibiótico y que posteriormente se escinde (Figs. II.3 y II.8). Mulders y col. (1991) secuenciaron el gen estructural de una variante natural de la nisina que recibió el nombre de nisina Z para diferenciarla de la variante anterior (que desde entonces se conoce como nisina A). Ambas variantes son idénticas a excepción del residuo 27, que es una histidina en el caso de la nisina A y una asparagina en el de la nisina Z. La sustitución His27Asn es el resultado de una transversión de citosina a adenosina en la secuencia nucleotídica del gen estructural. Recientemente, se ha descrito una nueva

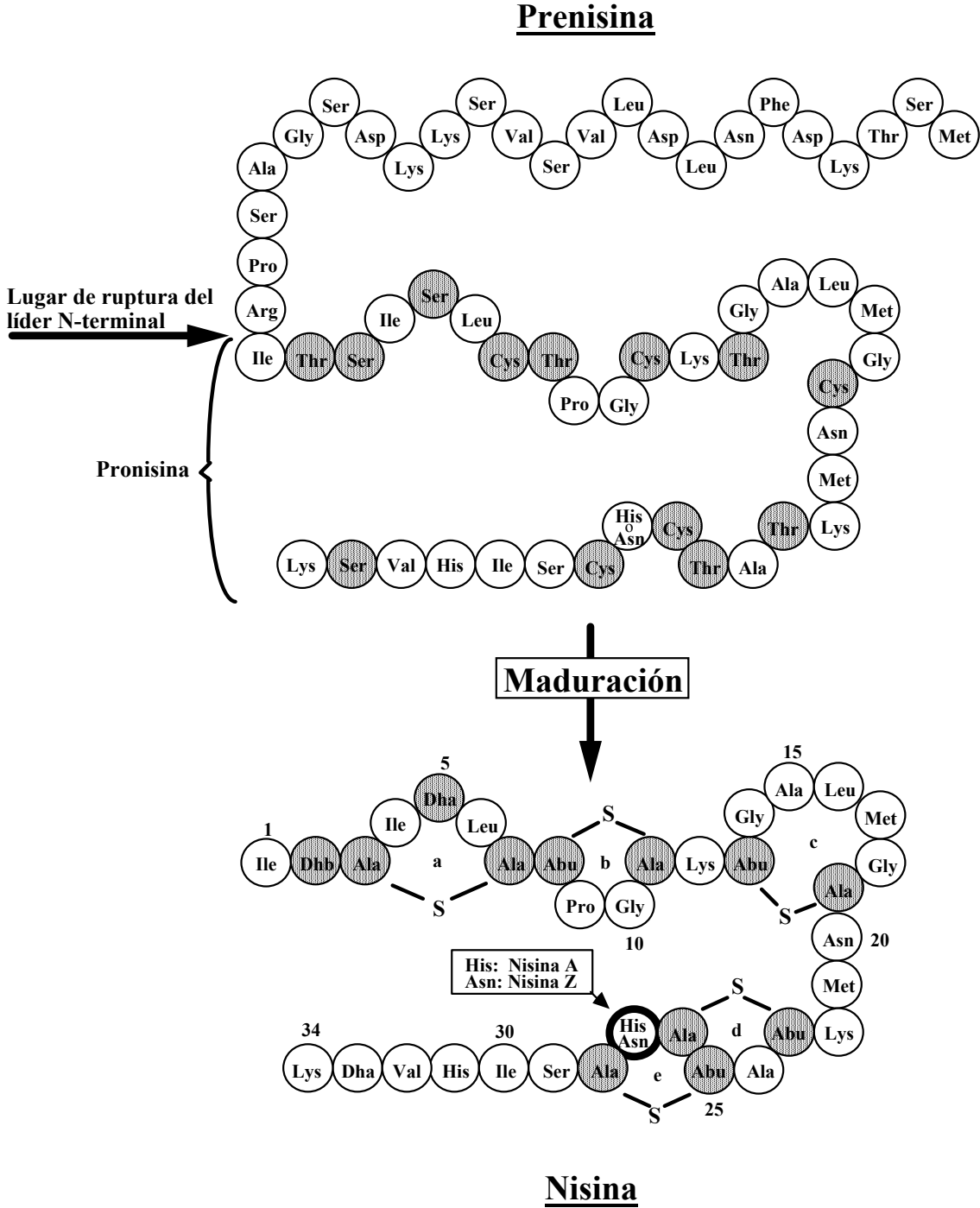


Fig. II.8. Representación esquemática de las moléculas de pronisina y nisina.

variante, la nisina Q, que difiere de la nisina A en cuatro aminoácidos del péptido maduro y dos de la secuencia líder (Zendo y col., 2003).

II.6.2. Identificación de los transposones Tn5301 y Tn5276

El trabajo de Buchman y col. (1988) condujo a la primera secuenciación de *nisA* pero no proporcionó información sobre su localización en las células productoras ya que el gen se detectó en una genoteca de DNA total de *L. lactis* ATCC11454. La localización cromosómica de *nisA* fue descubierta por Dodd y col. (1990) al analizar el DNA de un transconjugante productor de nisina (FI5876) obtenido del emparejamiento entre *L. lactis* NCFB 894 (cepa donante) y *L. lactis* MG1614 (cepa receptora libre de plásmidos). Estos investigadores identificaron una copia de la secuencia de inserción IS904 a unas 800 pb del inicio de *nisA*. El posterior análisis de la relación genómica entre esta copia de IS904 y el gen *nisA* proporcionó la primera prueba de la localización física de los determinantes genéticos de la biosíntesis de la nisina en el cromosoma de *L. lactis*. En el mismo estudio, el DNA de la cepa receptora MG1614 se comparó mediante la técnica de hibridación de Southern con el de sus transconjugantes productores de nisina, lo que permitió comprobar que en estos últimos se había producido la integración cromosómica de *nisA* junto con la de IS904. El hecho de que IS904 estuviera situado próximo a uno de los extremos del fragmento de DNA transferido sugirió que los genes de la producción de nisina y de la fermentación de sacarosa podrían estar localizados en un transposón conjugativo. La secuenciación de las secuencias que precedían a IS904 condujo a la identificación de una repetición directa terminal (5'-TTTTTG-3') que definía el extremo de un nuevo transposón conjugativo de 70 kb que recibió el nombre de Tn5301 (Horn y col., 1991).

Posteriormente, otros autores obtuvieron los mismos resultados en otras cepas productoras de nisina (Rauch y de Vos, 1992; Steen y col., 1991). Rauch y col. (1990) identificaron un elemento IS casi idéntico a IS904 en *L. lactis* NIZO

R5, una cepa en cuyo cromosoma se detectó después otro transposón conjugativo (Tn5276) con una organización idéntica a la de Tn5301 (Rauch y de Vos, 1992).

II.6.3. Organización de la agrupación de genes de la nisina

La biosíntesis de la nisina requiere otros genes aparte del gen estructural *nisA*. Al tratarse de un antibiótico de producción inducible, no sólo son necesarias proteínas encargadas de la inmunidad y del transporte (como en el caso de la lactococina A o la pediocina PA-1), sino también otras adicionales encargadas de otros procesos, como las modificaciones postraduccionales (deshidratación de los residuos de serina y treonina; formación de enlaces tioéster entre las cisteínas y los residuos deshidratados) o los fenómenos de transducción de señal. En total, la agrupación de genes de la nisina está integrada por 11 genes distribuidos en tres operones. La organización de esos genes se muestra en la Fig. II.9, mientras que sus características más importantes y las de los productos que codifican se relacionan en la Tabla II.3.

Los genes *nisABTCIP* conforman el primer operón, bajo control del promotor inducible P_{nisA} . Detrás de *nisA*, se encuentra el gen *nisB* (Buchman y col., 1988; Dodd y col., 1990; Kaleta y Entian, 1989). La mayor parte de la secuencia de *nisB* es idéntica en las diferentes cepas productoras de nisina analizadas hasta la fecha, pero existen pequeñas diferencias en el extremo 3' del gen. Estas diferencias conducen a cambios significativos en la secuencia aminoacídica C-terminal de las respectivas proteínas NisB (Buchman y col., 1988; Kaleta y Entian, 1989). No obstante, parece que dicho fragmento C-terminal de NisB no juega una función biológica importante ya que las distintas cepas no muestran diferencias significativas en la productividad de nisina (Rodríguez y Dodd, 1996). Las proteínas NisB intervienen en las modificaciones

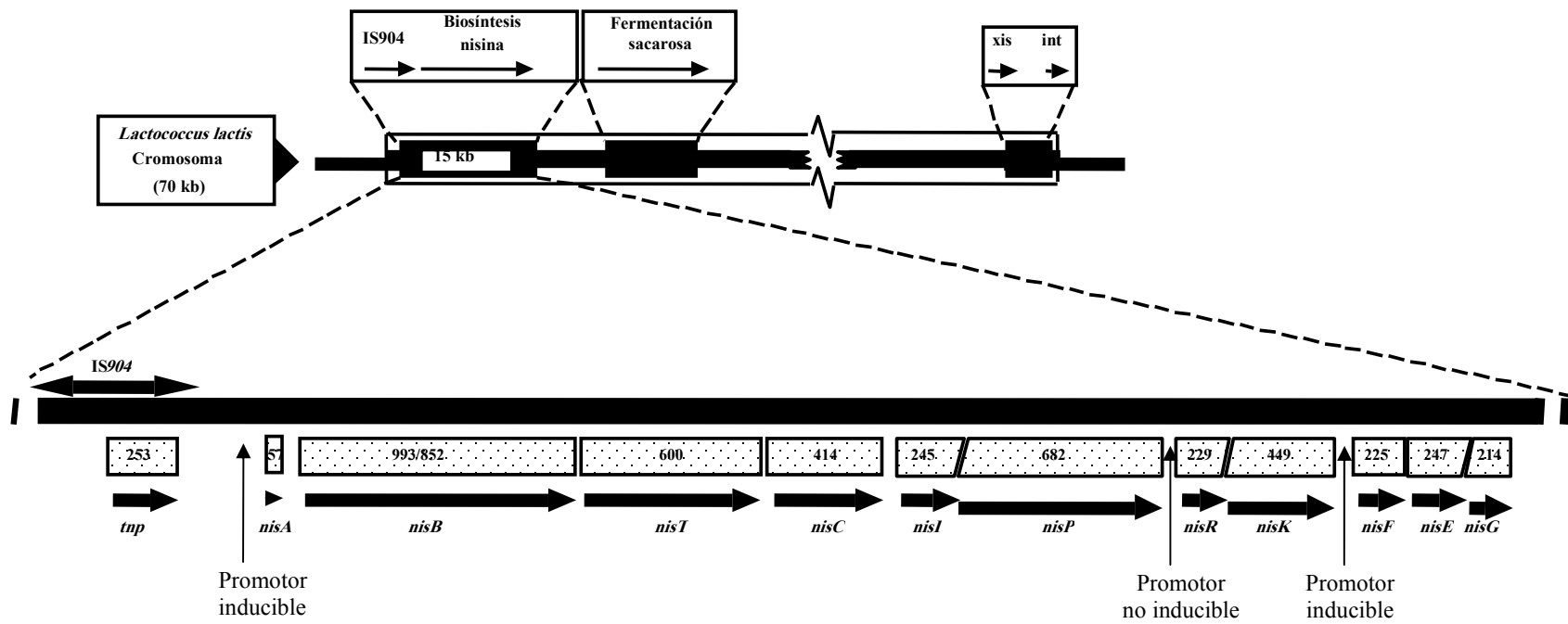


Fig. II.9. Representación esquemática de la agrupación de genes de la nisina

Tabla II.3. Genes que participan en la biosíntesis de la nisina y sus productos de expresión

Elemento genético	Tamaño (pb)	Proteína codificada (aminoácidos)	Tamaño	Descripción
IS904/IS1068	759	Tnp	253	Secuencia de inserción que precede a la agrupación de genes de la nisina
Promotor <i>nisA/nisZ</i>	171	Prenisina	57	Promotor inducible de los genes <i>nisABTCIP</i>
<i>IR</i>	20			Gen estructural de la nisina
<i>nisB</i>	2556/2982	NisB	852/993	Repetición inversa. Posible lugar de procesado del RNAm
<i>IR</i>	25			NisB interviene en la maduración de la prenisina
<i>nisT</i>	1803	NisT	600	Repetición inversa. Posible terminador transcripcional
<i>nisC</i>	1257	NisC	418	NisT es el transportador ABC
<i>nisI</i>	738	NisI	245	NisC interviene en la maduración de la prenisina
<i>nisP</i>	2049	NisP	683	NisI confiere inmunidad a la nisina
Promotor <i>nisR</i>	690	NisR	229	NisP se encarga de escindir el líder de la nisina
<i>nisK</i>	1341	NisK	447	Promotor constitutivo de los genes <i>nisRK</i>
<i>IR</i>				NisR y NisK forman el sistema de transcripción de señal
Promotor <i>nisF</i>	675	NisF	225	NisR es el regulador de respuesta
<i>nisE</i>	726/741	NisE	242/247	NisK es la proteína sensora
<i>nisG</i>	642	NisG	214	Repetición inversa. Posible terminador transcripcional
				Promotor inducible de los genes <i>nisFEG</i>
				NisF participa en la inmunidad a la nisina
				NisE participa en la inmunidad a la nisina
				NisG participa en la inmunidad a la nisina

Fuente: Rodríguez y Dodd (1996)

postraduccionales de la pronisina (Engelke y col., 1992; Karakas Sen y col., 1999).

A continuación, se encuentra el gen *nisT* que codifica un transportador del tipo ABC encargado de la secreción de la nisina al medio exocelular. El final de *nisT* se solapa con el inicio de *nisC*, gen que codifica una proteína que participa, junto con NisB, en las modificaciones postraduccionales de la pronisina (Narbad y col., 1997). A su vez, el último codón de *nisC* se solapa con el gen *nisl*, cuya proteína homónima es responsable de la inmunidad de las células frente a la propia bacteriocina que están produciendo. El último gen de este operón es *nisP* y codifica una serina-proteasa encargada del procesado del líder de la nisina.

El segundo operón no es inducible y engloba los genes *nisR* y *nisK*, que codifican un sistema de transducción de señal de dos componentes (Engelke y col., 1994; van der Meer y col, 1993). El funcionamiento de este sistema se describe más detalladamente en el siguiente apartado (II.6.4) debido a su importancia para el propósito de esta Tesis Doctoral.

Finalmente, el tercer operón incluye los genes *nisF*, *nisE* y *nisG*, bajo control del promotor inducible P_{nisF} (Siegiers y Entian, 1995). Las proteínas resultantes de su expresión (NisF, NisE y NisG, respectivamente) parecen estar involucradas, junto con Nisl, en la inmunidad frente a la nisina; en este sentido, cuando cualquiera de estos tres genes se inactiva, las cepas retienen la capacidad bacteriocinogénica pero se vuelven mucho más sensibles al antibiótico que las cepas salvajes (Siegiers y Entian, 1995). La identificación de un gen del operón de la sacarosa (*sacR*) por detrás de *nisG* sugiere que todos los genes que tienen relación con la biosíntesis de la nisina ya han sido identificados (Rodríguez y Dodd, 1996).

II.6.4. Inducción de la biosíntesis de nisina

La percepción de quórum (*quorum sensing*) en las bacterias lácticas es un fenómeno que se inicia cuando un péptido exocelular es reconocido por una histidina-quinasa localizada en la membrana. Generalmente, esta proteína sensora responde a la señal externa mediante la autofosforilación de un residuo de histidina en su dominio C-terminal. Inmediatamente, el grupo fosfato se transfiere a un residuo de ácido aspártico de un regulador de respuesta intracelular (Msadek y col., 1993). Esta segunda señal activa la transcripción de los genes diana, entre los que se suele incluir el gen estructural de la molécula inductora (Kleerebezem y col., 1997). Estos sistemas de transducción de señal de dos componentes (histidina-quinasa y regulador de respuesta) son indispensables para la activación de la transcripción de los genes que codifican varias sustancias autoinducibles, entre las que destacan las bacteriocinas y sus feromonas.

En el proceso de autorregulación de la nisina, la proteína NisK actúa como sensor para la nisina y la NisR como regulador de respuesta (Engelke y col., 1994; van der Meer y col., 1993). La nisina extracelular constituye la señal para el sistema de transducción y provoca la activación transcripcional de los genes bajo control del promotor P_{nisA} (*nisABTCIP*) y P_{nisF} (*nisFEG*) (de Ruyter y col., 1996a; Kuipers y col., 1995). Por lo tanto, la nisina actúa como feromona en el proceso de inducción de su propia biosíntesis (Dodd y col., 1996b; Kleerebezem y col., 1997; Qiao y col., 1996; Ra y col., 1996) (Fig. II.10).

El nivel de expresión de los genes bajo el control del promotor P_{nisA} en cepas que contienen las proteínas NisR y NisK pero que no producen nisina es despreciable (Kuipers y col., 1997). Sin embargo, la adición de nisina al medio de cultivo durante la fase logarítmica de crecimiento de esas mismas cepas activa la transcripción de los genes controlados por el promotor *nisA*, siendo el nivel de expresión proporcional a la cantidad de nisina añadida (Kuipers y col., 1995).

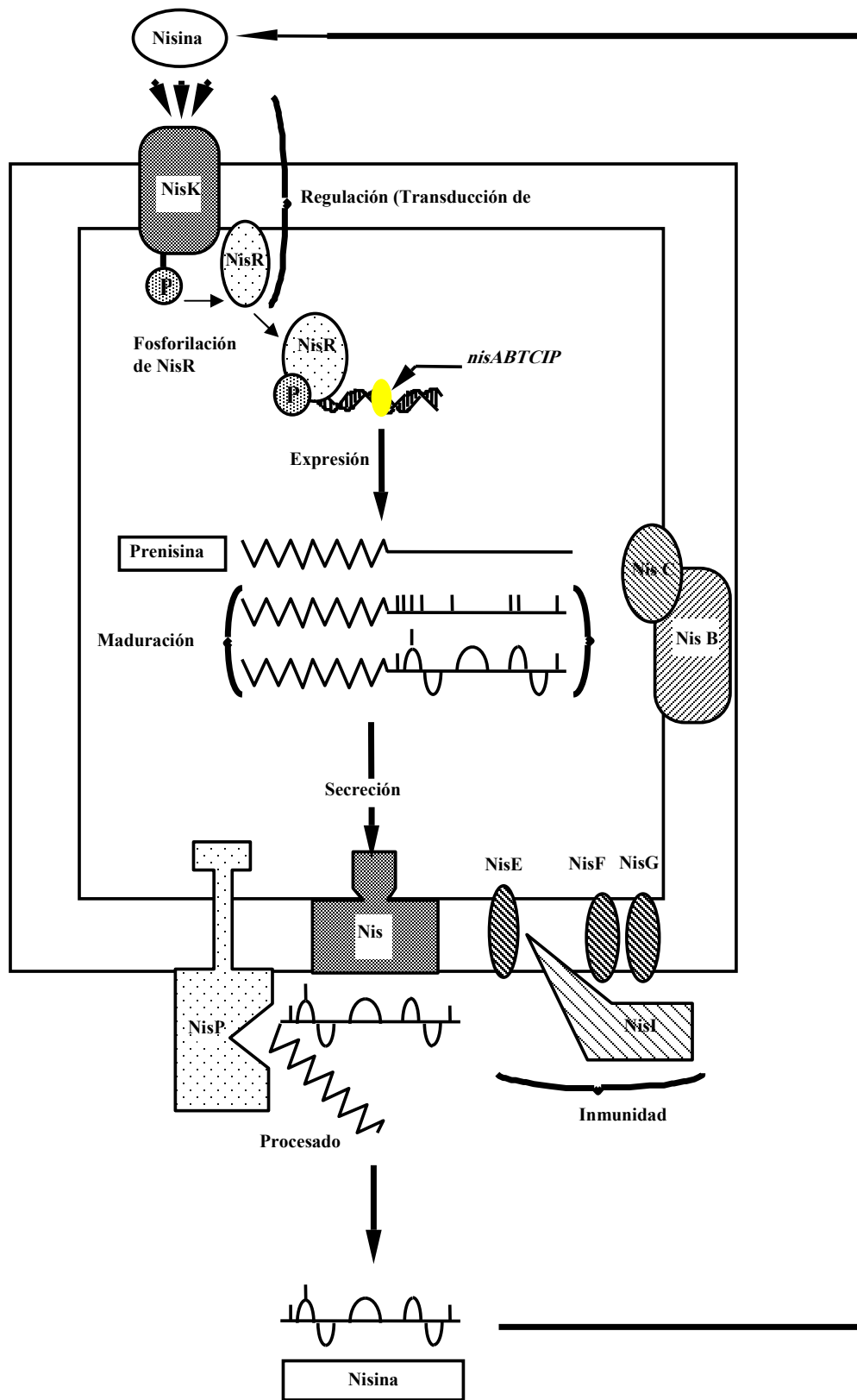


Fig. II.8. Representación esquemática del proceso de biosíntesis de la nisina

Inicialmente se pensaba que únicamente la nisina que interaccionaba con la parte extracelular de NisK provocaba la activación del regulón *nis*. Sin embargo, Qiao y Saris (1996) inactivaron el gen *nisT* en una cepa de *L. lactis* y observaron que aunque la cepa resultante era incapaz de secretar nisina al medio, todavía seguía produciendo nisina intracelular. Estos autores sugirieron que la activación de la transcripción en la cepa Δ nisT debía estar mediada o por la unión de la nisina intracelular a la membrana o por liberación de la bacteriocina debida a la lisis de parte de las células, si bien esta segunda posibilidad quedó descartada tras el estudio posterior de Wahlstrom y Saris (1999). Más tarde, Kylä-Nikkilä y col. (1999) demostraron que la nisina presente en el citoplasma de la cepa Δ nisT se adsorbe a la membrana y puede interactuar con NisK, de modo que desencadena el proceso de transducción de señal sin necesidad de alcanzar el medio extracelular.

Recientemente, Chandrapati y O'Sullivan (2002) han descubierto que la inducción del promotor P_{nisA} también ocurre durante el crecimiento de *L. lactis* ATCC 11454 en presencia de galactosa. Este fenómeno se produce de forma completamente independiente del sistema NisRK

II.6.5. Los sistemas NICE

El peculiar sistema de autorregulación de la biosíntesis de la nisina constituye la base de los sistemas de expresión controlados por la nisina (sistemas NICE, acrónimo del inglés ***N*isin-*C*ontrolled *E*xpression**; Kuipers y col., 1998). Los elementos imprescindibles en cualquier sistema NICE son: (a) una cepa que contenga los genes *nisRK*; (b) la adición de nisina como molécula

inductora; y (c) que el gen de interés esté controlado por los promotores P_{nisA} o P_{nisF} (Kuipers *et al.*, 1998).

Entre las ventajas que ofrecen los sistemas NICE para la producción de péptidos en *L. lactis* destacan las siguientes:

(1). La nisina es una molécula inductora idónea, ya que goza de grado alimentario y su empleo en la industria alimentaria está aceptado internacionalmente.

(2). El sistema es fácil de emplear y tiene un coste bajo, ya que la inducción de los cultivos se consigue simplemente añadiendo cantidades muy pequeñas de nisina (típicamente entre 0,05 y 5 $\mu\text{g l}^{-1}$). El empleo de cantidades subinhibitorias de nisina significa que los cultivos iniciadores que se empleasen conjuntamente no sufrirían daño alguno. Con algunas variedades mutantes de nisina, las concentraciones necesarias para la inducción son incluso menores (Kuipers y col., 1995).

(3). Se trata de un sistema flexible y versátil. Actualmente se dispone de toda una gama de cepas y vectores de expresión idóneos para su aplicación práctica (de Ruyter y col., 1996b).

(4). Este sistema se puede implementar en otras bacterias lácticas mediante complementación plasmídica. Para ello, se introducen dos plásmidos, uno con los genes *nisRK* y el otro con el promotor P_{nisA} seguido del gen que se desea expresar. Por supuesto, también se pueden disponer todos los elementos genéticos en un mismo plásmido.

(5). La expresión está sometida a un control extremadamente estricto. La proteína de interés no se produce si no se induce el sistema, por lo que se puede emplear para la sobreexpresión de proteínas letales.

(6). Se puede controlar el nivel de expresión en función de la cantidad de nisina añadida. Esto conduce, en última instancia, a una producción elevada del péptido o proteína de interés, que puede alcanzar hasta el 60% de la proteína intracelular total (Kuipers y col., 1997). Como en la mayoría de los casos las células no se lisan, se podría conseguir la secreción de una proteína empleando una secuencia señal adecuada, lo que facilitaría su procesado.

(7). Ya se ha conseguido un sistema de expresión de grado alimentario basado en lactococos deficientes en el gen *lacF* y que contienen los genes *nisRK* integrados en su cromosoma (Platteeuw y col., 1996). El sistema se complementa con plásmidos que contienen el gen de interés bajo control del promotor *PnisA* y el gen *lacF* como marcador selectivo. La nisina actúa como inductor.

El sistema del promotor *PnisA* se ha utilizado con éxito para sobreexpresar una gran variedad de genes heterólogos (de origen bacteriano, vírico o eucariota) en *L. lactis* (Chatel y col., 2001; De Ruyter, 1998; Enouf y col., 2001; Fernández y col., 2000; Kuipers y col., 1995; Plattteeuw y de Vos, 1992; van Alen-Boerrigter y col., 1991).

II.7. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS DE BACTERIAS LÁCTICAS

II.7.1. Utilidad de los sistemas de producción heteróloga de péptidos

En general, el empleo de sistemas de expresión heteróloga suele obedecer a tres razones principales (Makrides, 1996): (1) conocer la función y/o el modo de acción de ciertas proteínas y péptidos; (2) facilitar el control

transcripcional y/o traduccional sobre la expresión del gen recombinante; o (3) conseguir un nivel de producción mayor que el obtenido a partir de las fuentes nativas. Además, en el caso de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, los sistemas de producción heteróloga pueden tener otras aplicaciones interesantes (Rodríguez y col., 2002). La eficacia de estos péptidos antimicrobianos, y/o de las cepas productoras, como bioconservantes alimentarios puede verse seriamente comprometida por diversos factores; como un espectro antimicrobiano demasiado reducido, la pérdida espontánea de la bacteriocinogenicidad, la escasa adaptación del productor natural al alimento de interés, los posibles efectos adversos sobre las características organolépticas de los alimentos y/o la emergencia de bacterias resistentes (Daeschel, 1993; Holzapfel y col., 1995; Schillinger y col., 1996). En este contexto, la producción heteróloga de bacteriocinas puede ser una alternativa atractiva para evitar algunas de las situaciones adversas anteriormente citadas. Adicionalmente, esta estrategia también puede ser utilizada para la construcción de cepas multibacteriocinogénicas o para conferir propiedades antimicrobianas a cepas de interés tecnológico, como las que forman parte de cultivos iniciadores.

II.7.2. Hospedadores heterólogos

El diseño de un sistema de expresión eficiente para la producción de proteínas o péptidos recombinantes depende de muchos factores, incluyendo las características del crecimiento celular, el nivel de expresión, la localización del producto final, la existencia de modificaciones postraduccionales o la normativa, en el caso de proteínas comerciales (Makrides, 1996). Además, dado que los sistemas de expresión están constituidos por células hospedadoras y elementos genéticos (señales de transcripción y de traducción, genes, vectores, ...), la elección de cada uno de los componentes puede resultar crítica para la expresión del gen de interés (Rodríguez y col., 2002).

Desde los inicios de la microbiología molecular, *Escherichia coli* ha sido el huésped procariota más empleado para la clonación y expresión de genes heterólogos, lo cual es completamente lógico si se tiene en cuenta que se trata del microorganismo mejor caracterizado genéticamente. Muchos de los procesos biológicos de *E. coli* son bien conocidos y existe un número casi ilimitado de herramientas genéticas disponibles para su manipulación (Billman-Jacobe, 1996). En consecuencia, esta bacteria ha sido casi siempre seleccionada como el primer hospedador para la clonación de genes involucrados en la biosíntesis de diversas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. Sin embargo, resulta utópico pensar que una única especie sea adecuada para cualquier aplicación y, de hecho, no todos los genes se pueden expresar correctamente en *E. coli*. Existen varias razones que explican esta falta de universalidad de *E. coli* como productor heterólogo. En primer lugar, existen grandes diferencias entre el empleo de codones de *E. coli* y el de las bacterias lácticas (el contenido de G+C en los genes de *E. coli* es de aproximadamente un 50%, en contraste con el 35% existente en los de las bacterias lácticas). En segundo lugar, la proteína recombinante puede ser tóxica para *E. coli*. Por otra parte, pueden existir problemas con la estructura del gen recombinante y/o con la estabilidad o la eficiencia en la traducción del RNAm correspondiente. Tampoco conviene olvidar que *E. coli* es una bacteria Gram-negativa y, como tal, la organización de su membrana celular y anexos difiere significativamente de la que podemos encontrar en microorganismos Gram-positivos como las bacterias lácticas. Por lo tanto, la producción de una proteína heteróloga en *E. coli* puede enfrentarse a la falta de mecanismos de secreción que permitan el transporte del producto al medio de cultivo. Además, los péptidos o proteínas heterólogas pueden ser degradadas por la acción de las enzimas proteolíticas de *E. coli* (Makrides, 1996). Finalmente, es importante considerar que *E. coli* no sólo no está considerado como microorganismo GRAS sino, que bien al contrario, se debe considerar como patógeno o potencialmente patógeno. En consecuencia, se deben emplear hospedadores alternativos cuando lo que se desea es la producción de proteínas heterólogas con fines alimentarios.

Los inconvenientes citados anteriormente se pueden superar eligiendo otras bacterias alternativas aunque, en última instancia, la utilidad de unas u otras está dictada por la disponibilidad de herramientas para su manipulación genética. Algunas especies de bacterias lácticas, como *Lactococcus lactis*, están demostrando ser muy versátiles y, de hecho, su potencial ha aumentado notablemente en los últimos años como resultado de los recientes avances en la estabilización de genes heterólogos y en el control de su expresión (Venema y col., 1999). Actualmente las bacterias lácticas ya constituyen, en muchos casos, la primera elección para la expresión de genes heterólogos y, dada la gran cantidad de investigadores que están trabajando en la expresión génica en este tipo de organismos, no sería de extrañar que esta situación mejore sustancialmente en el futuro (Konings y col., 2000). Muchas bacterias lácticas son consideradas seguras o “de grado alimentario” y éste es uno de los principales motivos, junto con su importancia industrial, por el que resultan tan atractivas como biorreactores para la producción heteróloga de proteínas o péptidos de interés para el sector alimentario (Billman-Jacobe, 1996).

II.7.3. Producción heteróloga de bacteriocinas basada en la expresión de los genes nativos

La introducción de los genes nativos necesarios para la biosíntesis de una bacteriocina parece, a simple vista, el procedimiento más sencillo para su obtención en un hospedador heterólogo. Aunque se ha observado que no siempre es así, esta fue la estrategia seguida en los primeros trabajos sobre el tema y sigue teniendo cierta utilidad en la actualidad (Rodríguez y col., 2002).

II.7.3.1. Bacteriocinas de la Clase I

La producción heteróloga de nisina en otras bacterias lácticas resulta particularmente atractiva debido, entre otras razones, a su amplio espectro antimicrobiano, su aplicación industrial como aditivo y el hecho de que sus determinantes genéticos estén localizados en un transposón conjugativo. La transmisión de información genética mediante conjugación es un proceso natural que no requiere recombinación de DNA. Sin embargo, los intentos de transmisión del transposón de nisina a bacterias lácticas no pertenecientes a la especie *L. lactis* han sido tradicionalmente infructuosos. Excepcionalmente, Broadbent y col. (1995) consiguieron transferir el transposón Tn5307 a un enterococo de origen lácteo. Estos autores observaron que la cepa transconjugante (*Enterococcus* sp. N12 β) adquiría inmunidad a la nisina (previamente era sensible) pero no producía la bacteriocina. Más recientemente, Li y O'Sullivan (2002) investigaron la causa que impedía la obtención de nisina extracelular activa en los sobrenadantes del mencionado enterococo. Aunque el empleo de las técnicas de PCR e hibridación de Northern reveló la ausencia de transcripción del gen *nisA*, dicha transcripción pudo ser parcialmente restaurada cuando se añadía nisina exógena a los cultivos de la cepa N12 β . Además, los bioensayos mostraron que la cantidad de nisina activa que se producía dependía línealmente de la dosis de nisina exógena que se añadía como agente inductor. En cualquier caso, la cantidad mínima de nisina necesaria para la autoinducción era muy superior a la requerida para iniciar el mismo proceso en cepas de *L. lactis*.

La lactocina S es un lantibiótico producido por ciertas cepas de *Lactobacillus sakei* (Mørtvedt y Nes, 1990; Rodríguez y col., 1995). Su producción está codificada en una compleja agrupación de genes de localización plasmídica (Nes y col., 1994). Skaugen y col. (1999) consiguieron la biosíntesis

de esta bacteriocina en cepas de *Lb. sakei* no bacteriocinogénicas y también en *Lb. plantarum* mediante la subclonación de un fragmento de 16 kb que contenía los 11 genes de la agrupación en el vector pELS100. El sistema de expresión sirvió para analizar el efecto de distintas mutaciones introducidas en varios de los genes, lo que permitió conocer mejor la actividad biológica de las proteínas derivadas.

La lacticina 3147, producida por algunas cepas de *L. lactis*, es una bacteriocina de dos componentes con un amplio espectro antimicrobiano (Ryan y col., 1996). Los genes que intervienen en su biosíntesis están organizados en dos operones divergentes localizados en pMRC01, un plásmido conjugativo (Dougherty y col., 1998). Ryan y col. (1999) utilizaron la expresión heteróloga de esta bacteriocina en *Enterococcus faecalis* FA2-2 para comparar su actividad biológica con la de una citolisina producida heterológamente por un enterococo isogénico. Tras varios intentos fallidos de transferir directamente pMRC01 a la cepa FA2-2 mediante conjugación, estos autores consiguieron introducir en ese hospedador un plásmido (pOM02) que contenía los dos operones. De esta manera, pudieron comprobar que, a diferencia de la citolisina, la lacticina 3147 carece de actividad hemolítica. El espectro antimicrobiano del enterococo recombinante era ligeramente más estrecho que el del lactococo original, lo que se debía posiblemente a su menor productividad de bacteriocina.

La producción de acidocina B, una bacteriocina de *Lactobacillus acidophilus* M46, está codificada en un plásmido de 14 kb (pCV461) que ha sido transferido con éxito a una cepa de *Lb. plantarum* (Van der Vossen y col., 1994). La subclonación de fragmentos de restricción de pCV461 en los vectores pGKV21 (20 copias por célula) y pLPE24M (80 copias por célula) originó nuevos plásmidos con los que se ha conseguido la producción heteróloga de la acidocina B en *Lb. plantarum* y *Lb. fermentum* (Leer y col., 1995).

II.7.3.2. Bacteriocinas de la Clase II

La mayoría de las cepas productoras de la pediocina PA-1 son pediococos, unas bacterias asociadas con productos cárnicos y vegetales pero escasamente adaptadas a la leche y productos lácteos. Dada la actividad de esta bacteriocina frente a *Listeria monocytogenes* y otros patógenos preocupantes para el sector lácteo, sería interesante que las industrias queseras pudieran disponer de cultivos iniciadores o adjuntos con esta propiedad. En *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, la producción de esta bacteriocina está asociada al plásmido pSRQ11 (Marugg y col., 1992). El operón de la pediocina (*ped*), incluyendo su propio promotor, fue subclonado y expresado con éxito en *E. coli* y en una cepa originalmente sensible a la bacteriocina, *Pediococcus pentosaceus* PPE1.2., lo que permitió el análisis funcional del operón (Marugg y col., 1992; Venema y col., 1995). Chikindas y col. (1995) también consiguieron la producción y secreción de esta bacteriocina en *P. pentosaceus* PPE1.2 tras la introducción de pMC117. En este plásmido, el promotor de la pediocina ha sido sustituido por P32, un promotor lactocócico fuerte. La cantidad de bacteriocina producida fue hasta cuatro veces superior a la obtenida del productor natural *P. acidilactici* PAC1.0. Estos mismos autores consiguieron la transformación de *L. lactis* IL1403 con pMC117 pero, en este caso la producción representó menos de un 1% de la del pediococo parental. El nivel aumentó hasta un 50% cuando se empleó como hospedador *L. lactis* LL108, una cepa que porta varias copias del gen *repA* en su cromosoma y en la que, por lo tanto, el número de copias del plásmido es muy superior. En contraste, no se consiguió la producción de pediocina en *L. lactis* cuando el operón *ped* estaba bajo el control de su propio promotor. En el mismo trabajo, la introducción de pKV4, un plásmido que contiene los cuatro genes de la biosíntesis de la lactococina A, en *P. acidilactici* PAC1.0 resultó en la coproducción de pediocina PA-1 y lactococina A.

Aunque el trabajo de Chikindas y col. (1995) demostró que la pediocina PA-1 podría ser producida en *L. lactis*, las cepas empleadas como hospedadoras

carecían de algunas propiedades necesarias para su aplicación en la industria láctea. Para explorar el potencial de un cultivo comercial productor de pediocina PA-1, Buyong y col. (1998) seleccionaron como hospedador de pMC117 a *L. lactis* MM210, ya que se trata de una cepa empleada industrialmente en la elaboración de queso Cheddar. La actividad anti-*Listeria* del lactococo recombinante fue evaluada en quesos Cheddar coinoculados con el lactococo y con una mezcla de tres cepas de *L. monocytogenes*. En los quesos experimentales, los recuentos del patógeno disminuyeron en un ciclo logarítmico tras la primera semana de maduración y, posteriormente, se redujeron en un ciclo adicional a los tres meses (recuentos finales: 10 ufc g^{-1}). La presencia del plásmido con el operón *ped* no afectó al crecimiento ni a las propiedades tecnológicas del lactococo. En los quesos control, inoculados con la misma concentración de un lactococo isogénico no productor de pediocina, los recuentos de *L. monocytogenes* aumentaron en 4 ciclos logarítmicos tras las dos primeras semanas de maduración y, seguidamente, disminuyeron gradualmente hasta aproximadamente 10^3 ufc g^{-1} a los 6 meses.

Coderre y Somkuti (1999) han demostrado la producción de cantidades variables de pediocina PA-1 en *L. lactis*, *E. faecalis* y *Streptococcus thermophilus* transformados con pPC418, un plásmido equipado con *repA* y con el operón *ped* bajo control del promotor ST_{P2201} de *St. thermophilus*. La producción de esta bacteriocina no afectó al crecimiento de diversas cepas de *St. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, las bacterias utilizadas como cultivos iniciadores en la producción de yogur y de otros productos lácteos. No obstante, en el mismo estudio se observó que la estabilidad de pPC418 dependía del hospedador utilizado y que, en algunos casos, el subcultivo seriado de las cepas transformadas ocasionaba una pérdida gradual de la bacteriocinogenicidad. Esta estabilidad dependiente de cepa ha sido previamente observada en otros plásmidos de la misma familia (Soleiman y Somkuti, 1993).

La enterocina A es una bacteriocina inducible producida por cepas de *E. faecium* (Aymerich y col., 1996). Debido a las precauciones existentes (muchas veces de forma infundada) sobre el uso de enterococos en la industria alimentaria, la producción heteróloga de esta bacteriocina en otras bacterias lácticas sería una manera de aprovechar su actividad antilisteria, muy similar a la de la pediocina PA-1. O'Keeffe y col. (1999) clonaron todos los elementos genéticos necesarios para la biosíntesis de la enterocina A en pCI372. La introducción del plásmido resultante (pENT03) en *E. faecalis* OG1X condujo a la producción de la bacteriocina y de su factor de inducción en medio sólido. En caldo, la bacteriocina sólo se pudo detectar tras la adición exógena del factor de inducción. Los autores sugirieron que este hecho podría deberse a la falta de expresión de los dos componentes del sistema de transducción de señal (*entKR*). La introducción de pENT03 en *L. lactis* IL1403 y MG1614 no se tradujo en actividad bacteriocinogénica, incluso en placas que contenían el factor de inducción. De hecho, la producción de enterocina A en *L. lactis* IL1403 sólo se pudo conseguir (y con cierta inestabilidad) mediante la expresión constitutiva del cassette *entAITD* bajo control del promotor lactocócico P32 (plásmido pENT02).

Martínez y col. (2000) consiguieron coproducir pediocina PA-1 y enterocina A en *L. lactis* IL1403. Para ello, clonaron un fragmento de PCR que contenía los genes *pedA* (estructural) y *pedB* (inmunidad) del operón de la pediocina en el plásmido pHB04. El fragmento se insertó justo por detrás del promotor P32 y de los genes estructural (*entA*) y de inmunidad (*entI*) de la enterocina A. Las concentraciones de pediocina y de enterocina en los sobrenadantes del lactococo recombinante fueron prácticamente insignificantes. En cualquier caso, ambas bacteriocinas pertenecen a la subclase IIa; esto quiere decir que sus estructuras, sus modos de acción y sus espectros antimicrobianos son muy similares, por lo que carecen de acción sinérgica y su coproducción no es un objetivo relevante.

La acidocina A es una bacteriocina producida por *Lb. acidophilus* TK9201, una cepa empleada industrialmente para la elaboración de leches fermentadas

(Kanatani y col., 1995). La clonación de todos los elementos genéticos que intervienen en su producción permitió su producción en *Lb. casei* TK9008, una cepa no bacteriocinogénica y sensible a la acidocina A.

II.7.3.3. Bacteriocinas de la Clase III

La helveticina J es una bacteriocina producida por *Lb. helveticus* 481 (Joerger y Klaenhammer, 1986). A pesar de que su estrecho espectro antimicrobiano y su termosensibilidad limitan su potencial como bioconservante, esta bacteriocina podría contribuir a que las bacterias productoras sean más competitivas en sustratos lácteos complejos. La clonación de un fragmento que contenía el gen estructural en pGK12 y la posterior introducción del plásmido recombinante en *Lb. johnsoni* NCK64, posibilitaron la obtención de la nueva cepa bacteriocinogénica *Lb. johnsoni* NCK249. Aunque la falta de atractivo tecnológico de esta bacteriocina ha propiciado que no se haya seguido estudiando, hay que destacar que éste fue el primer trabajo en el que se consiguió la producción heteróloga de una bacteriocina producida por bacterias lácticas.

II.7.4. Producción heteróloga de bacteriocinas mediante intercambio de líderes y/o de sistemas de secreción del tipo ABC

La secreción y procesamiento de la mayoría de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas requiere un sistema dedicado integrado por un transportador de tipo ABC y una proteína accesoria. La explotación de las grandes homologías aminoacídicas existentes tanto entre los líderes como entre los transportadores de la mayor parte de las bacteriocinas de la clase II (incluyendo la colicina V) y de algunos lantibióticos constituye una estrategia atractiva para la producción heteróloga de bacteriocinas (Rodríguez y col., 2002).

Las bacteriocinas que se han conseguido producir en bacterias lácticas heterólogas empleando un transportador de tipo ABC se muestran en la Tabla II.4.

Por lo que se refiere a los lantibióticos, Kuipers y col. (1993) reemplazaron el líder de la nisina Z por el de la subtilina, un lantibiótico producido por *Bacillus subtilis*, y observaron que el precursor híbrido era reconocido por la maquinaria de transporte de la nisina Z existente en las cepas nisinogénicas de *L. lactis*. Sin embargo, el precursor no era procesado, lo que provocaba que la actividad antimicrobiana fuera unas 200 veces inferior a la del productor natural de nisina Z. Los líderes de los lantibióticos no sólo están involucrados en el transporte y procesado de las bacteriocinas, sino también en los complejos procesos de modificación postraduccional. Por ese motivo, contienen regiones atípicas que hacen que sea muy difícil su producción empleando líderes heterólogos. De hecho, se ha observado que mutaciones puntuales en el líder de la nisina provocan grandes diferencias en la producción de este lantibiótico (Van der Meer y col., 1994).

La lactacina F es una bacteriocina compuesta por dos péptidos (LafA y LafX) producida por *Lb. johnsonii* VPI 11088 (Fremaux y col., 1993; Allison y col., 1994). Entre las bacteriocinas de la clase II, las secuencias de los líderes de LafA y LafX y las de los líderes de las carnobacteriocinas A, BM1 y BM2 producidas por *Carnobacterium piscicola* LV17 (Worobo y col., 1994; Quadri y col., 1994) son las que muestran el mayor grado de homología. Para averiguar si sus sistemas de transporte y procesado eran intercambiables, Allison y col. (1995a) introdujeron el plásmido pTRK386 (con los tres genes del operón de la lactacina F) en *C. piscicola* LV17 y observaron que la cepa resultante era capaz de producir simultáneamente la lactacina F y las carnobacteriocinas. La productividad de las carnobacteriocinas era similar a la de la cepa parental, pero la producción de los péptidos de la lactacina F (especialmente LafA) fue muy inferior. Los autores sugirieron que podría ser debido a una menor afinidad de los

Tabla II.4. Bacteriocinas producidas heterológamente en bacterias lácticas empleando un sistema de transporte de tipo ABC

Bacteriocina	Hospedador nativo	Hospedador heterólogo	Vector	Referencia
Acidocina A	<i>Lb. acidophilus</i> TK9201	<i>Lb. casei</i> TK9008	pESX72	Kanatani y col. (1995)
Acidocina B	<i>Lb. acidophilus</i> M46	<i>Lb. plantarum</i> 80	pCV461	Van der Vossen y col. (1994)
	<i>Lb. acidophilus</i> M46	<i>Lb. plantarum</i> 80	pCV461-3	Leer y col. (1995)
	<i>Lb. acidophilus</i> M46	<i>Lb. plantarum</i> 80	pLPE24M	Leer y col. (1995)
Carnobacteriocina B2	<i>C. piscicola</i> LV61	<i>Lb. sakei</i> Lb79 (pSAK20)	pSC1	Axelsson y col. (1998)
	<i>C. piscicola</i> LV61	<i>Lb. sakei</i> Lb79 (pSAK20)	pSC2	Axelsson y col. (1998)
Colicina V	<i>E. coli</i>	<i>L. lactis</i> IL1403(pMB500)	pLEC2	van Belkum y col. (1997)
Divergicina A	<i>C. divergens</i> LV13	<i>Lc. gelidum</i> UAL 187-22	pLED1	van Belkum y col. (1997)
	<i>C. divergens</i> LV13	<i>Lc. gelidum</i> UAL 187-22	pLAD6	van Belkum y col. (1997)
	<i>C. divergens</i> LV13	<i>Lc. gelidum</i> UAL 187-22	pCOD1	van Belkum y col. (1997)
	<i>C. divergens</i> LV13	<i>L. lactis</i> IL1403(pMB500)	pLAD6	van Belkum y col. (1997)
	<i>C. divergens</i> LV13	<i>E. coli</i> MC4100 (pHK22)	pLED1	van Belkum y col. (1997)
	<i>C. divergens</i> LV13	<i>E. coli</i> MC4100 (pHK22)	pCOD1	van Belkum y col. (1997)
Enterocina A	<i>E. faecium</i> DPC1146	<i>E. faecalis</i> OG1X	pENT02	O'Keeffe y col. (1999)
	<i>E. faecium</i> DPC1146	<i>E. faecalis</i> OG1X	pENT03	O'Keeffe y col. (1999)
	<i>E. faecium</i> DPC1146	<i>L. lactis</i> IL1403	pENT02	O'Keeffe y col. (1999)
	<i>E. faecium</i> T136	<i>L. lactis</i> IL1403	pHB04	Martínez y col. (2000)
	<i>E. faecium</i> T136	<i>L. lactis</i> IL1403	pJM04	Martínez y col. (2000)
Helveticina J	<i>Lb. helveticus</i> NCDO 481	<i>Lb. johnsonii</i> NCK249	pGK12	Fremaux y Klaenhammer (1993)
Lactacina F	<i>Lb. johnsonii</i> VPI 11088	<i>C. piscicola</i> LV17	pTRK386	Allison y col. (1995a)
	<i>Lb. johnsonii</i> VPI 11088	<i>Lc. gelidum</i> UAL187-22	pTRK204	Allison y col. (1995b)
Lacticina 3147	<i>L. lactis</i> DPC3147	<i>E. faecalis</i> FA2-2	pOM02	Ryan y col. (2001)
Lactocina S	<i>Lb. sakei</i> L45	<i>Lb. plantarum</i> NC8	pELS163	Skaugen y col. (1999)
Lactococcina A	<i>L. lactis</i> WM4	<i>Lc. gelidum</i> UAL187-22	pMB553	van Belkum y Stiles (1995)
	<i>L. lactis</i> WM4	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	pKV4	Chikindas y col. (1995)
Leucocina A	<i>Lc. gelidum</i> UAL187	<i>L. lactis</i> IL1403 (pMB500)	pMJ6	van Belkum y Stiles (1995)
Mesentericina Y105	<i>Lc. mesenteroides</i> Y105	<i>Lb. johnsonii</i> NCK64	pCFYC5	Fremaux y col. (1995)
	<i>Lc. mesenteroides</i> Y105	<i>L. cremoris</i> LC	pFBYC04	Biet y col. (1998)

Tabla II.4. (cont.) Bacteriocinas producidas heterológamente en bacterias lácticas empleando un sistema de transporte tipo ABC

Bacteriocina	Hospedador nativo	Hospedador heterólogo	Vector	Referencia
Pediocina PA-1	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	<i>E. coli</i> V850	pSRQ11.1	Marugg y col. (1992)
	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	<i>E. coli</i> V850	pSRQ11.2	Marugg y col. (1992)
	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	<i>E. coli</i> V850	pSRQ220	Marugg y col. (1992)
	<i>P. acidilactici</i> LB42-923	<i>E. coli</i> JM109	pMBR1.0	Bukhtiyarova y col. (1992)
	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	<i>P. pentosaceus</i> PPE1.2	pMC117	Chikindas y col. (1995)
	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	<i>P. pentosaceus</i> PPE1.2	pSRQ220	Venema y col. (1995)
	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	<i>P. pentosaceus</i> PPE1.2	pMC117	Venema y col. (1995)
	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	<i>L. lactis</i> IL1403	pMC117	Chikindas y col. (1995)
	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	<i>L. lactis</i> LL108	pMC117	Chikindas y col. (1995)
	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	<i>L. lactis</i> MM210	pMC117	Buyong y col. (1998)
	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	<i>Lb. sakei</i> Lb790 (pSAK20)	pPED1	Axelsson y col. (1998)
	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	<i>Lb. sakei</i> Lb790 (pSAK20)	pPED2	Axelsson y col. (1998)
	<i>P. acidilactici</i> 347	<i>L. lactis</i> IL1403	pFI2126	Horn y col. (1998)
	<i>P. acidilactici</i> 347	<i>L. lactis</i> IL1403	pFI2126, pFI2148	Horn y col. (1999)
	<i>P. acidilactici</i> 347	<i>L. lactis</i> IL1403	pFI2160	Horn y col. (1999)
	<i>P. acidilactici</i> 347	<i>L. lactis</i> MG1614	pFI2126, pFI2148	Horn y col. (1999)
	<i>P. acidilactici</i> 347	<i>L. lactis</i> MG1614	pFI2160	Horn y col. (1999)
	<i>P. acidilactici</i> 347	<i>L. lactis</i> FI5876	pFI2126, pFI2148	Horn y col. (1999)
	<i>P. acidilactici</i> 347	<i>L. lactis</i> FI5876	pFI2160	Horn y col. (1999)
	<i>P. acidilactici</i> F	<i>E. coli</i> DH5a	pPC318	Coderre y Somkuti, 1999
	<i>P. acidilactici</i> F	<i>St. thermophilus</i> ST128	pPC418	Coderre y Somkuti, 1999
	<i>P. acidilactici</i> F	<i>L. lactis</i> ML3	pPC418	Coderre y Somkuti, 1999
	<i>P. acidilactici</i> F	<i>L. lactis</i> SLA1.1	pPC418	Coderre y Somkuti, 1999
	<i>P. acidilactici</i> F	<i>E. faecalis</i> DL3	pPC318	Coderre y Somkuti, 1999
	<i>P. acidilactici</i> 347	<i>L. lactis</i> IL1403	pJM03	Martínez y col. (2000)
	<i>P. acidilactici</i> 347	<i>L. lactis</i> IL1403	pJM04	Martínez y col. (2000)

precursores de la lactacina F por la maquinaria de secreción de las carnobacteriocinas. La enterocina B es una bacteriocina que, aunque carece de la secuencia consenso YGNGVXC, comparte ciertas similitudes con las secuencias de las bacteriocinas de la clase IIa y, especialmente, con la carnobacteriocina A (Casaus y col., 1997). Dado que el grado de homología es particularmente elevado (72% de identidad) dentro de las regiones correspondientes a los respectivos líderes, Franz y col. (1999) investigaron la posibilidad de que el sistema de transporte de tipo ABC de la carnobacteriocina reconociera al líder de la enterocina B. Efectivamente, la introducción de un plásmido con los genes estructurales (*entB*) y de inmunidad (*eniB*) de la enterocina B en *C. piscicola* LV17A (productora de carnobacteriocina A) permitió la coproducción de las dos bacteriocinas.

Fremaux y col. (1995) consiguieron producir mesentericina Y105, una bacteriocina de clase II producida por *Leuconostoc mesenteroides* Y105 (Hécharde y col., 1992), introduciendo un plásmido con el gen estructural (*mesY*) en *Lb. johnsonii* NCK64, una cepa no bacteriocinogénica pero que contiene los genes de transporte y procesamiento de la lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1987). La producción de mesentericina fue baja, lo que posiblemente se deba, como en el caso anterior, a una menor afinidad del sistema de exportación de la lactacina F por la bacteriocina citada. La leucocina A es otra bacteriocina de clase II, en este caso producida por *Leuconostoc gelidum* UAL187, una cepa aislada de carne envasada a vacío (Hastings y Stiles, 1991). La introducción del gen estructural (*lcaA*) y del de inmunidad (*lcaB*) en una cepa de *L. lactis* que contenía el sistema de transporte de la lactococina A no se tradujo en la producción de leucocina A (van Belkum y Stiles, 1995). En contraste, el sistema de transporte de la leucocina A presente en *Lc. gelidum* UAL187-22 fue capaz de dirigir la producción de lactococina A tras su transformación con un plásmido que contenía los genes *lcnA* y *lciA* (van Belkum y Stiles, 1995). En ese mismo hospedador, la introducción del operón de la lactacina F permitió la coproducción de leucocina A y lactacina F (Allison y col., 1995b).

El primer estudio detallado del papel de las secuencias líder de bacteriocinas heterólogas de la clase II fue realizado por van Belkum y col. (1997). Estos autores generaron genes híbridos en los que las secuencias que codifican los líderes de la leucocina A, la lactococina A y la colicina V estaban fusionadas a la secuencia que codifica la divergicina A. Esta última es una bacteriocina producida por *C. divergens* LV13 que no tiene relación con las anteriores y que se secreta a través de la ruta general de secreción SEC (Worobo y col., 1995). Los plásmidos que contenían dichas fusiones (pLED1, pLAD6 y pCOD1, respectivamente) se introdujeron en *Lc. gelidum* UAL187-22, *L. lactis* (pMB500) y *E. coli* MC4100 (pHK22). Estos hospedadores portan los sistemas de transporte y procesado de la leucocina A, la lactococina A y la colicina V, respectivamente. Los diferentes líderes fueron capaces de dirigir la secreción de la divergicina en los hospedadores que contenían los sistemas de secreción homólogos. Además, ciertas combinaciones “líder-translocador” permitieron la producción de divergicina con transportadores heterólogos. En *Lc. gelidum* UAL187-22 (pCOD1), la secreción de divergicina dirigida por el líder de la colicina V no fue tan eficaz como el mismo proceso dirigido por el líder de la leucocina. En contraste, el líder de la colicina fue incapaz de dirigir el transporte de divergicina en *L. lactis* IL1403 (pMB500, pCOD1) empleando la maquinaria de secreción de la lactococina A. Por otra parte, se consiguió producir colicina V en *L. lactis* IL1403 (pMB500) tras su transformación con pLEC2. Este plásmido contenía la fusión “líder de la leucocina A-colicina V” bajo el control del promotor P32. Sin embargo, no se consiguió producir colicina cuando el mismo plásmido se introdujo en *Lc. gelidum* UAL187-22. El trabajo de van Belkum y col. (1997) confirmó la flexibilidad de los sistemas de secreción de bacteriocinas de la clase II para exportar y procesar correctamente bacteriocinas heterólogas pertenecientes a esa misma clase. Pero, por otra parte, también demostró que los elementos que componen dichos sistemas de translocación no son universalmente intercambiables. Sobre la base de un trabajo previo de Gilson y col. (1990), van Belkum y col. (1997) sugirieron que la hidrofobicidad del líder

heterólogo puede jugar un papel muy importante en el proceso de secreción , permitiendo o no la producción de la bacteriocina.

Tanto la pediocina PA-1 como la lactococina A son bacteriocinas de la clase II y, en consecuencia, candidatas para un intercambio de líderes que posibilite la producción de pediocina PA-1 en *L. lactis*. Horn y col. (1998) describieron la producción heteróloga de esta bacteriocina en *L. lactis* IL1403 mediante la introducción de pFI2126, un plásmido derivado de pTG262 que contenía una fusión entre la secuencia que codifican el líder de la lactococina A y la que codifica la pediocina PA-1 madura, precedida por el promotor de la lactococina A. *L. lactis* IL1403 fue elegida como hospedador porque porta en su cromosoma los genes *lcnC'* y *lcnD'*, que son análogos a los que codifican el aparato de transporte de la lactococina A (Stoddard y col., 1992; Venema y col., 1996). La cepa resultante, *L. lactis* FI9043, secretaba pediocina PA-1 activa, pero en una cantidad muy inferior a la del productor natural *P. acidilactici* 347 (Rodríguez y col., 1997). Previamente ya se habían descrito reducciones significativas en la productividad de lactococina A en la cepa IL1403 (Holo y col., 1991; van Belkum y col., 1991). Estas disminuciones pueden ser atribuidas al bajo número de copia de los genes cromosómicos *lcnC'D'* (Stoddard y col., 1992) y/o al hecho de que el producto de esos genes puede no ser completamente idéntico al aparato de transporte de la lactococina A (Venema y col., 1996). Si se comparan los resultados obtenidos por Chikindas y col. (1995) y por Horn y col. (1998) se puede deducir que, en *L. lactis*, la secreción de pediocina PA-1 utilizando el líder y el sistema de transporte de la lactococina A es más eficaz que el proceso equivalente dirigido por el líder y la maquinaria secretora de la propia pediocina PA-1.

La producción heteróloga de pediocina PA-1 en *L. lactis* IL1403 mejoró notablemente gracias a la introducción en el sistema de los genes *lcnCD* y al aumento de la dosis de estos genes mediante su clonación en un plásmido multicopia que también contenía el gen estructural híbrido (Horn y col., 1999). En

el mismo estudio, se consiguió la obtención de un derivado del productor de nisina *L. lactis* F15876, capaz de coproducir nisina A y pediocina PA-1 (Horn y col., 1999). Aunque la nueva cepa mantenía la misma productividad de nisina que la cepa parental, la cantidad de pediocina PA-1 producida por el lactococo coproductor fue muy pequeña (aproximadamente un 5% de la producida por *P. acidilactici* 347). No obstante, este hecho representó el primer paso en la construcción de bacterias lácticas que puedan producir dos o más bacteriocinas bien caracterizadas, de amplio espectro y con diferentes modos de acción.

Posteriormente, Morisset y Frére (2002) emplearon una táctica similar para producir pediocina PA-1 en *Lc. mesenteroides*. Para ello, introdujeron en las células hospedadoras un plásmido multicopia que contenía el gen híbrido estructural “líder mesentericina-pediocina PA-1 madura” y los genes que codifican el sistema de secreción de la mesentericina Y105 (*mesCDE*). En este caso, la producción de pediocina PA-1 por parte del hospedador heterólogo también fue similar a la del pediococo parental.

Axelsson y col. (1998) desarrollaron un modelo alternativo para la producción heteróloga de bacteriocinas en *Lb. sakei* Lb709 basado en el sistema de secreción y activación transcripcional de la sakacina A. Los genes para la biosíntesis de esta bacteriocina de la clase II están repartidos en dos operones (Axelsson y Holck, 1995). El primero contiene el gen de inmunidad y el estructural, mientras que el segundo comprende los genes (*orf4sapKRTE*) involucrados en la secreción y en la activación transcripcional del promotor de la sakacina A. En el estudio de Axelsson y col. (1998), el modelo propuesto requería la introducción de dos plásmidos en la cepa de *Lb. sakei*. El primero (pSAK) contenía el operón *orf4sapKRTE*, mientras que el segundo portaba el gen estructural y el de inmunidad de la sakacina P (*sppA*, *spiA*), la pediocina PA-1 (*pedA*, *pedB*) o la piscicolina 61 (*psc61*, *orfX*), bien bajo control de sus propios promotores (pSPP1, pPED1 o pPSC1, respectivamente) o bien bajo control del promotor de la sakacina A (pSPP2, pPED2 o pPSC2, respectivamente). La

producción de sakacina P y pediocina PA-1 únicamente fue posible en presencia del promotor de la sakacina A. En contraste, se obtuvieron cantidades significativas de piscicolina 61 independientemente del promotor usado, probablemente debido a la gran similitud existente entre los elementos reguladores que se encuentran por delante de los promotores de la sakacina A y de la piscicolina 61 (Worobo y col., 1994). En las condiciones descritas, la producción de las tres bacteriocinas fue similar a la obtenida en las respectivas cepas parentales.

II.7.5. Producción heteróloga de bacteriocinas mediante la adición de péptidos señal reconocidos por los sistemas SEC

En contraste con las bacteriocinas de las bacterias lácticas, la mayoría de las proteínas procarióticas que se secretan poseen un péptido señal aminoterminal que permite su acceso a la ruta de secreción general (SEC) (Pugsley, 1993). No obstante, Zhang y col. (1995) mostraron que la bacteriocina colicina V podía ser exportada al periplasma de *E. coli* si la parte del gen estructural que codifica la colicina V madura se precede de la secuencia que codifica el péptido señal de la proteína OmpA.

De forma similar, una fusión de las secuencias que codifican el precursor de la proteína ligadora de matosa (pre-MBP) y la pediocina PA-1 condujo a la obtención de la proteína quimérica en el periplasma de *E. coli* (Miller y col., 1998a). La pre-MBP contiene un péptido señal que es reconocido por el sistema SEC de *E. coli*. Estos investigadores optaron por expresar y secretar pediocina PA-1 como parte de una proteína quimérica secretada por un sistema SEC para evitar la toxicidad celular asociada a la síntesis de proteínas de membrana, tales como las que componen el sistema de transporte de la pediocina PA-1 (PedC y PedD). La proteína quimérica “pre-MBP-pediocina PA-1” sirvió como modelo para

construir diversos mutantes de la pediocina PA-1 con los que estudiar las relaciones entre la estructura y la función de esta bacteriocina.

En la última década, se ha caracterizado un pequeño número de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas que emplean el sistema SEC para su transporte y procesado. Entre ellas se encuentran la divergicina A de *C. divergens* LV13 (Worobo y col., 1995), la acidocina B de *Lb. acidophilus* M46 (Leer y col., 1995) y la enterocina P de *E. faecium* P13 (Cintas y col., 1997). Más concretamente, los estudios de Worobo y col. (1995) y de Leer y col. (1995) han permitido la producción heteróloga de bacteriocinas biológicamente activas utilizando una nueva estrategia: la fusión entre una secuencia que codifique un péptido señal SEC y otra que codifique una bacteriocina madura.

En este contexto, se ha conseguido la producción de divergicina A en células de *C. piscicola* LV17A, LV17B, LV17C y UAL 26 y de *L. lactis* IL1403 y MG1363 transformadas con un plásmido que únicamente portaba los genes estructural (*dvnA*) y de inmunidad (*dviA*) de la divergicina A (Worobo y col., 1995). Este trabajo demostró que el péptido señal de la divergicina A es reconocido por los sistemas SEC de hospedadores heterólogos. Del mismo modo, estos mismos autores consiguieron que una bacteria Gram-negativa, *E. coli* DH5 α , produjera fosfatasa alcalina cuando su péptido señal nativo fue reemplazado por el de la divergicina A.

Esta estrategia también permite la coproducción de bacteriocinas. Por ejemplo, la transformación de *C. divergens* LV13 con un plásmido que contenía el gen de inmunidad de la carnobacteriocina B2 y una fusión “péptido señal de la divergicina A-carnobacteriocina B2 madura” resultó en la obtención de divergicina A y de carnobacteriocina B2 correctamente procesada (McCormick y col., 1996). Este estudio proporcionó el primer ejemplo de cepa multibacteriocinogénica segura y, por lo tanto, aplicable en la industria alimentaria. Además, también se

consiguió la producción de carnobacteriocina B2 en *C. piscicola* LV17C y UAL 26, *C. divergens* UAL 278 y *L. lactis* IL1403. Posteriormente, McCormick y col. (1999) emplearon el mismo sistema para producir colicina V en *C. piscicola* LV17C y UAL 26, *C. divergens* LV13 y *L. lactis* IL1403. Para ello, en el gen híbrido anterior se sustituyó la secuencia que codifica la carnobacteriocina B2 madura por la que codifica la colicina V madura. Aunque el espectro de inhibición de la colicina V es reducido, el sistema desarrollado puede servir como modelo para la producción en bacterias lácticas de otros péptidos antimicrobianos (procariotas o eucariotas) capaces de inhibir bacterias patógenas de especial preocupación para la industria alimentaria, como *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* o las cepas enterohemorrágicas de *E. coli* (McCormick y col., 1999).

La creación de un gen híbrido “péptido señal de la divergicina A-mesentericina Y105 madura” también ha permitido la producción de dicha bacteriocina en los hospedadores heterólogos *E. coli* DH5 α , *Lc. mesenteroides* DSM20484 y *Lc. cremoris* LC (Biet y col., 1998). En contraste, estos autores no consiguieron su producción en *L. lactis* IL1403 o RD230. En el mismo estudio, Biet y col. (1998) construyeron dos sistemas de producción heteróloga de mesentericina Y105 que, aunque eran directamente comparables, se diferenciaban en el sistema de transporte y procesado; más concretamente, en un sistema la bacteriocina se exportaba utilizando su propio sistema de transporte de tipo ABC, mientras que en el otro utilizaba el sistema SEC de la divergicina A. La producción de mesentericina Y105 en el modelo ABC fue cuatro veces mayor que la obtenida en el modelo SEC, lo que confirma que los sistemas de tipo ABC permiten una secreción más eficaz de bacteriocinas. Franz y col. (1999) también lograron obtener enterocina B en el hospedador heterólogo *E. faecalis* ATCC 19435 introduciendo un plásmido con la correspondiente fusión “péptido señal de la divergicina A-enterocina B madura”

Las levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*, son hospedadores utilizados frecuentemente para la expresión de proteínas en los ámbitos industriales y académicos debido a que, por una parte, se les puede aplicar las técnicas para la manipulación molecular de procariotas y, por otra, a que gozan de la versatilidad de los sistemas eucarióticos. Por lo que respecta a las bacteriocinas, Schoeman y col. (1999) investigaron la posibilidad de controlar a las bacterias alterantes que pueden crecer durante las fermentaciones dirigidas por levaduras mediante la producción de pediocina PA-1 en *S. cerevisiae*. Para ello, insertaron el gen *pedA* en un cassette bajo control del promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa I (*ADH1*). En dicho cassette, la secreción de la bacteriocina estaba dirigida por la señal de secreción del factor α de la feromona de levadura (*Mf α 1_S*). Tras la introducción de la construcción en *S. cerevisiae*, los bioensayos revelaron la producción de pediocina biológicamente activa. Sin embargo, la actividad de los sobrenadantes era baja ya que la mayor parte de las moléculas del péptido heterólogo estaban unidas a las células. En consecuencia, estos autores sugirieron que la producción extracelular de la bacteriocina se podría mejorar aumentando el nivel de expresión de *pedA* y/o aumentando la secreción de la pediocina recombinante. Más recientemente, Van Reenen y col. (2003) intentaron producir plantaricina 423, una bacteriocina muy similar a la pediocina PA-1, en *S. cerevisiae* siguiendo la misma estrategia de Schoeman y col. (1999) y observaron las mismas limitaciones.

Las bacteriocinas que se han conseguido producir en bacterias lácticas heterólogas unidas a un péptido señal SEC se muestran en la Tabla II.5. Como han señalado Cormick y col. (1996) se desconoce la razón exacta por la que la inmensa mayoría de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas poseen un sistema de transporte específico cuando se ha demostrado que también podrían tener acceso a los sistemas SEC si estuvieran provistas de un péptido señal adecuado. Es posible que estos péptidos antimicrobianos empleen maquinarias de exportación dedicadas específicamente a esa misión porque, de

Tabla II.5. Bacteriocinas producidas heterológamente en bacterias lácticas empleando un sistema de secreción SEC

Bacteriocina	Hospedador nativo	Hospedador heterologo	Vector	Referencia
Brococina-C	<i>B. campestris</i> ATCC 43754	<i>C. piscicola</i> LV17C	pVB-2	Bohaychuk y col. (1999)
	<i>B. campestris</i> ATCC 43754	<i>C. piscicola</i> UAL 26	pVB-2	Bohaychuk y col. (1999)
	<i>B. campestris</i> ATCC 43754	<i>C. divergens</i> UAL278	pVB-2	Bohaychuk y col. (1999)
Carnobacteriocina B2	<i>C. piscicola</i> LV17	<i>C. divergens</i> LV13	pJKM14	McCormick y col. (1996)
	Colicina V	<i>E. coli</i>	<i>C. piscicola</i> UAL 26	pJKM37
<i>E. coli</i>		<i>C. piscicola</i> LV17C	pJKM37	McCormick y col. (1999)
<i>E. coli</i>		<i>C. divergens</i> LV13	pJKM37	McCormick y col. (1999)
<i>E. coli</i>		<i>L. lactis</i> IL1403	pJKM37	McCormick y col. (1999)
Divergicina A		<i>C. divergens</i> LV13	<i>C. piscicola</i> UAL 26	pCD4.4
	<i>C. divergens</i> LV13	<i>C. piscicola</i> LV17A, B y C	pCD4.4	Worobo y col. (1995)
	<i>C. divergens</i> LV13	<i>C. piscicola</i> LV17C	pRW5.6	Worobo y col. (1995)
	<i>C. divergens</i> LV13	<i>L. lactis</i> MG1363	pRW5.6	Worobo y col. (1995)
	<i>C. divergens</i> LV13	<i>L. lactis</i> IL1403	pRW5.6	Worobo y col. (1995)
Enterocina B	<i>E. faecium</i> BFE 900	<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	pCMAP03	Franz y col. (1999)
	<i>E. faecium</i> BFE 900	<i>C. piscicola</i> LV17A	pCMAP04	Franz y col. (1999)
MBP-pediocina PA-1	<i>P. acidilactici</i> LB42-923	<i>E. coli</i> E609L	pPR6821	Miller y col. (1998a)
Mesentericina Y105	<i>Lc. mesenteroides</i> Y105	<i>E. coli</i> DH5a	pFBYC02	Biet y col. (1998)
	<i>Lc. mesenteroides</i> Y105	<i>L. cremoris</i> LC	pFBYC07	Biet y col. (1998)

esa manera, el proceso sea más eficaz. Ya se ha comentado anteriormente que Biet y col. (1998) compararon la producción heteróloga de mesentericina Y105 empleando ambos mecanismos de secreción y observaron que, bajo condiciones idénticas, la cantidad de bacteriocina producida vía SEC era cuatro veces inferior a la obtenida utilizando el sistema dedicado. Teniendo en cuenta que los líderes de las bacteriocinas no son completamente intercambiables, estos autores sugirieron que, en el futuro, la producción heteróloga de bacteriocinas se limitará al empleo de los sistemas de transporte propios de cada bacteriocina y de cepas hospedadoras que sean lo más homólogas posibles al productor natural.

II.7.6. Tendencias futuras en la producción heteróloga de bacteriocinas

El desarrollo de sistemas para la producción heteróloga de bacteriocinas de bacterias lácticas, independientemente de que estén basados en transportadores de tipo ABC o en sistemas SEC, puede contribuir a superar los problemas prácticos (escasa adaptación, baja producción, inestabilidad genética, interacción con ciertos componentes, etc.) que estos péptidos antimicrobianos y/o las bacterias productoras deben superar cuando se encuentran en los alimentos (Rodríguez y col., 2002).

La sobreexpresión de los genes estructurales y/o de los que codifican los sistemas de secreción recurriendo a promotores y vectores de grado alimentario, como por ejemplo los basados en los promotores inducibles *PnisA* (Kuipers y col., 1995; 1998; de Ruyter y col., 1996a; Kleerebezem y col., 1997) o *Pgad* (en el que NaCl actúa como agente inductor) (Sanders y col., 1997; 1998), puede ser otra alternativa para mejorar la productividad de bacteriocinas heterólogas. De hecho, Kemperman y col. (1999) consiguieron aumentar la secreción de pediocina PA-1 en *L. lactis* tras sobreexpresar el gen *pedC* bajo control de *Pgad*. Previamente, Venema y col. (1995) habían observado que la sobreexpresión de *pedD* conducía a un aumento de la producción de pediocina en pediococos lactococina A.

Obviamente, los sistemas desarrollados hasta este momento para la producción heteróloga de bacteriocinas pueden tener ciertas limitaciones. Por ejemplo, los niveles de producción suelen ser todavía bajos; además, algunos sistemas pueden ser útiles para algunos hospedadores pero no para otros. Por lo tanto, habrá que optimizar sistemas que sean adecuados para aplicaciones específicas, lo que implicará que las bacterias sean de grado alimentario. El uso de organismos modificados genéticamente para la producción *in situ* de bacteriocinas se enfrentará a importantes barreras legales, además de la oposición de las industrias y consumidores, a menos que se les convezca de sus ventajas, hecho que parece improbable a medio plazo.

Capítulo III

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. MATERIAL

III.1.1. Material biológico

III.1.1.1. Microorganismos y medios de cultivo

Las cepas de *E. coli* y de *L. lactis* empleadas en la realización de este trabajo, así como su origen y sus características más relevantes, se muestran en la Tablas III.1 y III.2, respectivamente. Además de las cepas citadas en dichas Tablas, otras cepas que tuvieron particular relevancia en el desarrollo de este trabajo fueron *P. acidilactici* 347 (cepa productora de pediocina PA-1) (Rodríguez y col., 1997), *L. lactis* WM4 (cepa productora de lactococina A) (Scherwitz-Harmon y McKay, 1987) y *E. coli* ATCC14763 (cepa productora de colicina V). Las cepas empleadas como indicadores de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas lactococina A, pediocina PA-1, colicina V y nisina A se presentan en las secciones de este capítulo dedicadas al análisis de la producción de estos péptidos antimicrobianos por parte de las cepas recombinantes.

El medio de cultivo empleado rutinariamente para el crecimiento de los lactococos fue el medio M17 complementado con un 0,5% (p/v) de glucosa (caldo GM17). Para el cultivo de *P. acidilactici* 347 se utilizó caldo MRS, mientras que las cepas de *E. coli*, se crecieron en caldo L. Los medios sólidos se prepararon añadiendo un 1,5% (p/v) de agar a los correspondientes caldos. Todos los medios fueron suministrados por Oxoid (Basingstoke, Reino Unido) y se prepararon siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las bacterias lácticas se crecieron habitualmente a 32°C sin agitación y las cepas de *E. coli* a 37°C y en agitación. Todos los microorganismos se mantuvieron en congelación a -20 y -80 °C en los correspondientes caldos con un 15% (v/v) de glicerol.

Los antibióticos añadidos a los medios de cultivo como agentes de

Tabla III.1. Cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo

Cepa	Hospedador	Plásmido	Genes ^a			
			<i>nIcnA</i> ^b	<i>nLpedA</i> ^c	<i>nLcvaC</i> ^d	<i>nLil2m</i> ^e
MC1022 ^f						
FI5495	MC1022	pTG262				
FI9959	MC1022	pFI2400	+ (d)			
FI9939	MC1022	pFI2396	+ (d)			
FI9940	MC1022	pFI2397	+ (i)			
FI9923	MC1022	pFI2394		+ (d)		
FI10034	MC1022	pFI2391		+ (d)		
FI10035	MC1022	pFI2392		+ (i)		
FI10045	TOP10F1 ^g	pFI2435			+ (d)	
FI10046	MC1022	pFI2436			+ (d)	
FI10047	MC1022	pFI2437			+ (i)	
FI9960	TOP10F1'	pFI2401				+ (d)
FI9945	MC1022	pFI2398				+ (d)
FI9946	MC1022	pFI2399				+ (i)

^a(d): genes clonados en orientación directa; (i): genes clonados en orientación inversa.

^b*nIcnA*: genes *IcnA* y *IciA* precedidos por el promotor de la nisina.

^c*nLpedA*: gen híbrido "líder de la lactococina A-propediocina PA-1", precedido por el promotor de la nisina.

^d*nLcvaC*: gen híbrido "líder de la lactococina A-procolicina V", precedido por el promotor de la nisina;

^e*nLmIL2*: gen híbrido "líder de la lactococina A-pronterleuquina-2 murina", precedido por el promotor de la nisina

^fCasadaban y Cohen (1980).

^gcepa suministrada por Invitrogen

Tabla III.2. Cepas de *L. lactis* empleadas en este trabajo

Cepa	Hospedador	Plásmido	Genes ^a				
			<i>nIcnA</i> ^b	<i>nLpedA</i> ^c	<i>IcnCD</i>	<i>Nis</i> ^d	Δ <i>nis</i> ^e
FI7847 ^f							+
FI5876 ^g						+	
FI9941	FI7847	pFI2396	+ (d)				+
FI9951	FI5876	pFI2396	+ (d)			+	
FI9942	FI7847	pFI2397	+ (i)				+
FI9952	FI5876	pFI2397	+ (i)			+	
FI9943	FI7847	pFI2396 pFI2148	+ (d)				+
FI9953	FI5876	pFI2396 pFI2148	+ (d)			+	
FI9944	FI7847	pFI2397 pFI2148	+ (i)				+
FI9954	FI5876	pFI2397 pFI2148	+ (i)			+	
FI9913	FI7847	pFI2391		+ (d)			+
FI10036	FI5876	pFI2391		+ (d)		+	
FI9915	FI7847	pFI2392		+ (i)			+
FI10037	FI5876	pFI2392		+ (i)		+	
FI9917	FI7847	pFI2391 pFI2148		+ (d)	+		+
FI10038	FI5876	pFI2391 pFI2148		+ (d)	+	+	
FI9919	FI7847	pFI2392 pFI2148		+ (i)	+		+
FI10039	FI5876	pFI2392 pFI2148		+ (i)	+	+	

^a(d): genes clonados en orientación directa; (i): genes clonados en orientación inversa.

^b*nIcnA*: genes *IcnA* y *IciA* precedidos por el promotor de la nisina.

^c*nLpedA*: gen híbrido "líder de la lactococina A-propediocina PA-1", precedido por el promotor de la nisina.

^d*Nis*: contiene el transposón Tn5301 con la agrupación de genes de la nisina.

^e Δ *nis*: contiene los genes *nisRK* pero no produce nisina y es sensible a la misma debido a una deleción que afecta al gen *nisA*. ^fDodd y col. (1996). ^gDodd y col. (1990).

Tabla III.2 (cont.). Cepas de *L. lactis* empleadas en este trabajo

Cepa	Hospedador	Plásmido	Genes ^a					
			<i>nLcvaC</i> ^b	<i>nLil2m</i> ^c	<i>lcnCD</i>	<i>Nis</i> ^d	Δ <i>nis</i> ^e	
FI10048	FI7847	pFI2436	+	(d)				+
FI10052	FI5876	pFI2436	+	(d)			+	
FI10049	FI7847	pFI2437	+	(i)				+
FI10053	FI5876	pFI2437	+	(i)			+	
FI10050	FI7847	pFI2436 pFI2148	+	(d)				+
FI10054	FI5876	pFI2436 pFI2148	+	(d)			+	
FI10051	FI7847	pFI2437 pFI2148	+	(i)				+
FI10055	FI5876	pFI2437 pFI2148	+	(i)			+	
FI9947	FI7847	pFI2398			+	(d)		+
FI9955	FI5876	pFI2398			+	(d)	+	
FI9948	FI7847	pFI2399			+	(i)		+
FI9956	FI5876	pFI2399			+	(i)	+	
FI9949	FI7847	pFI2398 pFI2148			+	(d)		+
FI9957	FI5876	pFI2398 pFI2148			+	(d)	+	
FI9950	FI7847	pFI2399 pFI2148			+	(i)		+
FI9958	FI5876	pFI2399 pFI2148			+	(i)	+	

^a(d): genes clonados en orientación directa; (i): genes clonados en orientación inversa.

^b*nLcvaC*: gen híbrido "líder de la lactococina A-procolicina V", precedido por el promotor de la nisina.

^c*nLmIL2*: gen híbrido "líder de la lactococina A-prointerleuquina 2 murina", precedido por el promotor de la nisina.

^d*Nis*: contiene el transposón Tn5301 con la agrupación de genes de la nisina.

^e Δ *nis*: contiene los genes *nisRK* pero no produce nisina y es sensible a la misma debido a una delección que afecta al gen *nisA*.

selección en los experimentos de clonación fueron: ampicilina ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$ para *E. coli*), cloranfenicol ($15 \mu\text{g ml}^{-1}$ para *E. coli* y $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ para lactococos) y eritromicina ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$ para lactococos). Todos los antibióticos fueron suministrados por Sigma. La nisina exógena necesaria para inducir el promotor *PnisA* en ciertos lactococos fue proporcionada amablemente por Aplin & Barret (Trowbridge, Reino Unido) y se añadía al medio de crecimiento a una concentración de 100 ng/ml^{-1} .

III.1.1.2. Vectores

Los plásmidos utilizados como vectores de clonación (pCR2.1; Invitrogen) o de expresión (pTG262; Dodd y col., 1995) con sus principales características se muestran en la Fig. III.1.

III.1.1.3. Anticuerpos anti-peptídicos frente a la colicina V

El péptido sintético PNC ($\text{NH}_2\text{-S-T-H-K-P-N-P-A-M-S-P-S-G-L-G-G-T-I-K-Q-COOH}$) comprende 20 aminoácidos de la colicina V. y fue sintetizado químicamente por la empresa Alpha Diagnostic International (San Antonio, EE.UU.). Su potencial inmunógeno se evaluó analizando diversos parámetros, como sus índices hidrofílico y antigénico, mediante los programas desarrollados por el Genetics Computer Group (GCG) de la Universidad de Wisconsin. La preparación de los conjugados para las inmunizaciones y los ensayos inmunoenzimáticos se realizaron de la forma descrita por Martínez y col. (1999). Se inmunizaron dos conejos macho de la raza White New Zealand, que se mantuvieron en el animalario de la empresa que suministró el péptido. A cada conejo se le administraron aproximadamente $450 \mu\text{g/dosis}$ del conjugado PNC-KLH, emulsionados en una mezcla a partes iguales (v/v, 1 ml total) de adyuvante de Freund (Sigma). Los animales recibieron un total de 5 dosis del inmunógeno (días 0, 14, 21, 35 y 45), inoculadas por vía intramuscular. En la primera inyección se empleó el Adyuvante Completo de

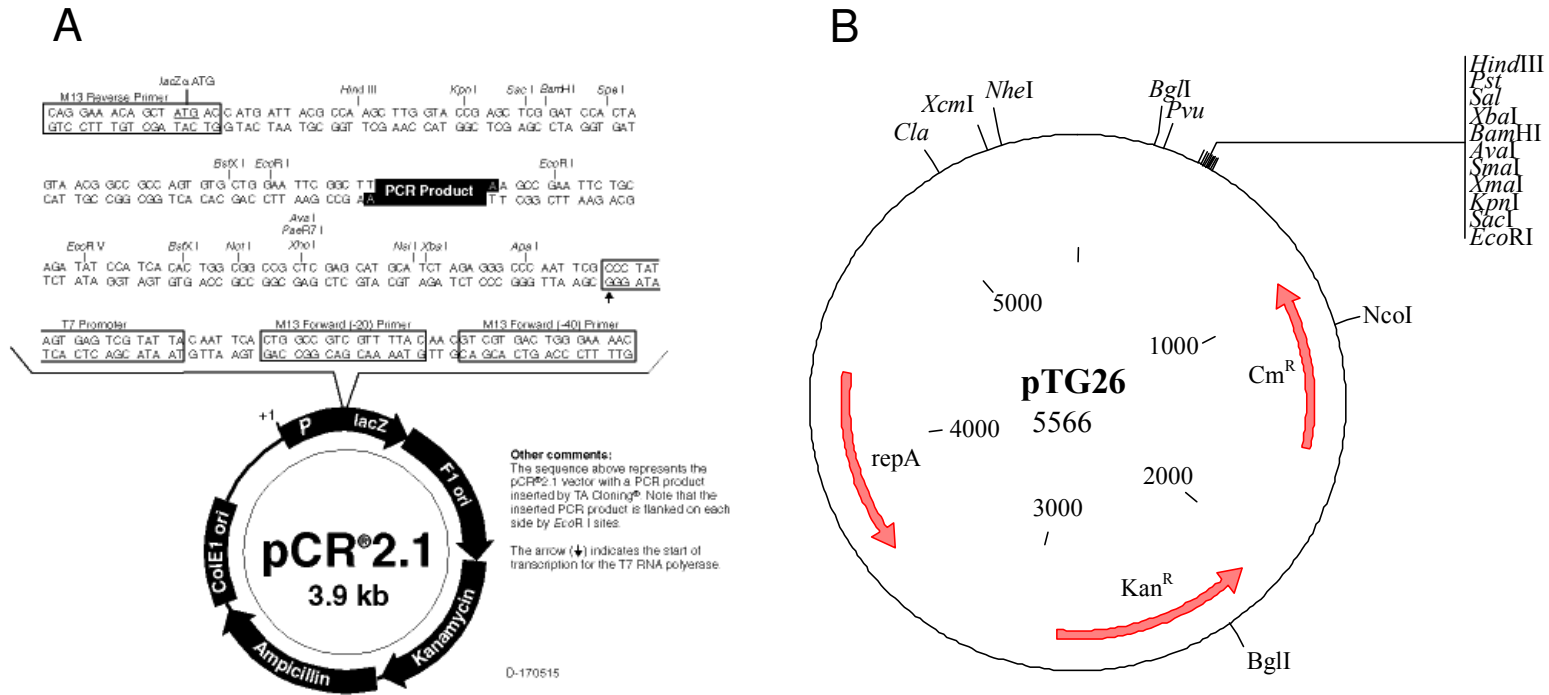


Fig. III.1. Mapa de los plásmidos pCR2.1(A) y pTG262 (B), empleados en este trabajo como vectores de clonación y expresión, respectivamente

Freund, siendo sustituido por el Incompleto en las inoculaciones posteriores.

Antes de la primera inoculación se realizó una sangría inicial de los conejos para determinar la ausencia de reactividad de los animales frente al antígeno utilizado. El día 56 se efectuó una sangría parcial y el día 63 se realizó una sangría final de los conejos, que fueron sacrificados posteriormente mediante una inyección letal de pentobarbital sódico. La sangría parcial se realizó mediante punción en la vena marginal de la oreja, mientras que la final se efectuó a partir de las arterias marginales de ambas orejas. La sangre extraída se conservó en refrigeración durante 24 h para favorecer la coagulación y el suero se obtuvo mediante centrifugación a 2.500 rpm durante 20 min. El suero resultante se conservó a -20°C hasta su evaluación. Tras las sangrías se comprobó el título de los sueros de los dos animales mediante un ensayo ELISA indirecto de serotitulación, realizado de la forma descrita por Martínez (2000). Posteriormente, la presencia de colicina V en los sobrenadantes de los lactococos se evaluó mediante un ensayo de tipo *dot-blot* (Martínez y col., 2000).

III.1.1.4. Cultivos celulares

Las líneas celulares empleadas en esta Tesis Doctoral se describen en las secciones III.2.5.4 y III.2.6.

III.1.2. Material de laboratorio

Para la preparación de los tampones y disoluciones acuosas se empleó agua destilada, obtenida en un aparato de filtración Millipore mod. Elix 3 y agua bidestilada, obtenida en un destilador Nanopure mod. Barnstead. Los tampones se disolvieron mediante agitación electromagnética y en algunos casos aplicando calor, con placas Nuova II mod. Thermolyne. Los agitadores de tubos empleados fueron Heidolph mod. REAX 2.000. Las pesadas

ordinarias se efectuaron en una balanza monoplato AND mod. EW-600A. Para las pesadas de precisión se utilizó la balanza analítica AND mod. ER-120A. Las determinaciones y ajustes de pH se llevaron a cabo en un pHmetro Crison mod. MicropH 2001.

Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga refrigerada Sorvall mod. RC-5B, equipada con rotores SS-34 y GSA. Para centrifugar pequeños volúmenes de muestra se utilizaron centrífugas Heraeus mod. Biofuge A, equipada con rotor 1.220, y Stratagene mod. Picofuge HF-120.

La esterilización del material utilizado en este trabajo se realizó en un autoclave Selecta mod. Autester G, utilizando cintas de papel indicador para comprobar la efectividad del proceso. La esterilización de material de vidrio se realizó por calor seco en una estufa de aire forzado Heraeus mod. KFTU-K. El resto de las soluciones y los sobrenadantes de los cultivos bacterianos se esterilizaron por filtración, con filtros Millipore de 0,22 μm de diámetro de poro. Las filtraciones de las soluciones que no requerían condiciones de esterilidad se realizaron con filtros Whatman.

Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en espectrofotómetros Kontron mod. Uvikon 820 e Hitachi mod. U-2000. Las determinaciones espectrofotométricas para la evaluación de actividad antimicrobiana se efectuaron en placas microtituladoras estériles Costar mod. 3590 empleando un lector de placas Labsystems mod. iEMS Reader MF. En las técnicas inmunoenzimáticas se utilizaron placas de ELISA de poliestireno de 96 pocillos Nunc mod. Maxisorp. La agitación de las placas se llevó a cabo en agitadores de placas de ELISA Wallac mod. 1.296-001 Delfia Plateshake. En estos ensayos, las medidas de absorbancia también se realizaron en el lector Labsystems mod. iEMS Reader MF.

Las muestras y reactivos que así lo requerían se conservaron en

congeladores Heraeus y Liebherr mod. GT6102, y en frigoríficos Liebherr mod. 38. Las incubaciones se realizaron en estufas Heraeus mod. KB-500, BK-600 y B6200 y Selecta mod. Termotronic 338, termostatadas a la temperatura deseada. Los tratamientos térmicos e incubaciones que requerían un control más preciso de la temperatura se realizaron en baños de agua termostatados Selecta mod. Unitronic 6320100 y Grant mod. W14. Las incubaciones en agitación se realizaron en un incubador-agitador orbital Lab-line mod. 35.271.

Las amplificaciones de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se llevaron a cabo en termocicladores Techne mod. Progene, equipados con tapa calefactora. Los oligonucleótidos usados como cebadores se sintetizaron en un sintetizador automático de DNA Applied Biosystems mod. 381A. Las electroforesis en geles de agarosa se efectuaron en cubetas de electroforesis horizontal Gibco mod. Horizon 58, conectadas a fuentes de alimentación Bio-Rad mod. 3000Xi. Las electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa se realizaron en cubetas de electroforesis horizontales para ácidos nucleicos Gibco BRL mod. HORIZON 58 y Bio-Rad mod. Sub-Cell GT. Se emplearon fuentes de alimentación Gibco BRL mod. 250 Power Supply y Bio-Rad mod. Power Pac 300. La visualización de las bandas de DNA teñidas con bromuro de etidio se realizó en un transiluminador de luz UV Spectroline mod. TL-132. La visualización de los fragmentos de DNA se llevó a cabo utilizando un transiluminador de luz ultravioleta Spectroline mod. TL-312A y un transiluminador de luz ultravioleta acoplado a un sistema de documentación de imágenes BioRad mod. Gel-Doc.

Las reacciones de secuenciación de DNA se llevaron a cabo en un secuenciador automático de DNA Applied Biosystems mod. 373A. La electroporación de células electrocompetentes se realizó en un electroporador Bio-Rad mod. Gene Pulser empleando cubetas de 0,2 cm.

La desecación a vacío de las muestras de DNA se efectuó en un desecador Thomas conectado a una bomba de vacío Eyela mod. A-3S. Las liofilizaciones se realizaron en un liofilizador Terruzi-Melvisa mod. TP3, dotado de equipo de registro, dispositivo de termovacío y programador.

El material general de laboratorio se componía de pipetas Pasteur, pipetas automáticas Gilson mods. P-20, P-200, P-1000 y HTL mods. VE-20, VE-200 y VE-1000, pipetas multicanales Labsystem mod. Finipipette, pipeteadores automáticos Bibby mod. 3100B, placas calefactoras y agitadoras Thermolyne mod. Nuova II y Bibby mod. B212, agitadores de tubos Heidolph mod. Reax 2000 y dispensadores de medios de cultivo Nichiryo mod. 2100DG y Brand mod. Dispensette. Se emplearon además, mecheros de gas, termómetros, jeringuillas, agujas, hojas de bisturí, etc. El material de vidrio empleado fue de tipo "Pirex" y el de plástico de Nunc, Falcon, Sterilin y Eppendorf.

III.1.3. Productos y reactivos

Los productos químicos de uso general fueron suministrados por Merck, Sigma, Fluka (Buchs, Suiza) y Panreac (Barcelona, España). Los productos utilizados en las experiencias microbiológicas fueron de las marcas Oxoid (Basingstoke, Reino Unido), Difco (Franklin Lakes, EE.UU) y Biomerieux (Marcy l'Etoile, Francia). Los antibióticos añadidos a los medios de cultivo se adquirieron a Sigma.

En las técnicas genéticas se emplearon reactivos con calidad *para biología molecular* suministrados por los siguientes proveedores (por orden alfabético): Appligene (Heidelberg, Alemania), Bioline Ltd. (Londres, Reino Unido), Bio-Rad (Hercules, EE.UU.), Biotools (Madrid, España), Cruachem (Glasgow, Reino Unido), Ecogen (Barcelona, España), Flowgen (Ashby de la Zouch, Reino Unido) Gibco BRL (Crewe, Reino Unido), Invitrogen (San Diego, EE.UU.), Perkin-Elmer (Boston, EE.UU.), Promega (Madison, EE.UU.),

Qbiogene (Carlsbad, EE.UU.), Qiagen (Hilden, Alemania) y Sigma (St. Louis, EE.UU.). Para el aislamiento, purificación y secuenciación de ácidos nucleicos se usaron *kits* de Applied Biosystems (Foster City, EE.UU.), Qiagen y Roche (Basilea, Suiza). En las técnicas de biología celular y en los inmunoensayos se utilizaron reactivos de Bio-Rad, Gibco BRL, Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia), Signet (Cambridge, Reino Unido) y Roche. El material necesario para las autorradiografías (películas, revelador y fijador) fue suministrado por Kodak (Rochester, EE.UU.) y Pharmacia Biotech.

III.2. MÉTODOS

III.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico

III.2.1.1. A partir de cultivos de *L. lactis*

La obtención del DNA plasmídico a partir de cepas de lactococos se realizó con los *kits* de aislamiento plasmídico de Qiagen, que combinan el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979) con el empleo de columnas de intercambio aniónico. El protocolo seguido fue básicamente el indicado por el fabricante, ligeramente modificado para adaptarlo a las características de las paredes celulares y membranas plasmáticas de estos microorganismos:

1. Las bacterias se crecieron en 10 ml de caldo GM17 a 32°C hasta alcanzar una A_{660} entre 0,6 y 0,7.
2. Los cultivos se centrifugaron (4.000 rpm, 10 min, 4°C) para obtener el sedimento celular.
3. El sedimento bacteriano se resuspendió en 300 μ l de una solución de lisozima (5 mg ml^{-1}) y mutanolisina (300 U ml^{-1}) en tampón P1 (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, RNAsa A 10 mg ml^{-1} , pH 8).

4. La suspensión celular se trasvasó a un tubo eppendorf y se incubó en un baño a 37°C durante 10 min. El EDTA, quelante de cationes divalentes, desestabiliza la membrana celular e inhibe las DNAsas; la lisozima y la mutanolisina debilitan las paredes celulares; la RNAsa, degrada el RNA.
5. A la muestra anterior se le añadieron 300 µl del tampón P2 (NaOH 200 mM, SDS 1% [p/v]). El detergente SDS produce la lisis de la membrana plasmática y desnaturaliza las proteínas, mientras que el hidróxido sódico desnaturaliza el DNA.
6. Los tubos se invirtieron suavemente varias veces hasta que la muestra ofreció un aspecto claro y una consistencia viscosa, señal indicativa de que se había producido la lisis bacteriana.
7. A continuación, se añadieron 300 µl del tampón P3 (acetato potásico 3 M, pH 5,5) preenfriado en un baño de hielo. Tras mezclar homogéneamente el tampón P3 con la muestra, los tubos se incubaron en hielo durante 5 min. El acetato potásico neutraliza el pH del medio y aumenta el contenido de sales de la muestra, provocando la precipitación de proteínas, DNA cromosómico, restos celulares y SDS. Sin embargo, la conformación de los plásmidos permite su renaturalización y, debido a su pequeño tamaño, permanecen en solución.
8. La muestra se centrifugó a 12.000 rpm y 4°C durante 15 min. El sobrenadante se depositó en una columna de intercambio aniónico, previamente equilibrada con 1 ml de tampón QBT (NaCl 750 mM, MOPS 50 mM, etanol 15%, Tritón X-100 0,15%, pH 7).
9. La columna se lavó con 4 ml de tampón QC (NaCl 1 M, MOPS 50 mM, etanol 15% [v/v], pH 7) para eliminar de la resina los restos de RNA y proteínas.

10. El DNA plasmídico se eluyó con 800 μ l de tampón QF (NaCl 1,25 M, Tris-HCl 50 mM, etanol 15% [v/v], pH 8,5).
11. La solución plasmídica se concentró precipitando el DNA con 560 μ l de iso- propanol y centrifugando la muestra a 12.000 rpm y 18°C durante 30 min.
12. El sedimento se lavó con 1 ml de una solución de etanol al 70% (v/v) en agua destilada, preenfriada a -20 °C, y se secó en un desecador conectado a una bomba de vacío, durante aproximadamente 10 min.
13. El sedimento desecado se resuspendió en 50 μ l de agua destilada estéril.

III.2.1.2. A partir de cultivos de *E. coli*

Los plásmidos de *E. coli* se obtuvieron habitualmente con los *kits* de aislamiento de DNA plasmídico de Qiagen previamente descritos en el aparatado anterior. En este caso, se siguieron rigurosamente las instrucciones del fabricante, ya que no es necesario el uso de lisozima y mutanolisina para romper las células de esta especie.

III.2.1.3. Visualización de los plásmidos

En general, 10 μ l de cada preparación se mezclaron con 2 μ l de una disolución de EDTA 0,1 M pH 8 con azul de bromocresol 0,05% (v/v), sacarosa 40% (p/v) y SDS 0,5% (p/v). El azul de bromocresol permite observar el avance del frente electroforético, la sacarosa aumenta la densidad de la muestra, favoreciendo el depósito de las mezclas en los pocillos, el EDTA inactiva la acción de posibles enzimas presentes en la muestra al

quelar los cationes divalentes y, finalmente, el SDS disocia los complejos DNA-proteínas que podrían dar lugar a interferencias durante la electroforesis.

La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V durante aproximadamente 1 h. Posteriormente, los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (1 mg ml^{-1}) (Sambrook y Russell, 2001) y las bandas de DNA se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta acoplado a un sistema de documentación de imágenes “BioRad” mod. Gel-Doc. Para determinar el tamaño de los plásmidos se empleó el estándar Supercoiled DNA ladder (Promega) que contiene 11 plásmidos de tamaño conocido, entre 2 y 10 kpb, siguiendo recomendaciones del fabricante.

III.2.2. Producción inducible de lactococina A en *L. lactis*

III.2.2.1. Construcción del fragmento *PnisA-IcnA-IciA*

La construcción de un fragmento de DNA en el que los genes *IcnA* y *IciA* estuvieran bajo el control del promotor inducible de la nisina (*PnisA*) se efectuó en tres etapas (Fig. III.2). En la primera fase, se amplificó la secuencia del promotor *PnisA*. Para ello, se recurrió a los cebadores pAD1 (5'-CCTGAATAATATAGAGATAGGTT-3') y pAD3 (5'-AAATTTAATTGATTTTTTCATTTTGAGTGCCTCC-3'), ya que delimitan exactamente el fragmento de 271 pb (fragmento 1) correspondiente a *PnisA* (Fig. III.2). El plásmido pF11003 (Karakas Sen y col., 1999) proporcionó la secuencia molde. El cebador PAD1 contenía un lugar de restricción para la enzima *EcoRI*, mientras que el pAD3 se diseñó de manera que los 17 nucleótidos del extremo 5' (subrayados) formaran una cola nucleotídica complementaria a la de la secuencia que codificaba el fragmento amino-terminal del líder de la lactococina A (Fig. III.2).

Los componentes de la reacción de PCR, que se mezclaron en un tubo eppendorf de 0,5 ml mantenido en un baño de hielo picado, fueron los

siguientes:

<u>Componente</u>	<u>Volumen</u> (μ l)	<u>Concentración</u>
Tampón de PCR (10x)	5	1x
Mezcla de dNTPs (10mM)	1	0,2 mM
MgCl ₂ (50 mM)	1,5	1,5 mM
cebador 1 (20 mM)	1	0,4 mM
cebador 2 (20 mM)	1	0,4 mM
Muestra	1	10-100 ng
DNA polimerasa (5 U μ l ⁻¹)	0,2	1 unidad
H ₂ O destilada estéril	39,3	

Habitualmente, la DNA polimerasa empleada en las construcciones génicas fue la BIO-X-ACT (Bioline Ltd., Londres, Reino Unido).

El programa de PCR utilizado fue: [(92°C, 2 min) x 1 ciclo] + [(92°C, 1 min; 37°C, 1 min; 72°C, 1 min) x 4 ciclos] + [(92°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1 min) x 22 ciclos]. El resultado de la PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TBE, de la forma descrita previamente para el DNA plasmídico (sección III.2.1.3). Para determinar el tamaño de las bandas de DNA se empleó el estándar 100 bp DNA ladder (Gibco BRL) que contiene 15 fragmentos de DNA de tamaño conocido entre 100 y 1.500 pb, y una banda adicional de 2.072 pb.

En la segunda etapa, se obtuvo el fragmento de 702 pb (fragmento 2) que comprende los genes *lcnA* y *lciA* del operón de la lactococina A mediante PCR a partir del plásmido pFI2058 (Horn y col., 1998), utilizando los cebadores pAD2 (5'-GGAGGCACTCAAAATGAAAAATCAATTAAATTT-3') y plcn2 (5'-ACCCCGGGATTGATGCCAGCTC-3'; Horn y col., 1998) (Fig. III.2). En este caso, los 16 nucleótidos subrayados del extremo 5' del cebador pAD2 eran complementarios a la región 3' del promotor de la nisina, mientras que la secuencia de plcn2 incluía un lugar de restricción para la enzima *Bam*HI.

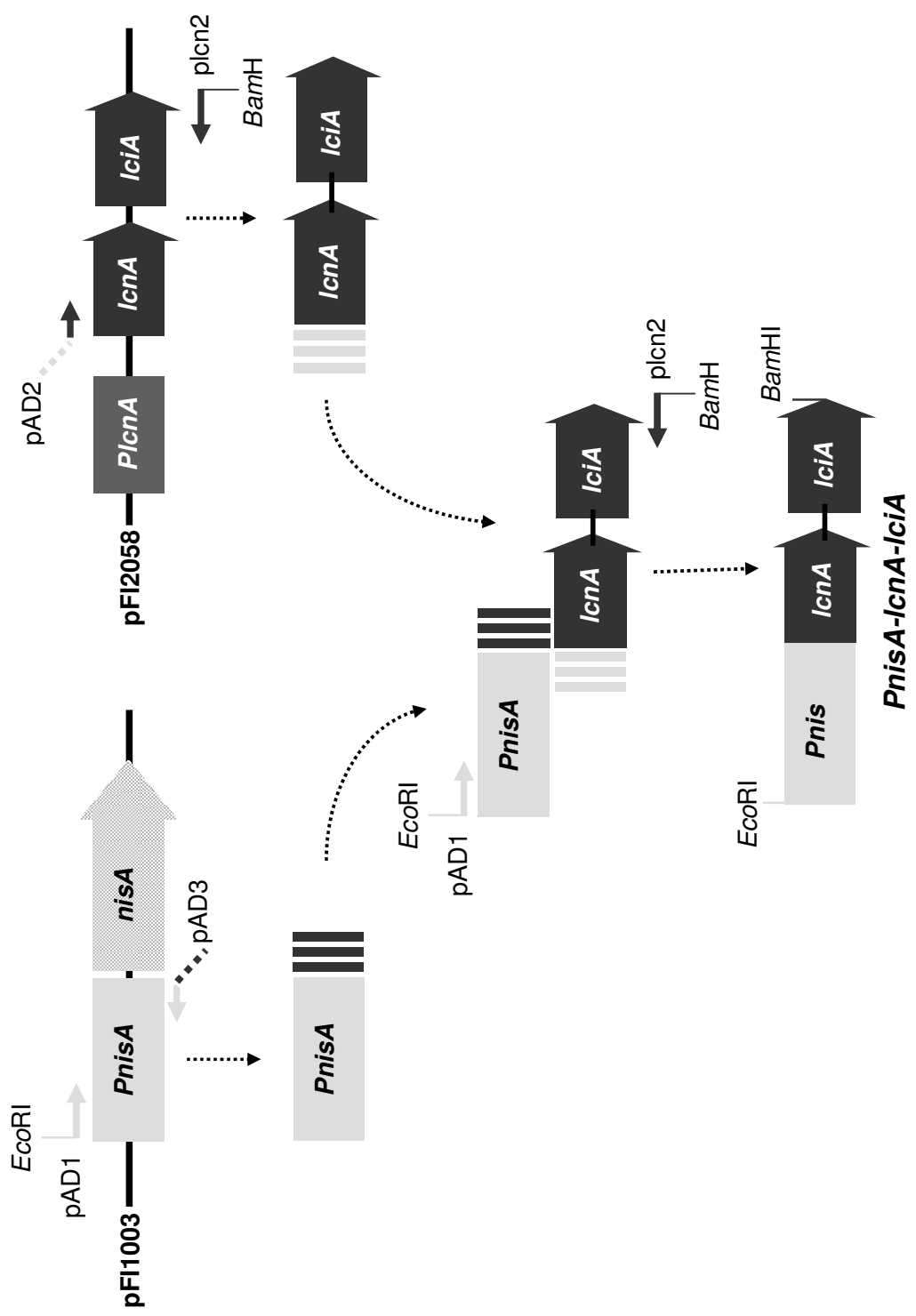


Fig. III.2. Construcción del fragmento *PøjsA-IcnA-IciA* empleando la técnica de PCR.

Tanto la composición de las reacciones de PCR como el programa de amplificación fueron idénticos a los descritos para la etapa 1. Por lo que respecta a la fuentes de DNA molde, se tomó una colonia de *L. lactis* WM4 con un asa de siembra y se resuspendió en 10 µl de agua destilada estéril.

Los fragmentos 1 y 2 se diluyeron en agua destilada (1:200) y las soluciones resultantes se mezclaron (1:1). La mezcla (2 µl) se empleó para amplificar un fragmento de 938 bp con los cebadores pAD1 y plc2. El fragmento, que se denominó *PnisA-IcnA-IciA*, contenía los genes *IcnA* y *IciA* bajo control del promotor inducible de la nisina y estaba flanqueado por lugares de restricción *EcoRI* y *BamHI* (Fig. III.2).

III.2.2.2. Clonación del fragmento *PnisA-IcnA-IciA* en el plásmido pCR2.1

El fragmento *PnisA-IcnA-IciA* se clonó en el plásmido pCR2.1 (Fig. III.1) empleando el *kit TA Cloning* (Invitrogen). El vector pCR2.1 se presenta en forma lineal, abierto en la zona media de su lugar de clonación múltiple (*polylinker*) y con colas de polidesoxiadenosina en sus extremos 3'. Como la DNA polimerasa empleada produce colas de polidesoxitimidina en los extremos 3' de los productos de PCR, el inserto y el vector se unen por complementariedad entre sus respectivas colas de polidesoxitimidina y polidesoxiadenosina. Posteriormente, la DNA ligasa del fago T4 consolida la unión.

En este trabajo, todas las ligaciones se realizaron manteniendo una proporción de una molécula de vector por tres de inserto. Una reacción típica contenía los siguientes componentes:

<u>Componente</u>	<u>Volumen (μl)</u>
tampón de ligación (10x)	1
Vector pCR2.1 (25 ng μl ⁻¹)	2
Inserto o producto de PCR (x ng μl ⁻¹)	1
Agua destilada estéril	5
DNA ligasa T4 (1 U μl ⁻¹)	1

El *kit* TA clonig proporcionaba todos los ingredientes de la reacción a excepción, lógicamente, del producto de PCR. Las mezclas de ligación se incubaron a 15°C durante toda la noche. La inserción del fragmento *PnisA-lcnA-lciA* en pCR2.1 originó el plásmido pFI2400, que fue introducido en *E. coli* MC1022 para proporcionar la cepa de *E. coli* FI9959.

III.2.2.3. Transformación de *E. coli* MC1022 con pFI2400

Las células de *E. coli* MC1022 se transformaron mediante electroporación siguiendo el método de Casadaban y Cohen (1980) con la modificación de Dodd y col. (1992):

Inicialmente, se inoculan 40 ml de caldo L fresco con 800 μl de un cultivo previo de las bacterias en ese mismo medio. El caldo recién inoculado se incuba durante aproximadamente 2 h a 37°C y en agitación (250 rpm), hasta obtener una densidad óptica (A_{600}) de entre 0,45 y 0,55.

Seguidamente, el cultivo se mantiene en hielo durante unos minutos para detener el crecimiento celular y, posteriormente, se centrifuga a 4.000 rpm durante 10 min. Tras eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspende (sin ayuda de pipeta) en 10 ml de una solución de glicerol (10%). Tras una nueva centrifugación, el sedimento se vuelve a resuspender en 400 μl de la solución de glicerol. De este modo, se obtiene la suspensión de células competentes.

A continuación, se añadieron entre 1 y 3 μl de la reacción de ligación (ver apartado anterior) a 40 μl de la suspensión de células competentes y la mezcla se sometió a un pulso eléctrico. La electroporación se realizó en cubetas de 0,2 cm y las condiciones de pulso fueron $12,5 \text{ kV cm}^{-1}$, 200Ω y 25 μF . Inmediatamente después, las células se diluyeron en 960 μl de caldo L y se incubaron durante 1 h a 37°C y en agitación. Transcurrido ese tiempo, la selección de las bacterias transformadas se efectuó mediante siembra en placas de agar L, con los antibióticos y en las condiciones recomendadas para el mantenimiento y replicación del vector.

III.2.2.4. Secuenciación del fragmento *PnisA-IcnA-IciA*

Para comprobar que el plásmido recombinante pFI2140 transportaba el fragmento *PnisA-IcnA-IciA*, se efectuaron reacciones de secuenciación cíclica empleando el *kit* Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems), y siguiendo estrictamente el protocolo recomendado por el fabricante. Las reacciones se realizaron con el cebador universal (5'-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGT-3') o con el inverso (5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA-3'). Estos dos cebadores flanquean el lugar de clonación múltiple de todos los vectores utilizados en este trabajo.

En primer, lugar se preparó la siguiente premezcla de reacción:

<u>Componente</u>	<u>Volumen (μl)</u>
Tampón TACS (5x)	4
Mezcla de dNTPs	1
Terminador ddATP marcado	1
Terminador ddTTP marcado	1
Terminador ddGTP marcado	1
Terminador ddCTP marcado	1
<i>Taq</i> DNA polimerasa	0,5

Posteriormente, se realizó la mezcla de secuenciación:

<u>Componente</u>	<u>Volumen (μl)</u>
Premezcla de reacción	9,5
Producto PCR (100 ng μl ⁻¹)	5
Cebador (3,2 mM)	1
H ₂ O destilada estéril	4,5

La reacción de secuenciación cíclica tuvo lugar de acuerdo con el siguiente programa: [(96°C, 2 min) x 1] + [(96°C, 30 s; 50°C, 15 s; 60°C, 4 min) x 25].

Finalizada la reacción, se efectuaron dos extracciones con una mezcla de fenol:agua:cloroformo (68:18:14, v/v), se precipitó el DNA con etanol y se desecó a vacío, siguiendo el protocolo recomendado. El sedimento desecado se disolvió en 4 μl de una solución de EDTA 50 mM, pH 8, en formamida desionizada. Una vez preparadas las muestras, éstas se cargaron en un gel de poliacrilamida al 6% (Sambrook y Russell, 2001), procediéndose a su electroforesis y análisis informático de las secuencias obtenidas.

III.2.2.5. Subclonación del fragmento *PnisA-IcnA-IciA* en el plásmido pTG262

El fragmento *PnisA-IcnA-IciA* se obtuvo a partir del plásmido pFI2400 empleando la enzima de restricción *EcoRI*; subsiguientemente, se subclonó en el vector pTG262, que previamente había sido digerido con la misma enzima.

III.2.2.5.1. Obtención del inserto

Para obtener el inserto (fragmento *PnisA-lcnA-lciA*), el plásmido pFI2400 se sometió al siguiente tratamiento enzimático:

	<u>Volumen</u> (μl)
tampón (10x)	5
DNA plasmídico	x
Agua destilada estéril	hasta 50
<i>EcoRI</i> ($10 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$)	2

En cada reacción se digirieron entre 5 y 10 μg de DNA. El volumen de solución plasmídica empleada dependía de su concentración, calculada espectrofotométricamente (Sambrook y Russell, 2001). Las mezclas se incubaron en un baño de agua termostatado a la temperaturas y tiempo recomendados por el fabricante. Tras la reacción, 2 μl de la muestra se analizaron por electroforesis en geles de agarosa para comprobar que se habían obtenido los fragmentos esperados, comparando su tamaño con el de los fragmentos incluidos en los estándares 100 pb ladder (Gibco BRL) y $\lambda\text{HindIII}$ (Appligene). Los 48 μl de muestra restantes se sometieron a electroforesis, y la banda de interés se extrajo con membranas de DEAE-celulosa siguiendo las recomendaciones de Sambrook y Russell (2001). Para obtener el DNA, las membranas se depositaron en tubos con 300 μl de NaCl 1,5 M en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, pH 8) y se incubaron a 65°C durante 1 hora. El DNA en solución se extrajo primero con fenol:cloroformo (1:1) y después con cloroformo, se precipitó con 1 ml de etanol, se desecó y se resuspendió en 10 μl de agua destilada estéril. La concentración de DNA se estimó después de una electroforesis de 1 μl de muestra en un gel de agarosa, por comparación con bandas de DNA de concentración conocida (Sambrook y Russell, 2001).

III.2.2.5.2. Obtención del vector

El vector pTG262 (Fig. III.1), obtenido de la cepa *E. coli* F15495 (Tabla III.1), también se digirió con la enzima *EcoRI*. Las condiciones de las reacciones de restricción fueron las indicadas para el inserto, pero partiendo de 3 µg de vector. Tras la digestión del vector, el DNA se diluyó con 350 µl de agua destilada estéril, se purificó mediante dos extracciones, la primera con fenol:cloroformo (1:1) y la segunda con cloroformo, y se precipitó con una mezcla formada por 40 µl de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 1 ml de etanol absoluto. El sedimento se lavó con etanol al 70% (v/v) en agua destilada estéril, y se resuspendió en 100 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8. Esta solución de DNA se trató con 1 µl de fosfatasa alcalina de ternero (9,2 U µl⁻¹) a 37°C durante 30 min, para desfosforilar los extremos 5' del vector y evitar su recircularización.

Posteriormente, la muestra se sometió nuevamente a dos extracciones sucesivas con fenol:cloroformo (1:1) y cloroformo, y su purificación se completó con el *kit* GeneClean (Qbiogene), siguiendo las instrucciones del fabricante. El *kit* contiene una suspensión de bolas de vidrio que retienen el DNA, pero no el resto de componentes de la muestra. La adsorción de DNA a las bolitas se favorece añadiendo a la muestra una solución de yoduro sódico 6M, que también proporciona el *kit*.

Finalmente, el vector purificado se eluyó con 15 µl de agua destilada estéril y su concentración se estimó por electroforesis en gel de agarosa de 1 µl de muestra, comparando su intensidad con la de bandas de DNA de concentración conocida (Sambrook y Russell, 2001).

III.2.2.5.3. Ligación

Las ligaciones se realizaron en volúmenes de 10 µl, manteniendo la proporción de una molécula de vector por tres de inserto, siendo la

concentración de DNA total de entre 20 y 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$. La ligación se llevó a cabo con una ligasa de alta concentración (15 U μl^{-1}) (Promega). Las mezclas de ligación se incubaron a 15 °C durante toda la noche.

III.2.2.6. Transformación de *L. lactis* FI5876 y FI7847 con la mezcla de ligación

La transformación de células de *L. lactis* se realizó por electroporación siguiendo el método descrito por Holo y Nes (1989) y modificado por Dodd y col. (1992).

Los lactococos se crecieron en 50 ml de caldo GM17 con glicina (2,5%, p/v) y se recogieron por centrifugación (4.000 rpm, 10 min, 4 °C) cuando los cultivos estaban en fase de crecimiento activo (A_{620} : 0,5). El sedimento bacteriano se lavó dos veces con 10 ml de una solución de sacarosa 0,5 M y glicerol al 10% (v/v) en agua, preenfriada en un baño de hielo. Las células se recogieron por centrifugaron en las condiciones citadas anteriormente y se resuspendieron en 500 μl de la solución de sacarosa y glicerol.

Tras añadir entre 1 y 3 μl de la reacción de ligación a 40 μl de la suspensión de células electrocompetentes, éstas se sometieron a un pulso eléctrico para transformarlas. La electroporación se realizó en cubetas de 0,2 cm y las condiciones del pulso fueron 12,5 kV cm^{-1} , 200 Ω y 25 μF . Inmediatamente después, las células se diluyeron en 10 ml de caldo SGM17MC (GM17 con sacarosa 0,5 M, MgCl_2 20 mM y CaCl_2 2 mM), se mantuvieron en hielo durante 10 min y se incubaron a 30 °C en un baño de agua durante 2 horas, para permitir que se expresaran los genes de los plásmidos adquiridos. La selección de las bacterias transformadas se efectuó sembrándolas en placas de agar GM17 con los antibióticos y condiciones adecuadas para el vector.

Para comprobar que las colonias seleccionadas portaban los plásmidos

recombinantes deseados, se efectuaron reacciones de PCR con los cebadores universal (5'-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGT-3') e inverso (5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA-3'). Alternativamente, se emplearon parejas de cebadores internos que contenían secuencias del fragmento insertado.

De esta manera, se obtuvieron los plásmidos pFI2396 (cuando el fragmento *PnisA-lcnA-lciA* estaba insertado en orientación directa) y pFI2397 (en orientación inversa), y se generaron las nuevas cepas *L. lactis* FI9941 (*L. lactis* FI7847, pFI2396), *L. lactis* FI9942 (*L. lactis* FI7847, pFI2397), *L. lactis* FI9951 (*L. lactis* FI5876, pFI2396) y *L. lactis* FI9952 (*L. lactis* FI5876, pFI2397).

Posteriormente, las cepas recombinantes fueron transformadas con el plásmido pFI2148 (que contiene los genes *lcnCD*) (Horn y col., 1999), generándose las cepas *L. lactis* FI9943 (*L. lactis* FI9941, pFI2148), *L. lactis* FI9944 (*L. lactis* FI9942, pFI2148), *L. lactis* FI9953 (*L. lactis* FI9951, pFI2148) y *L. lactis* FI9954 (*L. lactis* FI9952, pFI2148).

III.2.2.7. Transformación de *E. coli* MC1022 con pFI2396 y pFI2397

Las células de *E. coli* MC1022 se transformaron con los plásmidos pFI2396 y pFI2397 siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.2.2.3. El objetivo era disponer de una fuente rápida y sencilla de los citados plásmidos. De esta manera, se generaron las cepas *E. coli* FI9939 (pFI2396) y *E. coli* FI9940 (pFI2397).

III.2.2.8. Análisis de la producción de lactococina A y/o nisina A

Las pruebas de difusión en agar se realizaron siguiendo el procedimiento descrito por Tramer y Fowler (1964) y modificado por Dodd y col. (1992):

Las bacterias lácticas se cultivaron en 10 ml de caldo GM17 (complementado con el antibiótico necesario cuando era necesario) durante 16-18 h a 32°C. Los sobrenadantes libres de células se obtuvieron centrifugando los cultivos a 10.000 rpm y 4°C durante 10 min. El pH de los sobrenadantes se ajustó a 6,2 con NaOH 1N y, a continuación, se filtraron por filtros de 0,22 µm de diámetro de poro. Los filtrados se distribuyeron en alícuotas (250 µl) que se mantuvieron a -80°C hasta su utilización.

Posteriormente, en placas de agar GM17 inoculadas con un cultivo en fase estacionaria del microorganismo indicador correspondiente, se practicaron pocillos de 6 mm de diámetro en los que se depositaron 100 µl de los sobrenadantes. Todos los bioensayos se realizaron al menos por duplicado, e incluían controles positivos y negativos. A continuación, las placas se mantuvieron aproximadamente 6 h a 4°C para que la bacteriocina difundiera antes de que el microorganismo indicador empezara a crecer. Finalmente, las placas se incubaron durante toda la noche, a la temperatura óptima para el crecimiento del microorganismo indicador. Como indicadores se emplearon *L. lactis* FI9921 (un derivado de FI5876 que contiene el plásmido pFI2148 que se construyó durante este trabajo y que sensible a la lactococina y resistente a la nisina) y *L. lactis* FI9182 (sensible a la nisina y resistente a la lactococina A) (Horn y col., 1999).

La presencia de bacteriocina se puso de manifiesto por la aparición de zonas de inhibición del desarrollo del microorganismo indicador alrededor de los pocillos. Las áreas de inhibición se calcularon según la fórmula de Tramer y Fowler (1964):

$$\text{Área de inhibición} = \pi [(D/2)^2 - (d/2)^2],$$

siendo "D" el diámetro del halo de inhibición en mm y "d" el diámetro del pocillo (6 mm).

La cantidad de pediocina nisina A presente en los sobrenadantes también se calculó introduciendo en las pruebas de difusión en agar estándares de nisina (suministrada por Aplin & Barrett) cuya concentración oscilaba entre 0 y 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Las concentraciones de estas bacteriocinas en los sobrenadantes de las cepas analizadas se estimaron a partir de la ecuación de regresión que relacionaba el área de las zonas de inhibición causadas por los estándares con el logaritmo de sus respectivas concentraciones.

III.2.3. Producción inducible de pediocina PA-1 en *L. lactis*

III.2.3.1. Construcción del fragmento *PnisA-IlcnA/pedA*

La construcción de un fragmento de DNA en el que un gen híbrido (fusión de las secuencias que codifican el líder de la lactococina A y la propediocina PA-1) estuviera bajo el control del promotor inducible de la nisina (*PnisA*) se efectuó en tres etapas (Fig. III.3). En la primera fase, se amplificó la secuencia del promotor *PnisA* de la forma detallada en la sección III.2.2.1. (Fig. III.2).

Paralelamente, se amplificó un segundo fragmento de 242 pb (fragmento 2) (Fig. III.3) con los cebadores pAD2 y ppedD (5'-ACCCCGGGATTGATGCCAGCTC-3'; Horn y col., 1998), a partir de colonias de *Lactococcus lactis* F19043, una cepa que porta el gen híbrido deseado en el plásmido pFI2126 (Horn y col., 1998). Como se comentó anteriormente, los 16 nucleótidos del extremo 5' del cebador pAD2 eran complementarios a la región 3' del promotor de la nisina A, mientras que la secuencia del cebador ppedD incorporaba un lugar de corte para la enzima de restricción *Bam*HI (secuencia subrayada). El programa de PCR fue idéntico al descrito en la sección III.2.2.1.

Los fragmentos 1 y 2 se diluyeron en agua destilada (1:200) y las soluciones resultantes se mezclaron (1:1). La mezcla (2 μl) se empleó para

amplificar un fragmento de 479 bp con los cebadores pAD1 y ppedD. El fragmento, que se denominó *PnisA-lcnA/pedA*, contenía el gen híbrido “líder de lactococina A-propediocina PA-1” bajo control del promotor inducible de la nisina y estaba flanqueado por lugares de restricción *EcoRI* y *BamHI* (Fig. III.3). En este caso, el programa de PCR utilizado para obtener el fragmento fue:

[(92°C, 2 min) x 1 ciclo] + [(92°C, 1 min; 45°C, 1 min; 72°C, 1 min) x 4 ciclos] + [(92°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1 min) x 22 ciclos].

III.2.3.2. Clonación del fragmento *PnisA-lcnA/pedA* y transformación de *E. coli* MC1022 y *L. lactis* FI5876 y FI7847

El fragmento *PnisA-lcnA/pedA* se clonó en el vector pCR2.1 y el plásmido resultante (pFI2394) se introdujo en *E. coli* MC1022 mediante electroporación (ver sección III.2.2.3). La cepa resultante se denominó *E. coli* FI9923. La secuencia de la construcción génica se determinó mediante secuenciación nucleotídica (ver sección III.2.2.4).

Posteriormente el fragmento *PnisA-lcnA/pedA* se digirió con la enzima *EcoRI* y se subclonó en el vector pTG262 (ver sección III.2.2.5). De esta manera, se obtuvieron los plásmidos pFI2391 (cuando el fragmento *PnisA-lcnA/pedA* estaba insertado en orientación directa) y pFI2392 (orientación inversa). La transformación de *L. lactis* FI7847 y FI5876 con estos plásmidos (ver sección III.2.2.6) dio origen a las nuevas cepas *L. lactis* FI9913 (*L. lactis* FI7847, pFI2391), *L. lactis* FI9915 (*L. lactis* FI7847, pFI2392), *L. lactis* FI10036 (*L. lactis* FI5876, pFI2391) y *L. lactis* FI10037 (*L. lactis* FI5876, pFI2392).

Posteriormente, las cepas recombinantes fueron transformadas con el plásmido pFI2148 (que contiene los genes *lcnCD*) (Horn y col., 1999), generándose las cepas *L. lactis* FI9917 (*L. lactis* FI9913, pFI2148), *L. lactis* FI9919 (*L. lactis* FI9915, pFI2148), *L. lactis* FI10038 (*L. lactis* FI10036,

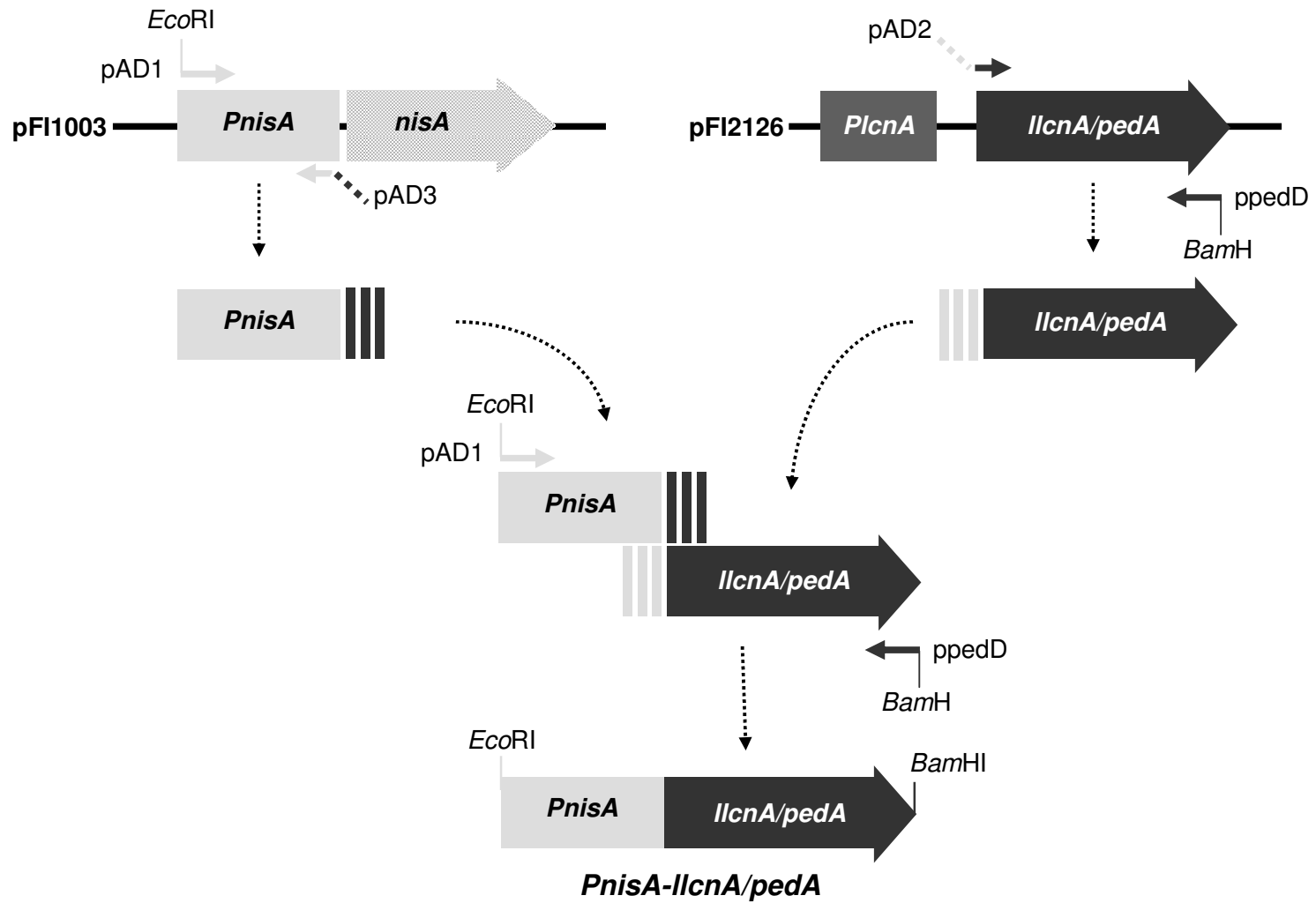


Fig. III.3. Construcción del fragmento *PnisA-IlcnA/pedA* empleando la técnica de PCR.

pFI2148) y *L. lactis* FI10039 (*L. lactis* FI10037, pFI2148).

E. coli MC1022 también se transformó con los plásmidos pFI2391 y pFI2392 siguiendo el procedimiento descrito en la sección III.2.2.3. El objetivo era disponer de una fuente rápida y sencilla de los citados plásmidos. De esta manera, se generaron las cepas *E. coli* FI10034 (pFI2396) y *E. coli* FI10035 (pFI2397).

III.2.3.3. Análisis de la producción de pediocina PA-1 y/o nisina A

III.2.3.3.1. Pruebas de difusión en agar

La actividad antimicrobiana presente en los sobrenadantes de los cultivos de las cepas recombinantes se evaluó mediante las pruebas de difusión en agar descritas en la sección III.2.2.8. Como microorganismos indicadores se emplearon *E. faecalis* TAB28 (sensible a la pediocina PA-1 y resistente a la nisina; Joosten y col., 1995) y *L. lactis* FI9180 (sensible a la nisina y resistente a la pediocina PA-1; Horn y col., 1999).

La cantidad de pediocina PA-1 y nisina A presente en las muestras se calculó introduciendo en las pruebas de difusión en agar estándares de pediocina PA-1 (suministrada por el Dr. José M^a. Martínez) o nisina (suministrada por Aplin & Barrett) cuya concentración oscilaba entre 0 y 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Las concentraciones de estas bacteriocinas en los sobrenadantes de las cepas analizadas se estimaron a partir de la ecuación de regresión que relacionaba el área de las zonas de inhibición causadas por los estándares con el logaritmo de sus respectivas concentraciones.

III.2.3.3.2. Pruebas de inhibición en placas microtituladoras

La actividad antimicrobiana de la cepa que producía la mayor cantidad de pediocina PA-1, *L. lactis* FI10038, también se evaluó en placas microtituladoras estériles de 96 pocillos (Nunc). Con cada indicador se realizaron tres ensayos independientes, en los que cada muestra se evaluaba por cuatuplicado. En la primera fila se depositaron 100 µl del sobrenadante de *L. lactis* FI10038 y de los controles positivos y negativos correspondientes. En el resto de los pocillos se añadieron 50 µl de caldo GM17 para, seguidamente, hacer diluciones seriadas (1:2, 1:4, 1:8, etc.) de las muestras anteriores. A continuación, se añadieron a cada pocillo 150 µl de una dilución 1:400, en caldo GM17, del microorganismo indicador. Concretamente, se emplearon tres microorganismos indicadores: *E. faecalis* TAB28 (sensible a la pediocina PA-1 y resistente a la nisina), *E. faecium* P21 (sensible a las dos bacteriocinas) y *E. faecium* TF1 (sensible a la pediocina PA-1 y moderadamente sensible a la nisina; colección de nuestro grupo). Posteriormente, las placas se incubaron a 32°C durante 12 h.

Tras la incubación, se realizó una lectura espectrofotométrica de las placas a 620 nm, calculándose las unidades bacteriocina (UB) presentes en los sobrenadantes iniciales. Una unidad bacteriocina se define como la inversa de la dilución que produce el 50% de inhibición del microorganismo indicador (Holo y col., 1991).

III.2.3.3.3. Pruebas de inhibición en tubos

En las pruebas en caldo se eligió como indicador *Listeria monocytogenes* L15 SV-1/2 ya que se trata de una cepa poco sensible a la nisina y moderadamente sensible a la pediocina PA-1. Básicamente, a los cultivos (10 ml) del indicador se les añadió 1 ml de los sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos (1×10^8 ufc ml⁻¹) de *L. lactis* FI5876, *L. lactis* FI10038 y *P. acidilactici* 347. El pH de los sobrenadantes se había ajustado a 6,2 y, posteriormente, se filtraron a través de filtros de 0,22 µm de diámetro de

poro. Los cultivos inoculados se incubaron durante 3 h a 32°C. Como controles se emplearon cultivos inoculados con 1 ml de medio GM17 estéril. Se probaron dos concentraciones iniciales del indicador: 1×10^5 y 1×10^8 ufc ml^{-1} . Tras las incubaciones, se realizaron recuentos del microorganismo indicador.

III.2.3.3.4. Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA-IC)

Paralelamente a las pruebas microbiológicas, se realizó un ELISA-IC empleando anticuerpos policlonales específicos frente a la pediocina PA-1 (Martínez y col., 1999). Los pocillos de las placas de ELISA se tapizaron con pediocina PA-1 (750 ng ml^{-1}) y, a continuación, se añadieron simultáneamente el anticuerpo específico y los sobrenadantes problema, que compitieron con la bacteriocina pura por su unión al anticuerpo. Para cuantificar la pediocina PA-1 de cada cepa, se realizó una curva estándar enfrentando concentraciones conocidas de pediocina PA-1 pura (entre 0 y $5 \mu\text{g ml}^{-1}$) con sus correspondientes valores de inhibición.

III.2.4. Producción inducible de colicina V en *L. lactis*

III.2.4.1. Construcción del fragmento *PnisA-IlnA/cvaC*

La construcción de un fragmento de DNA en el que un gen híbrido (fusión de las secuencias que codifican el líder de la lactococina A y la procolicina V) estuviera bajo el control del promotor inducible de la nisina (*PnisA*) se efectuó en tres etapas (Fig. III.4). En la primera fase, se amplificó la secuencia del promotor *PnisA* de la forma detallada en la sección III.2.2.1. (Fig. III.2).

Paralelamente, se amplificó un segundo fragmento de 349 pb (fragmento 2) (Fig. III.4) con los cebadores pAD2 y p135 (5'-

CCCGGGTTATAAACAAACATCACTAAG-3'), a partir del plásmido pAT.9 (pCR2.1 con un fragmento de 420 pb que incluye el promotor de la lactococina A y un gen híbrido “líder de la lactococina A/procolicina V”; colección del BBSRC Institute of Food Research, Norwich). Los 16 nucleótidos del extremo 5' del cebador pAD2 (subrayados) eran complementarios a la región 3' del promotor de la nisina A, mientras que la secuencia del cebador p135 incorporaba un lugar de corte para la enzima de restricción *Bam*HI (secuencia subrayada). El programa de PCR fue idéntico al descrito en la sección III.2.2.1.

Los fragmentos 1 y 2 se diluyeron en agua destilada (1:200) y las soluciones resultantes se mezclaron (1:1). La mezcla (2 µl) se empleó para amplificar un fragmento de 586 pb con los cebadores pAD1 y p135. El fragmento, que se denominó *PnisA-IlcnA/cvaC*, contenía el gen híbrido “líder de lactococina A-procolicina V” bajo control del promotor inducible de la nisina y estaba flanqueado por lugares de restricción *Eco*RI y *Bam*HI (Fig. III.4). En este caso, el programa de PCR utilizado para obtener el fragmento fue:

[(92°C, 2 min) x 1 ciclo] + [(92°C, 1 min; 45°C, 1 min; 72°C, 1 min) x 4 ciclos] + [(92°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1 min) x 22 ciclos].

III.2.4.2. Clonación del fragmento *PnisA-IlcnA/cvaC* y transformación de *E. coli* MC1022 y *L. lactis* FI5876 y FI7847

El fragmento *PnisA-IlcnA/cvaC* se clonó en el vector pCR2.1 y el plásmido resultante (pFI2435) se introdujo en *E. coli* TOP10F1' (Invitrogen) mediante electroporación (ver sección III.2.2.3). La cepa resultante se denominó *E. coli* FI10045. La secuencia de la construcción génica se determinó mediante secuenciación nucleotídica (ver sección III.2.2.4).

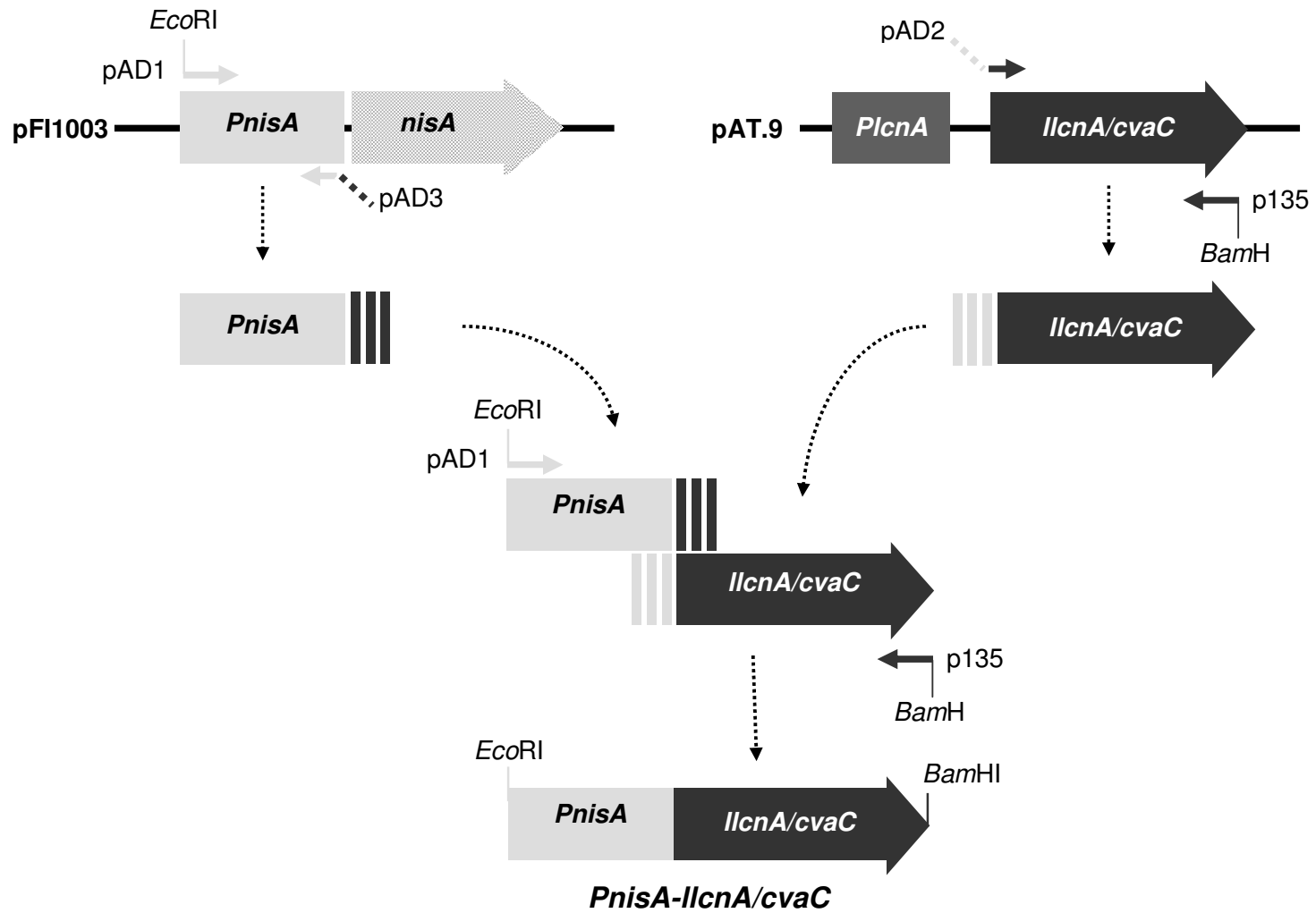


Fig. III.4. Construcción del fragmento *PnisA-IlcnA/cvaC* empleando la técnica de PCR.

Posteriormente el fragmento *PnisA-lcnA/cvaC* se digirió con la enzima *EcoRI* y se subclonó en el vector pTG262 (ver sección III.2.2.5). De esta manera, se obtuvieron los plásmidos pFI2436 (cuando el fragmento *PnisA-lcnA/cvaC* estaba insertado en orientación directa) y pFI2437 (orientación inversa). La transformación de *L. lactis* FI7847 y FI5876 con estos plásmidos (ver sección III.2.2.6) dio origen a las nuevas cepas *L. lactis* FI10048 (*L. lactis* FI7847, pFI2436), *L. lactis* FI10049 (*L. lactis* FI7847, pFI2437), *L. lactis* FI10052 (*L. lactis* FI5876, pFI2436) y *L. lactis* FI10053 (*L. lactis* FI5876, pFI2437).

Posteriormente, las cepas recombinantes fueron transformadas con el plásmido pFI2148 (que contiene los genes *lcnCD*) (Horn y col., 1999), generándose las cepas *L. lactis* FI10050 (*L. lactis* FI10048, pFI2148), *L. lactis* FI10051 (*L. lactis* FI10049, pFI2148), *L. lactis* FI10054 (*L. lactis* FI10052, pFI2148) y *L. lactis* FI10055 (*L. lactis* FI10053, pFI2148).

E. coli MC1022 también se transformó con los plásmidos pFI2436 y pFI2437 siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.2.2.3. El objetivo era disponer de una fuente rápida y sencilla de los citados plásmidos. De esta manera, se generaron las cepas *E. coli* FI10046 (pFI2436) y *E. coli* FI10047 (pFI2437).

III.2.4.3. Análisis de la producción de colicina V y/o nisina A

III.2.4.3.1. Pruebas de difusión en agar

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los lactococos se emplearon dos variantes de la prueba de difusión en agar.

En la primera variante, los lactococos se cultivaron en 10 ml de caldo GM17 durante 16-18 h a 32°C. Posteriormente, se recogieron 100 µl de estos cultivos y se centrifugaron a 10.000 rpm por 2 min a temperatura ambiente. El

sedimento bacteriano se resuspendió en 10 µl de caldo GM17. A continuación, una alícuota (1 µl) del concentrado bacteriano se depositó en placas de agar GM17 complementado con cloranfenicol, eritromicina y 2´2 dipiridil (0.1 mM). Esta última sustancia es un quelante del hierro que evita la represión de la expresión de la colicina V. Tras una incubación a 32°C durante 24 h, las colonias resultantes se inactivaron mediante un tratamiento con vapores de cloroformo durante 10 min. Seguidamente, se inocularon 800 µl de un cultivo en caldo L (aproximadamente 1×10^9 ufc ml⁻¹) de la cepa indicadora *E. coli* DH5α en 5 ml de agar L (0,75% de agar) y la mezcla resultante se depositó cuidadosamente sobre las placas de GM17 que contenían las colonias inactivadas. Finalmente, las placas se sembraron a 37°C durante 16-18 h.

En la segunda variante, los lactococos se crecieron en caldo GM17 complementado con cloranfenicol, eritromicina y 2´2 dipiridil (0.1 mM) durante 16 h a 32°C. Tras la incubación, los cultivos se diluyeron en una proporción 1:10 en caldo fresco (volumen total: 30 ml). Los cultivos resultantes se incubaron durante 3 h hasta alcanzar una densidad óptica (620 nm) de 0,5-0,6, momento en el que se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se esterilizaron mediante filtración con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore). Seguidamente, los sobrenadantes filtrados se sometieron a una precipitación con ácido tricloroacético (TCA), siguiendo el procedimiento de Fath y col. (1994). La concentración final de TCA en el sobrenadante fue del 10% (v/v). Los sobrenadantes tratados se incubaron en hielo durante 45 min. y, posteriormente, se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15 min. Los sedimentos se resuspendieron en 111 µl de una solución 3,5 M de Tris base (pH 9.5). Finalmente, se depositaron 10 µl de esos concentrados en placas de agar L (0,75% de agar) previamente inoculadas con la cepa indicadora *E. coli* DH5α. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h.

III.2.4.3.2. Pruebas de inhibición en placas microtituladoras

La actividad antimicrobiana de *L. lactis* FI10054 también fue evaluada

en placas microtituladoras siguiendo el procedimiento descrito en la sección III.2.3.3.2., con la única salvedad de que este caso los indicadores empleados fueron *E. coli* DH5 α , *E. coli* 88 (serotipo O157:H7) y *E. coli* 89 (serotipo O157:H7). Estas dos últimas cepas fueron amablemente cedidas por el Dpto. de Tecnología de Alimentos del INIA (Madrid).

III.2.4.3.3. Ensayos inmunoenzimáticos: dot-blot

Para la obtención de anticuerpos antipeptídicos de especificidad predeterminada frente a la colicina V se sintetizó el péptido PNC, cuya secuencia forma parte de la de la citada bacteriocina (ver sección III.1.1.3). Su pureza e identidad se confirmaron mediante HPLC y espectrometría de masas. Tanto la síntesis como los análisis fueron efectuados por la compañía Alpha Diagnostic Internacional (San Antonio, EE.UU.). La presencia de colicina V en los sobrenadantes de los lactococos se evaluó mediante un ensayo de tipo *dot-blot* realizado de la forma descrita por Martínez y col. (2000). Esta técnica (Fig. III.5) se basa en que los antígenos fijados a una superficie inerte son reconocidos por los anticuerpos específicos (anticuerpos primarios) y el complejo formado se detecta con un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente (anticuerpo secundario), que reconoce como antígenos a los anticuerpos primarios. La reacción se pone de manifiesto al actuar el enzima sobre el sustrato, dando lugar a un compuesto coloreado. En este caso, los antígenos (sobrenadantes) se fijaron manualmente a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL; Amersham Biosciences).

La detección de la colicina V inmovilizada en las membranas de nitrocelulosa se realizó empleando el *kit ECL Advance Western blotting Detection* (Amersham Biosciences). Para ello fueron necesarios los anticuerpos anti-PNC previamente obtenidos (anticuerpos primarios) y también anticuerpos anti-conejo conjugados a la peroxidasa de rábano (Sigma) (anticuerpos secundarios). Se siguieron estrictamente las instrucciones facilitadas con el *kit*. Una vez que los anticuerpos antiespecie

conjugados a la peroxidasa de rábano reaccionan con los anticuerpos anti-PNC unidos a la colicina V, se procede a su detección empleando los agentes de detección 1 y 2 del citado *kit*. El agente de detección 1 se descompone rápidamente liberando peróxido de hidrógeno, el sustrato de la peroxidasa de rábano. La peroxidasa desdobla el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, el cual oxida el luminol presente en el agente de detección 2, generando luz azul. Los resultados se visualizaron por autorradiografía empleando películas Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences).

III.2.5. Producción inducible de interleuquina-2 murina en *L. lactis*

Hasta este momento, el sistema heterólogo se había empleado con éxito para la producción de tres bacteriocinas cuyos líderes y transportadores manifestaban homologías significativas. Por ello, el siguiente paso fue tratar de extender la utilidad de este sistema para la producción de péptidos no relacionados. La molécula inicialmente elegida fue la interleuquina-2 (IL-2) debido a dos razones: (a) tiene una importante actividad biológica en la modulación de la respuesta del sistema inmunitario, y (b) su molécula no contiene modificaciones post-traduccionales.

III.2.5.1. Construcción del fragmento *PnisA-IlcnA/il2m*

La construcción de un fragmento de DNA en el que un gen híbrido (fusión de las secuencias que codifican el líder de la lactococina A y la prointerleuquina-2 murina) estuviera bajo el control del promotor inducible de la nisina (*PnisA*) se efectuó en tres etapas (Fig. III.6). En la primera fase, se amplificó un fragmento que contenía el promotor *PnisA* y la secuencia que codifica el líder de la lactococina A (fragmento 1). Para ello, se recurrió a los cebadores pAD1 y pIL2a (5'-CTTGAAGTGGGTGCTCCTCCGTTAGCTTC-3') y al plásmido pFI2396 (ver sección III.2.2.6) como fuente de DNA molde (Fig. III.6). El cebador PAD1 contenía un lugar de restricción para la enzima *EcoRI*,

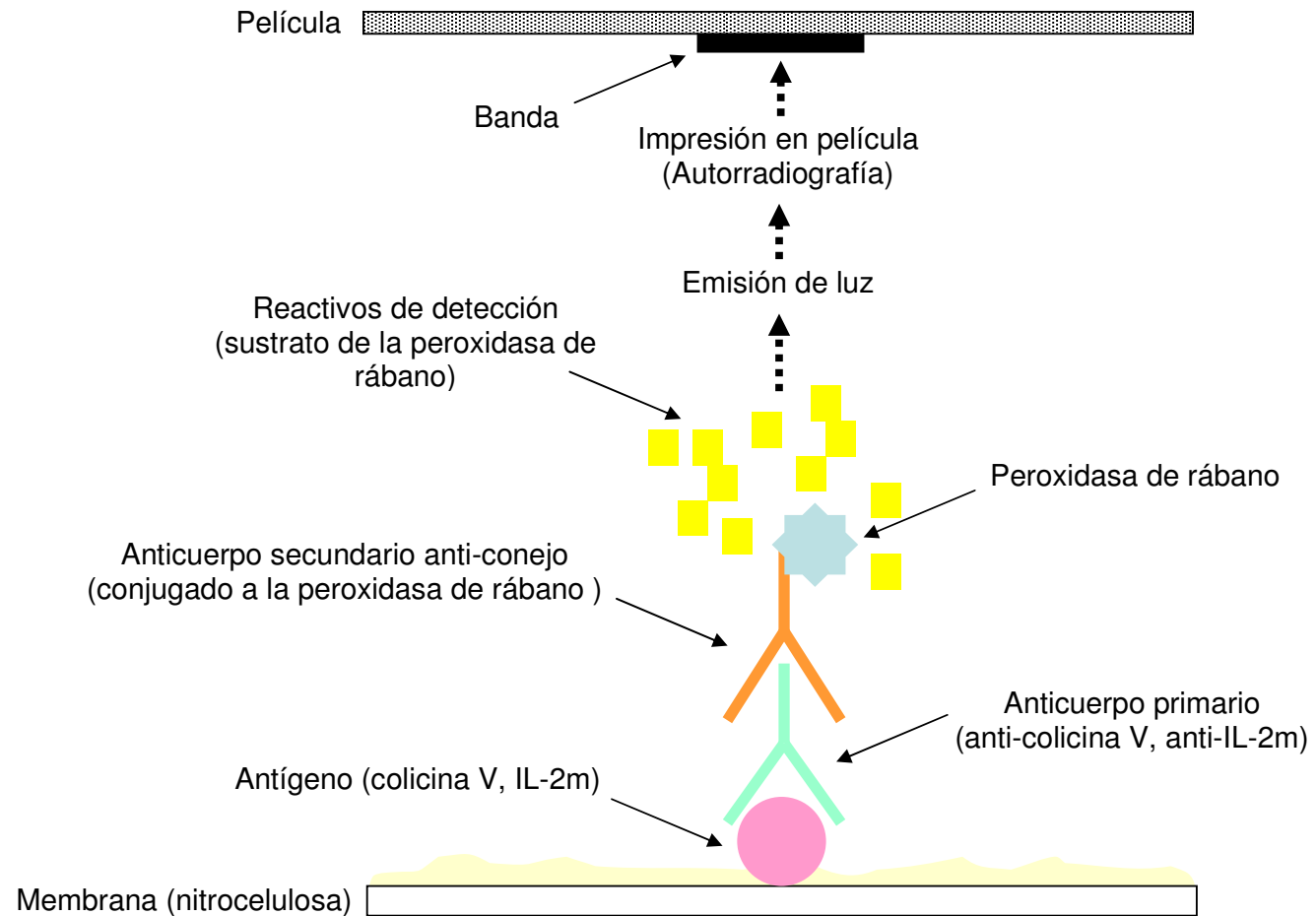


Fig. III.5. Representación esquemática de un inmunoensayo enzimático de tipo *dot-blotting*, *slot-blotting* o *Western-blotting*, tal y como se han empleado en esta Tesis Doctoral

mientras que pIL2a presentaba una cola de 14 nucleótidos (subrayados) complementarios a los que codifican la secuencia amino-terminal de la proIL-2. (Fig. III.6).

Paralelamente, se amplificó un segundo fragmento de 586 pb (fragmento 2) (Fig. III.6) con los cebadores pIL2c (5'-GAAGCTAACGGAGGAGCACCCACTTCAAG-3') y pIL2f (5'-GGATCCTTATTGAGGGCTTGTTGAG-3'), a partir del plásmido pT1-IL2 (Steidler y col., 1998). Los 15 nucleótidos del extremo 5' del cebador pIL2c (subrayados) eran complementarios a la región 3' del líder de la lactococina A, mientras que la secuencia del cebador pIL2f incorporaba un lugar de corte para la enzima de restricción *Bam*HI. El programa de PCR fue el siguiente:

[(92°C, 2 min) x 1 ciclo] + [(92°C, 1 min; 40°C, 1 min; 72°C, 1 min) x 4 ciclos] + [(92°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1 min) x 22 ciclos].

Los fragmentos 1 y 2 se diluyeron en agua destilada (1:200) y las soluciones resultantes se mezclaron (1:1). La mezcla (2 µl) se empleó para amplificar un fragmento de 763 pb con los cebadores pAD1 y pIL2f. El fragmento, que se denominó *PnisA-IlcnA/il2m*, contenía el gen híbrido "líder de lactococina A-prointerleuquina-2" bajo control del promotor inducible de la nisina y estaba flanqueado por lugares de restricción *Eco*RI y *Bam*HI (Fig. III.6). En este caso, el programa de PCR utilizado para obtener el fragmento fue:

[(92°C, 2 min) x 1 ciclo] + [(92°C, 1 min; 42°C, 1 min; 72°C, 1 min) x 4 ciclos] + [(92°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1 min) x 22 ciclos].

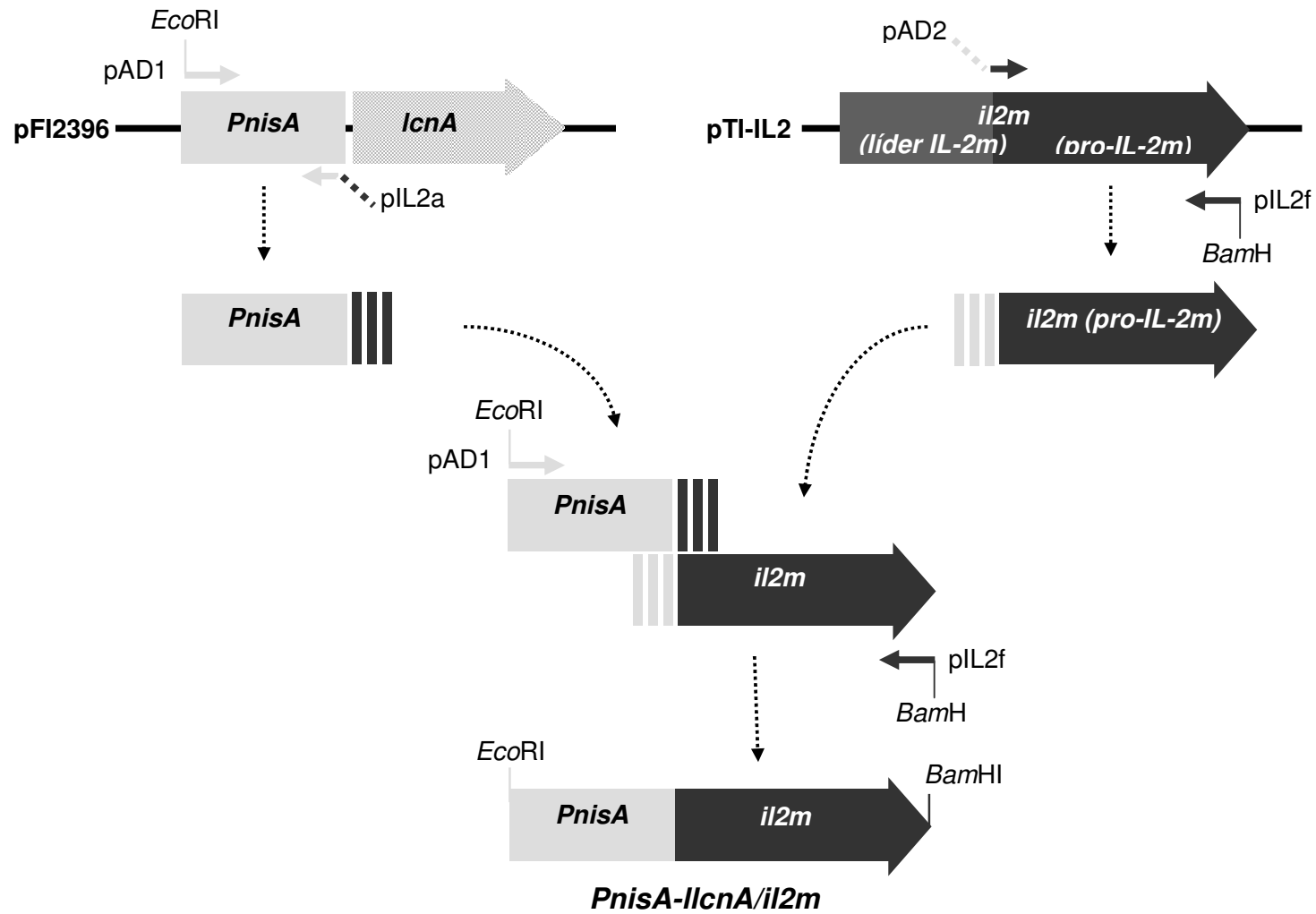


Fig. III.6. Construcción del fragmento *PnisA-IcnA/il2m* empleando la técnica de PCR.

III.2.5.2. Clonación del fragmento *PnisA-lcnA/il2m* y transformación de *E. coli* MC1022, *L. lactis* FI5876 y *L. lactis* FI7847

El fragmento *PnisA-lcnA/il2m* se clonó en el vector pCR2.1 y el plásmido resultante (pFI2401) se introdujo en *E. coli* TOP10F1' mediante electroporación (ver sección III.2.2.3). La cepa resultante se denominó *E. coli* FI9960. La secuencia de la construcción génica se determinó mediante secuenciación nucleotídica (ver sección III.2.2.4).

Posteriormente el fragmento *PnisA-lcnA/il2m* se digirió con la enzima *EcoRI* y se subclonó en el vector pTG262 (ver sección III.2.2.5). De esta manera, se obtuvieron los plásmidos pFI (cuando el fragmento *PnisA-lcnA/il2m* estaba insertado en orientación directa) y pFI (orientación inversa). La transformación de *L. lactis* FI7847 y FI5876 con estos plásmidos (ver sección III.2.2.6) dio origen a las nuevas cepas *L. lactis* FI9947 (*L. lactis* FI7847, pFI2398), *L. lactis* FI9948 (*L. lactis* FI7847, pFI2399), *L. lactis* FI9955 (*L. lactis* FI5876, pFI2398) y *L. lactis* FI9956 (*L. lactis* FI5876, pFI2399).

Posteriormente, las cepas recombinantes fueron transformadas con el plásmido pFI2148 (que contiene los genes *lcnCD*) (Horn y col., 1999), generándose las cepas *L. lactis* FI9949 (*L. lactis* FI9947, pFI2148), *L. lactis* FI9950 (*L. lactis* FI9948, pFI2148), *L. lactis* FI9957 (*L. lactis* FI9955, pFI2148) y *L. lactis* FI9958 (*L. lactis* FI9956, pFI2148).

E. coli MC1022 también se transformó con los plásmidos pFI2398 y pFI2399 siguiendo el procedimiento descrito en la sección III.2.2.3. El objetivo era disponer de una fuente rápida y sencilla de los citados plásmidos. De esta manera, se generaron las cepas *E. coli* FI9945 (pFI2398) y *E. coli* FI9946 (pFI2399).

III.2.5.3. Análisis de la producción de IL-2m y/o nisina A

III.2.5.3.1. Pruebas de difusión en agar

La actividad antimicrobiana presente en los sobrenadantes de los cultivos de las cepas recombinantes se evaluó mediante las pruebas de difusión en agar descritas en la sección III.2.2.8. Como microorganismos indicador se empleó *L. lactis* FI9180.

III.2.5.3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con Tris y glicina (Tris-G-PAGE)

La técnica de electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con Tris y glicina (*Tris-G-PAGE*, del inglés *Tris-Glycine-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) permite una correcta separación electroforética de proteínas de un tamaño entre 5 y 500 kDa, como es el caso de la IL-2m (17,2 kDa). Estos geles se pueden emplear para *Western blotting* y también para secuenciar los péptidos resueltos.

En este trabajo, los sobrenadantes obtenidos a partir de cepas presuntamente productoras de IL-2m se trataron convenientemente y se sometieron a Tris-G-PAGE por separado. Uno de los geles se tiñó para determinar el tamaño de las bandas proteicas resueltas. Las bandas proteicas resueltas en el gel restante se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para la posterior detección inmunológica de la banda proteica de interés mediante la técnica de hibridación de Western o *Western blotting*

(A) Preparación de las muestras: Los cultivos de las cepas presuntamente productoras de IL-2m se crecieron durante la noche en 100 ml de caldo GM17. Los sobrenadantes se obtuvieron mediante centrifugación de los cultivos a 10.000 rpm durante 10 min. y se mantuvieron en un baño de hielo picado. Posteriormente, a 90 ml de los sobrenadantes se les añadieron 135 ml de etanol absoluto a -80°C. La mezcla se centrifugó a 15.000 rpm

durante 30 min. a una temperatura de -5°C . Tras eliminar los sobrenadantes, se efectuó una centrifugación adicional para evitar cualquier resto líquido. Los sedimentos se dejaron secar durante unos minutos y, finalmente, se resuspendieron en $450\ \mu\text{l}$ de Tris 10 mM (pH 7,5). Antes de realizar la electroforesis, las muestras se mezclaron con la misma cantidad del tampón comercial *Tris-Glycine Sample Buffer* (2 x) (Novex) y se trataron a 85°C durante 2 min.

(B) Electroforesis: La electroforesis se llevó a cabo en geles NuPAGE Tris-Glycine (Novex) dispuestos en el interior de una cubeta Xcell™ II Mini-Cell (Novex) rellena de una dilución 1:9 (v/v) del tampón comercial *Tris-Glycine Running Buffer* (10 x) (Novex) en agua desionizada. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 125 V durante aproximadamente 90 min. Como estándares para determinar el tamaño de las bandas proteicas se emplearon una muestra de IL-2m pura (Sigma) y el producto *MagicMark Western Standard* (Novex) que contiene 8 proteínas de un tamaño entre 20 y 120 kDa. Una vez finalizada la electroforesis, el gel que no se destinaba al *Southern blotting* se tiñó con el *kit Colloidal Blue Staining* (Novex) siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.2.5.3.3. Ensayos *Western blotting* y *slot-blotting*

El fundamento de los ensayos *Western blotting* (Sambrook y Russell, 2001) y *slot-blotting* es idéntico al del *dot-blotting* (Fig. III.5).

Una vez finalizada la electroforesis, las bandas proteicas resueltas en uno de los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Biosciences) con el equipo de transferencia *Western Transfer Apparatus* (Novex) (25 V, 90 min.), siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. Se trata de una difusión de proteínas, desde el gel hasta la membrana receptora, propiciada por la aplicación de un campo eléctrico transversal. Seguidamente, para minimizar la adsorción inespecífica, la membrana se introdujo en 30 ml de una solución de bloqueo (PBS con un

2% de albúmina sérica bovina) (BSA) y se incubó a 4°C durante 16 h.

La detección de las muestras de IL-2m inmovilizadas en las membranas de nitrocelulosa se realizó empleando el *kit ECL Advance Western blotting Detection* (Amersham Biosciences). Para ello fueron necesarios anticuerpos policlonales anti-IL-2m obtenidos en conejos (Signet, Cambridge, Reino Unido) (anticuerpos primarios) y anticuerpos anti-conejo conjugados a la peroxidasa de rábano (Sigma) (anticuerpos secundarios). En este caso, también se siguieron estrictamente las instrucciones facilitadas con el *kit*. Una vez que los anticuerpos antiespecie conjugados a la peroxidasa de rábano reaccionan con los anticuerpos anti-IL-2m unidos a la IL-2m, se procede a su detección empleando los agentes de detección 1 y 2 del citado *kit*. El agente de detección 1 se descompone rápidamente liberando peróxido de hidrógeno, el sustrato de la peroxidasa de rábano. La peroxidasa desdobra el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, el cual oxida el luminol presente en el agente de detección 2, generando luz azul. Los resultados se visualizaron por autorradiografía empleando películas Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences).

En el caso del ensayo *slot-blotting*, los antígenos (sobrenadantes) se fijan a una membrana de nitrocelulosa con ayuda de un equipo de microfiltración (GeneMate). Este aparato consta de una base plástica en la que se depositan papeles de filtro. Sobre éstos se deposita la membrana de nitrocelulosa y, sobre ésta, una guía perforada que encaja en la base plástica inferior con la ayuda de tornillos, de tal manera que el sistema queda herméticamente cerrado. La guía contiene 48 orificios con forma de franja, dispuestos en dos filas, que sirven para depositar los antígenos sobre las membranas. La base plástica inferior se conecta a una bomba de vacío a través de un tubo de silicona con una válvula para regular el flujo. Este sistema permite depositar grandes volúmenes de muestra (hasta 200 µl/orificio) sin riesgo de que la muestra se extienda por capilaridad sobre una superficie mayor a la delimitada por el orificio.

Para la realización de este último ensayo se emplearon muestras de 100 μ l, tanto de sobrenadantes como extractos intracelulares. Estos últimos se incluyeron para determinar si parte de la IL-2m quedaba retenida en el citoplasma de las células productoras. Para obtener los extractos intracelulares, se centrifugaron los cultivos (al final de su fase exponencial) a 7.000 rpm durante 20 min y a 2°C, y se eliminaron los sobrenadantes. Los sedimentos se resuspendieron en 1 ml de acetato sódico 50mM (pH 6). A continuación, se repitió el mismo proceso de centrifugación y resuspensión. Seguidamente, se añadieron perlas de vidrio de 0,10-0,11 mm de diámetro a los concentrados celulares y se agitaron en un vórtex durante 1 min, proceso que se repitió cinco veces. Posteriormente, se dejaron reposar en hielo durante unos minutos y se centrifugaron a 11.000 rpm durante 30 min. Finalmente, los sobrenadantes resultantes de la última centrifugación se mantuvieron a -80°C hasta su análisis.

III.2.5.3.4. ELISA sándwich

Para la determinación de la concentración de IL-2m existente en los sobrenadantes de los lactococos productores, se recurrió a la técnica ELISA (del inglés *Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay*) en formato sándwich empleando los reactivos, estándares y controles incluidos en el *kit Mouse Interleukin-2 (mIL-2) ELISA* (BioSource Internacional Inc.). Se realizaron un total de cuatro ensayos independientes y, en cada uno de ellos, se incluyeron los sobrenadantes, los estándares y los controles por cuatuplicado.

El principio de esta técnica es el siguiente:

Los sobrenadantes problema se depositan en pocillos de placas microtituladoras pretapizados con un anticuerpo monoclonal específico para la IL-2m y, a continuación, se añade un segundo anticuerpo monoclonal biotinilado. Durante una primera incubación, el antígeno (IL-2m) se une simultáneamente al anticuerpo inmovilizado (de captura) por un lugar de su

molécula y al anticuerpo biotinilado de fase líquida por otro lugar distinto. Tras la eliminación del exceso de anticuerpo secundario, se añade la enzima (estreptavidina-peroxidasa), cuyas moléculas se unen específicamente a las del anticuerpo biotinilado (reacción estreptavidina-biotina). Tras una segunda incubación y un lavado para eliminar el exceso de de enzima, se añade el substrato cromógeno (TMB). Entonces, la peroxidasa actúa sobre el substrato y da lugar a la aparición de color, cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de IL-2m presente en la muestra original.

Metodología:

1. Añadir 50 µl de las muestras y estándares en los correspondientes pocillos, que se comercializan ya pretapizados con un anticuerpo monoclonal anti-IL-2m. Las muestras problema eran sobrenadantes filtrados obtenidos a partir de cultivos en caldo GM17 de los lactococos productores de IL-2m. Los estándares empleados poseían las siguientes concentraciones de IL-2m: 0, 16, 32, 63, 125, 250, 500 y 1000 pg ml⁻¹. Para cada ensayo se realizó una curva estándar a partir de triplicados de los distintos estándares. Además, se dejaron tres pocillos vacíos para que sirvieran de blanco cromógeno.

2. Añadir 50 µl de la solución de anticuerpo anti-IL-2m biotinilado (excepto en los pocillos destinados a blanco cromógeno) y agitar suavemente la placa.

3. Cubrir la placa e incubar durante 2 h a 37°C.

4. Extraer completamente el líquido de los pocillos mediante decantación y aspiración.

5. Lavar los pocillos 4 veces. En cada lavado se rellenan los pocillos con la solución de lavado (al menos 0,4 ml por pocillo); tras 30 segundos de contacto, se aspira el líquido y se invierte la tapa sobre papel absorbente hasta que los pocillos estén completamente secos.

6. Añadir 100 μ l de la solución estreptavidina-peroxidasa, excepto en los pocillos destinados a blanco cromógeno.

7. Cubrir la placa e incubar durante 30 min. a temperatura ambiente.

8. Extraer completamente el líquido de los pocillos mediante decantación y aspiración.

9. Lavar los pocillos 4 veces. En cada lavado se rellenan los pocillos con la solución de lavado (al menos 0,4 ml por pocillo); tras 30 segundos de contacto, se aspira el líquido y se invierte la tapa sobre papel absorbente hasta que los pocillos estén completamente secos.

10. Añadir 100 μ l de la solución de cromógeno estabilizado (TMB) en cada pocillo. En ese momento, el líquido de los pocillos positivos empezará a convertirse en azul.

11. Cubrir inmediatamente la placa e incubar durante 30 min. a temperatura ambiente y en oscuridad.

12. Añadir 100 μ l de la solución de parada en cada pocillo y agitar suavemente las placas.

13. Leer la densidad óptica (450 nm) de los pocillos habiendo realizado previamente un blanco frente al blanco cromógeno (compuesto únicamente de 100 μ l de la solución de cromógeno estabilizado y 100 μ l de la solución de parada). La lectura se debe efectuar dentro de las dos primeras horas desde la adición de la solución de parada.

14. Representar los valores de absorbancia de los estándares frente a la concentración de IL-2m en esos mismos estándares y calcular la ecuación de regresión.

15. Calcular la concentración de IL-2m en las muestras problema a partir de la ecuación de regresión.

III.2.5.4. Actividad biológica de la IL-2m

La actividad biológica de la IL-2m producida los lactococos recombinantes se evaluó mediante el bioensayo CTLL-2 descrito por Gillis y col. (1978) y modificado por Ahmed y col. (1994) y Hopkins y Failla (1995). Este bioensayo se basa en que la proliferación de la línea celular CTLL-2 depende de la presencia en el medio de IL-2 (humana o murina). Por lo tanto, únicamente en el caso de que la IL-2m presente en los sobrenadantes de los lactococos sea biológicamente activa, se observará proliferación celular.

El procedimiento original de Gillis y col. (1978) implicaba la incorporación de timidina marcada radioactivamente para evaluar el grado de proliferación celular. Posteriormente, Ahmed y col. (1994) y Hopkins y Failla (1995) comprobaron que la timidina tritiada se podía sustituir por el colorante Alamar Blue sin que existiera una disminución en la sensibilidad del ensayo. La intensidad del color de los cultivos tras la adición de Alamar Blue se correlaciona directamente con el grado de proliferación celular y se puede cuantificar espectrofotométricamente en un lector de placas de ELISA. El Alamar Blue es un indicador de oxido-reducción que se reduce en presencia de células metabólicamente activas. Tanto la forma reducida como la oxidada muestran una elevada absorbancia a 570 nm pero, sólo la forma oxidada muestra una elevada absorbancia a 620 nm. Por lo tanto, el crecimiento de las células CTLL-2 se puede medir restando el valor obtenido a 570 nm del obtenido a 620 nm.

La línea celular CTLL-2 se obtuvo de la ATCC (Rockville, EE.UU.) y se creció en medio RPMI 1640 (Gibco), con un 8% de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina (2 mmol l^{-1}), piruvato sódico (2 mmol l^{-1}), 2-mercaptoetanol (50

$\mu\text{mol l}^{-1}$), fungizona ($0,54 \mu\text{mol l}^{-1}$), penicilina (10^5 U l^{-1}) y estreptomina (100 mg l^{-1}). El medio y sus suplementos fueron adquiridos a Gibco. El crecimiento se efectuó en placas microtituladoras de 96 pocillos. Los sobrenadantes de los lactococos recombinantes se añadieron a pocillos que contenían 2×10^4 células CTLL-2 en $100 \mu\text{l}$ del medio RPMI complementado. Se adicionaron las cantidades de los sobrenadantes requeridas para que sus concentraciones finales en los pocillos fueran del 5, 10 y 20%. Tras una incubación de 20 h, a cada pocillo se le añadieron $20 \mu\text{l}$ del colorante Alamar Blue (Alamar Biosciences, Sacramento, EE.UU.) y, posteriormente, las placas se incubaron durante otras 20 h, antes de proceder a la medición de la absorbancia a 570 y 620 nm. Todas las muestras y los estándares se evaluaron por triplicado (para cada dilución). Como estándares se emplearon diversas concentraciones (U ml^{-1}) de interleuquina-2 humana (IL-2h) recombinante (2 U ng^{-1} ; Genzyme, Boston, EE.UU.). La actividades biológicas específicas de la interleuquina-2 humana (IL-2h) y de la murina (IL-2m) son idénticas en este tipo de ensayo (Mosmann y col., 1987).

III.2.6. Efecto de la producción heteróloga de lactococina A, pediocina PA-1, colicina V en la proliferación de células HT-29

El efecto de los péptidos producidos heterológamente sobre la proliferación de las células intestinales HT-29 se evaluó siguiendo el procedimiento descrito por Xaus y col. (2001). Este procedimiento se basa en la capacidad del colorante cristal violeta para penetrar dentro de las células fijadas con paraformaldehído. Por lo tanto, cuanto mayor sea el número de células existentes, mayor será la cantidad de colorante que queda retenido. Dicha cantidad se puede medir mediante lectura espectrofotométrica a 630 nm.

Las células HT-29 fueron suministradas por el Dpto. de Inmunología de Puleva Biotech S.A. y se crecieron en medio DMEM (Dulbecco modified Eagle

medium, Gibco) con FBS (10%) y L-glutamina (1 mmol l⁻¹). Para el ensayo de proliferación, se depositaron 10⁵ células HT-29 (vehiculadas en 100 µl del citado medio) en los pocillos de placas microtituladoras de 96 pocillos (Nunc) y se incubaron durante 24 h. Posteriormente, se añadieron los sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos de las cepas recombinantes (1x10⁸ ufc ml⁻¹) en caldo GM17. La cantidad añadida fue la necesaria para que obtener una concentración final de sobrenadante del 5, 10 y 20% (en el pocillo). A continuación, se incubaron las placas durante 24h adicionales. Tras la incubación, se eliminaron los sobrenadantes y se fijaron las células con 100 µl de una solución de paraformaldehído (al 4% en PBS) a temperatura ambiente durante 30 min. Las placas se lavaron 3 veces por inmersión con agua bidestilada. Seguidamente, se tiñeron las células con 100 µl de una solución acuosa de cristal violeta (0,1%). Tras una incubación a temperatura ambiente durante 20 min, las placas se lavaron 3 veces con agua bidestilada y se dejaron secar a 37°C. Finalmente, se añadieron 100 µl de HCl 0,1M para que se lisaran las células, de tal modo que el colorante se liberara al medio exocelular. Tras 5 min. de incubación, se realizaron las determinaciones espectrofotométricas a 630 nm en el lector de placas de ELISA. Se evaluó por triplicado cada una de las concentraciones (5, 10 y 20%) de cada sobrenadante.

Capítulo IV

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. Producción inducible de lactococina A en *L. lactis* empleando el sistema de secreción LcnC-LcnD

IV.1.1. Construcción y clonación del fragmento *PnisA-lcnA-lciA*

La producción inducible de lactococina A en *L. lactis* FI7847 y FI5876 se basó en la introducción de dos plásmidos compatibles, uno con los genes estructural (*lcnA*) y de inmunidad (*lciA*) de dicha bacteriocina bajo el control de *PnisA* (*PnisA-lcnA-lciA*) y el otro (pFI2148; Horn y col., 1999) con los genes *lcnC* y *lcnD* bajo control de su propio promotor. El fragmento *PnisA-lcnA-lciA* se construyó mediante PCR empleando la técnica de solapamiento de fragmentos génicos con extremos complementarios y se clonó en el plásmido pCR2.1, dando lugar al plásmido pFI2400. El análisis de la secuencia nucleotídica del fragmento insertado en pCR2.1 reveló que se correspondía fielmente con el fragmento deseado, con la excepción de la sustitución de una única base que modificaba el codón 42 de *lciA*, que pasaba de **T**CT (serina) a **C**CT (prolina). Posteriormente, se comprobó que tal sustitución no afectaba a la actividad biológica de la proteína homónima LciA.

La construcción *PnisA-lcnA-lciA* se aisló de pFI2400 en forma de fragmento *EcoRI* y se subclonó en pTG262, originando los plásmidos pFI2396 (inserto en orientación directa) y pFI2397 (en orientación inversa). La cotransformación de *L. lactis* FI7847 (cepa no productora de nisina y sensible a la misma pero que contiene los genes *nisRK*) y *L. lactis* FI5876 (cepa productora de nisina) con pFI2396 y pFI2148 dió lugar a las cepas FI9943 y FI9953, respectivamente. Por otra parte, la cotransformación de *L. lactis* FI7847 y *L. lactis* FI5876 con pFI2397 y pFI2148 dió lugar a las cepas FI9944 y FI9954, respectivamente.

IV.1.2. Producción de lactococina A en los derivados de *L. lactis* FI7847

Seguidamente, se realizaron ensayos de difusión en agar utilizando un indicador sensible a la lactococina A (*L. lactis* FI9921) y se observó que la presencia de los genes *lcnC* y *lcnD* (pFI2148) era imprescindible para la producción exocelular de lactococina A. De hecho, no se observó actividad antimicrobiana en los sobrenadantes obtenidos a partir de los derivados de FI7847 que carecían del plásmido pFI2148 (FI9941 y FI9942) (Tabla IV.1).

En contraste, tanto FI9943 como FI9944, que contenían la construcción P_{nisA} -*lcnA-lciA* (pFI2396 o pFI2397) y los genes *lcnC* y *lcnD* (pFI2148), producían lactococina A cuando el sistema se inducía previamente con nisina. La cantidad de lactococina A producida por ambas cepas (y particularmente por FI9943) era superior a la existente en los sobrenadantes de la cepa productora *L. lactis* WM4 (Tabla IV.1; Fig. IV.1). En el transcurso de este estudio se observó que la actividad de la lactococina en los sobrenadantes de diferentes cultivos de *L. lactis* WM4 variaba considerablemente, un hecho previamente descrito por otros autores (Holo *et al.*, 1991). En este sentido, la producción de esta bacteriocina en FI9943 y FI9944 fue, además de elevada, muy estable, no observándose las grandes fluctuaciones que caracterizan a la cepa parental.

IV.1.3. Coproducción de lactococina A y nisina A en los derivados de *L. lactis* FI5876

Con respecto a los derivados de *L. lactis* FI5876, los bioensayos también demostraron que la presencia de los genes *lcnC* y *lcnD* (pFI2148) era imprescindible para la producción exocelular de la bacteriocina. En este sentido, tampoco se pudo detectar actividad antimicrobiana en los sobrenadantes

obtenidos a partir de los derivados que carecían del plásmido pFI2148 (FI9951 y FI9952) (Tabla IV.1).

Por otra parte, las pruebas de difusión en agar revelaron que FI9953 y FI9954 producían lactococina en una cantidad similar o mayor que la de FI9943 sin necesidad de inducción previa (Tabla IV.1; Fig. IV.1). Además, ambas cepas coproducían nisina A y lactococina A, siendo la productividad de nisina equiparable a la de la cepa parental (FI5876) (Tabla IV.1; Fig. IV.2).

Al igual que sucedía con los derivados de FI7847, la producción de lactococina A por parte de FI9953 y FI9954 era mucho más estable y reproducible que en el caso de *L. lactis* WM4, cepa caracterizada por una gran fluctuación de la producción de la bacteriocina dependiendo del cultivo del que se obtiene el sobrenadante.

IV.2. Producción inducible de pediocina PA-1 en *L. lactis* empleando el sistema de secreción LcnC-LcnD

IV.2.1. Construcción y clonación del fragmento *PnisA-lcnA/pedA*

La estrategia seguida para la producción inducible de pediocina PA-1 en *L. lactis* FI7847 y FI5876 fue similar a la descrita anteriormente para la lactococina A. El fragmento *PnisA-lcnA/pedA* se construyó mediante PCR empleando igualmente la técnica de solapamiento de fragmentos génicos con extremos complementarios y se clonó en el plásmido pCR2.1, dando lugar al plásmido pFI2394. El análisis de la secuencia nucleotídica del fragmento insertado en pCR2.1 reveló que se correspondía exactamente con la esperada.

La construcción *PnisA-lcnA/pedA* se aisló de pFI2394 en forma de fragmento *EcoRI* y se subclonó en pTG262, originando los plásmidos pFI2391

(inserto en orientación directa) y pFI2392 (en orientación inversa). La cotransformación de *L. lactis* FI7847 y *L. lactis* FI5876 con pFI2391 y pFI2148 dió lugar a las cepas FI9917 y FI10038, respectivamente. Por otra parte, la cotransformación de *L. lactis* FI7847 y *L. lactis* FI5876 con pFI2392 y pFI2148 dió lugar a las cepas FI9919 y FI10039, respectivamente.

IV.2.2. Producción de pediocina PA-1 en los derivados de *L. lactis* FI7847

Las pruebas de difusión en agar empleando como indicador sensible a la pediocina PA-1 *E. faecalis* TAB28 revelaron que las cepas FI9917 y FI9919 producían esa bacteriocina siempre que se añadiera nisina como agente inductor (Tabla IV.1; Fig. IV.3). La concentración de pediocina PA-1 en los sobrenadantes de las distintas cepas construidas se cuantificó de dos maneras. Por una parte, introduciendo en las pruebas de difusión en agar estándares de pediocina PA-1 pura cuya concentración oscilaba entre 0 y 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. De esta manera, se determinó que la producción de pediocina en FI9917 y FI9919 era de 460 (± 15) y 400 (± 14) ng ml^{-1} , respectivamente. Estos valores representan aproximadamente el 21% y el 18%, respectivamente, de la pediocina producida por *P. acidilactici* 347 ($2200 \pm 27 \text{ ng ml}^{-1}$). Por otra, mediante un ELISA-IC empleando anticuerpos policlonales específicos frente a la pediocina PA-1. Sin embargo, los concentraciones mencionadas se encuentran actualmente en el límite de detección de los anticuerpos, por lo que no se pudieron extraer conclusiones de los valores de absorbancia obtenidos tras el inmunoensayo.

Como sucediera con la lactococina A, se observó que la presencia de los genes *lcnC* y *lcnD* (pFI2148) era imprescindible para la producción exocelular de pediocina PA-1 ya que ninguna de las cepas que carecían del plásmido pFI2148 (FI9913 y FI9915) mostraron actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes (Tabla IV.1).

Tabla IV.1. Producción de bacteriocinas por parte de los lactococos recombinantes^a

Cepa	Hospedador	Plásmido	Bacteriocina			
			Lactococina A	Pediocina PA-1	Colicina V	Nisina A
FI9941	FI7847	pFI2396	-	-	-	-
FI9951	FI5876	pFI2396	-	-	-	++++
FI9942	FI7847	pFI2397	-	-	-	-
FI9952	FI5876	pFI2397	-	-	-	++++
FI9943	FI7847	pFI2396 pFI2148	++++	-	-	-
FI9953	FI5876	pFI2396 pFI2148	+++++	-	-	++++
FI9944	FI7847	pFI2397 pFI2148	++++	-	-	-
FI9954	FI5876	pFI2397 pFI2148	+++++	-	-	++++
FI9913	FI7847	pFI2391	-	-	-	-
FI10036	FI5876	pFI2391	-	-	-	++++
FI9915	FI7847	pFI2392	-	-	-	-
FI10037	FI5876	pFI2392	-	-	-	++++
FI9917	FI7847	pFI2391 pFI2148	-	+	-	-
FI10038	FI5876	pFI2391 pFI2148	-	++	-	++++
FI9919	FI7847	pFI2392 pFI2148	-	+	-	-
FI10039	FI5876	pFI2392 pFI2148	-	++	-	++++

^aLa producción de las distintas bacteriocinas se determinó mediante bioensayos y/o inmunoensayos a partir de sobrenadantes obtenidos de cultivos con, aproximadamente, la misma concentración bacteriana. La producción de lactococina A, pediocina PA-1, colicina V y nisina A por parte de los lactococos recombinantes se compara con la de las cepas de referencia *L. lactis* WM4, *P. acidilactici* 347, *E. coli* ATCC14763 y *L. lactis* FI5876, respectivamente.

(+++++): producción superior a la de la respectiva cepa de referencia; (++++): producción entre un 75 y un 100% de la exhibida por la respectiva cepa de referencia; (+++): producción entre un 50 y un 75% de la exhibida por la respectiva cepa de referencia; (++) : producción entre un 50 y un 25% de la exhibida por la respectiva cepa de referencia; (+): producción entre un 10 y un 25% de la exhibida por la respectiva cepa de referencia; (-): producción no detectable. La producción de bacteriocinas por parte de los derivados de *L. lactis* FI7847 requiere la inducción previa de los cultivos con nisina.

Tabla IV.1. (cont.). Producción de bacteriocinas por parte de los lactococos recombinantes^a

Cepa	Hospedador	Plásmido	Bacteriocina			
			Lactococina A	Pediocina PA-1	Colicina V	Nisina A
FI10048	FI7847	pFI2436	-	-	-	-
FI10052	FI5876	pFI2436	-	-	-	++++
FI10049	FI7847	pFI2437	-	-	-	-
FI10053	FI5876	pFI2437	-	-	-	++++
FI10050	FI7847	pFI2436 pFI2148	-	-	+	-
FI10054	FI5876	pFI2436 pFI2148	-	-	++	++++
FI10051	FI7847	pFI2437 pFI2148	-	-	+	-
FI10055	FI5876	pFI2437 pFI2148	-	-	++	++++
FI9947	FI7847	pFI2398	-	-	-	-
FI9955	FI5876	pFI2398	-	-	-	++++
FI9948	FI7847	pFI2399	-	-	-	-
FI9956	FI5876	pFI2399	-	-	-	++++
FI9949	FI7847	pFI2398 pFI2148	-	-	-	-
FI9957	FI5876	pFI2398 pFI2148	-	-	-	++++
FI9950	FI7847	pFI2399 pFI2148	-	-	-	-
FI9958	FI5876	pFI2399 pFI2148	-	-	-	++++

^aLa producción de las distintas bacteriocinas se determinó mediante bioensayos y/o inmunoensayos a partir de sobrenadantes obtenidos de cultivos con, aproximadamente, la misma concentración bacteriana. La producción de lactococina A, pediocina PA-1, colicina V y nisina A por parte de los lactococos recombinantes se compara con la de las cepas de referencia *L. lactis* WM4, *P. acidilactici* 347, *E. coli* ATCC14763 y *L. lactis* FI5876, respectivamente.

(++++): producción superior a la de la respectiva cepa de referencia; (++++): producción entre un 75 y un 100% de la exhibida por la respectiva cepa de referencia; (+++): producción entre un 50 y un 75% de la exhibida por la respectiva cepa de referencia; (++) : producción entre un 50 y un 25% de la exhibida por la respectiva cepa de referencia; (+): producción entre un 10 y un 25% de la exhibida por la respectiva cepa de referencia; (-): producción no detectable. La producción de bacteriocinas por parte de los derivados de *L. lactis* FI7847 requiere la inducción previa de los cultivos con nisina.

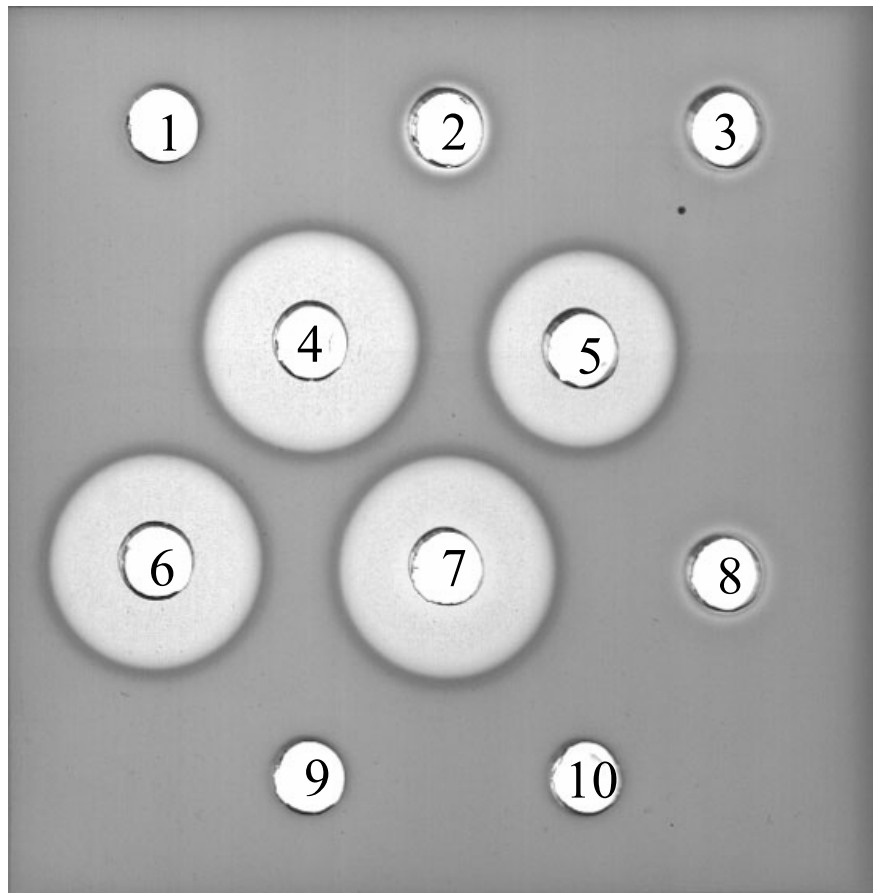


Fig. IV.1. Prueba de difusión en agar para detectar la producción de lactococina A empleando el indicador *L. lactis* FI9921. Las muestras se corresponden con los sobrenadantes de las siguientes cepas de *L. lactis*: (1) FI9943 (cultivo no inducido), (2) WM4, (3) FI5876, (4) FI9166, (5) FI9165, (6) FI9943 (cultivo inducido), (7) FI9953, (8) FI9951, (9) FI9941 (cultivo inducido) y (10) FI9941 (cultivo no inducido). Dada la inestabilidad de la producción de lactococina A por parte de la cepa WM4, también se utilizaron como controles positivos los sobrenadantes de FI9166 y FI9165, dos cepas recombinantes productoras de lactococina A obtenidas en un trabajo anterior (Horn y col., 1999).

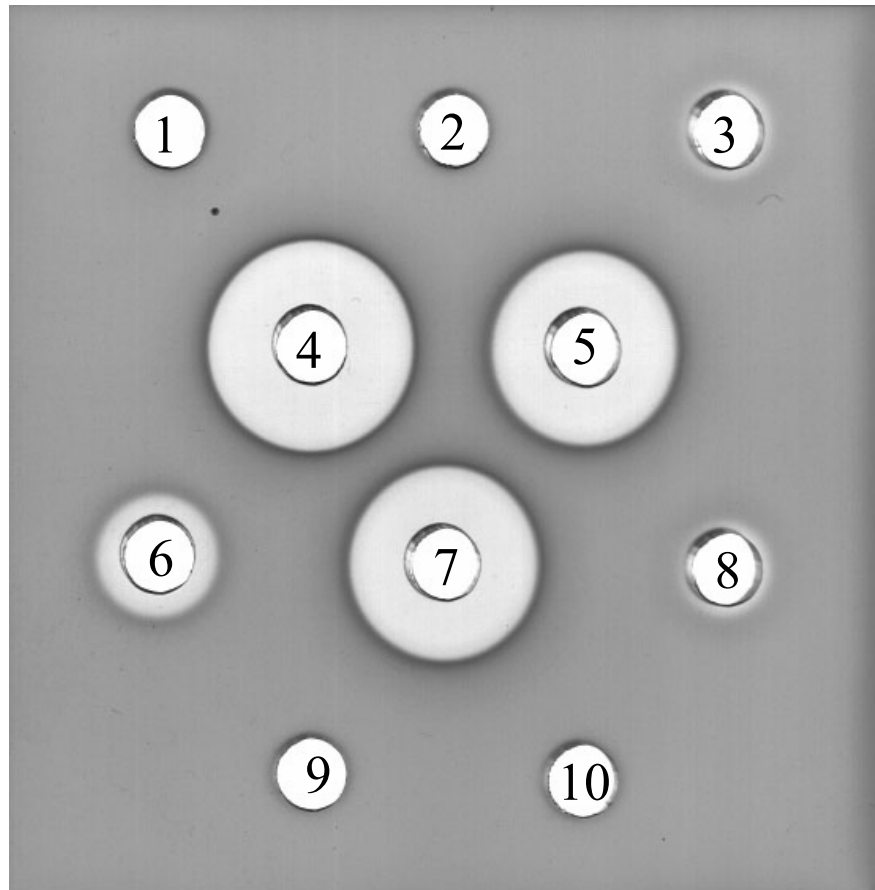


Fig. IV.2. Prueba de difusión en agar para detectar la producción de nisina empleando el indicador *L. lactis* FI9182. Las muestras se corresponden con los sobrenadantes de las siguientes cepas de *L. lactis*: (1) caldo GM17 sin inocular, (2) FI7847, (3) FI7847(cultivo inducido), (4) FI9953, (5) FI5876, (6) FI9943 (cultivo inducido), (7) FI9951, (8) FI9941 (cultivo inducido), (9) FI9943 (cultivo no inducido), y (10) FI9941 (cultivo no inducido).

IV.2.3. Coproducción de pediocina PA-1 y nisina A en los derivados de *L. lactis* FI5876

Con respecto a los derivados de *L. lactis* FI5876, los bioensayos revelaron que FI10038 y FI10039 producían pediocina PA-1 sin necesidad de inducción previa (Tabla IV.1; Fig. IV.3). La concentración de pediocina en los sobrenadantes de FI10038 y FI10039 era de 625 (\pm 23) y 525 (\pm 17) ng ml⁻¹, respectivamente. En este caso, se estimaron unos valores similares (\pm 10%) mediante la técnica ELISA-IC. Estos valores representan aproximadamente el 28% y el 24%, respectivamente, de la pediocina producida por *P. acidilactici* 347 2200 (\pm 27) ng ml⁻¹. Por su parte, la concentración de pediocina en los sobrenadantes de *L. lactis* FI9262, una cepa idéntica a FI10038 con la única diferencia de que el gen híbrido está bajo control del promotor de la lactococina A en vez del de la nisina, fue de 70 ng ml⁻¹, aproximadamente un 3% de la producida por *P. acidilactici* 347. Por otra parte, las pruebas de difusión en agar también demostraron que la presencia de los genes *lcnC* y *lcnC* (pFI2148) era imprescindible para la producción exocelular de pediocina. En este sentido, tampoco se pudo detectar actividad antimicrobiana en los sobrenadantes obtenidos a partir de los derivados que carecían del plásmido pFI2148 (FI10036 y FI10037) (Tabla IV.1).

Adicionalmente, las cepas FI10038 y FI10039 coproducían nisina A y pediocina PA-1, siendo la productividad de nisina equiparable a la de la cepa parental (FI5876) (Tabla IV.1; Fig. IV.4).

Los ensayos en placas microtituladoras empleando los indicadores *E. faecalis* TAB28, *E. faecium* TF1 y *E. faecium* P21 confirmaron estos resultados ya que, en todos los casos, la actividad de los sobrenadantes de *L. lactis* FI10038 representaba aproximadamente un 26% de la existente en los de *P. acidilactici* 347. Más concretamente, la actividad antimicrobiana en los sobrenadantes de *L. lactis* FI10038 y *P. acidilactici* 347 fue de 308 (\pm 21) y 1200 (\pm 7) UB ml⁻¹,

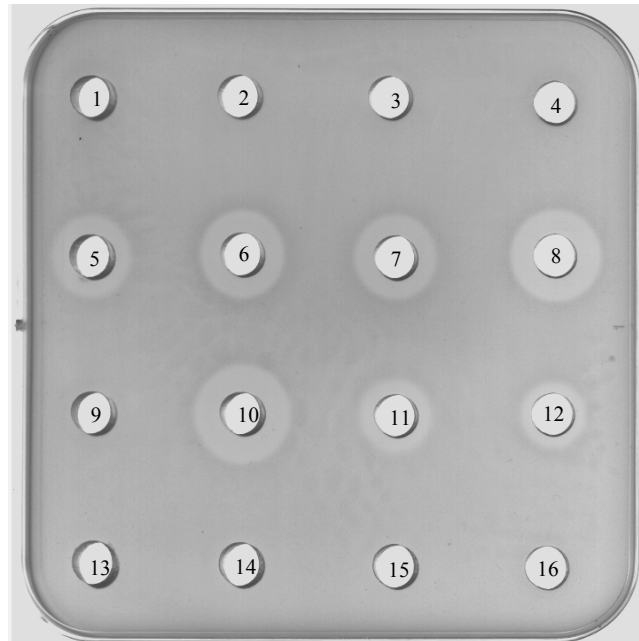


Fig. IV.3. Prueba de difusión en agar para detectar la producción de pediocina PA-1 empleando el indicador *E. faecalis* TAB28. Las muestras se corresponden con los sobrenadantes de las siguientes cepas (pertenecientes a la especie *L. lactis* salvo que se indique lo contrario): (1) FI7847, (2) FI5876, (3) FI9913 (cultivo inducido), (4) FI10036, (5) FI9919, (6) FI10039 (cultivo inducido), (7) FI9917 (cultivo inducido), (8) FI10038, (9) FI9915 (cultivo inducido), (10) *P.acidilactici* 347, (11) FI9181, (12) FI9262, y (13) FI10037. El resto de pocillos no contienen ninguna muestra. *L. lactis* FI9181 y FI9262 son dos cepas recombinantes productoras de pediocina PA-1 obtenidas en un trabajo anterior (Horn y col., 1999).

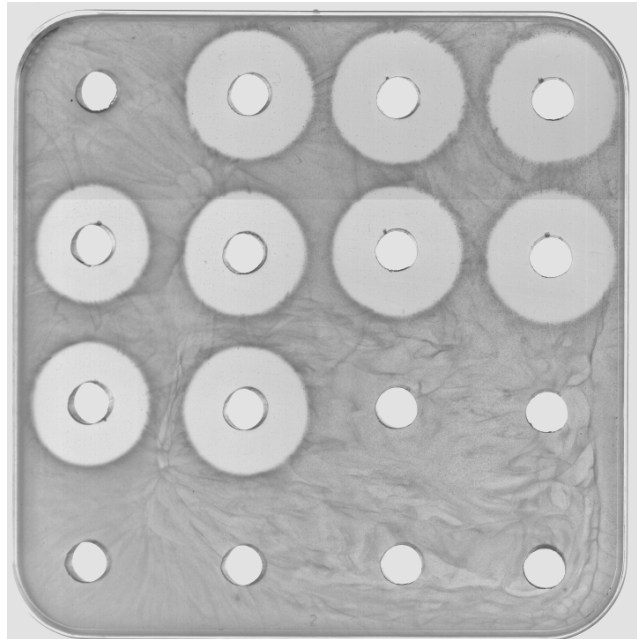


Fig. IV.4. Prueba de difusión en agar para detectar la producción de nisina empleando el indicador *L. lactis* FI9180. Las muestras se corresponden con los sobrenadantes de las siguientes cepas de *L. lactis*: (1) FI7847, (2) y (3) FI5876, (4) FI10036, (5) FI9262, (6) FI10039, (7) FI10039, (8) y (9) FI10038, y (10) FI10037. El resto de pocillos no contienen ninguna muestra. *L. lactis* FI9262 es una cepa recombinante coproductoras de pediocina PA-1 y nisina obtenida en un trabajo anterior (Horn y col., 1999).

respectivamente, frente a *E. faecalis* TAB28, de 2298 (\pm 29) y 8863 (\pm 36) UB ml⁻¹, respectivamente, frente a *E. faecium* TF1, y de 1828 (\pm 15) y 7451 (\pm 37) UB ml⁻¹, respectivamente, frente a *E. faecium* P21. El hecho de que la actividad de los sobrenadantes de *L. lactis* FI5876 fuera de 53 (\pm 5) y 91(\pm 7) UB ml⁻¹ frente a *E. faecium* TF1y *E. faecium* P21, respectivamente, reflejó la poca sensibilidad de estos indicadores a la nisina. En el caso de *E. faecalis* TAB28, una cepa resistente a la nisina, no se detectó actividad antimicrobiana en los sobrenadantes de *L. lactis* FI5876.

El posible efecto combinado de la nisina y la pediocina coproducida por *L. lactis* FI10038 se evaluó utilizando pruebas de difusión en agar y pruebas en caldo. Con las primeras se observó que dentro de los halos de inhibición ocasionados por esta cepa en diversos indicadores, como *E. faecium* TF1, se producía una reducción drástica del número de colonias resistentes, en comparación con las existentes dentro de los halos producidos por *P. acidilactici* 347 y FI9917 (Fig. IV.5). Los halos causados por los sobrenadantes de *L. lactis* FI5876 (productor de nisina) en *E. faecium* TF1eran de menor tamaño que los originados por los sobrenadantes de *P. acidilactici* 347 y *L. lactis* FI9917 (productores de pediocina PA-1); sin embargo, dentro de los halos debidos a *L. lactis* FI5876 no se observaba crecimiento alguno del indicador, a diferencia de lo que sucedía con los halos de *P. acidilactici* 347 y *L. lactis* FI9917, en cuyo interior crecían numerosas colonias resistentes de *E. faecium* TF1(Fig. IV.5). Por su parte, los halos derivados de la actividad antimicrobiana de *L. lactis* FI10038 tenían un tamaño similar a los de *P. acidilactici* 347 y, adicionalmente, no se observaba crecimiento alguno del indicador en su interior (Fig. IV.5).

Por su parte, en las pruebas en caldo se eligió como indicador *Listeria monocytogenes* L15 SV-1/2 ya que se trata de una cepa poco sensible a la nisina y moderadamente sensible a la pediocina PA-1. Básicamente, a los cultivos (10 ml) del indicador se les añadió 1 ml de los sobrenadantes (pH 6,2) obtenidos a partir de cultivos (1×10^8 ufc ml⁻¹) de *L. lactis* FI5876, *L. lactis* FI10038 y *P.*

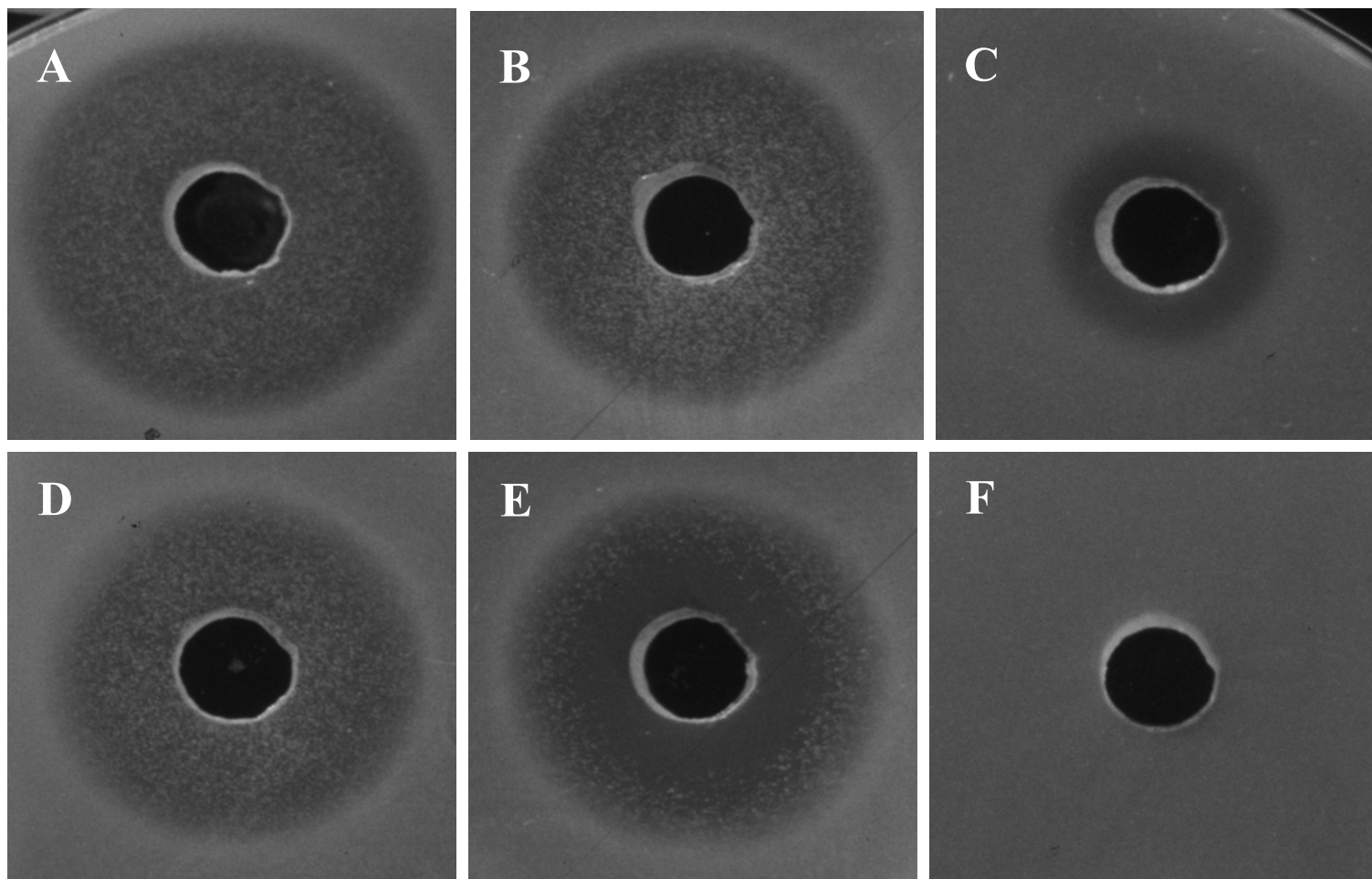


Fig. IV.5. Prueba de difusión en agar para detectar actividad antimicrobiana empleando el indicador *E. faecium* TF1. Las muestras se corresponden con los sobrenadantes de las siguientes cepas: (1) *P. acidilactici* 347; (2) *P. acidilactici* 347 (diluido 1:4 en caldo MRS); (3) *L. lactis* FI5876; (4) *L. lactis* FI9917 (cultivo inducido); (5) *L. lactis* FI10038; y (6) *L. lactis* FI7847. Todas las imágenes están a la misma escala.

acidilactici 347 (este último diluido 1:4 en caldo para que la concentración de pediocina fuera similar a la existente en el sobrenadante de *L. lactis* FI10038), y se incubaron durante 3 h a 32°C. Se probaron dos concentraciones iniciales del indicador: 1×10^5 y 1×10^8 ufc ml⁻¹. Los recuentos obtenidos cuando los cultivos de *L. monocytogenes* (concentración inicial: 1×10^5 ufc ml⁻¹) se inocularon con sobrenadantes de *L. lactis* FI10038 (3×10^3 ufc ml⁻¹) fueron significativamente inferiores a los obtenidos a partir de los cultivos inoculados con los de *L. lactis* FI5876 (2×10^5 ufc ml⁻¹) o *P. acidilactici* 347 (4×10^4 ufc ml⁻¹). La concentración final de los cultivos del patógeno inoculados con 1 ml de caldo GM17 estéril fue de 2×10^6 ufc ml⁻¹ (Tabla IV.2). La tendencia fue similar cuando los cultivos de *L. monocytogenes* con 1×10^8 ufc ml⁻¹ se inocularon con sobrenadantes de *L. lactis* FI10038 (2×10^6 ufc ml⁻¹), *L. lactis* FI5876 (1×10^8 ufc ml⁻¹) y *P. acidilactici* 347 (3×10^7 ufc ml⁻¹) (Tabla IV.2; Fig. IV.6). En este caso, la concentración final de los cultivos del patógeno inoculados con 1 ml de caldo GM17 estéril fue de 5×10^8 ufc ml⁻¹ (Tabla IV.2).

IV.3. Producción inducible de colicina V en *L. lactis* empleando el sistema de secreción LcnC-LcnD

IV.3.1. Construcción y clonación del fragmento *PnisA-llcnA/cvaC*

La estrategia seguida para la producción inducible de colicina V en *L. lactis* FI7847 y FI5876 fue similar a la descrita anteriormente para la lactococina A y la pediocina PA-1. El fragmento *PnisA-llcnA/cvaC* se construyó mediante PCR empleando igualmente la técnica de solapamiento de fragmentos génicos con extremos complementarios y se clonó en el plásmido pCR2.1, dando lugar al plásmido pFI2435. El análisis de la secuencia nucleotídica del fragmento insertado en pCR2.1 reveló que se correspondía exactamente con la esperada.

Tabla IV.2. Efecto de la adición de los sobrenadantes de *L. lactis* FI5876, *L. lactis* FI10038 y *P. acidilactici* 347 sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* L15 SV-1/2

Sobrenadante	<i>L. monocytogenes</i> L15 SV-1/2 ^a	
	1x10 ⁵ cfu ml ⁻¹	1x10 ⁸ cfu ml ⁻¹
Medio de cultivo no inoculado	2x10 ⁶ cfu ml ⁻¹	5x10 ⁸ cfu ml ⁻¹
<i>L. lactis</i> FI5876	2x10 ⁵ cfu ml ⁻¹	1x10 ⁸ cfu ml ⁻¹
<i>L. lactis</i> FI10038	3x10 ³ cfu ml ⁻¹	2x10 ⁶ cfu ml ⁻¹
<i>P. acidilactici</i> 347 ^b	4x10 ⁴ cfu ml ⁻¹	3x10 ⁷ cfu ml ⁻¹

^aConcentración inicial de *L. monocytogenes* L15 SV-1/2 en el medio de cultivo.

^bEl sobrenadante de *P. acidilactici* 347 se diluyó (1:4) con caldo para que la concentración de pediocina fuera similar a la existente en el sobrenadante de *L. lactis* FI10038).

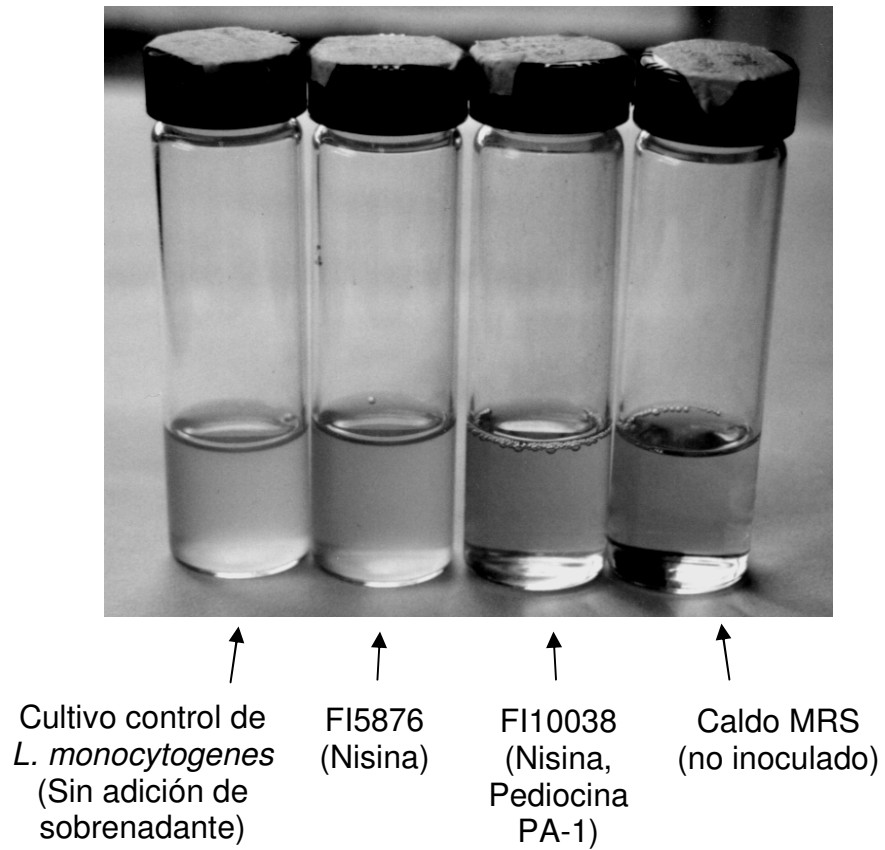


Fig. IV.6. Prueba en caldo para evaluar el efecto de ciertas cepas en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* L15 SV-1/2. Las cepas de las que procedían los sobrenadantes adicionados al cultivo del patógeno están indicadas en la imagen.

La construcción *PnisA-lcnA/cvaC* se aisló de pFI2435 en forma de fragmento *EcoRI* y se subclonó en pTG262, originando los plásmidos pFI2436 (inserto en orientación directa) y pFI2437 (en orientación inversa). La cotransformación de *L. lactis* FI7847 y *L. lactis* FI5876 con pFI2436 y pFI2437 dió lugar a las cepas FI10050 y FI10054, respectivamente. Por otra parte, la cotransformación de *L. lactis* FI7847 y *L. lactis* FI5876 con pFI2437 y pFI2148 dió lugar a las cepas FI10051 y FI10055, respectivamente.

IV.3.2. Producción de colicina V en los derivados de *L. lactis* FI7847 y FI5876

Las pruebas de difusión en agar empleando *E. coli* DH5 α como indicador sensible a la colicina V revelaron que las cepas FI10050 y FI10051 producían esa bacteriocina siempre que se añadiera nisina como agente inductor (Tabla IV.1; Fig. IV.7). Como en los casos anteriores, la presencia de los genes *lcnC* y *lcnD* (pFI2148) era esencial para la producción exocelular de colicina V. No se observó actividad antimicrobiana en los sobrenadantes obtenidos a partir de los derivados de FI7847 que carecían del plásmido pFI2148 (FI10048 y FI10049) (Tabla IV.1).

Las pruebas de difusión en agar empleando el indicador *E. coli* DH5 α también revelaron que las cepas FI10054 y FI10055 producían colicina V, aunque en este caso sin la necesidad de añadir nisina exógena como agente inductor (Tabla IV.1; Fig. IV.7). Estas cepas eran capaces de coproducir simultáneamente nisina A y colicina V, siendo la productividad de nisina equiparable a la de la cepa parental (FI5876) (Tabla IV.1; Fig. IV.8). No se observó actividad antimicrobiana en los sobrenadantes obtenidos a partir de los derivados de FI5876 (FI10052 y FI10053) que carecían del plásmido pFI2148 (y, por tanto, de los genes *lcnCD*) (Tabla IV.1).

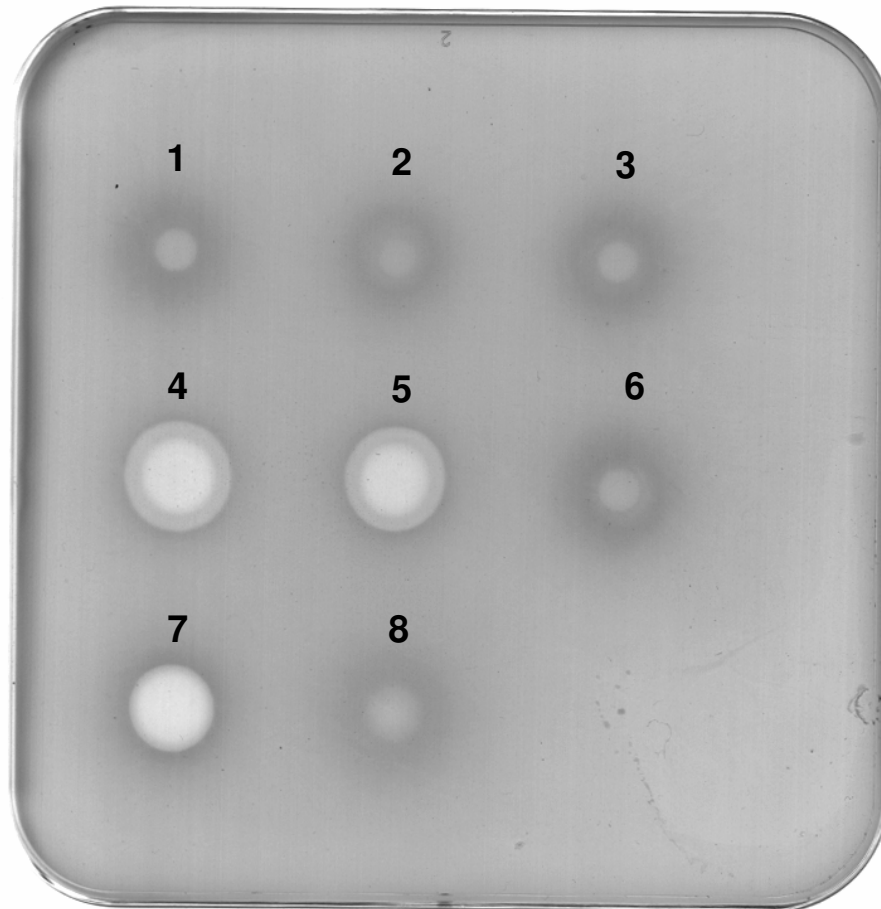


Fig. IV.7. Prueba de difusión en agar para detectar la producción de colicina V empleando el indicador *E. coli* DH5a. Las muestras se corresponden con los sobrenadantes (obtenidos por el método del TCA) de las siguientes cepas: (1) *L. lactis* FI5876; (2) *L. lactis* FI7847; (3) *L. lactis* FI10048 (cultivo inducido); (4) *L. lactis* FI10050 (cultivo inducido); (5) *L. lactis* FI10054; (6) *L. lactis* FI10052; (7) *E. coli* ATCC 14763 (control positivo); y (8) Tris 3,5M (pH 9,5) (control negativo).

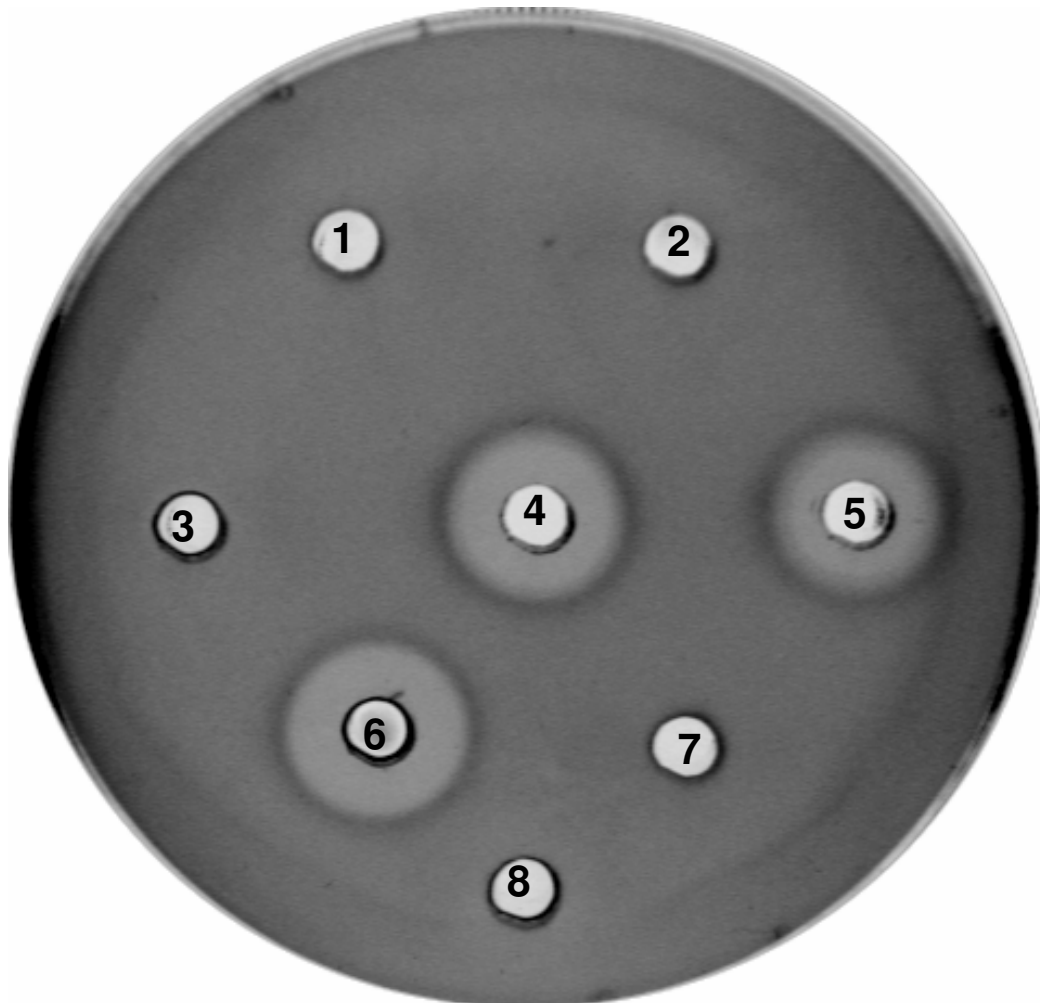


Fig. IV.8. Prueba de difusión en agar para detectar la producción de nisina empleando el indicador *L. lactis* FI9180. Las muestras se corresponden con los sobrenadantes de las siguientes cepas: (1) *L. lactis* FI7847; (2) *L. lactis* FI10048; (3) *L. lactis* FI10050; (4) *L. lactis* FI5876; (5) *L. lactis* FI10052; (6) *L. lactis* FI10054; (7) *E. coli* ATCC 14763; y (8) *L. lactis* FI9180.

La presencia de colicina V en los sobrenadantes de las cepas que habían mostrado actividad frente a *E. coli* DH5 α en los ensayos de actividad antimicrobiana se confirmó mediante la técnica *dot-blot* empleando anticuerpos policlonales anti-peptídicos que reconocían específicamente a la colicina V (Fig. IV.9). Para la obtención de anticuerpos anti-peptídicos de especificidad predeterminada frente a la colicina V se sintetizó el péptido PNC, cuya secuencia forma parte de la de la citada bacteriocina. La cantidad sintetizada fue de 6 mg. Su pureza (73%) e identidad se confirmaron mediante HPLC y espectrometría de masas por parte de la compañía Alpha Diagnostic International (San Antonio, EE.UU.). La serotitulación de los anticuerpos se realizó mediante un ELISA indirecto (Tabla IV.3). En este tipo de ensayo, se considera que el título de los anticuerpos es la mayor dilución del suero que es claramente positiva cuando se compara con el suero control (conejo preinmune). Es decir, el valor de absorbancia obtenido por la dilución del suero debe ser por lo menos dos veces mayor que la del suero de un animal preinmune. En estos ensayos no es extraño que los sueros de animales preinmunes muestren valores de absorbancia de entre 0,1 y 0,5, particularmente en sueros poco diluidos (<1:200). Tras analizar los resultados de la serotitulación, en los ensayos *dot-blotting* se emplearon los anticuerpos del conejo 1 a una dilución 1:100000. El hecho de que en el transcurso de esta Tesis no se dispusiera de colicina V totalmente pura para elaborar estándares hizo que no se intentara otro tipo de inmunoensayo más adecuado para cuantificar la bacteriocina en los sobrenadantes de los lactococos productores.

Los ensayos en placas microtituladoras mostraron que la actividad de los sobrenadantes de *L. lactis* FI10054 frente a dos cepas de *E. coli* del serotipo O157:H7 representaba aproximadamente un 40% de la existente en los de *E. coli* ATCC14763. Más concretamente, la actividad antimicrobiana en los sobrenadantes de *L. lactis* FI10038 y *E. coli* ATCC14763 fue de 146 (\pm 11) y 343 (\pm 17) UB ml⁻¹, respectivamente, frente a *E. coli* 88, y de 101 (\pm 9) y 274 (\pm 14) UB ml⁻¹, respectivamente, frente a *E. coli* 89. No se detectó actividad

Tabla IV.3. Resultados (absorbancia a 450 nm) de los inmunoensayos de serotitulación (ELISA indirecto) realizados con los sueros obtenidos tras la primera sangría de dos conejos inmunizados con un fragmento de la bacteriocina colicina V. Entre paréntesis se muestran los valores de absorbancia obtenidos con sueros de conejos preinmunes.^a

Dilución del antisuero	Conejo 1	Conejo 2
1:100	3,38 (0,57)	3,08 (0,56)
1:1000	3,00 (0,50)	3,18 (0,46)
1:10000	2,98 (0,38)	1,15 (0,33)
1:100000	1,99 (0,28)	0,88 (0,23)

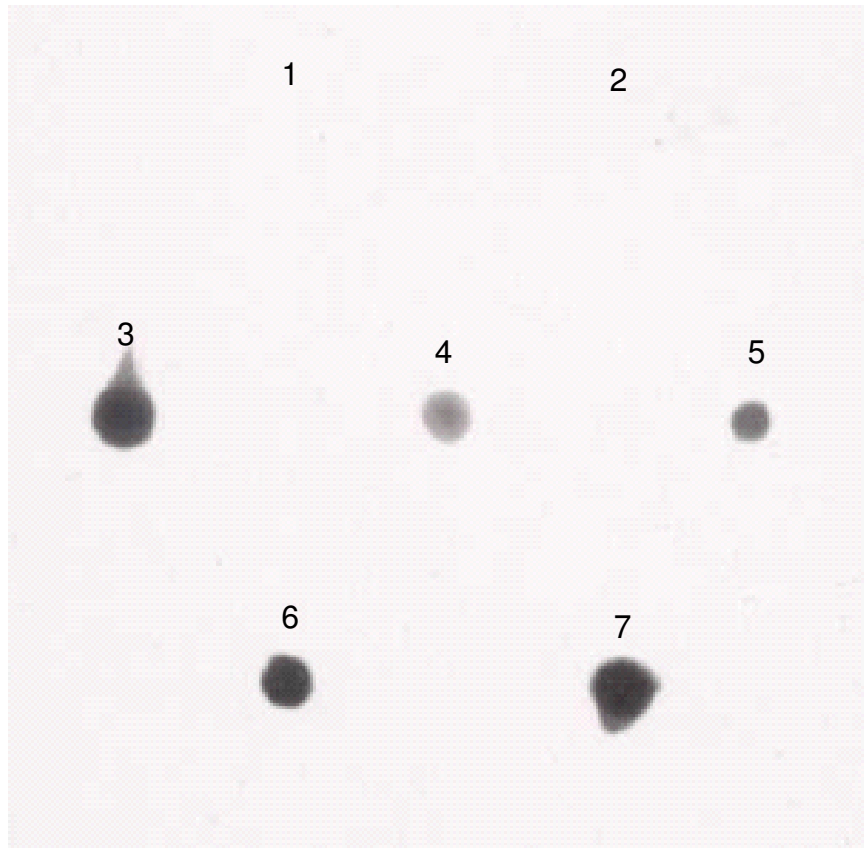


Fig. IV.9. Ensayo *dot-blotting* para la detección de colicina V empleando anticuerpos policlonales específicos. Las muestras se corresponden con los sobrenadantes de las siguientes cepas: (1) *L. lactis* FI5876 (control negativo); (2) *L. lactis* FI10050 (cultivo no inducido); (3) *E. coli* ATCC 14763 (control positivo); (4) *L. lactis* FI10050 (cultivo inducido); (5) *L. lactis* FI10051 (cultivo inducido); (6) *L. lactis* FI10055; y (7) *L. lactis* FI10054.

antimicrobiana frente a ambos indicadores en los sobrenadantes de *L. lactis* FI5876, lo que confirmó su resistencia natural a la nisina.

IV.4. Producción inducible de interleuquina-2 (IL-2m) en *L. lactis* empleando el sistema de secreción LcnC-LcnD

IV.4.1. Construcción y clonación del fragmento P_{nisA} -*IlcnA/il2m*

La estrategia utilizada para la producción inducible de IL-2m en *L. lactis* FI7847 y FI5876 fue similar a la seguida previamente para las bacteriocinas. El fragmento P_{nisA} -*IlcnA/il2m* se construyó mediante PCR empleando igualmente la técnica de solapamiento de fragmentos génicos con extremos complementarios y se clonó en el plásmido pCR2.1, dando lugar al plásmido pFI2401. El análisis de la secuencia nucleotídica del fragmento insertado en pCR2.1 reveló que se correspondía totalmente con la esperada.

La construcción P_{nisA} -*IlcnA/il2m* se aisló de pFI2401 en forma de fragmento *EcoRI* y se subclonó en pTG262, originando los plásmidos pFI2398 (inserto en orientación directa) y pFI2399 (en orientación inversa). La cotransformación de *L. lactis* FI7847 y *L. lactis* FI5876 con pFI2398 y pFI2148 dió lugar a las cepas FI9947 y FI9955, respectivamente. Por otra parte, la cotransformación de *L. lactis* FI7847 y *L. lactis* FI5876 con pFI2399 y pFI2148 dió lugar a las cepas FI9948 y FI9956, respectivamente.

IV.4.2. Producción de IL-2m y, en su caso, nisina A en los derivados de *L. lactis* FI7847 y FI5876

Los sobrenadantes obtenidos a partir de cepas presuntamente productoras de IL-2m se sometieron a electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con Tris y glicina (*Tris-G-PAGE*) por duplicado. Uno de los geles se tiñó para determinar el tamaño de las bandas proteicas resueltas, mientras que el segundo se empleó para la detección inmunológica de la IL-2m mediante la técnica de hibridación de Western.

La electroforesis demostró que los sobrenadantes inducidos de las cepas FI9949 y FI9950 (derivadas de FI7847) y los no inducidos de FI9957 y FI9958 (derivadas de FI5876) contenían un péptido con un peso molecular idéntico al de la IL-2m pura utilizada como control. Seguidamente, los ensayos con la técnica Western demostraron la producción exocelular de esta citoquina en esas cepas ya que los anticuerpos policlonales anti-IL-2m reaccionaron específicamente con el péptido mencionado (Fig. IV.10).

Posteriormente, se realizaron ensayos inmunoenzimáticos en formato *slot-blot* que confirmaron la producción de IL-2m por parte de las cepas FI9949, FI9950, FI9957 y FI9958 (Fig. IV.11). En dichos ensayos, se incluyeron diversas concentraciones conocidas de IL-2m, de tal manera que la comparación entre el tamaño de las bandas que originaban los estándares y el correspondiente a las muestras problema sugería que la concentración de IL-2m en los sobrenadantes de los lactococos oscilaba entre 50 y 100 ng ml⁻¹ (Fig. IV.11). No se detectó IL-2m en el contenido intracelular de ninguno de los derivados de FI5876 ó FI7847 que producían IL-2m exocelular.

Para realizar una cuantificación más exacta de la IL-2m existente en los sobrenadantes de *L. lactis* FI9949 y FI9957 (los derivados de FI7847 y FI5876,

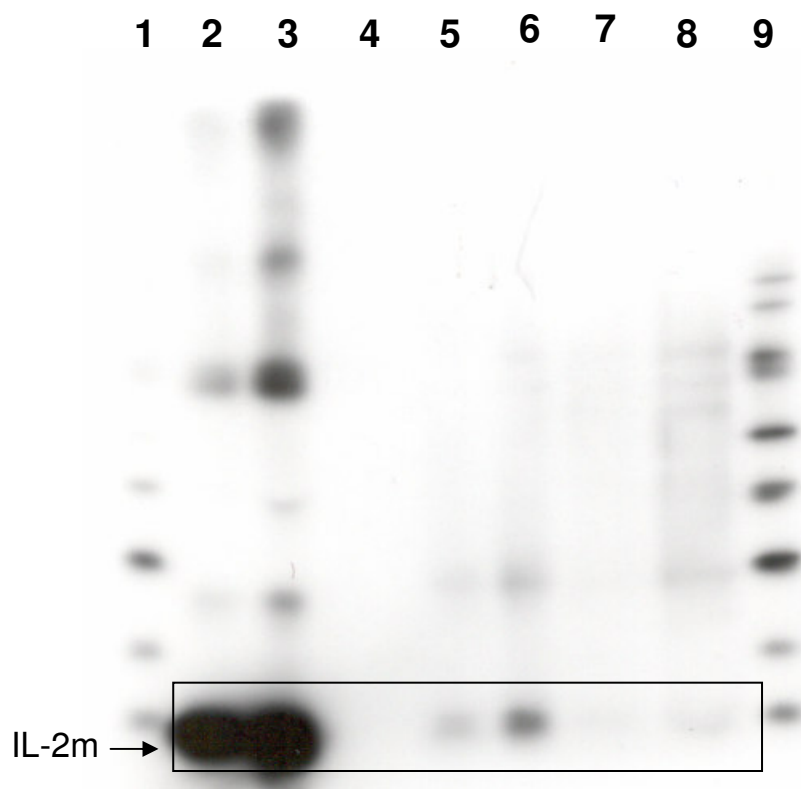


Fig. IV.10. *Western blotting* para detectar IL-2m en un gel obtenido tras *Tris-G-PAGE*. Las muestras son las siguientes: (1) y (9) estándar *MagicMark Western Standard* (Novex); (2) y (3) IL-2m pura (Sigma); (4) *L. lactis* FI9947; (5) *L. lactis* FI9949 (cultivo inducido); (6) *L. lactis* FI9957; (7) *L. lactis* FI9950; y (8) *L. lactis* FI9958.

respectivamente, que mostraron una mayor productividad de la citoquina) productores se recurrió a la técnica de ELISA sándwich empleando dos anticuerpos monoclonales específicos. La producción de IL-2m por parte de las cepas FI9949 y FI9957 fue de $65 (\pm 4)$ y $85 (\pm 6)$ ng ml⁻¹, respectivamente, lo que confirmó los resultados obtenidos previamente con la técnica *slot-blotting*.

La producción de nisina por parte de los derivados de FI5876 cepa se puso de manifiesto mediante pruebas de difusión en agar. Las cepas FI9957 y FI9958 eran capaces de coproducir simultáneamente nisina A e IL-2m, siendo la producción de nisina equiparable a la de la cepa parental (FI5876) (Tabla IV.1; Fig. IV.12).

IV.4.3. Actividad biológica de la IL-2m producida por los derivados de *L. lactis* FI7847 y FI5876

Para evaluar si la IL-2m existente en los sobrenadantes de *L. lactis* FI9949 y FI9957 (los derivados de FI7847 y FI5876, respectivamente, que mostraron una mayor productividad de la citoquina) poseía actividad biológica se recurrió al bioensayo con células CTLL-2, una línea celular cuya proliferación depende de la presencia en el medio de IL-2 humana o murina. Como estándares se emplearon muestras de caldo GM17 con diversas concentraciones de interleuquina-2 recombinante (la actividad del *stock* era actividad de 2×10^6 U mg⁻¹).

Los resultados obtenidos con los sobrenadantes de FI9949 y FI9957 revelaron que la IL-2m producida por ambas cepas poseía actividad biológica ya que inducía la proliferación de células CTLL-2, en contraposición con los sobrenadantes de las células hospedadoras (FI5876 y FI7847), que no mostraron ningún efecto (ni positivo ni negativo) sobre la proliferación celular. La actividad del sobrenadante de FI9949 era de aproximadamente $1,2 \times 10^2$ U ml⁻¹, mientras que la existente en el de FI9957 era de aproximadamente $1,8 \times 10^2$ U ml⁻¹. Estos

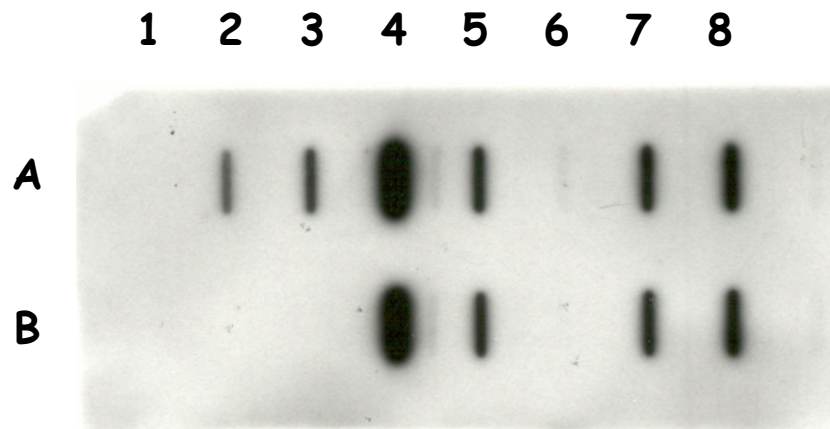


Fig. IV.11. Ensayo *slot-blotting* para la detección de IL-2m empleando anticuerpos policlonales específicos. Las muestras se corresponden con los sobrenadantes de las siguientes cepas: (1) *L. lactis* FI7847; (2) *L. lactis* FI9950; (3) *L. lactis* FI9949; (4) y (5) IL-2m pura (Sigma); (6) *L. lactis* FI5876; (7) *L. lactis* FI9958; y (8) *L. lactis* FI9957. En la fila A, los cultivos de las cepas derivadas de FI7847 (FI9949 y FI9950) habían sido inducidos con nisina, mientras que los correspondientes a la fila B no habían sido inducidos.

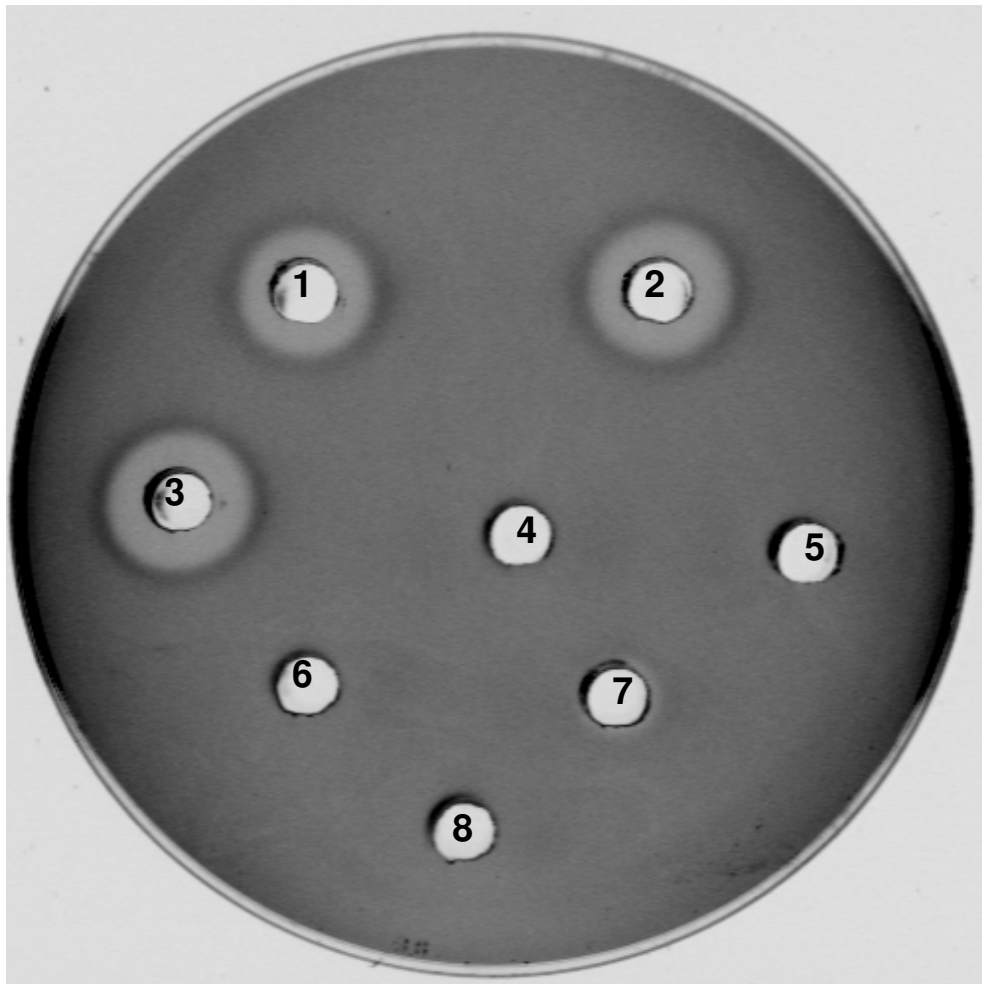


Fig. IV.12. Prueba de difusión en agar para detectar la producción de nisina empleando el indicador *L. lactis* FI9180. Las muestras se corresponden con los sobrenadantes de las siguientes cepas de *L. lactis*: (1) FI5876; (2) FI9955; (3) FI9957; (4) FI9947(cultivo no inducido); (5) FI9947(cultivo inducido); (6) FI9949(cultivo no inducido); (7) FI9947(cultivo inducido); y (8) FI7847.

valores representan concentraciones de IL-2 de 60 y 90 ng ml⁻¹, respectivamente, y se ajustan perfectamente a los obtenidos con la técnica de ELISA sándwich para estas mismas cepas (65 y 85 ng ml⁻¹, respectivamente).

IV.5. Efecto de la producción heteróloga de lactococina A, pediocina PA-1, colicina V en la proliferación de células HAT-29

El efecto de las bacteriocinas producidas heterológamente sobre la proliferación de las células intestinales HT-29 se evaluó añadiendo alicuotas de los cultivos de las distintas cepas a pocillos de placas microtituladoras que contenían aproximadamente 10⁵ células HT-29. Cada uno de los sobrenadantes se probaron a tres concentraciones: 5, 10 y 20% del contenido final del pocillo.

La adición de los sobrenadantes evaluados (tanto de los lactococos hospedadores como de sus respectivos derivados recombinantes, e independientemente de su concentración final), a los cultivos HT-29 no afectó en ningún caso a la viabilidad celular. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de absorbancia obtenidos a partir de las distintas muestras evaluadas. Los resultados obtenidos, expresados en porcentajes de absorbancia con respecto a los cultivos control, se muestran en la Tabla IV.4.

Tabla IV.4. Efecto de los sobrenadantes de los lactococos recombinantes (20, 10 y 5% del volumen final del cultivo celular) sobre la proliferación de las células intestinales HT-29. Los valores están expresados en porcentaje con respecto a la proliferación de los cultivos control (100%). Entre paréntesis se incluye la desviación estándar.

Cepa de <i>L. lactis</i> ^a	20%	10%	5%
<i>L. lactis</i> FI7847 (Bac ⁻)	117,04 (± 13)	103,04 (± 5)	105,98 (± 12)
<i>L. lactis</i> FI5876 (NisA)	98,49 (± 9)	108,82 (± 7)	106,95 (± 3)
<i>L. lactis</i> WM14 (LcnA)	98,37 (± 5)	102,01 (± 9)	103,84 (± 11)
<i>L. lactis</i> MG1614 (Bac ⁻)	96,3 (± 13)	99,96 (± 8)	118,71 (± 13)
<i>P. acidilactici</i> 347 (Ped)	94,29 (± 17)	106,20 (± 10)	105,67 (± 9)
<i>L. lactis</i> FI9943 ^b (Bac ⁻)	99,50 (± 8)	107,99 (± 9)	110,74 (± 2)
<i>L. lactis</i> FI9953 (LcnA, NisA)	95,82 (± 8)	106,01 (± 13)	111,93 (± 7)
<i>L. lactis</i> FI10051 ^b (Bac ⁻)	100,16 (± 11)	99,81 (± 12)	101,35 (± 9)
<i>L. lactis</i> FI10054 (ColV, NisA)	93,52 (± 13)	102,19 (± 1)	102,91 (± 12)
<i>L. lactis</i> FI9917 ^b (Bac ⁻)	117,41 (± 10)	109,24 (± 3)	111,59 (± 11)
<i>L. lactis</i> FI10038 (Ped, NisA)	96,27 (± 13)	102,71 (± 12)	113,70 (± 11)
<i>L. lactis</i> FI9943 ^c (LcnA)	94,32 (± 15)	103,37 (± 8)	110,10 (± 6)
<i>L. lactis</i> FI10051 ^c (ColV)	92,17 (± 15)	97,37 (± 9)	106,37 (± 9)
<i>L. lactis</i> FI9917 ^c (Ped)	95,74 (± 12)	108,72 (± 15)	95,08 (± 12)
Ninguna (control)	100,00 (± 6)	100,00 (± 6)	100,00 (± 6)

^aBac⁻: cepa no bacteriocinogénica; NisA: cepa productora de nisina A; LcnA: cepa productora de lactococina A; Ped: cepa productora de pediocina PA-1; ColV: cepa productora de colicina V.

^bDerivado de FI7847 cuyo cultivo no fue inducido con nisina

^cDerivado de FI7847 cuyo cultivo fue inducido con nisina

Capítulo V

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

V.1. Sistemas para la producción heteróloga de proteínas en *L. lactis*

Las bacterias lácticas son ampliamente utilizadas por la industria alimentaria para la producción y conservación de una gran variedad de alimentos y, en consecuencia, son ingeridas regularmente por los consumidores. Desde hace aproximadamente 20 años se han hecho grandes esfuerzos para comprender mejor las bases moleculares de estos microorganismos y, de esta manera, obtener un mejor control de los procesos industriales en los que están implicados. Este creciente conocimiento ha promovido un gran interés por su potencial para nuevas aplicaciones, entre las que destaca la producción heteróloga de proteínas en biorreactores, en alimentos fermentados o directamente en las mucosas de las personas y los animales. Las bacterias lácticas ofrecen ventajas sobre otras bacterias ya que, salvo casos puntuales, están consideradas como seguras (GRAS) y los consumidores tienen una percepción muy positiva sobre este grupo bacteriano, al que asocian con las leches fermentadas tradicionales.

Entre las bacterias lácticas, *Lactococcus lactis* es, con diferencia, la especie mejor conocida. De hecho, existen numerosas herramientas genéticas para su manipulación, lo que ha permitido que actualmente se disponga de la secuencia completa del genoma de al menos dos cepas de esta especie (Bolotin y col., 2001). Esta especie es una excelente candidata para la producción heteróloga de proteínas y péptidos ya que está considerada como segura (GRAS) y secreta un número muy limitado de proteínas “propias” al medio exocelular. Además, las cepas de *L. lactis* más empleadas en los laboratorios no producen proteasas extracelulares que degraden las proteínas heterólogas secretadas (Nouaille y col., 2003).

En general, la obtención de grandes cantidades de proteínas heterólogas en *L. lactis* requiere una selección cuidadosa de los promotores lactocócicos que controlan los genes de interés. Hasta la fecha, se han empleado al menos 38 promotores constitutivos que difieren en su capacidad

para inducir una fuerte expresión del gen heterólogo (de Vos, 1999). De hecho, en una Tesis Doctoral previa (Martínez, 1999), que sirvió de punto de partida para este trabajo, se consiguió la producción heteróloga de pediocina PA-1 en *L. lactis* empleando un promotor lactocócico constitutivo (*P_{lcnA}*).

Sin embargo, los promotores constitutivos pueden tener dos problemas: (1) puede tratarse de promotores débiles (como en el caso de *P_{lcnA}*) y (2) en el caso de que sean fuertes, la continua producción de grandes cantidades de una proteína puede conducir a su agregación, acumulación y/o degradación intracelular (Makrides, 1996), y estos fenómenos pueden ser deletéreos para las células productoras. Precisamente, los sistemas basados en promotores inducibles se han desarrollado para prevenir los posibles efectos negativos derivados de una elevada producción constitutiva (Kuipers y col., 1997). En estos sistemas, la expresión génica puede estar controlada por un inductor, por un represor o por factores ambientales, tales como el pH, la temperatura o la concentración de ciertos iones (Nouaille y col., 2003).

El sistema de expresión inducible mejor caracterizado es el basado en la transcripción inducida por la lactosa del operón *lac* (de Vos y Vaughan, 1994). Sin embargo, la aplicación de este sistema está limitada por un bajo nivel de inducción y porque este fenómeno está mediado por un metabolito intermedio (tagatosa-6-fosfato) cuya concentración no se puede controlar fácilmente, especialmente en fermentaciones a gran escala. Otros sistemas inducibles empleados en *L. lactis*, como los basados en el promotor del bacteriófago T7 de *E. coli* (Wells y col., 1993), presentan los mismos inconvenientes y, además su uso no está permitido para aplicaciones alimentarias.

Para evitar estos problemas, se han desarrollado sistemas alternativos basados en el promotor inducible de la nisina (*P_{nisA}*) (de Vos y Gasson, 1989). Su interés se debe al peculiar sistema de autorregulación de la biosíntesis de este antibiótico y al hecho de que la nisina es un bioconservante de grado alimentario autorizado con fines alimentarios en numerosos países. Las proteínas NisK y NisR, codificadas en los genes homónimos *nisK* y *nisR*, constituyen un sistema de regulación de dos componentes: un sensor histidina

kinasa (NisK) y un regulador de respuesta (NisR) (Engelke y col., 1994; van der Meer y col., 1993). La nisina extracelular actúa como señal para el sistema de transducción y provoca la activación transcripcional de los genes bajo control de los promotores *PnisA* (*nisABTCIP*) y *PnisF* (*nisFEG*) (de Ruyter y col., 1996a; Kuipers y col., 1995). Por lo tanto, la nisina actúa como feromona en el proceso de inducción de su propia biosíntesis (Dodd y col., 1996b; Kleerebezem y col., 1997; Qiao y col., 1996; Ra y col., 1996).

En consecuencia, el nivel de expresión de los genes bajo el control del promotor *PnisA* en cepas que contienen las proteínas NisR y NisK pero que no producen nisina, es despreciable (Kuipers y col., 1997). Sin embargo, la adición de nisina al medio de cultivo durante la fase logarítmica de crecimiento de esas mismas cepas activa la transcripción de los genes controlados por el promotor *nisA*, siendo el nivel de expresión proporcional a la cantidad de nisina añadida (Kuipers y col., 1995). Las ventajas que ofrece la sobreexpresión de genes bajo el control de los promotores *PnisA* o *PnisF* se exponen en la introducción de esta Tesis. Por todos estos motivos, se eligió el promotor *PnisA* para conseguir la producción inducible de tres bacteriocinas (lactococina A, pediocina PA-1, colicina V) y una citoquina (IL-2m) en dos cepas de *L. lactis* que contenían los genes *nisRK*.

V.2. Producción inducible de lactococina A en *L. lactis*

En este trabajo, la transformación de *L. lactis* FI5876 (cepa productora de nisina) y *L. lactis* FI7847 (cepa no bacteriocinogénica derivada de la anterior) con dos vectores, uno con la construcción *PnisA-lcnA-lciA* y el segundo con los genes *lcnC* y *lcnD*, condujo a un aumento de la producción de lactococina A en comparación con la cepa parental (*L. lactis* WM4). Pero, además, la producción de esta bacteriocina en las nuevas cepas recombinantes era muy estable, sin que se observaran las grandes fluctuaciones de productividad que caracterizan a *L. lactis* WM4 y que también han sido puestas de manifiesto por otros autores (Holo y col., 1991). Por otra parte los derivados de *L. lactis* FI5876 fueron capaces de coproducir

lactococina A y nisina A en cantidades similares a las de las cepas parentales (*L. lactis* WM4 y *L. lactis* FI5876, respectivamente).

La producción de lactococina A en hospedadores lactocócicos y no lactocócicos que no la producen de forma natural ha sido objeto de investigaciones previas. Chikindas y col. (1995) introdujeron un plásmido con los cuatro genes que intervienen en la biosíntesis de la lactococina en *P. acidilactici* PAC1.0, una cepa productora de pediocina PA-1, y consiguieron la coproducción de ambas bacteriocinas, aunque no compararon la producción de lactococina con la de alguna cepa que la produzca de forma natural. Simultáneamente, van Belkum y Stiles (1995) mostraron que el sistema de transporte de la leucocina A era capaz de dirigir, a un nivel muy modesto, la secreción de lactococina en células de *Leuconostoc gelidum* UAL187-22 transformadas con pMB553 (*lcnA* y *lciA*).

L. lactis IL1403 ha sido frecuentemente seleccionado como hospedador para la producción de lactococina A ya que en su cromosoma existen genes (*lcnC'*, *lcnD'*) análogos a los que codifican el aparato de secreción de dicha bacteriocina (*lcnC*, *lcnD*); en consecuencia, teóricamente sólo se requiere la introducción de los genes *lcnA* y *lciA* para su obtención. Sin embargo, este hospedador tiene limitaciones prácticas importantes para la producción de cantidades significativas de lactococina A. Por ejemplo, el hecho de que exista una única copia de los genes *lcnC'* y *lcnD'* en el cromosoma de la cepa IL1403 puede suponer una menor eficiencia en la secreción de la bacteriocina (Stoddard y col., 1992). Observaciones similares han sido obtenidas por van Belkum y col. (1991) y Holo y col. (1991). Ambos grupos describieron una reducción en la productividad de lactococina A cuando esta bacteriocina se expresaba en un derivado de *L. lactis* IL1403. El análisis del sistema de secreción de IL1403 ha revelado que los genes *lcnC'D'* son análogos, pero no idénticos, a sus equivalentes del sistema de transporte de lactococina A, *lcnCD* (Venema y col., 1996). Por lo tanto, las diferencias entre ambos sistemas pueden suponer una menor capacidad de las proteínas LcnC'-LcnD' para secretar y procesar correctamente bacteriocinas unidas al líder de la lactococina A. De hecho, cuando sistemas de secreción basados en los genes

lcnC'D' se complementan con los genes específicos *lcnCD*, la producción de bacteriocinas aumenta 10 veces como mínimo (van Belkum y col., 1997; Venema y col., 1996). Por todo ello, no es de extrañar que, aunque Horn y col. (1998) consiguieron producir esta bacteriocina en la cepa *L. lactis* IL1403 transformada con pFI2058 (*lcnA* y *lciA*), la productividad era muy inferior a la de *L. lactis* WM4. Otros autores también han descrito una escasa productividad de lactococina A en *L. lactis* IL1403 (van Belkum y col., 1991; Holo y col., 1991).

Para mejorar la producción de lactococina A, Horn y col. (1999) clonaron los genes *lcnC* y *lcnD* en pFI2058, generando el plásmido pFI2149, que posee los cuatro genes de la biosíntesis de lactococina A. En el presente trabajo, se ha conseguido un notable aumento en la producción de esta bacteriocina colocando los genes *lcnA* y *lciA* genes bajo el control del promotor inducible de la nisina, en vez de bajo el control del promotor constitutivo de la lactococina A.

En contraste con el espectro antimicrobiano de la nisina, el de la lactococina A es muy reducido y se limita a ciertas cepas de lactococos (Holo y col., 1991). Sin embargo, a pesar de que los beneficios de bacteriocinas con un espectro tan estrecho no resulten inmediatamente obvios, la coproducción de lactococina A y nisina puede tener aplicaciones prácticas en la industria alimentaria (Morgan y col., 1995). En este sentido, la lactococina A ejerce un efecto lítico sobre lactococos que forman parte de la microbiota autóctona o de los cultivos iniciadores empleados en las industrias queseras (Holo y col., 1991; Morgan y col., 1995). Este efecto se debe probablemente a un proceso de degradación incontrolada de las paredes celulares mediado por la liberación de autolisinas como la *AcmA* (Martínez-Cuesta y col., 2000).

La lisis de las células del cultivo iniciador, y la consiguiente liberación de enzimas intracelulares en la matriz del queso, es un proceso lento que puede jugar un papel importante en el desarrollo de algunas de las propiedades organolépticas de este alimento (Collins y col., 2002). En consecuencia, la adición de un lactococo con un efecto lítico progresivo sobre las células del cultivo iniciador podría contribuir a acelerar la maduración de ciertos tipos de quesos, sin necesidad de recurrir al empleo de bacteriocinas puras como

aditivos (Holzapfel y col., 1995). Dado que la nisina también puede ejercer un efecto lítico sobre otros lactococos, la acción combinada de ambas bacteriocinas podría tener repercusiones positivas para la calidad sensorial de aquellos quesos con un tiempo de maduración suficiente para permitir la lisis gradual de los cultivos iniciadores (Morgan y col., 1995).

El hecho de que la producción de lactococina A, y de todos los otros péptidos heterólogos (pediocina PA-1, colicina V, IL-2m) estudiados en esta Tesis, haya sido mayor cuando se empleaba como hospedador *L. lactis* FI5876 en vez de *L. lactis* FI7847 refleja los mayores niveles de nisina presentes en el ambiente externo de FI5876. Esta cepa y sus derivados recombinantes producen continuamente elevadas cantidades de nisina, por lo que se encuentran en un permanente estado de inducción. En contraste, la producción heteróloga en los derivados de FI7847 depende de la pequeña cantidad de nisina exógena añadida al medio de cultivo.

V.3. Producción heteróloga de pediocina PA-1 en *L. lactis*

Los pediococos son microorganismos normalmente asociados con productos vegetales y cárnicos, y se emplean frecuentemente en la fermentación comercial de ese tipo de alimentos. Algunas cepas, la mayoría pertenecientes a la especie *P. acidilactici*, producen pediocina PA-1, una bacteriocina de amplio espectro antimicrobiano, particularmente activa frente a *L. monocytogenes*. Sin embargo, los pediococos están escasamente adaptados para la colonización de alimentos en los que no residen de forma natural. En este sentido, su capacidad para fermentar la lactosa es escasa y su actividad proteolítica en leche es irrelevante (Caldwell y col., 1996). Por lo tanto, no son los candidatos ideales para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en productos lácteos.

L. monocytogenes es uno de los microorganismos que más preocupan actualmente a las industrias lácteas, especialmente a las que elaboran productos a partir de leche cruda. Se trata de un microorganismo recalcitrante a

medidas de control tradicionales, como la refrigeración o la acidificación. En este sentido, bacteriocinas como la pediocina PA-1 podrían emplearse para mejorar los sistemas de conservación de alimentos en el marco del concepto de “barreras” (Leistner, 1992). En general, la aplicación de pediocina PA-1 en sistemas alimentarios consigue reducciones de entre 1 y 4 ciclos logarítmicos en las poblaciones de *L. monocytogenes* (Muriana, 1996). Aunque tales niveles de inhibición pueden ser inaceptables como método de conservación primario, resultarían muy útiles como factor adicional para la eliminación de patógenos mediante el sistema de barreras. A pesar de que la listeriosis no es una enfermedad frecuente, los brotes típicos tienen un gran impacto social ya que se acompañan de las tasas de mortalidad más elevadas provocadas por patógenos de transmisión alimentaria en los países desarrollados (Farber y Peterkin, 1991). En consecuencia, la expresión y secreción de pediocina PA-1 en lactococos proporcionaría una forma adecuada de aplicar las propiedades beneficiosas de esta bacteriocina a la industria láctea. En este contexto, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue la mejora de los sistemas de producción de pediocina PA-1 en *L. lactis* basados en algunos de los genes que participan en la biosíntesis de la lactococina A.

Previamente, Martínez y col. (2001) intentaron la producción de pediocina PA-1 en *L. lactis* empleando el sistema de expresión de la nisina (incluyendo el líder de este lantibiótico). Concretamente, substituyeron el gen estructural de la nisina por un gen híbrido (fusión de las secuencias que codifican el líder de la nisina A y la propediocina PA-1) en la agrupación de genes de la nisina existente en Tn5301. Sin embargo, este sistema fue incapaz de dirigir la producción de pediocina PA-1 exocelular activa. La nisina es un lantibiótico que contiene aminoácidos modificados postraduccionalmente. Concretamente, los residuos de Ser y Thr de la pronisina se deshidratan y originan residuos deshidroalanina (DHA) y deshidrobutirina (DHB), respectivamente. La condensación de los residuos DHA y DHB con los grupos sulfhidrilo de las cisteínas presentes en la molécula origina los aminoácidos lantionina y β -metil-lantionina, respectivamente (de Vos y col., 1995; Sahl y col., 1995). Estas modificaciones están catalizadas por las proteínas NisB y NisC, codificadas en los genes homónimos *nisB* y *nisC* (Engelke y col., 1992;

Karakas Sen y col., 1999; Narbad y col., 1997; Rodríguez y Dodd, 1996). Como la cepa de *L. lactis* creada por Martínez y col. (2001) poseía los genes *nisB* y *nisC* en la misma unidad transcripcional que el gen híbrido es probable que la ausencia de actividad antimicrobiana se debiera a los cambios estructurales ocasionados por la acción de las proteínas NisB y NisC sobre las moléculas de pediocina PA-1 unidas al líder de la nisina. La molécula de pediocina PA-1 contiene 2 residuos de Ser, 4 de Ala y 4 de Cys, en posiciones adecuadas para una hipotética reacción postraducciona. Los correspondientes aminoácidos deshidratados (DHA y DHB) podrían reaccionar con las cisteínas, residuos esenciales para el mantenimiento de la estructura espacial y de la actividad biológica de esta bacteriocina (Chen y Montville, 1995; Chen y col., 1997b; Miller y col., 1998).

Otros autores han conseguido producir y secretar nisina mediante la expresión de un gen híbrido que codificaba el líder de la subtilina fusionado a la pronisina, en células de *Bacillus subtilis* que poseían toda la maquinaria celular para la biosíntesis de la subtilina, a excepción del gen estructural de la presubtilina (Kuipers y col., 1993). También se ha conseguido la secreción de un precursor de la nisina Z, dirigida por el líder de la subtilina, mediante la introducción del correspondiente gen híbrido en una cepa de *L. lactis* productora de nisina A (Chakicherla y Hansen, 1995). Sin embargo, a diferencia de la pediocina PA-1, tanto la nisina A y Z como la subtilina son lantibióticos que sufren el mismo tipo de modificaciones postraduccionales. Las secuencias de estos tres lantibióticos, como la de las proteínas encargadas de sus respectivas modificaciones, muestran un grado de homología muy elevado.

Por este motivo, en este trabajo se procedió al desarrollo de un sistema inducible de producción de pediocina PA-1 en *L. lactis* en el que la expresión de la propediocina estuviera bajo control de *PnisA*, pero en el que el transporte y procesado estuviera basado en el sistema de secreción de otra bacteriocina de la clase II, la lactococina A (líder de la lactococina, LcnC, LcnD).

La flexibilidad del aparato secretor de las bacteriocinas de la clase II ha sido demostrada por van Belkum y col. (1997). Esos autores construyeron

genes híbridos fusionando las secuencias que codifican los líderes de la leucocina A, lactococina A y colicina V, con la que codifica la divergicina A, una bacteriocina que se secreta a través del sistema de secreción general (*sec*) de las células (Worobo y col., 1995). Los diferentes líderes fueron capaces de dirigir la secreción de divergicina en *Leuconostoc gelidum*, *L. lactis* y *E. coli*, es decir, en los respectivos hospedadores homólogos. Además, ciertas combinaciones hospedador-vector permitieron la producción de divergicina cuando los líderes se emplearon en hospedadores heterólogos. La misma estrategia se empleó para obtener colicina V en *L. lactis* IL 1403. En ese caso, la secuencia que codifica la colicina se fusionó al péptido señal de la leucocina A.

Sin embargo, los componentes de los sistemas de secreción de bacteriocinas de la clase II no son universalmente intercambiables, lo que indica que algunos péptidos líderes son pobremente reconocidos por los transportadores ABC heterólogos (van Belkum y Stiles, 1995; van Belkum y col., 1997). Allison y col. (1995) han demostrado que los dos péptidos del complejo de la lactacina F pueden emplear la maquinaria secretora de *Carnobacterium piscicola* LV17, una cepa que produce las carnobacteriocinas A, BM1 y B2 (Ahn y Stiles, 1990). La secreción de ambos péptidos de la lactacina F en este hospedador heterólogo puede haber sido facilitada por el hecho de que los líderes N-terminales de estas carnobacteriocinas y de los dos péptidos de la lactacina F sean los que muestran el mayor grado de homología de entre todos los líderes de bacteriocinas de la clase II. Por el contrario, el aparato transportador de la lactococina A fue incapaz de conducir la secreción de leucocina A en *L. lactis* (van Belkum y Stiles, 1995).

Tanto la pediocina PA-1 como la lactococina A son bacteriocinas de la clase II y, en consecuencia, candidatos potenciales para la expresión y secreción heteróloga. En este trabajo se construyó el gen híbrido *lcnA/pedA* sustituyendo las secuencias nucleotídicas posteriores al lugar Gly-Gly donde se procesa la lactococina A por la región equivalente del gen *pedA*. La expresión del gen híbrido en aquellas cepas de *L. lactis* que también contenían los genes *lcnC* y *lcnD* condujo a la producción exocelular de pediocina PA-1.

Chikindas y col. (1995) han descrito un sistema de expresión similar, también en *L. lactis* IL 1403, en el que los cuatro genes del operón de la pediocina PA-1 se habían clonado en el vector lactocócico pWV01, originando el plásmido recombinante pMC117. En esa cepa, la secreción de la pediocina, dirigida por su propio líder, tuvo lugar únicamente cuando el operón estaba bajo control de un promotor lactocócico. Incluso en esas condiciones, la producción de pediocina era inferior al 1% del nivel obtenido en el pediococo parental. Esto sugiere que, en *L. lactis*, la secreción de pediocina PA-1 es más eficiente cuando se emplea el líder de la lactococina A que cuando se utiliza el líder de la pediocina PA-1.

Más recientemente, Buyong y col. (1998) han elaborado quesos Cheddar con *L. lactis* subsp. *lactis* MM217, un cultivo iniciador que contiene el plásmido pMC117. La leche de partida fue inoculada con el cultivo iniciador (10^6 ufc ml⁻¹) y con una mezcla de tres cepas de *L. monocytogenes* (10^3 ufc ml⁻¹). En los quesos control, en los que el iniciador era sustituido por una cepa isogénica no productora de pediocina PA-1, la población del patógeno aumentó hasta alcanzar aproximadamente 10^7 ufc g⁻¹ a las 2 semanas de maduración y luego disminuyó gradualmente, siendo de 10^3 cfu g⁻¹ a los 6 meses de maduración. En los quesos elaborados con la cepa MM217, la concentración de *L. monocytogenes* fue de 10^2 ufc g⁻¹ tras una semana y de alrededor de 10 cfu g⁻¹ a los 3 meses de maduración. El título medio de pediocina en esos quesos disminuyó desde 64.000 UA g⁻¹ al primer día de maduración hasta alrededor de 2.000 UA g⁻¹ a los 6 meses, no detectándose actividad pediocina en los controles. La presencia de pMC117 en la cepa MM217 no alteró la capacidad del cultivo para dirigir la fermentación láctea, ya que las tasas de producción de ácido, los valores de pH y los niveles de humedad, NaCl y grasa, fueron similares en los quesos experimentales y en los controles.

Por su parte, Horn y col. (1998) introdujeron un plásmido con un gen híbrido *llcnA/pedA* bajo control del promotor de la lactococina A en *L. lactis* IL 1403 y la cepa resultante, *L. lactis* FI9043, produjo aproximadamente una cuarta parte de la pediocina producida por el pediococo parental *P. acidilactici*

347. Como se ha comentado en la sección anterior, el hecho de que exista una única copia de los genes *lcnC'* y *lcnD'* en el cromosoma de la cepa IL1403 puede suponer una menor eficiencia en la secreción de la bacteriocina (Stoddard y col., 1992).

Para mejorar la producción heteróloga de pediocina PA-1 en *L. lactis*, Horn y col. (1999) siguieron dos estrategias: (1) emplear los genes específicos del sistema de secreción de la lactococina y (2) aumentar la dosis génica mediante el empleo de plásmidos multicopia. En consecuencia, estos autores procedieron, en primer lugar, a la síntesis y clonación de los genes *lcnC* y *lcnD* y a su introducción en el sistema de producción de pediocina PA-1 en *L. lactis*. Cuando *L. lactis* IL1403 se cotransformó con los plásmidos pFI2148 (genes *lcnCD*) y pFI2126 (gen *lcnA/pedA*), la producción de pediocina por parte de la cepa resultante (FI9181) se dobló en relación con la de FI9043, un lactococo que contiene el pFI2126 pero que carece del pFI2148. Es decir, la presencia de los genes *lcnCD* aumentó considerablemente la eficacia de la secreción de pediocina en *L. lactis* IL1403. No obstante, el nivel de producción seguía siendo marcadamente inferior (aproximadamente una cuarta parte) al de *P. acidilactici* 347, el productor natural.

Horn y col. (1999) solucionaron el problema de la productividad con la construcción de un plásmido que contenía tanto el gen híbrido (*lcnA/pedA*) como los genes *lcnCD* (pFI2160), todos ellos en sentido directo. La transformación de IL1403 con pFI2160 originó *L. lactis* FI9265, una cepa que producía pediocina PA-1 a un nivel mucho más próximo al de *P. acidilactici* 347. El aumento de productividad observado en *L. lactis* FI9265 podría deberse a que, en esa cepa, todos los genes requeridos para la producción heteróloga de pediocina (*lcnA/pedA*, *lcnC* y *lcnD*) se encuentran en un mismo plásmido (pFI2160). La organización y orientación relativa de los tres genes es equivalente a la existente en la agrupación de genes de la lactococina A. Sin embargo, el gen estructural y los de transporte están codificados en operones distintos y, por lo tanto, son transcripcionalmente independientes (Stoddard y col., 1992). En consecuencia, su coexistencia en el mismo replicón no debería influenciar significativamente los niveles globales de expresión. Resulta más

probable que la mejora de la productividad sea debida al aumento en la dosis de los genes *lcnCD*. En este sentido, el plásmido pFI2160 deriva del plásmido lactocócico pSH71, que se mantiene a un nivel de 50-60 copias por célula (Gasson y Anderson, 1985), mientras que pFI2148 es un plásmido de bajo número de copias (6-9 por célula) (Simon y Chopin, 1988).

En un estudio previamente citado, Chikindas y col. (1995) desarrollaron un derivado de IL1403 que portaba un vector lactocócico (pMC117) con el operón de la pediocina PA-1 pero que producía niveles muy bajos de bacteriocina. La secreción estaba dirigida por el líder de la pediocina PA-1 e involucraba el sistema de transporte específico *pedCD*. Posteriormente, esos autores mejoraron la producción de pediocina aumentando el número de copias del plásmido que contenía el operón *ped*; sin embargo, la productividad máxima que obtuvieron fue aproximadamente un 50% de la alcanzada por las cepas construidas durante el desarrollo de esta tesis doctoral. Este hecho confirma que la producción de pediocina PA-1 activa en lactococos es más eficiente cuando la bacteriocina se une al líder de la lactococina A que cuando lo hace al líder de la pediocina PA-1 (Horn y col., 1998). Emond (1996) observó que la pediocina PA-1 podía ser eficientemente exportada por la maquinaria de la lactococina A, independientemente de que estuviera unida a su propio líder o al líder de la lactococina. Por el contrario, la pediocina unida al líder de la lactococina y la lactococina unida al líder de la pediocina eran pobremente secretadas empleando el aparato secretor de la pediocina, lo que mostraba la mayor especificidad de este sistema de transporte por su sustrato natural.

Una observación relevante del trabajo de Horn y col. (1999) es que la producción homóloga de lactococina A y heteróloga de pediocina PA-1 también está influenciada por la cepa de *L. lactis* empleada como hospedadora. La comparación de derivados de *L. lactis* IL 1403, MG1614 y FI5876 que portaban plásmidos recombinantes equivalentes para la producción de lactococina o pediocina, reveló que, en todos los casos, los derivados de IL1403 manifestaban niveles de actividad significativamente mayores. La cuantificación de la producción de pediocina PA-1 demostró que la productividad de los derivados de IL 1403 era, como mínimo, 4 veces superior a la de los derivados

de las otras dos cepas. Esta variación en la productividad puede reflejar diferencias metabólicas entre las subespecies *lactis* (IL1403) y *cremoris* (MG1614 y FI5876) de *L. lactis*. Actualmente se desconoce la influencia que pueden ejercer las funciones propias de una cepa de *L. lactis* en la producción heteróloga de péptidos (Horn y col., 1999). La expresión de la copia cromosómica adicional de los análogos *lcnC'D'* que posee IL 1403 también pudo haber contribuido a la variación observada.

El interés por la producción heteróloga de pediocina PA-1 no se limita al campo de las bacterias lácticas. El uso excesivo de dióxido de azufre y otros aditivos químicos para prevenir el crecimiento de microorganismos no deseados en el vino, cerveza y otras bebidas fermentadas, va en detrimento de la calidad de los productos finales y tiene que afrontar una oposición cada vez mayor por parte de los consumidores. Dado que, en este tipo de bebidas, las fermentaciones están frecuentemente dirigidas por levaduras, Schoeman y col. (1999) han investigado la capacidad de *Saccharomyces cerevisiae* para producir pediocina PA-1. El objetivo final sería el desarrollo de cultivos iniciadores que, además de dirigir la fermentación, impidan el desarrollo de bacterias alterantes, entre las que destacan las bacterias lácticas. Para ello, insertaron el gen *pedA* en un cassette de expresión/secreción propio de levaduras y obtuvieron la construcción PED1 (*ADH1_P-MF α 1_S-pedA-ADH1_T*), en la que la expresión de *pedA* se situaría bajo control del promotor (*ADH1_P*) y del terminador (*ADH1_T*) del gen que codifica la alcohol deshidrogenasa I en levaduras. La secreción estaría dirigida por la señal de secreción del factor- α de la feromona sexual de levadura (*MF α 1_S*). La construcción PED1 se introdujo en *S. cerevisiae* Y294 en forma de episoma multicopia. El análisis mediante Northern *blot* reveló que el gen *pedA* se expresaba en las levaduras recombinantes, mientras que las pruebas de difusión en agar indicaron la producción de pediocina biológicamente activa. La mayor parte de las moléculas heterólogas se encontraban adheridas a las células de levadura y únicamente una pequeña fracción de pediocina se secretaba al medio exocelular.

Al igual que en este trabajo, Horn y col. (1999) también construyeron cepas de *L. lactis* (FI9262, FI9267) que expresaban y secretaban simultáneamente nisina A y pediocina PA-1, lo que supuso un primer paso en la generación de bacterias lácticas capaces de coproducir dos o más bacteriocinas de amplio espectro y bien caracterizadas. No obstante, la producción de pediocina PA-1 en una cepa naturalmente productora de nisina (FI5876) fue muy pequeña (~5% de la producida por *P. acidilactici* 347). Por lo tanto, este trabajo ha conseguido aumentar considerablemente (~6 veces) la productividad de pediocina PA-1 en *L. lactis* FI5876.

La nisina es el único péptido antimicrobiano autorizado como aditivo alimentario, siendo particularmente activo frente a los clostridios y sus esporos, mientras que la pediocina PA-1, utilizada comercialmente en el fermentado Alta 2341, destaca por su actividad anti-*Listeria* (Stiles, 1996). Aunque el empleo de bacteriocinas como aditivos alimentarios es un tema controvertido, la utilización de microorganismos de grado alimentario para su producción *in situ* puede proporcionar un medio apropiado para explotar los beneficios potenciales de estos compuestos antimicrobianos (Holzapfel y col., 1995).

La actividad y espectro antimicrobiano de una bacteriocina se pueden aumentar si se combina con otras bacteriocinas. Se ha observado que una combinación de sakacina A y nisina A inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes* de una forma mucho más acusada que cualquiera de las dos bacteriocinas por separado (Schillinger y col., 1996). De forma similar, Hanlin y col. (1993) demostraron un salto cualitativo en la actividad de una combinación de nisina A y pediocina PA-1 frente a diversas bacterias Gram-positivas. En ese trabajo, la combinación nisina-pediocina inhibía el crecimiento de todas las cepas de *L. monocytogenes* y de *Clostridium* spp. evaluadas, mientras que la nisina o la pediocina, por sí solas, originaban resultados variables. Mulet-Powell y col. (1998) han mostrado el efecto sinérgico de la pediocina PA-1 cuando se emplea en combinación con las bacteriocinas nisina A, lacticina 481, lacticina B y lacticina F.

La coproducción de bacteriocinas con estructuras y actividades biológicas completamente distintas, como la nisina y la pediocina PA-1, puede tener consecuencias prácticas positivas. La emergencia de organismos resistentes a las bacteriocinas de la clase II parece un hecho bastante común y supone un obstáculo potencial para la generalización de su aplicación como bioconservantes antimicrobianos. Rekhif y col. (1994) han descrito mutantes de *L. monocytogenes* que han adquirido resistencia espontánea a tres bacteriocinas de la familia de la pediocina PA-1: mesenterocina 52, curvaticina 13 y plantaricina C19. Aunque los mutantes mostraron resistencia cruzada a otros miembros de la misma clase, su sensibilidad a la nisina permanecía intacta. El gran potencial antimicrobiano de la pediocina PA-1 y de la nisina, así como los efectos sinérgicos de su producción simultánea, son propiedades que se pueden explotar para extender las aplicaciones de estas dos bacteriocinas en la industria alimentaria.

En el transcurso de esta Tesis Doctoral se observó que, aunque la coproducción de pediocina y nisina no aumentaba el tamaño del halo de inhibición de los indicadores (en comparación con el de las cepas parentales), sí hacía desaparecer prácticamente por completo las colonias resistentes que crecían en el interior de los halos correspondientes a las cepas productoras de una única bacteriocina (Fig. IV.5).

V.4. Producción heteróloga de colicina V en *L. lactis*

La colicina V es otra buena candidata para ser producida con el sistema desarrollado a pesar de ser una bacteriocina producida por bacterias Gram-negativas. Esto se debe a que su líder y su sistema de transporte comparten importantes homologías con los respectivos líderes y transportadores de un gran número de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, incluyendo la lactococina A y la pediocina PA-1 (Havarstein y col., 1995).

Previamente, van Belkum y col. (1997) consiguieron la secreción de colicina V en *L. lactis* empleando el líder de la leucocina A en combinación con

la maquinaria de secreción de la lactococina A pero les resultó imposible obtenerla empleando el líder de la lactococina A. No obstante, consiguieron que diversas bacterias lácticas produjeran colicina V utilizando el sistema general de secreción (*sec*) cuando reemplazaron el líder de la colicina por el péptido señal de la divergicina A.

Aunque la biosíntesis de colicina V en *E. coli* requiere la expresión de varios genes, la construcción de cepas de *L. lactis* capaces de producir colicina V únicamente ha requerido la parte del gen estructural (*cvaC*) que codifica el péptido maduro. Esto se debe a que los lactococos son naturalmente resistentes a dicha bacteriocina y a que, en este trabajo, las funciones de secreción y procesado fueron proporcionadas por los genes *lcnC* y *lcnD*.

Las toxiinfecciones alimentarias causadas por cepas patógenas de *E. coli* tienen una repercusión sanitaria y económica importante, no sólo en los países en vías de desarrollo sino también en los desarrollados. Entre las medidas propuestas para el control de patógenos en los alimentos se incluye el empleo de bacteriocinas y otros bioconservantes. No obstante, la nisina y el resto de bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas actúan exclusivamente sobre bacterias Gram-positivas y carecen de actividad frente a Gram-negativas (*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, etc.), a menos que se hayan expuesto previamente a algún estrés subletal (Cutter y Siragusa, 1995; Arqués y col., 2003). Por el contrario, las colicinas producidas por *E. coli* y otros miembros de la Familia *Enterobacteriaceae* inhiben específicamente a cepas de *E. coli* y de géneros estrechamente relacionados (Pugsley, 1984). En los últimos años, se ha despertado un gran interés por el efecto de las colicinas sobre las cepas enterohemorrágicas de *E. coli* y, particularmente, sobre las de serotipo O157:H7. Las tasas de mortalidad (~4%) y morbilidad de los brotes causados por este serotipo son particularmente elevadas en niños y ancianos, por lo que suelen tener una considerable repercusión en los medios de comunicación. En este contexto, Bradley y col. (1991) evaluaron la sensibilidad de 20 cepas de *E. coli* O157:H7 a diversas colicinas y observaron que la colicina V inhibía a 18 de ellas. En esta Tesis Doctoral, las dos cepas de *E. coli*

O157:H7 empleadas como indicadoras fueron sensibles a los sobrenadantes de los lactococos productores de colicina V.

En esta Tesis también se ha conseguido la coproducción simultánea de nisina A y colicina V en *L. lactis*. Se trata de un primer paso en la generación de bacterias lácticas capaces de coproducir una bacteriocina (nisina A) de amplio espectro frente a bacterias Gram-positivas y otra (colicina V) con un espectro más limitado pero en el que se incluyen bacterias Gram-negativas tan significativas para la Salud Pública como algunas cepas de *E. coli* O158:H7.

V.5. Producción heteróloga de IL-2 en *L. lactis*

Los distintos tipos de respuesta del sistema inmune están controlados por una red de proteínas denominadas citoquinas, que además juegan un papel importante en otras muchas funciones biológicas. Las citoquinas se originan frente a estímulos específicos (p.e.: diversos productos de origen microbiano) y son responsables de la generación, estimulación y diferenciación de diversos tipos de células y del control de la producción de otras citoquinas que, a su vez, pueden estimular o inhibir la síntesis y/o la actividad biológica de otras proteínas y tipos celulares (Curfs y col., 1997). Estas relaciones se traducen en una compleja red de regulación intercelular que puede conducir, en última instancia, a la erradicación de microorganismos invasores.

La capacidad o incapacidad para generar ciertas citoquinas (o patrones de citoquinas) como respuesta a una infección influye, en ocasiones de forma determinante, en el desarrollo o no de una enfermedad y, en su caso, en el curso clínico (Lucey y col., 1996). Por ejemplo, existen citoquinas, como IL-2, IL-6, IL-12 o IL-15, que pueden contribuir a evitar el desarrollo de enfermedades infecciosas de transmisión alimentaria causadas por microorganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* o *L. monocytogenes* (Curfs et al., 1997).

La citoquina interleuquina-2 (IL-2), también conocida como factor de crecimiento de las células T, es una glicoproteína de 133 aminoácidos (15,5 kDa) secretada primariamente por los linfocitos T activados. Los procesos de transcripción, traducción y secreción de la IL-2 se estimulan tras la activación de los linfocitos T maduros por un antígeno o una sustancia mitógena. Una vez secretada, esta citoquina ejerce numerosas funciones biológicas (Nicola, 1995; Thomas y Lotze, 2003).

En primer lugar, la IL-2 se une a los receptores existentes en la superficie de los linfocitos y promueve la expansión clonal de las células T efectoras antígeno-específicas. Por lo tanto, la IL-2 es un factor de diferenciación de las células T y es capaz de inducir la síntesis de otras linfoquinas, como la interleuquina-4 (IL-4) y el interferón- γ (IFN- γ). La IL-2 también promueve el crecimiento de las células B e induce la secreción de inmunoglobulinas. Además, esta citoquina estimula la síntesis de la cadena J que permite el ensamblaje y la secreción de las IgM. Los precursores de los macrófagos, los monocitos primarios de sangre periférica y otras subpoblaciones de células mieloides expresan receptores para la IL-2; la unión de esta citoquina a los receptores conduce a la proliferación, diferenciación y estimulación de la actividad citolítica de estas células. Las numerosas actividades biológicas de la IL-2 hacen que esta citoquina IL-2 posea múltiples aplicaciones terapéuticas (Curfs y col., 1997). Recientemente, apareció en numerosos medios de comunicación una vacuna que se está ensayando en España frente al VIH, y a la que se le añade IL-2 con el objetivo de optimizar la respuesta de los afectados.

La condición GRAS de *L. lactis*, su estrecha asociación con la industria alimentaria y el hecho de ser la bacteria láctica más estudiada hacen que esta especie sea una de las más deseadas para la producción de proteínas eucariotas de interés agroalimentario y/o biomédico (van de Guchte y col. 1989; Simons y col., 1992; Langella y Le Loir, 1999; Chatel y col., 2001; Enouf y col., 2001; Ribeiro y col., 2002; Bermudez-Humaran y col., 2002), incluyendo citoquinas como la IL-2 (Steidler y col., 1995), la IL-6 (Steidler y col., 1998), la

IL-10 (Schotte y col., 2000; Steidler y col., 2000) y la IL-12 (Bermudez y col., 2003).

Casi todas las bacterias recombinantes desarrolladas hasta la fecha para la administración de antígenos vacunales derivan de patógenos atenuados como *Salmonella* o *Mycobacterium bovis*, unos microorganismos cuyas limitaciones prácticas por motivos de seguridad son evidentes. En contraste, *L. lactis* es un hospedador particularmente atractivo para la (co)producción de antígenos y/o citoquinas ya que, aunque no coloniza ni invade la mucosa intestinal, es capaz de presentar correctamente antígenos heterólogos al sistema inmunitario, tanto al asociado a las mucosas como al sistémico (Wells y Schofield, 1996). Por este motivo, *L. lactis* constituye uno de los prototipos emergentes para el desarrollo de una nueva clase de vacunas bacterianas derivadas de bacterias Gram-positivas no patógenas y sin capacidad invasiva (Wells y col., 1996).

Steidler y col. (1995; 1998) proporcionaron el primer ejemplo de la eficacia *in vivo* de una cepa de *L. lactis* productora de citoquinas IL-2 y/o IL-6 para aumentar la respuesta inmune frente a la toxina tetánica y evitar la enfermedad en ratones a los que se les administró una dosis letal de la toxina. De forma similar a lo observado en esta Tesis, la IL-2m producida heterológamente por *L. lactis* tenía actividad biológica ya que inducía la proliferación de células CTLL-2 (Steidler y col., 1995). Posteriormente, Steidler y col. (2000) confirmaron la eficacia terapéutica de este modo de administración de citoquinas. Más recientemente, Al-Ramadi y col. (2001) construyeron una cepa de *Salmonella* atenuada que secretaba IL-2m y la administraron a ratones. La producción *in vivo* de IL-2 condujo a una rápida eliminación de *Salmonella* de los ratones y se correlacionó con una marcada disminución de la esplenomegalia (en comparación con los ratones control que recibieron la *Salmonella* parental que no producía IL-2). Estos resultados indican que la respuesta inmune frente a bacterias intracelulares puede ser manipulada favorablemente mediante citoquinas expresadas y secretadas por bacterias recombinantes y abre nuevas perspectivas en las estrategias preventivas y/o terapéuticas frente a patógenos de transmisión alimentaria.

En esta Tesis, se han obtenido lactococos capaces de coproducir nisina A e IL-2, empleando el promotor *PnisA* y el sistema de secreción de la bacteriocina lactococina A. La combinación de IL-2 con una bacteriocina de amplio espectro como la nisina A, podría ser una estrategia útil para minimizar el impacto de las toxiinfecciones alimentarias. Por una parte, la nisina actuaría inhibiendo el crecimiento de ciertos patógenos en el alimento al que se incorporara el lactococo, mientras que la IL-2 actuaría en el interior del consumidor, una vez que hubiera ingerido el alimento. En futuros trabajos se tratará de determinar la validez de esta estrategia.

V.6. Efectos toxicológicos de las bacteriocinas

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las bacteriocinas producidas por los hospedadores naturales o por sus correspondientes derivados recombinantes no ejercían ningún efecto sobre la proliferación de células HT-29. La ausencia de toxicidad de las bacterias lácticas y/o sus metabolitos es una propiedad que se suele asumir a pesar de los escasos datos científicos disponibles. En las dos últimas décadas, estudios *in vitro* empleando líneas celulares de animales y humanas revelaron la ausencia de toxicidad de numerosas cepas de bacterias lácticas (Thoreux y col., 1996; Naidu y col., 1999). Además, estudios *in vivo* utilizando ratones BALB/c corroboraron dicha propiedad (Zhou y col., 2000). Estos resultados están en consonancia con los de Zabala y col. (2000a,b) que observaron que 36 bacterias lácticas de origen alimentario y humano pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* no mostraron actividad citotóxica en células Vero.

La necesidad de una cuidadosa evaluación toxicológica de aquellas bacteriocinas que se quieran aplicar en alimentos fue puesta en evidencia por Gilmore y col. (1996) al observar que la citolisina de *E. faecalis* compartía una gran homología estructural con la lactocina S, un lantibiótico producido por

cepas de *Lactobacillus sakei* de origen alimentario (Mørtvedt y Nes, 1990; Rodríguez y col., 1995). Además, dicha citolisina también posee actividad bacteriocina y hemolítica. En este sentido, se debería evaluar la citotoxicidad de todas las bacteriocinas, incluso de las producidas por bacterias lácticas con una larga historia de uso seguro.

En el caso de la pediocina PA-1, el hecho de que los microorganismos productores (y seguramente la propia bacteriocina) se encuentren de forma natural en diversos substratos alimenticios como productos cárnicos (Bhunia y col., 1988; Gonzalez y Kunka, 1987; Ray y col., 1989; Rodríguez y col., 1997), lácteos (Ennahar y col., 1996) y vegetales (Bennik y col., 1997) y que, por lo tanto, se hayan ingerido durante siglos sin efectos adversos aparentes, es un primer indicativo del escaso poder tóxico de esta bacteriocina. Adicionalmente, la inactivación de la pediocina por las enzimas del tracto gastroduodenal garantiza un efecto inocuo en la flora intestinal.

El tratamiento de cultivos de células de mieloma de ratón con pediocina PA-1, no ocasiona pérdidas en la viabilidad celular ni alteraciones morfológicas (Ray, 1992). Tampoco se observan reacciones adversas locales o generales cuando se administra pediocina PA-1 (o fragmentos derivados) por vía subcutánea, intradérmica, intravenosa o intraperitoneal a ratones y conejos para obtener anticuerpos (Bhunia y col., 1990; Martínez y col., 1998; Martínez y col., 1999; Martínez y col., 1997). Finalmente, no se han observado efectos adversos entre los 12 componentes de un panel de catadores que evaluaron las características organolépticas de embutidos elaborados con *P. acidilactici* H (cepa productora de pediocina PA-1), a pesar de efectuar un mínimo de 10 catas durante un período de 6 meses (Wu y col., 1991). Finalmente, no se ha producido hasta la fecha ningún incidente asociado a la aplicación del producto ALTA 2341 (Quest) en alimentos listos para comer. Se trata de un fermentado obtenido a partir de cultivos de una cepa de *P. acidilactici* productora de pediocina PA-1. Precisamente esta bacteriocina es la sustancia anti-*Listeria* en la que se basa la actividad de dicho producto comercial. Actualmente se comercializa con éxito en numerosos países, incluyendo España.

Por lo que respecta a la nisina, el hecho de que los microorganismos productores y seguramente la nisina también se encuentren de forma natural en diversos sustratos alimenticios como la leche y productos lácteos (Rogers, 1928; Hirsch, 1951), vegetales (Harris y col., 1992) y productos cárnicos (Rodríguez y col., 1995a) y que, por lo tanto, se haya ingerido durante décadas sin ningún efecto adverso aparente, es cuando menos indicativo de su escasa o nula toxicidad (Frazer y col., 1962). La seguridad de la nisina está refrendada por el hecho de que, tras décadas de uso en numerosos países, no se haya producido ningún problema toxicológico asociado al uso de *Nisaplin* (Aplin & Barrett) o de cualquier otro producto comercial que contenga nisina y que se aplique en la conservación de alimentos.

Además, la inactivación de la nisina por las enzimas del tracto gastrointestinal (Heinemann y Williams, 1966; Jarvis y Mahoney, 1969) garantiza un efecto inocuo en la microbiota intestinal (1952). Por otro lado, la nisina no se detectó en la saliva de las personas que ingirieron chocolate con 200 UI ml⁻¹ de nisina a los 10 min. de haberlo consumido (Claypool y col., 1966) por lo que no se cree que tenga efecto alguno en la microbiota del aparato digestivo. También se ha evaluado su toxicidad en cerdos (Barber y col., 1952) y aves (Coates y col., 1951) sin que se observaran efectos nocivos para la salud de los animales tratados.

Además, la nisina no manifiesta resistencia cruzada con los antibióticos que se emplean en terapéutica humana (Hirsch, 1951, 1954; Lipinska, 1977) y tampoco se han observado efectos de sensibilización en seres humanos (Lipinska, 1977). La dosis letal 50 (DL₅₀) es similar a la de la sal común, es decir, unos 7 g por kg de peso corporal. En 1969, el Comité de Expertos sobre Aditivos en los Alimentos de la FAO/WHO, revisando los estudios realizados sobre la toxicidad de la nisina, recomendó su aceptación como aditivo (WHO, 1969), con una dosis diaria aceptable de 0,825 mg por kg de peso y día. Esta bacteriocina también posee la condición GRAS; para la administración estadounidense, el límite de nisina en los alimentos está situado en 62,5 ppm y la dosis diaria aceptable es de 2,9 mg por persona y día (U.S. Food and Drug Administration, 1988). Actualmente, su utilización está permitida en más de 50

países (en concentraciones que oscilan entre 12 y 200 ppm) y se incluye en la lista positiva de aditivos autorizados en marco de la UE (E-234), donde puede etiquetarse como “conservante natural”.

Al contrario de lo que se suele pensar, la aprobación de la nisina como sustancia GRAS no se basó en una historia de consumo seguro sino en datos científicos *in vitro* e *in vivo* sobre su seguridad (Frazer y col., 1962; U.S. Food and Drug Administration, 1988). No obstante, la mayor parte de la información sobre la seguridad de la nisina procede de trabajos realizados hace más de 30 años. Posiblemente, la ausencia de problemas sanitarios asociados a su ingestión sea responsable de la escasez de trabajos más recientes. Kordel y Sahl (1986) observaron que una concentración de nisina de 3500 ppm (1 mM) no producía ningún efecto tóxico en eritrocitos humanos u ovinos. Tampoco observaron efectos citotóxicos en otras líneas celulares. Mucho más recientemente, Murinda y col. (2003) observaron que la nisina y la pediocina PA-1 (semipurificadas) resultaban tóxicas para las células SV40-HC, una línea celular infectada con un virus tumoral. Sin embargo, las células infectadas con este tipo de virus son mucho más sensibles a las bacteriocinas que las células eucariotas normales (Smarda, 1991).

La especial sensibilidad de estos péptidos antimicrobianos por células como las SV40-HC indica que podrían actuar terapéuticamente sobre células malignas, incluyendo las infectadas por virus causantes de tumores. Diversos estudios previos ya habían sugerido dicho potencial (Farkas-Himsley, 1976; Farkas-Himsley y Kuzniak, 1978; Farkas-Himsley y Musclow, 1986; Smarda, 1991). Las células malignas desarrollan más receptores en la superficie de sus membranas celulares y diversas sustancias, incluidas las bacteriocinas (Farkas-Himsley y Musclow, 1986; Smarda, 1983) pueden unirse a tales receptores y ejercer su actividad biológica. Saito y Watanabe (1979; 1981) y Saito y col. (1979) evaluaron el potencial citotóxico de la esmegmatocina 14468, una bacteriocina producida por una bacteria Gram-positiva que no pertenece al grupo de las bacterias lácticas, y observaron que inhibía células malignas humanas y células animales transformadas con virus tumorales pero no afectaba a células animales y humanas normales.

Capítulo VI

CONCLUSIONES

Primera. Durante la realización de esta Tesis Doctoral, se han construido genes estructurales híbridos, controlados por el promotor de la nisina (*PnisA*), con las fusiones de las secuencias que codifican, por una parte, el líder de la lactococina A y, por otra, la prolactococina A, la propediocina PA-1 o la colicina V. La cotransformación de *L. lactis* FI7847 y *L. lactis* FI5876 con un plásmido que portaba el correspondiente gen estructural y un segundo plásmido que contenía los genes *lcnC* y *lcnD*, que codifican el sistema de transporte y procesado de la lactococina A, condujo a la producción exocelular de las bacteriocinas lactococina A, pediocina PA-1 y colicina V, respectivamente.

Segunda. Todas las nuevas cepas derivadas de *L. lactis* FI5876 conservaron intacta la propiedad de producir nisina A. Por lo tanto, se han obtenido cepas coproductoras de lactococina A y nisina A, de pediocina PA-1 y nisina A, y de colicina V y nisina A. En el caso de la coproducción de pediocina PA-1 y nisina A, *L. lactis* FI10038 produjo aproximadamente 9 veces más pediocina PA-1 que *L. lactis* FI9262, una cepa desarrollada anteriormente. La única diferencia entre *L. lactis* FI10038 y *L. lactis* FI9262 es que, en esta última cepa, el gen híbrido está bajo control del promotor de la lactococina A en vez del de la nisina. En consecuencia, el cambio de promotor ha supuesto una mejora significativa del sistema heterólogo previo. Por otra parte, en este trabajo se han conseguido las primeras bacterias lácticas capaces de coproducir una bacteriocina activa frente a bacterias Gram-positivas (nisina A) y otra bacteriocina activa frente a bacterias Gram-negativas (colicina V).

Tercera. El aparato de transporte y procesado de la lactococina A ha sido capaz de dirigir la secreción de interleuquina-2 activa en *L. lactis*. Este hecho sugiere que el sistema heterólogo desarrollado puede ser muy versátil para la producción de péptidos en *L. lactis* ya que la citoquina interleuquina-2 difiere notablemente de las bacteriocinas citadas anteriormente en secuencia, estructura, tamaño, sistema de secreción y función biológica.

Cuarta. La adición de los sobrenadantes de los lactococos recombinantes a cultivos celulares de la línea de células intestinales HT-29 no afectó a su proliferación. En consecuencia, las bacteriocinas existentes en dichos sobrenadantes no parecen ejercer un efecto citotóxico en estas células eucariotas.

Capítulo VII

TRABAJO FUTURO

La condición GRAS de *L. lactis*, su estrecha asociación con la industria alimentaria y el hecho de ser la bacteria láctica más estudiada hacen que esta especie sea una de las más deseadas para la producción de péptidos o proteínas de interés agroalimentario y/o biomédico. La obtención de cepas de *L. lactis* que (co)producen bacteriocinas como la pediocina PA-1, la colicina V o la nisina puede contribuir a mejorar la calidad higiénica de los alimentos en los que se añadan. Por otra parte, *L. lactis* es un hospedador particularmente atractivo para la (co)producción de antígenos y/o citoquinas ya que, aunque no coloniza ni invade la mucosa intestinal, es capaz de presentar correctamente antígenos heterólogos al sistema inmunitario, tanto al asociado a las mucosas como al sistémico (Wells y Schofield, 1996). Por este motivo, *L. lactis* constituye uno de los prototipos emergentes para el desarrollo de una nueva clase de vacunas bacterianas derivadas de bacterias Gram-positivas no patógenas y sin capacidad invasiva (Wells y col., 1996).

Sin embargo, para que los beneficios de la producción heteróloga de dichas sustancias pudieran ser aprovechados por la industria alimentaria sería deseable: (1) aumentar la productividad de dichos péptidos; (2) desarrollar cepas capaces de competir en sustratos reales y que posean propiedades tecnológicas adecuadas; y (3) que gocen de grado alimentario. Precisamente, estos son los objetivos del trabajo futuro.

En primer lugar, para aumentar la productividad de los péptidos mencionados anteriormente se seguirán dos estrategias. La primera consistirá en clonar los genes *lcnC* y *lcnD* en el mismo plásmido multicopia que contiene el gen estructural híbrido. El aumento de la dosis génica del transportador redundará en una mayor producción exocelular de los péptidos de interés. La segunda estrategia se basará en la introducción en el vector multicopia pTG262 del operón completo de la pediocina PA-1 bajo control de promotores fuertes como P32 (no inducible) o *PnisA* (inducible).

En segundo lugar, las construcciones que se obtengan se introducirán en cepas de *L. lactis* aisladas de quesos artesanos y seleccionadas por sus propiedades tecnológicas. De este modo, se garantizará la competitividad de las cepas derivadas en productos lácteos fermentados. Las cepas procederán del Dpto. de Tecnología de Alimentos del INIA (Madrid).

Finalmente, se intentará desarrollar cepas de *L. lactis* que produzcan los péptidos citados y que gocen de grado alimentario. Para ello, se utilizarán dos estrategias distintas y complementarias. La primera consistirá en la eliminación de todas las secuencias del vector pTG262 que pertenezcan a *E. coli*, incluyendo el origen de replicación y los genes de resistencia a antibióticos. De este modo, se originará un plásmido multicopia de grado alimentario que permita mantener una dosis génica elevada del gen estructural y de los genes *lcnC* y *lcnD*. Paralelamente, se abordará la integración cromosómica del fragmento de interés “*PnisA*-gen estructural híbrido-*lcnC-lcnD*” en el cromosoma de las cepas de *L. lactis*.

Capítulo VIII

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, S.A., Gogal, R.M. y Walsh, J.E.** (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods*, **170**: 211-224.
- Ahn, C. y Stiles, M.E.** (1990). Plamid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 2503-2510.
- Al-Ramadi, B.K., Al-Dhaheri, M.H., Mustafa, N., Abouhaidar, M., Xu, D., Liew, F.Y., Lukic, M.L. y Fernández-Cabezudo, M.J.** (2001). Influence of vector-encoded cytokines on anti-*Salmonella* immunity: divergent effects of interleukin-2 and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.*, **69**: 3980-3988.
- Allison, G.E., Fremaux, C., Ahn C. y Klaenhammer, T.R.** (1994). Expansion of the bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.*, **176**: 2235-2241.
- Allison, G.E., Worobo, R.W., Stiles, M.E. y Klaenhammer, T.R.** (1995a). Heterologous expression of the lactacin F peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 1371-1377.
- Allison, G.E., Ahn, C., Stiles, M.E. y Klaenhammer, T.R.** (1995b). Utilization of the leucocin A export system in *Leuconostoc gelidum* for production of a *Lactobacillus* bacteriocin. *FEMS Microbiol. Lett.*, **131**: 87-93.
- Arqués, J.L., Rodríguez, E., Tomillo, J., Gaya, P., Núñez, M. y Medina, M.** (2003). Tratamientos combinados de altas presiones y bacterias lácticas productoras de bacteriocinas en la inactivación de patógenos. En: *Bacteriocinas de Bacterias Lácticas en la Mejora de la Calidad de los Alimentos*, pp. 181-192. Medina, M. y Núñez, M. (Coordinadores). INIA.
- Axelsson, L. y Holck, A.** (1995). The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.*, **177**: 2125-2137.
- Axelsson, L., Katla, T., Bjornslett, M., Eijsink, V.G.H. y Holck, A.** (1998). A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **168**: 137-143.

- Ayad, E.H.E., Verheul, A., de Jong, C., Wouters, J.T.M. y Smit, G.** (1999). Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *Int. Dairy J.*, **9**: 725-735.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Wouters, J.T.M. y Smit, G.** (2002). Antimicrobial-producing wild lactococci isolated from artisanal and non-dairy origins. *Int. Dairy J.*, **12**: 145-150.
- Aymerich, M.T. y Hugas, M.** (1998). Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. *Eurocarne*, **72**: 39-49.
- Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. y Nes, I.F.** (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 1676-1682.
- Barber, R.S., Braude, R. y Hirsch, A.** (1952). Growth of pigs given skim milk soured with nisin-producing streptococci. *Nature*, **169**: 200.
- Bennik, M.H.J., Verheul, A., Abee, T., Naaktgeboren-Stoffels, G., Gorris, L.G.M. y Smid, E.J.** (1997). Interactions of nisin and pediocin PA-1 with closely related lactic acid bacteria that manifest over 100-fold differences in bacteriocin sensitivity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 3628-3636.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. y Cogan, T.M.** (2001). Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.*, **11**: 259-274.
- Bermúdez-Humaran, L.G., Langella, P., Miyoshi, A., Gruss, A., Guerra, R.T., Montes de Oca-Luna, R. y Le Loir, Y.** (2002). Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 917-922.
- Bermúdez-Humaran, L.G., Langella, P., Cortez-Perez, N., Gruss, A., Tamez-Guerra, R.S., Oliveira, S.C., Montes de Oca-Luna, R. y Le Loir, Y.** (2003). Intranasal administration of recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine interleukin-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production. *Infect. Immun.*, **71**: 1887-1896.
- Bhunja, A.K., Johnson M.G. y Ray B.** (1988). Purification, characterization and

- antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.*, **65**: 261-268.
- Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. y Belden, E.L.** (1990). Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici* H. *J. Appl. Bacteriol.*, **69**: 211-215.
- Bhunia, A. K., Johnson, M.C., Ray, B. y Kalchayanand, N.** (1991). Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.* **70**: 25-33.
- Bhunia, A.K., Bhowmik, T.K. y Johnson, M.G.** (1994). Determination of bacteriocin-encoding plasmids of *Pediococcus acidilactici* strains by Southern hybridization. *Lett. Appl. Microbiol.*, **18**: 168-170.
- Biet, F., Berjeaud, J.M., Worobo, R.W., Cenatempo, Y. y Fremaux, C.** (1998). Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway. *Microbiology*, **144**: 2845-2854.
- Billman-Jacobe, H.** (1996). Expression in bacteria other than *Escherichia coli*. *Curr. Opinion Biotech.*, **7**: 499-504.
- Birnboim, H.C. y Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**: 1513-1523.
- Blom, H., Katla, T., Hagen, B.F. y Axelsson, L.** (1997). A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.*, **38**: 103-109.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauer, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. y Sorokin, A.** (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.*, **11**: 731-753.
- Bradley, D.E., Howard, S.P. y Lior, H.** (1991). Colicinogeny of O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli* and the shielding of colicin and phage receptors by their O-antigenic side chains. *Can. J. Microbiol.*, **37**: 97-104.

- Broadbent, J.R., Sandine, W.E. y Kondo, J.K.** (1995). Characteristics of Tn5307 exchange and intergeneric transfer of genes associated with nisin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**: 139-146.
- Buchman, W.B., Banerjee, S. y Hansen, J.N.** (1988). Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.*, **263**: 16260-16266.
- Buyong, N., Kok, J. y Luchansky, J.B.** (1998). Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 4842-4845.
- Caldwell, S.L., McMahon, D.J., Oberg, C.J. y Broadbent, J.R.** (1996). Development and characterization of lactose-positive *Pediococcus* species for milk fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 936-941.
- Caplice, E. y Fitzgerald, G.F.** (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, **50**: 131-149.
- Casadaban, M.J. y Cohen, S.N.** (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **138**: 179-207.
- Casaus, P., Nielsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E. y Holo, H.** (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, **143**: 2287-2294.
- Chakicherla, A. y Hansen, J.N.** (1995). Role of the leader and structural regions of prelantibiotic peptides as assessed by expressing nisin-subtilin chimeras in *Bacillus subtilis* 168, and characterization of their physical, chemical, and antimicrobial properties. *J. Biol. Chem.*, **270**: 23533-23539.
- Chandrapati, S. y O'Sullivan, D.J.** (2002). Characterization of the promoter regions involved in galactose- and nisin-mediated induction of the *nisA* gene in *Lactococcus lactis* ATCC 11454. *Mol. Microbiol.*, **2**: 467-477.
- Chatel, J.M., Langella, P., Adel-Patient, K., Commissaire, J., Wal, J.M. y Corthier, G.** (2001). Induction of mucosal immune response after intranasal

- or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**: 545-551.
- Chen, Y. y Montville, T.J.** (1995). Efflux of ions and ATP depletion induced by pediocin PA-1 are concomitant with cell death in *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Appl. Bacteriol.*, **79**: 684-690.
- Chen, Y., Ludescher, R.D. y Montville, T.J.** (1997). Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4770-4777.
- Chikindas, M.L., García-Garcerá, M.J., Driessen, A.J.M., Ledebøer, A.M., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Abee, T., Konings, W.N. y Venema, G.** (1993). Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 3577-3584.
- Chikindas, M.L., Venema, K., Ledebøer, A.M., Venema, G. y Kok, J.** (1995). Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**: 183-189.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E. y Nes, I.F.** (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4321-4330.
- Claypool, L., Heinemann, B., Voris, L. y Stumbo, C.R.** (1966). Residence time of nisin in the oral cavity following consumption of chocolate milk containing nisin. *J. Dairy Sci.*, **49**: 314-316.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. y Chikindas, M.L.** (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, **71**: 1-20.
- Coates, M.E., Harrison, G.F., Kon, S.K., Mann, M.E. y Rose, C.D.** (1951). Effect of antibiotics and vitamin B12 on the growth of normal and "Animal Protein Factor" deficient chicks. *Proc. Biochemical Society*, xii-xiii.
- Coderre, P.E. y Somkuti, G.A.** (1999). Cloning and expression of the pediocin

- operon in *Streptococcus thermophilus* and other lactic fermentation bacteria. *Curr. Microbiol.*, **39**: 295-301.
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H. y Wilkinson, M.G.** (2003). Evidence of a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in Cheddar cheese during ripening. *J. Dairy Res.*, **70**: 105-113
- Curfs, J.H.A.J., Meis, J.F.G.M. y Hoogkamp-Korstanje, J.A.A.** (1997). A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**: 742-780.
- Cutter, C. y Siragusa, G.R.** (1995). Population reductions of Gram-negative pathogens following treatment with nisin and chelators under various conditions. *J. Food Prot.*, **58**: 977-983.
- Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., Simard, R.E. y Lemieux, L.** (1994). Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *J. Appl. Bacteriol.*, **77**: 682-688.
- Daeschel, M.A.** (1992) Procedures to detect antimicrobial activities of microorganisms. En: *Food Biopreservatives of Microbial Origin*, pp. 57-80. Ray, B. y Daeschel, M.A. (eds.). CRC Press, Boca Raton.
- de Ruyter, P.G.G.A.** (1998). Development, molecular characterisation and exploitation of the nisin controlled expression system in *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral. Universidad de Wageningen, Holanda.
- de Ruyter, P.G.G.A., Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., van Alenboerrigter, I.J. y de Vos, W.M.** (1996a). Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, **178**: 3434-3439.
- de Ruyter, P.G.G.A., Kuipers, O.P. y de Vos, W.M.** (1996b). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 3662-3667.
- de Vos, W.M.** (1999). Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**: 289-295.
- de Vos, W.M.** (2001). Advances in genomics for microbial food fermentations and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**: 493-498.
- de Vos, W.M. y Gasson, M.J.** (1989). Structure and expression of the

- Lactococcus lactis* gene for phosphobeta-galactosidase (*lacG*) in *Escherichia coli* and *L. lactis*. *J. Gen. Microbiol.*, **2**: 1833-1846.
- de Vos, W.M. y Vaughan, E.E.** (1994). Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **15**: 217-237.
- de Vos W.M., Kuipers, O.P., Van Der Meer, J.R. y Siezen, R.J.** (1995). Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, **17**: 427-437.
- De Vuyst, L.** (2000). Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technol. Biotechnol.*, **38**: 105-112.
- De Vuyst, L., De Vin, F., Vanningelgem, F. y Degeest, B.** (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, **11**: 687-707.
- Delcour, J., De Vuyst, L. y Shortt, C.** (1999). Recombinant dairy starters, probiotics, and prebiotics: scientific, technological, and regulatory challenges. *Int. Dairy J.*, **9**: 1-82.
- Delves-Broughton, J.** (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.*, **44**: 100-117.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J. y Hugenholtz, J.** (1996). Applications of the bacteriocin nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, **69**: 193-202.
- Dodd, H.M., Horn, N. y Gasson, M.J.** (1990). Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.*, **136**: 555-566.
- Dodd, H.M., Horn, N., Zhang, H. y Gasson, M.J.** (1992). A lactococcal expression system for engineered nisins. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3683-3693.
- Dodd, H.M., Horn, N. y Gasson, M.J.** (1995). A cassette vector for protein engineering the lantibiotic nisin. *Gene*, **162**: 163-164.
- Dodd, H.M., Horn, N., Chan, W.C., Giffard, C.J., Bycroft, B.W., Roberts, G.C.K. y Gasson, M.J.** (1996). Molecular analysis of the regulation of nisin immunity. *Microbiology*, **142**: 2385-2392.
- Dougherty, B.A., Hill, C., Weidman, J.F., Richardson, D.R., Venter, J.C. y Ross, R.P.** (1998). Sequence and analysis of the 60 kb conjugative,

- bacteriocin-producing plasmid pMRC01 from *Lactococcus lactis* DPC3147. *Mol. Microbiol.*, **29**: 1029-1038.
- Eijsink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B. y Nes, I.F.** (1998). Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 3275-3281.
- Emond, E.** (1996). Caractérisation moléculaire de la pédiocine PA-1 et des mécanismes de la maturation et de l'exportation des bactériocines de la classe II. Tesis Doctoral. Universidad Laval de Québec, Canadá.
- Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Hammelman, M. y Entian, K.D.** (1992). Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane location of the NisB protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3730-3743.
- Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Kiesau, P., Siegers, K., Hammelman, M. y Entian, K.D.** (1994). Regulation of nisin biosynthesis and immunity of *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 814-825.
- Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Sorokine, O., van Dorselaer, A., Bringel, F., Hubert, J.C. y Hasselmann, C.** (1996). Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 4381-4387.
- Enouf, V., Langella, P., Commissaire, J., Cohen, J. y Corthier, G.** (2001). Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 1423-1428.
- Farber, J.M. y Peterkin, P.I.** (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.*, **55**: 476-511.
- Farkas-Himsley, H.** (1976). Bacteriocins as growth inhibitors of neoplastic and tumorigenic cells. *IRCS Med. Sci.*, **4**: 291-295.
- Farkas-Himsley, H. y Kuzniak, S.** (1978). Bacteriocins as inhibitors of neoplasia. En: *Current chemotherapy*, vol. 2, pp. 1188-1191. Siegenthaler, W. y Luthy, R. (eds.). American Society for Microbiology, Washington.
- Farkas-Himsley, H. y Musclow, C.E.** (1986). Bacteriocin receptors on malignant mammalian cells: are they transferrin receptors?. *Cell. Mol. Biol.*, **32**: 607-617.
- Fath, M.J. y Kolter, R.** (1993). ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol.*

- Rev.*, **57**: 995-1017.
- Fath, M. J., L. H. Zhang, J. Rush, and R. Kolter.** 1994. Purification and characterization of colicin V from *Escherichia coli* culture supernatants. *Biochemistry* **33**: 6911-6917.
- Fernández, L., Beerthuyzen, M.M., Brown, J., Siezen, R.J., Coolbear, T., Holland, R. y Kuipers, O.P.** (2000). Cloning, characterization, controlled overexpression, and inactivation of the major tributyrin esterase gene of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 1360-1368.
- Fimland, G., Blingsmo, O.R., Sletten, K., Jung, G., Nes, I.F. y Nissen-Meyer, J.** (1996). New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 3313-3318.
- Fimland, G., Jack, R., Jung, G., Nes, I.F. y Nissen-Meyer, J.** (1998). The bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center towards the C terminus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 5057-5060.
- Franke, C.M.** (1998). Topology of a type I secretion system for bacteriocins of *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Holanda.
- Franke, C.M., Leenhouts, K.J., Haandrikman, A.J., Kok, J., Venema, G. y Venema, K.** (1996). Topology of LcnD, a protein implicated in the transport of bacteriocins from *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, **178**: 1766-1769.
- Franz, C.M.A.P., Worobo, R.W., Quadri, L.E.N., Schillinger, U., Holzappel, W.H., Vederas, J.C. y Stiles, M.E.** (1999). Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 2170-2178.
- Frazer, A., Sharratt, M. y Hickman, J.** (1962). Biological effects of food additives. *J. Sci. Food Agric.*, **13**: 32-42.
- Fremaux, C., Ahn, C. y Klaenhammer, T.R.** (1993) Molecular analysis of the lactacin F operon. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 3906-3915.
- Fremaux, C., Héchar, Y. and Cenatiempo, Y.** (1995) Mesentericin Y105 gene

- clusters in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Microbiology*, **141**: 1637-1645.
- Gasson, M.J.** (1984). Transfer of sucrose fermenting ability, nisin resistance and nisin production in *Streptococcus lactis* 712. *FEMS Microbiol. Lett.*, **21**: 7-10.
- Gasson, M.J. y Anderson, P.H.** (1985). High copy number plasmid vectors for use in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Letts.*, **30**: 193-196.
- Gillis, S., Fern, M.M., Ou, W. y Smith, K.A.** (1978). T cell growth factor: parameters of production and quantitative microassay for activity. *J. Immunol.*, **120**: 2027-2032.
- Gilmore, M., Skaugen, M. y Nes, I.** (1996). *Enterococcus faecalis* cytolysin and lactosin S of *Lactobacillus sake*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **69**: 129-138.
- Gilson, L., Mahanty, H. K. y Kolter, R.** (1987). Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. *J. Bacteriol.*, **169**: 2466-2470.
- Gilson, L., Mahanty, H.K. y Kolter, R.** (1990) Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *EMBO J.*, **9**: 3875-3884.
- Gonzalez, C. F. y Kunka, B. S.** (1987). Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 2534-2538.
- Gratia, A.** (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C. R. Soc. Biol. Fill.*, **93**: 1040-1041.
- Grunert, K.G., Bech-Larsen, T. y Bredahl, L.** (2000). Three issues in consumer quality perception and acceptance of dairy products. *Int. Dairy J.*, **10**: 575-584.
- Hanlin, M.B., Kalchayanand, N., Ray, P. y Ray. B.** (1993). Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *J. Food Prot.*, **56**: 252-255.
- Hardy, K.G.** (1975). Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriol. Rev.*, **39**: 464-515.
- Harris, L.J.** (1998). The microbiology of vegetable fermentations. En: *Microbiology of Fermented Foods*, Vol. 1, pp. 45-72. Wood, B.J.B. (ed.). Blackie, Londres.

- Harris, L.J., Fleming, H.P. y Klaenhammer, T.R.** (1992). Characterization of two nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from commercial sauerkraut fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 1477-1483.
- Hastings, J.W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K.L., Vederas, J.C. y Stiles, M.E.** (1991). Characterization of leucocin A-UAL187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.*, **173**: 7491-7500.
- Håvarstein, L.S., Holo, H. y Nes, I.F.** (1994). The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with the leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology*, **140**: 2383-2389.
- Håvarstein, L.S., Diep, D.B. y Nes, I.F.** (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.*, **16**: 229-240.
- Hébert, E.M., Raya, R.R., Tailliez, P. y de Giori, G.S.** (2000). Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, **59**: 19-27.
- Héchar, Y., Dérijard, B., Letellier, F. y Cenatiempo, Y.** (1992) Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Gen. Microbiol.*, **138**: 2725-2731.
- Heinemann, B. y Williams, R.** (1966). The inactivation of nisin by pancreatin. *J. Dairy Sci.*, **49**: 312-313.
- Henderson, J.T., Chopko, A.L., van Wassenaar, P.D.** (1992). Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Arch. Biochem. Biophys.*, **295**: 5-12.
- Hirsch, A.** (1951). Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.*, **5**: 208-221.
- Hirsch, A.** (1954). Some polypeptide antibiotics. *J. Appl. Bacteriol.*, **17**: 108-115.
- Hirsch, A. y Grinsted, E.** (1951). The differentiation of the lactic streptococci and their antibiotics. *J. Dairy Res.*, **18**: 198-204.
- Holo, H. y Nes, I.F.** (1989). High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically

- stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 3119-3123.
- Holo, H. Nissen, O. y Nes, I.F.** (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.*, **173**: 3879-3887.
- Holzappel, W.H., Geisen, R. y Schillinger, U.** (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.*, **24**: 343-362.
- Hoover, D.G., Walsh, P.M., Kolaetis, K.M. y Daly, M.M.** (1988). A bacteriocin produced by *Pediococcus* species associated with a 5,5 megadalton plasmid. *J. Food Prot.*, **59**: 29-31.
- Hopkins, R.G. y Failla, M.L.** (1995). Chronic intake of a marginally low copper diet impairs *in vitro* activities of lymphocytes and neutrophils from male rats despite minimal impact on conventional indicators of copper status. *J. Nutr.*, **125**: 2658-2668.
- Horn, N., Martínez, M.I., Martínez, J.M., Hernández, P.E., Gasson, M.J., Rodríguez, J.M. y Dodd. H.M.** (1998). Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococcin A secretory apparatus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 818-823.
- Horn, N., Martínez, M. I., Martínez, J. M., Hernández, P. E., Gasson, M. J., Rodríguez, J. M. y Dodd. H. M.** (1999) Enhanced production of pediocin PA-1, and coproduction of nisin and pediocin PA-1, by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 4443-4450.
- Horn, N., S. Swindell, H. M. Dodd, y M. J. Gasson.** (1991). Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. *Mol. Gen. Genet.*, **228**: 129-135.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. y Monfort, J.M.** (1995). Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *J. Appl. Bacteriol.*, **79**: 322-330.
- Hughenoltz, J. y Kleerebezem, M.** (1999). Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Curr. Opinion Biotech.*, **10**: 492-497.

- Hurst, A.** (1981). Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.*, **27**: 85-123.
- Hwang, J., Zhong, X. y Tai, P.C.** (1997). Interactions of dedicated export membrane proteins of the colicin V secretion system: CvaA, a member of the membrane fusion protein family, interacts with CvaB and TolC. *J. Bacteriol.*, **179**: 6264-6270.
- Ingram, L.** (1970). A ribosomal mechanism for synthesis of peptides related to nisin. *Biochim. Biophys. Acta*, **224**: 263-265
- Jack, R.W., Tagg, J.R. y Ray, B.** (1995). Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, **59**: 171-200.
- Jager, K. y Harlander, S.** (1992). Characterization of a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PC and comparison of bacteriocin-producing strains using molecular typing procedures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**: 631-637.
- Jarvis, B. y Mahoney, R.R.** (1969). Inactivation of nisin by alpha-chymotrypsin. *J. Dairy Sci.*, **52**: 1448-1450.
- Joerger, M.C. y Klaenhammer, T.R.** (1986) Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.*, **167**: 439-446.
- Joosten, H.M.L.J., Gaya, P. y Nuñez, M.** (1995). Isolation of tyrosin decarboxylaseless mutants of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* strain and their application in cheese. *J. Food Prot.*, **58**: 1222-1226.
- Kalchayanand, N., Hanilin, M.B. y Ray, B.** (1992). Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.*, **15**: 239-243.
- Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C.P. y Ray, B.** (1998). Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *J. Food Prot.*, **61**: 425-431.
- Kaletta, C. y Entian, K.D.** (1989). Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.*, **171**: 1597-1601.
- Kanatani, K., Oshimura, M. y Sano, K.** (1995) Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*.

- Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 1061-1067.
- Karakas Sen, A., Narbad, A., Dodd, H.M., Parr, A., Colquhoun, I. y Gasson, M.J.** (1999). Posttranslational modification of nisin: The role of NisB protein in the dehydration process. *Eur. J. Biochem.*, **261**: 1-10.
- Kemperman, R., Sanders, J.W., Venema, G. y Kok, J.** (1999) Enhanced secretion of pediocin PA-1 by overexpression of the accessory protein PedC. *Abstracts of the Sixth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, C80, Veldhoven, Holanda.
- Klaenhammer, T.R.** (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, **70**: 337-349.
- Klaenhammer, T.R. y Kullen, M.J.** (1999). Selection and design of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, **50**: 45-58.
- Kleerebezem, M., Quadri, L.E.N., Kuipers, O.P. y de Vos, W.M.** (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, **24**: 895-904.
- Klijn, N., Weerkamp, A.H. y de Vos, W.M.** (1995). Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 788-792.
- Koninsky, J.** (1982). Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu. Rev. Microbiol.*, **36**: 125-144.
- Kordel, M. y Sahl, H.G.** (1986). Susceptibility of bacterial, eukaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides, Pep5 and nisin. *FEMS Microbiol. Lett.*, **34**: 139-144.
- Kuipers, O.P., Rolema, H.S., de Vos, W.M. y Siezen, R.J.** (1993). Biosynthesis and secretion of a precursor of nisin Z by *Lactococcus lactis*, directed by the leader peptide of the homologous lantibiotic subtilin from *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.*, **330**: 23-27.
- Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M. M., de Ruyter, P.G.G.A., Luesink, E.J. y de Vos, W.M.** (1995). Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **270**: 27299-27304.
- Kuipers, O.P., de Ruyter, P.G.G.A., Kleerebezem, M. y de Vos, W.M.** (1997).

- Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.*, **15**: 135-140.
- Kuipers, O.P., de Ruyter, P.G.G.A., Kleerebezem, M. y de Vos, W.M.** (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria *J. Biotech.*, **64**: 15-21.
- Kýla-Nikkilä, K., Ra, R. y Saris, P.E.J.** (1999). Induction by nisin seems to occur via the membrana and not only directly from the hydrophilic exterior. *Abstracts of the Sixth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, C86, Veldhoven, Holanda.
- Langella, P. y Le Loir, Y.** (1999). Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **32**: 191-198.
- Law, B.A.** (2001). Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. *Int. Dairy J.*, **11**: 383-398.
- Leer, J.R., van der Vosse, J.M.B M., van Gieze, M., van Noort, J.M. y Pouwels, P.H.** (1995). Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology*, **141**: 1629-1635.
- Leistner, L.** (1992). Food preservation by combined methods. *Food Res. Int.*, **25**: 151-158.
- Leroy, F. y De Vuyst, L.** (2003). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.*, **15**: 67-78.
- Li, H. y O'Sullivan, D.J.** (2002). Heterologous expresion of the *Lactococcus lactis* bacteriocin, nisin in a dairy *Enterococcus* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 3392-3400.
- Lipinska, E.** (1977). Nisin and its applications. En: *Antibiotics and Antibiosis in Agriculture*, pp. 103-130. Woodbine, M. (ed.). Butterworth, Londres.
- Lucey, D.R., Clerici, M. y Shearer, G.M.** (1996). Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic and immflamatory diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, **9**: 532-562.
- Luchansky, J.B., Glass, K.A., Harsono, K.D., Degnan, A.J., Faith, N.G., Cauvin, B., Baccus-Taylor, G., Arihara, K., Bater, B., Maurer, A.J. y Cassen, R.G.** (1992). Genomic analysis of *Pediococcus acidilactici* in turkey

- summer sausage. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3053-3059.
- Makrides, S.C.** (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, **60**: 512-538.
- Martínez, J.M.** (2000). Producción y empleo de anticuerpos de especificidad predeterminada para la detección, cuantificación y purificación de las bacteriocinas pediocina PA-1 y enterococina A y para el reconocimiento específico de su (co)expresión heteróloga en *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- Martínez, J.M., Kok, J., Sanders, J.W y Hernández, P.E.** (2000). Heterologous co-production of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 3543-3549.
- Martínez, J.M., Martínez, M.I., Suárez, A.M., Herranz, C., Casaus, P., Cintas, L.M., Rodríguez, J.M. y Hernández, P.E.** (1998). Generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity against pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 4536-4545.
- Martínez, J.M., Martínez, M.I., Suárez, A.M., Herranz, C., L. M. Cintas, L.M., Rodríguez, J.M. y Hernández, P.E.** (1999). Polyclonal antibodies of predetermined specificity against a synthetic 1-9 N-terminal fragment of pediocin PA-1: specificity and cross-reactivity with other class II bacteriocins. *Microbiology*, **145**: 2777-2787.
- Martínez, J.M., Martínez, M.I., Herranz, C., Suárez, A.M., Cintas, L.M., Fernández, M.F., Rodríguez, J.M. y Hernández, P.E.** (2000). Use of genetic and immunological probes for pediocin PA-1 gene detection and quantification of bacteriocin production in *Pediococcus acidilactici* strains of meat origin. *Food Agric. Immunol.*, **12**: 299-310.
- Martínez, M.I.** (1999). Expresión heteróloga de la bacteriocina pediocina PA-1 en *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- Martínez, M.I., Horn, N., Fernández, A., Rodríguez, J.M. y Dodd, H.M.** (2001). Producción heteróloga de pediocina PA-1 y/o citoquinas en *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus* spp. En: *Bacteriocinas producidas por bacterias lácticas*

- y su aplicación en la industria alimentaria, M. Maqueda (coord.), pp. 105-119. Universidad de Granada.
- Martínez, M.I., Rodríguez, J.M., Suárez, A., Martínez, J.M., Azcona, J.I. y Hernández, P.E.** (1997). Generation of polyclonal antibodies against a chemically synthesized N-terminal fragment of the bacteriocin pediocin PA-1. *Lett. Appl. Microbiol.*, **24**: 488-492.
- Martínez-Cuesta, M.C., Kok, J., Herranz, E., Peláez, C., Requena, T. y Buist, G.** (2000). Requirement of autolytic activity for bacteriocin-induced lysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 3174-3179
- Marugg, J.D., González, C.F., Kunka, B.S., Ledebøer, A.M, Pucci, M.J., Toonen, M.Y., Walker, S.A., Zoetmulder, L.C.M. y Vandenberg, P.A.** (1992). Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 2360-2367.
- Mattick, A.T.R. y Hirsch, A.** (1947). Further observation on an inhibitor (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, **2**: 5-7.
- McAuliffe, O., Hill, C. y Ross, R.P.** (2000) Identification and overexpression of *ltnI*, a novel gene which confers immunity to the two component lantibiotic, lactacin 3147. *Microbiology*, **146**: 129-138.
- McClintock, M., Serres, L., Marzolf, J.J., Hirsch, A. y Mocquot, G.** (1952). Action inhibitrice des streptococques producteurs de nisine sur le developpement des sporules anaerobies dans le fromage de Gruyère fondu. *J. Dairy Res.*, **19**: 187-193.
- McCormick, J.K., Worobo, R.W. y Stiles, M.E.** (1996) Expression of the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal peptide-dependent general secretory pathway. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 4095-4099.
- McCormick, J.K., Klaenhammer, T.R. y Stiles, M.E.** (1999) Colicin V can be produced by lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, **29**: 37-41.
- Meisel, H. y Bockelmann, W.** (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and tropho-functional properties. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, **76**: 207-215.

- Miller, K.W., Schamber, R., Chen, Y. y Ray, B.** (1998). Production of active chimeric pediocin PA-1 in *Escherichia coli* in the absence of processing and secretion genes from *Pediococcus pap* operon. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 14-20.
- Mogensen, G.** (1993) Starter cultures. En: *Technology of reduced-additive foods*, pp. 1-25. Smith, J. (ed.). Blackie, Londres.
- Montville, T.J. y Winkowski, K.** (1997). Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. En: *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, pp. 557-576. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J. (eds.). ASM Press, Washington.
- Morgan, S., Ross, R. P. y Hill, C.** (1995). Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding lactococcins A, B, and M. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 2995-3001.
- Morisset, D. y Frère, J.** (2002). Heterologous expression of bacteriocins using the mesentericin Y105 dedicated transport system by *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochimie*, **84**: 569-576.
- Mørtvedt, C.I., y Nes, I.F.** (1990). Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus sake* strain. *J. Gen. Microbiol.*, **136**: 1601-1607.
- Mosmann, T.R., Tokota, Y., Kastelein, R., Zurawski, S.M., Arai, N. y Takebe, Y.** (1987). Species-specificity of T cell stimulating activities of IL2 and BSF-1 (IL4): comparison of normal and recombinant, mouse and human IL2 and BSF-1 (IL4). *J. Immunol.*, **138**: 1813-1816.
- Motlagh, A.M., Bhunia, A.K., Szosteck, F., Hansen, T.R., Johnson, M.C. y Ray, B.** (1992). Nucleotide and amino acid sequence of *pap*-gene (pediocin AcH production) in *Pediococcus acidilactici* H. *Lett. Appl. Microbiol.*, **15**: 45-48.
- Motlagh, A.M., Bukhtiyarova, M. y Ray, B.** (1994). Complete nucleotide sequence of pSMB74, a plasmid encoding the production of pediocin AcH in *Pediococcus acidilactici*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **18**: 305-312.
- Msadek, T., Kunst, F. y Rapoport, G.** (1993). Two-component regulatory

- systems. En: *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*, pp. 729-746. Sonenshein, A.L., Hock, J.A. y Losick, R. (eds). American Society for Microbiology, Washington.
- Mulders, J.W.M., Boerrigter, I.J., Rollema, H.S., Siezen, R.J. y De Vos, W.M.** (1991). Identification y characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.*, **201**: 581-584.
- Mulet-Powell, N., Lacoste-Armynot, A.M., Viñas, M. y De Buochberg, M.S.** (1998). Interactions between pairs of bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, **61**: 1210-1212.
- Muriana, P.M.** (1996). Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *J. Food Prot.*, **suppl. 1996**: 54-63.
- Muriana, P.M. y Klaenhammer, T.R.** (1987). Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53** : 553-560.
- Murinda, S.E., Rashid, K.A. y Roberts, R.F.** (2003). In vitro assessment of the cytotoxicity of nisin, pedicin, and selected colicins on simian virus 40-transfected human colon and vero monkey kidney cells with trypan blue staining viability assays. *J. Food Prot.*, **66**: 847-853.
- Murinda, S.E., Roberts, R.F. y Wilson, R.A.** (1996). Evaluation of colicins for inhibitory activity against diarrheagenic *Escherichia coli* strains, including serotype O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 3196-3202.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R. y Clemens, R.A.** (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **38**: 13-126.
- Narbad, A.N., Horn, N., Dodd, H.M., Brown, D.T. y Gasson, M.J.** (1997). Characterisation of the maturation pathway of nisin biosynthesis. En: *Perspectives on Protein Engineering 2*, pp. 129-136. Geisow, M.J. (ed.). BIODIGM, Nottingham (Reino Unido).
- Neve, H., Geis, A y Teuber, M.** (1984). Conjugal transfer and characterization of bacteriocin plasmids in group N (lactic acid) streptococci. *J. Bacteriol.*, **157**: 833-838.
- Nes, I.F. y Holo, H.** (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic acid

- bacteria. *Biopoly*, **50**: 50-61.
- Nes, I.F., Mørtvedt, C.I., Nissen-Meyer, J. y Skaugen, M.** (1994). Lactocin S, a lanthionine-containing bacteriocin isolated from *Lactobacillus sake*. En: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*, pp. 435-449. De Vuyst, L. y Vandamme, E.J. (eds.). Elsevier, Reino Unido.
- Nicola, N.A.** (1995). *Guidebook to Cytokines & Their Receptors*. Oxford University Press, Oxford.
- Nieto-Lozano, J.C., Nissen-Meyer, J., Sletten, K., Peláez, C. y Nes, I.F.** (1992). Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Gen. Microbiol.*, **138**: 1-6.
- Nouaille, S., Ribeiro, L.A., Miyoshi, A., Pontes, D., Le Loir, Y., Oliveira, S.C., Langella, P. y Azevedo, V.** (2003) Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genetics and Molecular Research*, **2**: 102-111.
- Nutrition Business Journal.** (2002). *Functional foods report*. Penton Media.
- Oberman, H. y Libudzisz, Z.** (1998). Fermented milks. En: *Microbiology of Fermented Foods*, Volume 1, pp. 308-349. Wood, B.J.B. (ed.). Blackie, Londres.
- O’Keeffe, T., Hill, C. y Ross, R.P.** (1999). Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 1506-1515.
- Orla-Jensen, S.** (1919). *The Lactic Acid Bacteria*. Andr. Fred. Host & Son, Copenhagen.
- Platteeuw, C. y de Vos, W.M.** (1992). Location, characterization and expression of lytic enzyme-encoding gene, *lytA*, of *Lactococcus lactis* bacteriophage ϕ US3. *Gene*, **118**: 115-120.
- Platteeuw, C., van Alen-Boerritger, I., van Schalkwijk, S. y de Vos, W.M.** (1996). Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 1008-1013.
- Pugsley, A.P.** (1984). The ins and outs of colicins. I. Production, and

- translocation across membranes. *Microbiol. Sci.*, **1**: 168-175.
- Pugsley, A.P.** (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.*, **57**: 50-108.
- Qiao, M. y Saris, P.E.J.** (1996). Evidence for a role of NisT in transport of the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* N8. *FEMS Microbiol. Lett.*, **144**: 89-93.
- Qiao, M., Ye, S., Koponen, O., Ra, R., Usabiaga, M., Immonen, T. y Saris, P.E.J.** (1996). Regulation of the nisin operons in *Lactococcus lactis* N8. *J. Appl. Bacteriol.*, **80**: 626-634.
- Quadri, L.E.N., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. y Stiles, M.E.** (1994). Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV 17B. *J. Biol. Chem.*, **269**: 12204-12211.
- Ra, S.R., Qiao, M., Immonen, T., Pujana, I. y Saris, P.E.J.** (1996). Genes responsible for nisin synthesis, regulation and immunity form a regulon of two operons and are induced by nisin in *Lactococcus lactis* N8. *Microbiology*, **142**: 1281-1288.
- Rauch, P.J. y de Vos, W.M.** (1992). Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, **174**: 1280-1287.
- Rauch, P.J.G., Beerthuyzen, M.M. y de Vos, W.M.** (1990). Nucleotide sequence of IS904 from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain NIZO R5. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 4253-4254.
- Ray, B.** (1992). The need for food biopreservation. En: *Food Biopreservatives of Microbial Origin*, pp. 1-23. Ray, B. y Daeschel, M. (eds). CRC Press, Boca Raton.
- Ray, B.** (1994). Pediocins of *Pediococcus* species. En: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, pp. 465-495. de Vuyst, L. y Vandamme, E.J. (eds). Chapman y Hall, Glasgow.
- Ray, B y Hoover, D. G.** (1993). Pediocins. En: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, pp. 181-210. Hoover, D.G. y Steenson, L.R. (eds). Academic Press, San Diego.

- Ray, S.K., Kim, W.J., Johnson, M.C. y Ray, B.** (1989). Conjugal transfer of a plasmid encoding bacteriocin production and immunity in *Pediococcus acidilactici* H. *J. Appl. Bacteriol.*, **66**: 393-399.
- Rekhif, N., Atrih, A. y Levefre, G.** (1994). Selection of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains. *Curr. Microbiol.*, **28**: 237-241.
- Ribeiro, L.A., Azevedo, V., Le Loir, Y., Oliveira, S.C., Dieye, Y., Piard, J.C., Gruss, A. y Langella, P.** (2002). Production and targeting of the *Brucella abortus* antigen L7/L12 in *Lactococcus lactis*: a first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 910-916.
- Rodríguez, E., Gaya, P., Nuñez, M. y Medina, M.** (1998). Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, **39**: 129-132.
- Rodríguez, J.M.** (1996). Espectro antimicrobiano, estructura, propiedades y modo de acción de la nisina, una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*. *Food Sci. Technol. Int.*, **2**: 61-68
- Rodríguez, J.M. y Dodd, H.M.** (1996). Genetic determinants for the biosynthesis of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. *Microbiol. SEM*, **12**: 61-74.
- Rodríguez, J.M., Cintas, L.M., Casaus, P., Horn, N., Dodd, H.M., Hernández, P.E. y Gasson, M.J.** (1995a). Isolation of nisin producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.*, **78**: 109-115.
- Rodríguez, J.M., Cintas, L.M., Casaus, P., Suárez, A. y Hernández, P.E.** (1995b). PCR detection of the lactocin S structural gene in bacteriocin-producing lactobacilli from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 2802-2805.
- Rodríguez, J.M., Cintas, L.M., Casaus, P., Martínez, M.I., Suárez, A. y Hernández, P.E.** (1997). Detection of pediocin PA-1 producing pediococci by rapid molecular producing by rapid molecular biology techniques. *Food Microbiol.*, **14**: 363-37.
- Rodríguez, J.M., Martínez, M.I., Horn, N. y Dodd, H.M.** (2002). Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, **80**:

101-116.

- Rogers, L.A.** (1928). The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.*, **16**: 321-325.
- Ross, R.P., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G.F. y Coffey, A.** (2000). Novel cultures for cheese improvement. *Trends Food Sci. Technol.*, **11**: 96-104.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. y Zoon, P.** (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, **12**: 163-171.
- Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Warner, P.J. y Jiménez-Díaz, R.** (1994). Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 2059-2064.
- Ryan, M.P., Rea, M.C., Hill, C. y Ross, R.P.** (1996). An application in Cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 612-619.
- Ryan, M.P., McAuliffe, O., Ross, R.P. y Hill, C.** (1999). Heterologous expression of lacticin 3147 in *Enterococcus faecalis*: comparison of biological activity with cytolysin. *Lett. Appl. Microbiol.*, **32**: 71-77.
- Sahl, H.G., Jack, R.W. y Bierbaum, G.** (1995). Latibiotics: biosynthesis and biological activities of peptides with unique posttranslational modification. *Eur. J. Biochem.*, **230**: 827-853.
- Saito, H. y Watanabe, T.** (1979). Effect of a bacteriocin produced by *Mycobacterium smegmatis* on growth of cultured tumor and normal cells. *Cancer Res.*, **39**: 5114-5117.
- Saito, H. y Watanabe, T.** (1981). Effects of a bacteriocin from *Mycobacterium smegmatis* on BALB/3T3 and Simian Virus 40-transformed BALB/c mouse cells. *Microbiol. Immunol.*, **25**: 13-22.
- Saito, H., Watanabe, T. y Tomioka, H.** (1979). Purification, properties and cytotoxic effect of a bacteriocin from *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **15**: 504-509.
- Salmond, G.P.C. y Reeves, P.J.** (1993). Membrane traffic wardens and protein

- secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Biochem. Sci.*, **18**: 7-12.
- Sambrook, J. y Russell, D.** (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanders, J.W., Venema, G. y Kok, J.** (1997). A chloride-inducible gene expression cassette and its use in induced lysis of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4877-4882.
- Sanders, J. W., Leenhouts, K., Burghoorn, J., Brands, J. R., Venema, G. y Kok, J.** (1998). A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Mol. Microbiol.*, **27**: 299-310.
- Sandine, W.E.** (1996). Commercial production of dairy starter cultures. En: *Dairy starter cultures*, pp. 191-206. Cogan, T.M. y Accolas, J.P. (eds.). Wiley-VCH, Nueva York.
- Scherwitz-Harmon, K.M. y McKay, L.L.** (1987). Restriction enzyme analysis of lactose and bacteriocin plasmids from *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* strain WM4 and cloning of *BclI* fragments coding for bacteriocin production. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 1171-1174.
- Scherwitz, K.M., Baldwin, K.A. y McKay, L.L.** (1983). Plasmid linkage of a bacteriocin-like substance in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* strain WM4: transferability to *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**: 1506-1512.
- Schillinger, U., Geisen, R. y Holzapfel, W.H.** (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.*, **7**: 158-164.
- Schoeman, H., Vivier, M.A., du Toit, M., Dicks, L.M.T. y Pretorius, I.S.** (1999). The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**: 647-656.
- Schotte, L., Steidler, L., Vandekerckhove, J. y Remaut, E.** (2000). Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*. *Enzyme Microb. Technol.*, **27**: 761-765.
- Schülein, R., Gentshev, I., Mollenkopf, H.J. y Goebel, W.** (1992). A

- topological model for the haemolysin translocator protein HlyD. *Mol. Gen. Genet.*, **234**: 155-163.
- Schved, F. Lalazar, A. Henis, Y. y Juven, B.J.** (1993). Purification, partial characterization and plasmid linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.*, **74**: 67-77.
- Siegers, K. y Entian, K.D.** (1995). Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 1082-1089.
- Simon, D. y Chopin, A.** (1988). Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie*, **70**: 559-566.
- Simons, G., Rutten, G., Hornes, M., Nijhuis, M., y van Asseldonk, M.** (1992). Production of prochymosin in lactococci. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **306**: 115-120.
- Skaugen, M., Christie, V.H. y Nes, I.F.** (1999). Biosynthesis of the lantibiotic lactocin S: heterologous expression of a two-operon gene cluster encoding regulatory, biosynthetic, and immunity functions. *Abstracts of the Sixth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, FEMS, Veldhoven, Holanda, C86.
- Smarda, J.** (1983). The action of colicins on eukaryotic cells. *J. Toxicol. Toxin Rev.*, **2**: 1-76.
- Smarda, J.** (1991). Colicins as anti-tumor drugs. En: *Bacteriocins, microcins and lantibiotics, series H: cell biology*, vol. 65, pp. 505-510. James, R., Lazdunski, C. y Pattus, F. (eds.). Springer-Verlag, Berlin.
- Smith, J.** (1993). *Technology of reduced-additive foods*. Blackie, Londres.
- Soleiman, D.K.Y. y Somkuti, G.A.** (1993). Shuttle vectors developed from *Streptococcus thermophilus* native plasmid. *Plasmid*, **30**: 67-78.
- Stanley, G.** (1998). Cheeses. En: *Microbiology of fermented foods*, Vol. 1, pp. 263-307. Wood B.J.B. (ed.). Blackie, Londres.
- Steele, J.L. y McKay, L.L.** (1986). Partial characterization of the genetic basis for sucrose metabolism and nisin production in *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**: 57-64.
- Steen, M.T., Chung, Y.J. y Hansen, J.N.** (1991). Characterization of the nisin

- gene as a part of a polycistronic operon in the chromosome of *Lactococcus lactis* ATCC 11454. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1181-1188.
- Steidler, L., Wells, J. M., Raeymaekers, A., Vandekerckhove, J., Fiers, W. y Remaut, E.** (1995). Secretion of biologically active murine interleukin-2 by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 1627-1629.
- Steidler, L., Robinson, K., Chamberlain, L., Schofield, K. M., Remaut, E., Le Page, R. W. F. y Wells, J. M.** (1998). Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect. Immun.*, **66**: 3183-3189.
- Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neiryneck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W. y Remaut, E.** (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, **289**: 1352-1355.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A. y Klaenhammer, T.R.** (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 3613-3615.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A. y Klaenhammer, T.R.** (1992). Effect of treatment conditions on nisin inactivation of Gram-negative bacteria. *J. Food Prot.*, **55**: 763-766.
- Stiles, M.E.** (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, **70**: 331-345.
- Stoddard, G.W., Petzel, J.P., Van Belkum, M.J., Kok, J. y McKay, L.L.** (1992). Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* WM4. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 1952-1961.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. y Wannamaker, L.W.** (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **40**: 722-756.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.J. y Huis in't Veld, J.** (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **11**: 73-84.
- Thomas, A.V. y Lotze, M.T.** (2003). *The Cytokine Handbook*. Academic Press, Londres.

- Thomas, L.V., Clarkson, M.R. y Delves-Broughton.** (2000). Nisin. En: *Natural Food Antimicrobial Systems*, pp. 463-524. Naidu A.S. (ed.). CRC Press, Boca Raton.
- Thoreux, K., Senegas-Balas, F., Bernard-Perrone, F., Giannarelli, S., Denariáz, G., Bouley, C. y Balas, D.** (1996). Modulation of proliferation, second, Messenger levels, and morphotype expresión of the rat intestinal epithelial cell line IEC-6 by fermented milk. *J. Dairy Sci.*, **79**: 33-43.
- Tramer, J. y Fowler, G.G.** (1964). Estimation of nisin in foods. *J. Sci. Food Agric.*, **15**: 522-528.
- U.S. Food and Drug Administration.** (1998) Nisin preparation: affirmation of GRAS status as direct human food ingredient. Federal Register. 53, April 6.
- van Alen-Boerrigter, I.J., Baankreis, R. y de Vos, W.M.** (1991). Characterization and overexpression of the *Lactococcus lactis pepN* gene and localization of its product, aminopeptidase N. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 2555-2561.
- van Belkum, M.J. y Stiles, M. E.** (1995). Molecular characterization of genes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 3573-3579.
- van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, J., Kok, J. y Venema, G.** (1989). Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcus bacteriocin plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 1187-1191.
- van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Jeeninga, R.E., Kok, J. y Venema, G.** (1991). Organization and nucleotide sequence of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 492-498.
- van Belkum, M.J., Kok, J. y Venema, G.** (1992). Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of *IcnB*, a third bacteriocin determinant from lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 572-577.
- van Belkum, M.J., Worobo, R.W. y Stiles, M.E.** (1997). Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.*, **23**: 1293-1301.

- van de Guchte, M., van der Vossen, J.M.B.M., Kok, J. y Venema, G.** (1989). Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 224-228.
- van der Meer, J.R., Polman, J., Beethuyzen, M.M., Siezen, R.J., Kuipers, O.P. y de Vos, W.M.** (1993). Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J. Bacteriol.*, **175**: 2578-2588.
- Van der Meer, J.R., Rollema, H.S., Siezen, R.J., Beethuyzen, M.M., Kuipers, O.P. y de Vos, W.M.** (1994). Influence of amino acid substitutions in the nisin leader peptide on biosynthesis and secretion of nisin by *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.*, **69**: 3555-35562.
- Van der Vossen, J.M.B.M., van Herwijnen, M.H.M., Leer, R.J., ten Brink, B., Pouwels, P.H. y Huis in't Veld, J.H.J.** (1994) Production of acidocin B, a bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* M46 is a plasmid encoded trait: plasmid curing, genetic marking by in vivo plasmid integration, and gene transfer. *FEMS Microbiol. Lett.*, **116**: 333-340.
- Van Reenen, C.A., Chikindas, M.L., Van Zyl, W.H. y Dicks, L.M.T.** (2003). Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.*, **81**: 29-40.
- Venema, K.** (1995). Bacteriocins from lactic acid bacteria: lactococcins from *Lactococcus lactis* and pediocin PA-1 from *Pediococcus acidilactici*. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Holanda.
- Venema, K., Kok, J., Marugg, J.D., Toonen, M.Y., Ledebøer, A.M., Venema, G. y Chikindas, M.L.** (1995). Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC1.0: PedB is the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme. *Mol. Microbiol.*, **17**: 515-522.
- Venema, K., Dost, M.H.R., Beun, P.A.H., Haandrikman, A.J., Venema, G. y Kok, J.** (1996). The genes for secretion and maturation of lactococcins are

- located on the chromosome of *Lactococcus lactis* IL1403. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 1689-1692.
- Venema, G., Kok, J. y Sinderen, D.** (1999). From DNA sequence to application: possibilities and complications. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**: 3-23.
- Von Heijne, G.** (1988). The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. *Protein Eng.*, **2**: 531-534.
- Wahlström, G. y Saris, P.E.J.** (1999). Nisin bioassay based on bioluminescence. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 3743-3745.
- Waters, V.L. y Crosa, J.H.** (1991). Colicin V virulence plasmids. *Microbiol. Rev.*, **55**: 437-450.
- Weerkamp, A.H. Klijn, N., Neeter, R. y Smit, G.** (1996). Properties of mesophilic lactic acid bacteria from raw milk and naturally fermented raw milk products. *Neth. Milk Dairy J.*, **50**: 19-332.
- Wells, J.M., y Schofield, K.M.** (1996). Cloning and expression vectors for lactococci. *NATO ASI Ser. H*, **98**: 37-63.
- Wells, J.M., Robinson, K., Chamberlain, L.M, Schofield, K.M. y Le Page, R.W.F.** (1996). Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles. *Antonie Leeuwenhoek*, **70**: 317-330.
- Wells, J.M., Wilson, P.W., Norton, P.M. y Le Page, R.W.** (1993). A model system for the investigation of heterologous protein secretion pathways in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 3954-3959.
- WHO** (1969). WHO Expert Committee on Biological Standardization. 22nd Report. *WHO Technical Report Series* n° 444.
- Wood, B.J.B.** (1997). *Microbiology of fermented foods*. Blackie, Londres.
- Wood, B.J.B. y Holzapfel, W.H.** (1995). *The genera of lactic acid bacteria*. Blackie, Londres.
- Worobo, R.W., Henkel, T., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J. y Stiles, M.E.** (1994). Characteristics and genetics determinants of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology*, **140**: 517-526.
- Worobo, R.W., van Belkum, M.J., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. y Stiles**

- M.E.** (1995). A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.*, **177**: 3143-3149.
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J. y Smit, G.** (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.*, **12**: 91-109.
- Wu, W.H., Rule, D.C., Busboom, J.R., Field, R.A. y Ray, B.** (1991). Starter culture and time/temperature storage influences on quality of fermented mutton sausages. *J. Food Sci.*, **56**: 916-919, 925.
- Xaus, J., Comalada, M., Cardó, M., Valledor, A.F. y Celada, A.** (2001). Decorin inhibits M-CSF-proliferation of macrophages and enhances cell survival through induction of p27kpi1 and p21waf1. *Blood*, **98**: 2124-2133
- Yang, C.C. y Konisky, J.** (1984). Colicin V-treated *Escherichia coli* does not generate membrane potencial. *J. Bacteriol.*, **158**: 757-759.
- Zabala, A., Martín, M.R., Haza, A.I., Fernández, L., Rodríguez, J.M. y Morales, P.** (2001). Antiproliferative effect of two lactic acid bacteria strains of human origin on the growth of a myeloma cell line. *Lett. Appl. Microbiol.*, **32**: 287-292.
- Zabala, A., Martín, M.R., Haza, A.I., Fernández, L., Morales, P. y Rodríguez, J.M.** (2001). Inhibition of the proliferation of myeloma cells by the meat origin strain *Enterococcus faecium* CH3. *Meat Sci.*, **59**: 79-85.
- Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J. y Sonomoto, K.** (2003). Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**: 1616-1619.
- Zhang, L.H., Fath, M.J., Mahanty, H.K., Tai, P.C. y Kolter, R.** (1995). Genetic analysis of the colicin V secretion pathway. *Genetics*, **141**: 25-32.
- Zhou, J.S., Shu, Q., Rutherford, K.J., Prasad, J., Birtles, M.J., Gopal, P.K. y Gill, H.S.** (2000). Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacteria strain *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. *Int. J. Food Microbiol.*, **56**: 87-96.