

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos**



**“LACTOCOCCUS LACTIS” PRODUCTORES DE
PEDIOCINA PA-1 Y ENTEROCOCOS AISLADOS DE
LECHE MATERNA COMO AGENTES
BIOCONSERVANTES EN QUESOS**

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

Carlota Reviriego Herráez

Bajo la dirección de los doctores
Juan Miguel Rodríguez Gómez y Leónides Fernández Álvarez

Madrid, 2009

• **ISBN: 978-84-692-1096-3** © **Carlota Reviriego Herráez, 2008**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



***Lactococcus lactis* PRODUCTORES DE PEDIOCINA PA-1 Y ENTEROCOCOS
AISLADOS DE LECHE MATERNA COMO AGENTES BIOCONSERVANTES
EN QUESOS**

Memoria que para optar al grado de
Doctor, con mención honorífica
“*Doctorado Europeanus*”, presenta la
Licenciada Carlota Reviriego Herráez

Madrid, marzo de 2008

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 Y LEÓNIDES FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, PROFESORA TITULAR DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS, DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “*Lactococcus lactis* productores de pediocina PA-1 y enterococos aislados de leche materna como agentes bioconservantes en quesos”, de la que es autora la Licenciada Carlota Reviriego Herráez, 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 la dirección conjunta de los que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor con mención honorífica “*Doctorado Europeus*”.

Madrid, 27 de febrero de 2008

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Juan Miguel Rodríguez Gómez

Leónides Fernández Álvarez

*A mis dos familias,
la familia de la que vengo
y la familia que he creado*

“Si crees totalmente en ti mismo, no habrá nada que esté fuera de tus posibilidades”

Wayne W. Dyer

“Estar preparado es importante, saber esperar lo es aún más, pero aprovechar el momento adecuado es la clave de la vida”

Arthur Schnitzler

“Me he arrepentido de haber hablado, pero nunca de haber guardado silencio”

Publio Siro

Quisiera dar las gracias a todos los que durante el camino de realización de esta Tesis Doctoral he ido encontrando, a todos los que, con sus consejos y experiencias me han ayudado a llegar hasta el final de esta etapa.

A Lorenzo de la Hoz, director del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, por acogerme en el Departamento y por la amabilidad mostrada a lo largo de estos años. Gracias Lorenzo por esas charlas matutinas y por escucharme, ¡que se que hablo mucho!

A mis directores de tesis, por abrirme las puertas al maravilloso mundo de la investigación. A Juan Miguel, por sus infinitos conocimientos dentro y fuera de la ciencia, por su preocupación diaria y su aliento en los momentos bajos. A Leo, por su tranquilidad y su calma, algo que a mí me falta, y por sus eternas jornadas de trabajo en búsqueda del camino a seguir. Por supuesto a ambos por su paciencia, por su trabajo y su dedicación hasta conseguir culminar este proyecto. Muchas gracias por todo.

A todas las personas que han pasado por el laboratorio y que han formado parte de mi grupo de investigación. A Rocío, por su amistad, por saber escuchar, por esos consejos y por no dejar de aconsejarme aun sabiendo que pocas veces los hago caso. Gracias por esas largas conversaciones telefónicas y por saber estar siempre cuando se te necesita. Eso sí que es una amiga. A Esther por su cariño y por sus contagiosas ganas de trabajar, por su ayuda desinteresada y como no, por resumir como nadie los capítulos de las series que me perdía por acostarme “como las gallinas”.

A todos los compañeros y profesores del Departamento que he conocido estos largos años y que han hecho posible que la convivencia fuera mucho más sencilla durante las largas jornadas de trabajo. Mención especial a Billy por su apoyo y por esos viajes por el BUS-VAO de los que guardo un recuerdo tan entrañable, a Meri por las profundas conversaciones sobre la familia y por descubrirme el instinto maternal y a Rakelita, por estar ahí aunque fuera en silencio.

A todas las personas que conocí durante mis estancias en Norwich y en Holanda. A Tracy Eaton y Jan Kok, por acogerme en sus grupos de trabajo y por preocuparse de que mi estancia fuera lo más agradable posible. A Cristina por esos viernes de pelis tumbadas en el sofa, por las tardes de compras y por comerse mis macarrones

“bomba”. A Satya por preocuparse como un “hermano” y enseñarme a apreciar las bondades de la cultura india. Y como no, a Naomi, Rute, Rasmus y Chris, por esos irrepetibles “Friday meetings” entre “toasties”, “triples” y “kaas suflés”.

A mis amig@s por aguantarme con paciencia, a los viejos, en especial a Noelia, por una sonrisa que da moral, y a Virginia, por crecer a mi lado. A los nuevos, a los Fredis, los Txemas, los Cornflakes, los Juanjos, Earlybird, Inés, a los de Teagasc, Evonne, Raffy, Jarek... a tod@s, por animarme a tirar p’alante. A los de la “facul”, Cristina y Sergio, por seguir mis pasos y no perderme la pista. A las de la Resi, Mar, Elena y Luisa, por seguir ahí a pesar del tiempo que ha pasado. A las “mamá de Julio 2006”, por su confianza y su apoyo todos estos meses y por compartir conmigo la experiencia de ser madre. Muchas gracias amig@s, caminando a vuestro lado todo resulta más fácil.

A mis dos familias, por estar ahí y por quererme. A Diego y a Fer por el entusiasmo de hermano pequeño, y sobre todo por ese afán proteccionista que os sale de dentro cuando os tocan a alguien querido. A mi madre, Mer, por su saber estar, su cariño y comprensión y por “no preguntar”. Me harían falta miles de hojas para agradecérselo todo, y ahora que la madre soy yo, mucho más. A mi padre, Jose, por haber andado previamente por mi camino y haber encontrado las piedras antes que yo. Por haberme dejado sus huellas marcadas para ayudarme a no tropezar y por esforzarse en comprender cuando, a pesar de todo, me empeño en pisar fuera de ellas. A Jorge por no darse nunca por vencido, por creer en mí y por quitarme la razón cuando no la tengo, que no es tarea fácil. Sin tu persistencia hace tiempo que habría “partido las peras” y lo sabes. Sin dudarlo un segundo, y aunque no siempre sea capaz de demostrarlo, Jimena y tú sois lo mejor que me ha pasado en la vida. Es evidente que no soy fácil como hija, ni como hermana, ni como pareja, ni probablemente como madre, así que gracias por quererme a pesar de las dificultades.

A “los Peter” y especialmente a Ana por su apoyo logístico, sin vuestra ayuda esto sí que no habría sido posible. Ana, teniendo una prima como tú, ¿para qué necesito más? Ya se sabe, quien tiene una prima tiene un tesoro, y más si es médico ;-)

Y esto es todo, aunque seguro que me olvido de alguien...

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

A) Producción heteróloga de pediocina PA-1 en cepas de *Lactococcus lactis*. Empleo como cultivos bioprotectores para la elaboración de queso

En esta Tesis se han desarrollado diversos sistemas para la producción heteróloga de pediocina PA-1 en cepas de *Lactococcus lactis* previamente seleccionadas para la elaboración de quesos debido a sus buenas propiedades tecnológicas. Inicialmente, el plásmido pFI2160, que contiene el gen híbrido *L-peda* (codifica la fusión entre el líder de la lactococina A y la propediocina PA-1) y los genes *lcnC* y *lcnD* (codifican el sistema de secreción de la lactococina A) se introdujo en *L. lactis* ESI 153 y *L. lactis* ESI 515 (Nis⁺). El nivel de producción de pediocina de los respectivos transformantes (*L. lactis* CL1 y CL2) fue de aproximadamente 600 y 400 ng/ml, respectivamente, lo que representa un 30 y un 20% de la cantidad producida por *Pediococcus acidilactici* 347, una cepa que produce dicha bacteriocina de forma natural. La transformación de *L. lactis* ESI 515 con pFI2160 no afectó a su capacidad para producir nisina. Los ensayos de actividad bacteriocinogénica revelaron la estabilidad de pFI2160 en los dos hospedadores, tanto en condiciones selectivas como no selectivas.

Posteriormente, se intentó mejorar la producción de pediocina en los mismos hospedadores mediante la introducción de los plásmidos pMC117, pRK119 y pCNC16, que contienen el operón completo de la pediocina bajo control del promotor P32. En este caso, el nivel de producción de pediocina de todos los transformantes fue mayor que el obtenido en el estudio anterior basado en el intercambio del líder y sistema de transporte de la lactococina A. Con relación a las cepas recombinantes derivadas de *L. lactis* ESI 153, la concentración de pediocina en los sobrenadantes de *L. lactis* RK1 (pRK119) y CNC1 (pCNC16) fue notablemente superior (163-165 %) que la obtenida en los de *P. acidilactici* 347. La transformación de *L. lactis* ESI 515 con cualquiera de estos tres plásmidos tampoco afectó a su capacidad para producir nisina. La producción de pediocina por *L. lactis* RK2 (pRK119) y CNC2 (pCNC16) fue similar (95-100%) a la de *P. acidilactici* 347. En consecuencia, se obtuvieron cepas de *L. lactis* con la capacidad de coproducir pediocina PA-1 y nisina a niveles

comparables a los de las respectivas cepas parentales. En este caso, los ensayos de actividad bacteriocinogénica también revelaron la estabilidad de pMC117, pRK119 y pCNC16 en los dos hospedadores en condiciones selectivas y no selectivas. En contraste, la integración de los genes necesarios para la biosíntesis de pediocina en el cromosoma de *L. lactis* MG1614 no condujo a la producción exocelular de esta bacteriocina.

Finalmente, se construyó otro plásmido (pGA1) para intentar la producción de pediocina PA-1 en los mismos hospedadores mediante un sistema de grado alimentario. El plásmido pGA1 también porta el operón completo de la pediocina bajo control del promotor P32 pero presenta la particularidad de carecer de genes que confieren resistencia a antibióticos. Una vez obtenidos los transformantes de *L. lactis* ESI 153 y *L. lactis* ESI 515 (*L. lactis* GA1 y GA2, respectivamente), se evaluó su eficacia para inhibir el crecimiento de *Listeria innocua* SA1 durante la elaboración de quesos. Los quesos se manufacturaron a partir de leche inoculada con un 1% de un cultivo láctico (*L. lactis* ESI 153, ESI 515, GA1 ó GA2) con o sin la presencia de *L. innocua* SA1 ($\sim 1 \times 10^4$ ufc/ml). Al final del período de maduración, los recuentos de *L. innocua* fueron inferiores a 50 ufc/g en los quesos que contenían *L. lactis* GA1 e inferiores a 25 ufc/g en aquellos con *L. lactis* GA2. En consecuencia, las cepas desarrolladas pueden resultar útiles como cultivos bioprotectores para controlar el crecimiento de *Listeria* en quesos.

B) Empleo de cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de leche materna como cultivos bioprotectores para la elaboración de quesos

La leche materna es el alimento ideal para los recién nacidos ya que satisface todos sus requerimientos nutritivos y les protege frente a infecciones. En el momento de iniciarse esta Tesis Doctoral, los pocos estudios existentes sobre la microbiología de la leche humana se restringían básicamente al aislamiento e identificación de bacterias potencialmente patógenas en bancos de leche y en casos de mastitis o infecciones neonatales. En consecuencia, se desconocía la composición microbiológica de la leche de mujeres sanas.

Inicialmente se investigó si este fluido biológico contenía bacterias lácticas (BAL) y, de hecho, se pudieron aislar de leche, areola mamaria, piel del pecho, vagina y heces de ocho madres sanas y de la cavidad oral y heces de sus respectivos hijos. A continuación, se seleccionaron al azar algunos aislados (178 de cada pareja madre-hijo) y se sometieron a un análisis de sus perfiles genéticos mediante la técnica RAPD. Posteriormente, se identificaron aquellos aislados que, independientemente de su origen, compartían perfiles idénticos. De esta manera, se observó que ciertas cepas de *Lactobacillus gasseri* y *Enterococcus faecium* se podían aislar simultáneamente de las muestras de leche, areola mamaria, cavidad oral infantil y heces proporcionadas por una misma pareja madre-hijo. En contraste, ninguna de las BAL aisladas de piel del pecho o de vagina compartió perfiles de RAPD con aislados de otros orígenes. Estos resultados revelaron que la leche materna es una fuente importante de BAL para el intestino neonatal y que las BAL presentes en la leche pueden tener un origen endógeno.

El siguiente objetivo fue la evaluación de la seguridad de las cepas de *E. faecium* aisladas de leche humana. Para ello, se investigó la presencia de posibles factores determinantes de virulencia mediante las técnicas de PCR y de hibridación DNA-DNA. El potencial de las cepas para adquirir plásmidos mediante conjugación se determinó mediante el análisis de genes implicados en los procesos conjugativos de los enterococos. Paralelamente, se realizaron diversos ensayos fenotípicos de propiedades relacionadas con la seguridad de las cepas. La presencia de genes que confieren resistencia a la vancomicina se determinó mediante PCR. Los resultados obtenidos revelaron que todas las cepas estaban libres de determinantes de virulencia. Ninguna de las cepas mostró actividad gelatinasa, producción de hemolisinas o capacidad de agregación. Ninguna portaba los genes *vanA* o *vanB*. Por lo tanto, la leche de mujeres sanas parece ser una fuente de cepas apatógenas de *E. faecium* para el intestino del lactante.

Finalmente, se procedió a evaluar si las cepas de *E. faecium* aisladas de leche materna poseían actividad anti-*Listeria* y/o diversas propiedades bioquímicas de interés tecnológico para la industria láctea, incluyendo capacidad acidificante y actividades proteolítica, aminopeptidásica, lipásica y esterásica. *In vitro*, todas las

cepas inhibieron el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*, siendo *E. faecium* LJx4 la que manifestó la actividad anti-*Listeria* más potente. En cuanto a las propiedades tecnológicas, su actividad acidificante fue baja y no mostraron actividad proteolítica detectable, a excepción de dos cepas (LJx4 y Lc4) en las que la actividad fue pequeña. En contraste, todas las cepas mostraron actividad peptidásica y esterásica. Finalmente, se evaluó la eficacia de *E. faecium* LJx4 para inhibir el crecimiento de *Listeria innocua* SA1 durante la elaboración de quesos. Los quesos se manufacturaron a partir de leche inoculada con la cepa LJx4, con o sin la presencia de *L. innocua* SA1 ($\sim 1 \times 10^4$ ufc/ml). Al final del período de maduración, los recuentos de *L. innocua* fueron de aproximadamente 5×10^2 y 2×10^6 ufc/g en presencia o ausencia de *E. faecium* LJx4, respectivamente. En consecuencia, los enterococos analizados también podrían resultar útiles como cultivos adjuntos y/o bioprotectores en la elaboración de quesos aunque deberían aplicarse conjuntamente con un cultivo iniciador.

SUMMARY

A) Heterologous production of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis* strains. Use as bioprotective cultures for cheese making

Heterologous production of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis* strains, which had been previously selected because of their technological properties for cheese making, was investigated. Plasmid pFI2160, which contains a hybrid gene (*L-peda*) encoding the fusion between the lactococcin A leader and propediocin PA-1, and also the genes *lcnC* and *lcnD*, that encode the lactococcin A secretion apparatus, was introduced into *L. lactis* ESI 153 and *L. lactis* ESI 515 (Nis⁺). The pediocin production level of their respective transformants, *L. lactis* CL1 and CL2, was approximately 600 and 400 ng ml⁻¹, respectively, which represents a 30% and a 20% of the quantity produced by the natural pediocin PA-1 producer *Pediococcus acidilactici* 347. Transformation of *L. lactis* ESI 515 with pFI2160 did not affect its ability to produce nisin. Pediocin bioassays showed the stability of pFI2160 in both heterologous hosts under selective and non-selective conditions.

Later, plasmids pMC117, pRK119 and pCNC16, which contain the complete pediocin operon under the control of the strong P32 promoter, were introduced into the same hosts in order to enhance pediocin PA-1 production. The pediocin production levels of all the transformants were higher than those obtained in the previous study through a strategy based on exchange of the leader and transporter system of the bacteriocin lactococcin A. In relation to *L. lactis* ESI 153 derivatives, pediocin production by strains RK1 (pRK119) and CNC1 (pCNC16) was notably higher (163-165 %) than that produced by *P. acidilactici* 347. Transformation of *L. lactis* ESI 515 with the plasmids cited above did not affect its ability to produce nisin. The level of pediocin production by *L. lactis* RK2 and CNC2 was similar (95-100%) to that of *P. acidilactici* 347. Therefore, we obtained *L. lactis* strains technologically suited for cheese making with the ability to coproduce pediocin PA-1 and nisin A at levels comparable to the respective wild parental strains. Pediocin bioassays revealed the stability of plasmids pMC117, pRK119 and pCNC16 in both heterologous hosts after ten subcultures under selective and non-selective conditions. In contrast, chromosomal

integration of the genes required for pediocin production in *L. lactis* MG1614 did not lead to pediocin production.

Finally, plasmid pGA1 was constructed in order to achieve food-grade heterologous production of pediocin PA-1 in the lactococcal hosts. This plasmid contains the complete pediocin operon under the control of the strong P32 promoter and is devoid of any antibiotic marker. Then, the antimicrobial activity of the pediocin-producing transformants on the survival of *Listeria innocua* SA1 during cheese ripening was also investigated. Cheeses were manufactured from milk inoculated with 1% of the lactic culture and with or without approximately 1×10^4 CFU/ml of the *Listeria* strain. *L. lactis* ESI 153, *L. lactis* ESI 515, and their transformants (*L. lactis* GA1 and GA2, respectively) were used as starter cultures. At the end of the ripening period, counts of *L. innocua* in cheeses made with the bacteriocin-producing lactococcal strains were below 50 CFU/g in the *L. lactis* GA1 cheeses and below 25 CFU/g in the *L. lactis* GA2 ones. As a consequence, the food-grade recombinant strains can be useful as bioprotective cultures to control the growth of *Listeria* in cheeses.

B) Use of *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk as bioprotective cultures for cheese making

During some months, breast milk is the best food for the rapidly-growing infant since it fulfils all the nutritional requirements. Additionally, several studies have shown that breastfeeding protects the newborn against infectious diseases. When this PhD Thesis started, the few microbiological studies focused on human milk had been restricted to the identification of potential pathogenic bacteria in stored milk and in clinical cases of maternal or infant infection. Therefore, the microbiological composition of breast milk in healthy women was completely unknown.

Initially, we investigated if human breast milk contains potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB). LAB were isolated from milk, mammary areola, breast skin, vaginal swabs and feces of eight healthy mothers, and oral swabs and feces of

their respective breast-fed infants. Some isolates (178 from each mother-newborn pair) were randomly selected and submitted to randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR analysis, and those that displayed identical RAPD patterns were identified by 16S rDNA sequencing. Within each mother-newborn pair, some rod-shaped LAB isolated from mammary areola, breast milk, infant oral swabs and feces displayed identical RAPD profiles. All of them were identified as *Lactobacillus gasseri*. Similarly, among coccoid LAB from these different sources, some shared an identical RAPD pattern and were identified as *Enterococcus faecium*. In contrast, none of the LAB isolated from breast skin shared RAPD profiles with LAB of the other sources. These results revealed that breastfeeding can be a significant source of LAB to the infant gut and that LAB present in milk may have an endogenous origin (the maternal gut) instead of being a mere result of contamination from the surrounding breast skin.

Since some of the breast milk isolates belonged to the species *E. faecium*, the objective of this work was to evaluate their safety. The enterococcal strains were screened by PCR and Southern hybridization for the presence of virulence determinants. The potential of the strains to acquire plasmids by conjugation was investigated by screening for genes involved in conjugation processes. Parallel, phenotypic assays were performed. Presence of genes conferring resistance to vancomycin was assessed by PCR. PCR amplifications and Southern hybridizations revealed that all the strains were clear of the majority of potential virulence determinants. None of the strains showed gelatinase activity, hemolysin production or aggregation phenotype and none of them carried *vanA* or *vanB* genes. These findings suggest that milk of healthy mothers may be a source of avirulent *E. faecium* isolates to the newborns.

Finally, we analyzed if the *E. faecium* strains isolated from breast milk had anti-*Listeria* activity and/or a variety of biochemical properties of technological interest to dairy industries, including acidifying ability and proteolytic, aminopeptidase, lipase and esterase activities. *In vitro*, all the enterococcal strains inhibited the growth of all the *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains tested, being *E. faecium* LJx4 the one that showed the highest anti-*Listeria* activity. In

relation to the technological properties, their acidifying capacity was low and they did not show detectable proteolytic activity, with the exception of two strains (LJx4 y Lc4) which displayed a low activity. In contrast, all the strains showed peptidase and esterase activities. Finally, the effect of *E. faecium* LJx4 on the survival of *Listeria innocua* SA1 during cheese ripening was also investigated. Cheeses were manufactured from milk inoculated with the enterococcal strain and with or without approximately 1×10^4 CFU/ml of the *Listeria* strain. At the end of the ripening period, counts of *L. innocua* were approximately 5×10^2 and 2×10^6 CFU/g in cheeses made with and without *E. faecium* LJx4, respectively. As a consequence, the enterococcal strains could be useful as adjunct and/or bioprotective in cheese making although they should be used together with a starter culture.

	<u>Página</u>
CAPÍTULO I. Exposición general del tema a investigar	1
CAPÍTULO II. Introducción general	7
II.1. Las bacterias lácticas	9
II.1.1. Metabolitos de las bacterias lácticas	14
II.1.2. Bacteriocinas de las bacterias lácticas	15
II.2. Pediocina PA-1	21
II.2.1. Características moleculares	22
II.2.2. Organización genética	27
II.2.3. Biosíntesis y regulación	30
II.2.4. Espectro antimicrobiano	33
II.2.5. Modo de acción	36
II.2.6. Inmunidad de las células productoras	40
II.2.7. Aplicación de la pediocina PA-1 en los alimentos	43
II.2.7.1 Adición de pediocina PA-1 o de un fermentado	45
II.2.7.2. El empleo de pediocina PA-1 en sistemas de barreras	52
II.2.7.3. Adición de un cultivo productor de pediocina PA-1	58
II.2.8. Expresión heteróloga de la pediocina PA-1	61
II.2.8.1. Hospedadores heterólogos	62
II.2.8.2. Expresión heteróloga de bacteriocinas en <i>Escherichia coli</i>	65
II.2.8.3. Expresión heteróloga de bacteriocinas en bacterias lácticas	67
II.2.8.3.1. Expresión de genes nativos	67
II.2.8.3.2. Intercambio de líderes y/o sistemas de secreción	69
II.2.8.3.3. Aplicaciones y perspectivas futuras de la producción heteróloga de bacteriocinas en bacterias lácticas	71
II.3. Enterococos	74
II.3.1. Perspectiva histórica	74
II.3.2. Aislamiento e identificación de enterococos	77
II.3.3. Los enterococos en hospedadores sanos	81

	<u>Página</u>
II.3.4. Los enterococos como probióticos	82
II.3.5. Los enterococos como patógenos oportunistas	85
II.3.6. Factores de virulencia de los enterococos	86
II.3.6.1. Citolisina	88
II.3.6.2. Gelatinasa	91
II.3.6.3. Sustancia de agregación y feromonas	92
II.3.6.4. Proteína de superficie de enterococos	94
II.3.6.5. Adhesina de unión al colágeno	96
II.3.6.6. Adhesinas <i>efaA_{fs}</i> y <i>efaA_{fm}</i>	97
II.3.6.7. Carbohidratos de la pared celular y polisacáridos capsulares	97
II.3.6.8. Superóxido extracelular	98
II.3.7. Resistencia a antibióticos y mecanismos de transferencia	98
II.3.8. Aplicaciones de los enterococos en los quesos	102
II.3.8.1. Características tecnológicas de los enterococos	105
II.3.8.1.1. Actividad acidificante	105
II.3.8.1.2. Actividad proteolítica	106
II.3.8.1.3. Actividad lipolítica	108
II.3.8.1.4. Metabolismo del citrato	109
II.3.8.1.5. Producción de bacteriocinas	110
II.3.8.2. Los enterococos como cultivos adjuntos en la maduración	113
II.3.8.3. Los enterococos en bioprotección	114
II.4. El queso	115
II.4.1. Tecnología del queso	116
II.4.2. Cambios bioquímicos durante la maduración	121
II.4.3. Microbiología del queso	126
CAPÍTULO III. La leche humana es una fuente de bacterias lácticas para el intestino infantil	133
CAPÍTULO IV. Mejora de la producción de pediocina PA-1 en cepas salvajes de <i>Lactococcus lactis</i> de origen lácteo	141
CAPÍTULO V. Desarrollo de un sistema de grado alimentario para la producción de pediocina PA-1 en cepas de <i>Lactococcus lactis</i>. Aplicación para inhibir el crecimiento de <i>Listeria</i> en quesos experimentales	147

	<u>Página</u>
CAPÍTULO VI. La leche humana es una fuente de bacterias lácticas para el intestino infantil	155
CAPÍTULO VII. Análisis de los determinantes de virulencia en cepas de <i>Enterococcus faecium</i> aisladas de leche humana	163
CAPÍTULO VIII. Actividad anti-<i>Listeria</i> y propiedades bioquímicas de interés para la industria láctea en cepas de <i>Enterococcus faecium</i> aisladas de leche materna	173
CAPÍTULO IX. Discusión general	203
IX.1. Producción heteróloga de pediocina PA-1 en <i>L. lactis</i> de interés industrial	205
IX.1.1. Empleo de cepas de interés industrial como hospedador heterólogo	207
IX.1.2 Expresión heteróloga de pediocina PA-1 empleando el sistema secretor de la lactococina A	208
IX.1.3 Mejora de la producción heteróloga de pediocina PA-1 empleando promotores fuertes	209
IX.1.4. Integración cromosómica del gen que codifica la pediocina PA-1 en <i>L. lactis</i>	211
IX.1.5. Construcción de un vector de grado alimentario	213
IX.2. La microbiota de la leche humana	215
IX.2.1. Origen y función de las bacterias lácticas aisladas de leche materna	218
IX.2.2. El caso particular de los enterococos	223
IX.2.3. Los enterococos de la leche humana como agentes bioterapéuticos y/o bioconservantes	227
CAPÍTULO X. CONCLUSIONES	231
CAPÍTULO XI. BIBLIOGRAFÍA	237

I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL TEMA A INVESTIGAR

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

(a) Muchas cepas que las producen pertenecen a especies reconocidas generalmente como seguras (*GRAS*) y/o con presunción cualificada de seguridad (*QPS*).

(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. Los quesos elaborados con leche cruda,

insuficientemente tratada y/o recontaminada son los que plantean un mayor riesgo de transmisión de este patógeno.

En dos Tesis Doctorales previas (Martínez, 1999; Fernández, 2004), se obtuvieron 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 las citadas Tesis, 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. No obstante, se emplearon como hospedadoras cepas laboratoriales que carecen de ciertas propiedades tecnológicas que resultan esenciales para su aplicación en productos lácteos. Además, todos los vectores empleados contenían genes que confieren resistencia a ciertos antibióticos como marcadores fenotípicos para facilitar el proceso de selección de las colonias recombinantes. Por este motivo, la primera parte de la Tesis Doctoral tenía como objetivos: (1) la producción de esta bacteriocina a partir de cepas salvajes de *L. lactis* seleccionadas por sus características tecnológicas; (2) la comparación del sistema desarrollado previamente (empleo del líder/sistema de secreción de la lactococina A) con una estrategia alternativa basada en el empleo del operón completo de la pediocina PA-1 bajo control de un promotor fuerte (P32); y (3) el desarrollo de un sistema de grado alimentario mediante la integración cromosómica de los genes necesarios para la biosíntesis de la pediocina o la construcción de un plásmido que portara esa misma información pero que estuviera desprovisto de genes de resistencia a antibióticos. Finalmente, se evaluaría la capacidad de algunas de las cepas generadas para inhibir el crecimiento de *Listeria* durante la elaboración de quesos. 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 ese motivo, una de las cepas salvajes seleccionadas como hospedadora tenía la capacidad de producir nisina.

Obviamente, las cepas de *L. lactis* productoras de pediocina son cepas recombinantes y pueden enfrentarse al rechazo de los consumidores. Por ese motivo, en esta Tesis también se contempló el empleo de bacterias no modificadas genéticamente pero que tuvieran un origen peculiar con fines bioprotectores. En el momento en el que se iniciaba esta Tesis Doctoral se pensaba que las bacterias sólo podían atravesar el epitelio intestinal intacto a través de las células M, unas células epiteliales especializadas que se localizan principalmente en las placas de Peyer. Sin embargo, Vazquez-Torres y col. (1999) y Rescigno y col. (2001) demostraron que las células CD18⁺ (básicamente, células dendríticas y macrófagos) existentes en la lámina propia pueden penetrar el epitelio intestinal intacto y captar bacterias comensales directamente de la luz intestinal. Más concretamente, las células dendríticas son capaces de abrir las zonas de oclusión entre enterocitos adyacentes, proyectar dendritas al exterior del epitelio y captar células viables, preservando la integridad de la barrera intestinal mediante la expresión de las proteínas que integran las zonas de oclusión. Una vez captadas por las células CD18⁺, las bacterias pueden propagarse fácilmente a mucosas distantes de la del aparato digestivo, ya que es bien conocida la circulación de células del sistema inmunitario dentro del sistema linfoide asociado a mucosas (Roitt, 1994).

Algunas bacterias podrían utilizar este mecanismo para migrar desde la mucosa intestinal y colonizar mucosas distantes, como la de los tractos respiratorio y genitourinario, la de las glándulas salivares y lacrimales, y la que recubre los conductos de las glándulas mamarias en las mujeres embarazadas y/o lactantes (Roitt, 1994). En este sentido, se sabe que durante el período de lactancia, existe una colonización selectiva del epitelio de la glándula mamaria por parte de células inmunitarias procedentes del intestino materno (la llamada circulación entero-

mamaria) (Bertotto y col., 1991). En consecuencia, si ciertas bacterias intestinales pudieran migrar asociadas a células del sistema inmunitario, la leche materna sería una fuente importante de bacterias para la colonización del intestino del recién nacido. El estudio de la posible transmisión vertical (madre-hijo) de bacterias lácticas es particularmente interesante ya que estas bacterias se aíslan con facilidad en el intestino humano y se suelen incluir entre las que poseen un mayor potencial para ejercer efectos beneficiosos en un hospedador. Dado que la leche materna es un alimento ingerido por neonatos, el aislamiento en este fluido biológico de bacterias lácticas resultaría particularmente atractivo ya que, por su propia naturaleza, cumplirían algunos de los requisitos generalmente recomendados para bacterias empleadas como probióticos humanos, tales como una ingestión prolongada sin efectos adversos en una población particularmente susceptible a las enfermedades infecciosas y una total adaptación tanto a mucosas humanas como a ambientes lácteos. En este sentido, los objetivos de la segunda parte de la Tesis Doctoral fueron los siguientes: (1) conocer si la leche materna obtenida de mujeres sanas es una fuente de bacterias lácticas; (2) en caso del aislamiento de enterococos, se procedería a analizar su seguridad, incluyendo la presencia o ausencia de determinantes de virulencia, genes de resistencia a vancomicina, capacidad de participar en procesos conjugativos y perfil de resistencia a antibióticos; y (3) analizar la capacidad tecnológica de algunas de las cepas de enterococos que se consideren seguras y evaluar su eficacia para inhibir el crecimiento de *Listeria* durante la elaboración de quesos.

II. INTRODUCCIÓN

II.1. LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas probablemente son el grupo bacteriano más ligado al hombre. Están presentes de forma natural en el ambiente y en una gran cantidad de alimentos, tanto de origen animal como vegetal, y, además, se encuentran habitualmente asociadas a las mucosas de los vertebrados. Recientemente su papel clásico como microorganismos involucrados en la producción de una amplia variedad de alimentos e ingredientes alimentarios se ha ampliado e incluye el de mantener la salud de los consumidores. A pesar de que las bacterias lácticas se consideraron como un grupo diferenciado a principios del siglo XX, es difícil definirlo porque engloba a microorganismos Gram-positivos muy heterogéneos, tanto desde el punto de vista morfológico como del filogenético (Figura II.1). Pueden tener forma bacilar o cocoide, aparecer aisladas o formando cadenas, no forman esporas, carecen de citocromos y de una verdadera catalasa, son tolerantes al ácido y poseen carácter anaeróbico más o menos estricto (Axelsson, 2004; Stiles y Holzapfel, 1997).

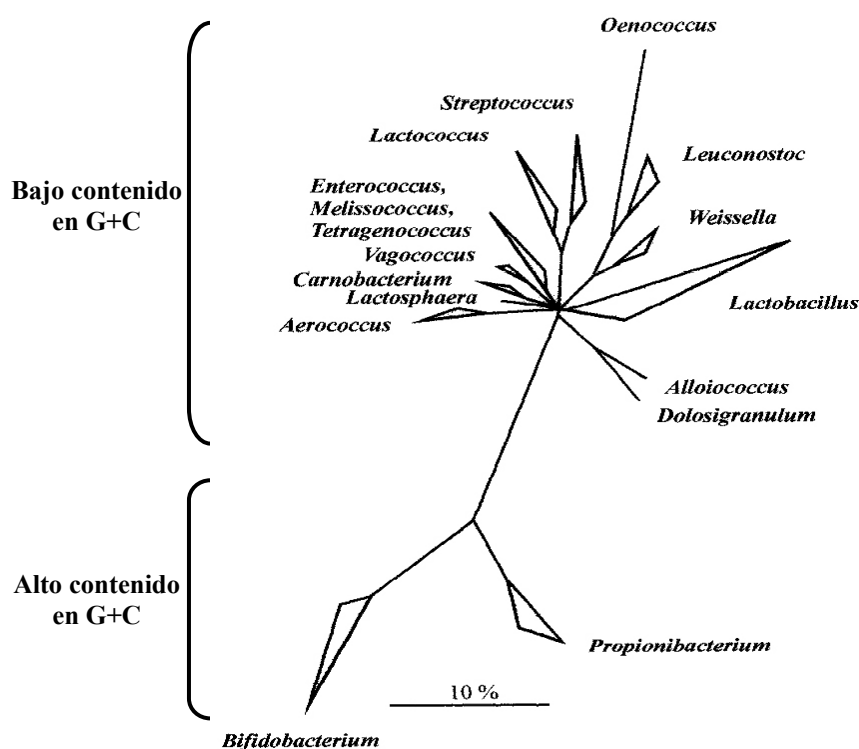


Figura II.1. Relación filogenética entre los principales géneros de bacterias lácticas y bacterias Gram-positivas relacionadas. Adaptado de Stiles y Holzapfel (1997).

El rasgo común que caracteriza a estas bacterias es una propiedad metabólica: la producción de ácido láctico como único o principal producto final de la fermentación de una gran variedad de sustratos (Axelsson, 2004). Este rasgo metabólico está asociado a bacterias que pertenecen a distintas ramas del árbol filogenético del dominio *Bacteria*. En la actualidad, las principales bacterias lácticas relacionadas con los alimentos y que poseen interés industrial pertenecen a los géneros *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Leroy y De Vuyst, 2004; Stiles y Holzapfel, 1997).

Las bacterias lácticas se encuentran en ambientes muy variados, pero generalmente están asociadas con sustratos ricos en nutrientes. Esto ha determinado que en su evolución hayan perdido muchas capacidades biosintéticas, así como la capacidad de esporulación, innecesarias en sustratos como los alimentos o el tracto gastrointestinal (Makarova y Koonin, 2007; Pfeiler y Klaenhammer, 2007). En relación con los alimentos, forman parte de la microbiota natural de las superficies de vegetales, aparecen con frecuencia en leche y derivados, en productos cárnicos y en otros alimentos. En estos sustratos la acidificación y otros cambios que acompañan el crecimiento de las bacterias lácticas, como por ejemplo la producción de compuestos antimicrobianos, exopolisacáridos y diversas enzimas, contribuyen al aroma, textura, conservación y valor nutritivo de una gran variedad de productos fermentados (Kleerebezem y Hugenholtz, 2003; Wood, 1997). En general, las bacterias lácticas toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias por lo que suelen llegar a predominar en los hábitats que colonizan. Gracias a las bacterias lácticas la vida útil y la calidad microbiológica y organoléptica de los productos finales aumentan notablemente con respecto a la materia prima original. Sin embargo, el interés industrial de estas bacterias no se limita a la obtención de alimentos fermentados, sino que también abarca la producción de diversos compuestos químicos y biológicos como etanol, ácido láctico, bacteriocinas, biopolímeros o enzimas (Leroy y De Vuyst, 2004).

Un aspecto muy positivo de las bacterias lácticas es que prácticamente todas las cepas que forman parte de la microbiota de los alimentos fermentados poseen un amplio historial de consumo seguro (Caplice y Fitzgerald, 1999; Wood y Holzapfel,

1995). El hecho de que las bacterias lácticas y los productos de su metabolismo hayan sido consumidos por el hombre durante tantos siglos sin ocasionar problemas, salvo en muy contadas excepciones, ha determinado se consideren como bacterias reconocidas generalmente como seguras (GRAS, acrónimo de *Generally Recognized As Safe*). Para hacernos una idea de su inocuidad baste considerar que un europeo ingiere unos 22 kg de leche fermentada al año, lo que equivaldría a un consumo global, tan sólo en Europa, de $8,5 \times 10^{20}$ bacterias lácticas (o 3.400 toneladas) cada año, sin que se les haya asociada con ningún problema sanitario grave (Chamba y Jamet, 2007). Precisamente la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria ha propuesto para obtener la calificación de presunción cualificada de seguridad (QPS, *Qualified Presumption of Safety*) a un gran número de especies pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas. Es decir, se asume el supuesto de su seguridad en base a las evidencias disponibles. Este calificativo, otorgado a un género o a un grupo de especies relacionadas, se hace en base a cuatro pilares: establecimiento de la identidad, cuerpo de conocimiento, posible patogenicidad y empleo final. Permite que cualquier microorganismo cuya identidad se pueda determinar inequívocamente, y se garantice su pertenencia a un grupo QPS, se aplique en la producción de alimentos sin necesidad de estudios adicionales para asegurar su seguridad. De todas las bacterias lácticas empleadas habitualmente para la elaboración de productos fermentados, sólo dos géneros tienen una posición ambigua en lo que respecta a la seguridad de su uso en alimentación humana. Se trata del género *Enterococcus*, ya que en él que se encuentran algunas cepas patógenas y no es fácil distinguirlas de las que carecen de rasgos virulentos, siendo necesario estudiar cada caso individualmente, y los estafilococos coagulasa negativos (EFSA, 2007a).

Los productos fermentados suponen alrededor de un tercio de los alimentos que consumimos habitualmente. La importancia económica de las fermentaciones a gran escala en la industria alimentaria ha desterrado la práctica tradicional de confiar en las fermentaciones espontáneas o de utilizar como inóculo una pequeña porción de una fermentación previa (*back-slopping*). Estos métodos han quedado relegados en la actualidad a la obtención de productos fermentados en países en vías de desarrollo o para la elaboración de productos fermentados artesanos, así como en ciertos casos en los que no se conoce con precisión la sucesión de los microorganismos implicados, en

países desarrollados (Harris, 1998). En los países occidentales la práctica habitual para la producción a gran escala de alimentos fermentados es el empleo de cultivos iniciadores. En este caso lo que se añade es un microorganismo, o una mezcla, seleccionado previamente por sus características fisiológicas y metabólicas. Así, se logra un estrecho control del proceso de la fermentación y de las características del producto final, evitándose las grandes pérdidas económicas derivadas de fermentaciones fallidas o anómalas. Un grave inconveniente asociado a esta práctica es que con frecuencia los productos fermentados industriales carecen de las propiedades organolépticas que caracterizan a los productos artesanos elaborados sin empleo de cultivos iniciadores y que son tan apreciadas por los consumidores (Caplice y Fitzgerald, 1999).

En los últimos años en la elaboración industrial de alimentos fermentados se está extendiendo el empleo de cultivos iniciadores funcionales (De Vuyst, 2000). Estos cultivos poseen, al menos, una propiedad funcional que contribuye a incrementar la seguridad del alimento y/o ofrece ventajas organolépticas, tecnológicas o nutricionales. Aplicando estas cepas como cultivos iniciadores o adjuntos en los procesos fermentativos se puede conseguir el desarrollo *in situ* de la propiedad deseada, mientras que el alimento mantiene su condición de natural y saludable (Ross et al., 2000). Permiten sustituir de manera total o parcial el uso de algunos aditivos químicos por compuestos naturales producidos por las cepas de bacterias lácticas incorporadas, además de ofrecer alimentos atractivos acordes con la demanda del consumidor actual (Thomas et al., 2000). Cabe destacar que la aplicación de bacterias lácticas en los alimentos goza de gran aceptación, ya que son consideradas como “*naturales*” e incluso “*beneficiosas para la salud*”, al contrario que los aditivos químicos. En este sentido, las bacterias lácticas son candidatos idóneos para formar parte de cultivos bioprotectores, entendiéndose por bioconservación “*la extensión de la vida útil y el incremento de la seguridad sanitaria de los alimentos mediante la microflora natural o sus metabolitos*” (Aymerich y Hugas, 1998). No obstante, no puede descartarse totalmente la utilización de aditivos químicos, ya que continúan siendo necesarios en la conservación de alimentos, además de mejorar algunas de sus características organolépticas.

La creciente demanda de alimentos menos procesados y con menos aditivos parece estar en contradicción con el deseo de alimentos cada vez más seguros. Para contrarrestar este problema, las industrias buscan alternativas adecuadas y, en el caso de los alimentos fermentados, uno de los puntos clave lo constituyen los cultivos iniciadores (Leroy y De Vuyst, 2004). Hasta el momento, la disponibilidad de nuevas cepas ha sido muy limitada; sin embargo, los crecientes avances de la bioinformática y las diversas “ómicas” (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica) de los microorganismos de interés industrial aumentan las perspectivas de mejora de los cultivos iniciadores (Klaenhammer et al., 2005; Seizen et al., 2004). A esto se suma el que, desde hace ya algún tiempo, la biología molecular permite la expresión de ciertas propiedades deseables y la supresión de otras no deseables en cepas que forman parte de cultivos iniciadores (Delcour et al., 1999; Law, 2001; Mogensen, 1993).

Otro aspecto de interés en relación con las bacterias lácticas es que algunas especies, sobre todo las pertenecientes a los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*, forman parte de la microbiota natural de la mucosa intestinal de los mamíferos (Vaughan et al., 2002). Estas bacterias intestinales contribuyen a la salud y el bienestar de los individuos mediante diversos efectos, como por ejemplo manteniendo el equilibrio de la microbiota intestinal, la exclusión competitiva de patógenos y la estimulación y/o modulación del sistema inmunitario. Los consumidores, que prestan cada vez más atención a los temas relacionados con la alimentación y la salud, no son ajenos a esta relación. Prueba de ello es el rápido crecimiento del mercado de alimentos con propiedades beneficiosas para la salud, siendo el de mayor éxito comercial el sector de los productos lácteos conteniendo como probióticos cepas seleccionadas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Saxelin et al., 2005). Los probióticos se definen como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedador” (FAO/WHO, 2002). El uso de probióticos se ha asociado con un gran número de efectos beneficiosos como la mejora de la intolerancia a la lactosa, la modulación del sistema inmunitario, la reducción de la hipercolesterolemia y la hipertensión, y la protección frente a enfermedades infecciosas, inflamatorias, alérgicas y tumorales. Sin embargo, no se debe asumir, bajo ningún concepto, que todas las bacterias lácticas y bifidobacterias posean propiedades beneficiosas. De igual

manera, cuando se adscribe un efecto beneficioso a una cepa, tampoco se puede extrapolar esa propiedad a las restantes cepas de la misma especie. Incluso la adscripción de un efecto beneficioso a una cepa depende de las condiciones de su empleo y, muy particularmente, de la dosis. La excesiva generalización sobre los beneficios de los probióticos suele tener efectos contraproducentes ya que crea escepticismo en la comunidad científica, en la médica y en los consumidores.

Las tendencias de mercado y el marco legislativo actual, junto a sus peculiares e interesantes propiedades, dotan de gran atractivo a la aplicación industrial de las bacterias lácticas. Dado que el empleo de microorganismos modificados genéticamente despierta en los consumidores rechazo es de gran interés aislar cepas de fuentes naturales y seleccionarlas por sus propiedades funcionales. Sin embargo, es importante señalar que este rechazo al empleo de microorganismos modificados genéticamente se deba, probablemente, a la carencia de información adecuada sobre su proceso de obtención y los beneficios que pueden reportar. No hay que olvidar que el espectacular avance de la biología molecular ofrece una amplia gama de posibilidades para la construcción de cultivos iniciadores de grado alimentario según las necesidades (de Vos, 2001; Klaenhammer y Kullen, 1999; Law, 2001).

II.1.1. Metabolitos de las bacterias lácticas

Las bacterias lácticas producen numerosos compuestos, como ácido láctico, diacetilo, acetaldehído, etanol, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno o bacteriocinas, como resultado de su metabolismo. El nivel final y la proporción de estos metabolitos dependen de la especie, la composición química del sustrato y las condiciones que imperan durante la fermentación. Estos compuestos contribuyen a la textura y al desarrollo de las propiedades aromáticas y sápidas características de un determinado alimento fermentado. Por ejemplo, el ácido láctico es responsable de la coagulación de la leche para la elaboración del queso y el diacetilo y el acetaldehído determinar el olor y sabor típicos de la mantequilla. Otros metabolitos de estas bacterias ejercen una acción antibacteriana, como los ácidos orgánicos, el etanol, el dióxido de carbono, la reuterina, la reuteriicina, el peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas (Hugas et al., 1995; Rodríguez et al., 1998). Estas sustancias

antimicrobianas son una alternativa muy interesante para sustituir, al menos parcialmente, a agentes químicos como los nitritos, los sulfitos o los ácidos propiónico, sórbico y benzoico (Smith, 1993).

De entre todas estas sustancias antimicrobianas cabe destacar a las bacteriocinas, cuyo interés para la industria alimentaria se debe a que inhiben a bacterias alterantes y patógenas resistentes a algunos métodos de conservación tradicionales (como, por ejemplo, la refrigeración o la acidificación). Además, son compuestos muy atractivos desde el punto de vista tecnológico, dado que son efectivas a concentraciones muy bajas y no modifican las características organolépticas del producto. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas han sido intensamente investigadas, por lo que se conoce relativamente bien su composición química y su modo de acción (Ross et al., 1999; Patton y van der Donk, 2005; Fimland et al., 2005). Dado que las bacterias lácticas han sido utilizadas durante siglos en la elaboración de alimentos para consumo humano, sus bacteriocinas se presentan como unos agentes bioconservadores particularmente atractivos.

II.1.2. Bacteriocinas de las bacterias lácticas

Tradicionalmente las bacteriocinas se han definido como péptidos biológicamente activos con propiedades antimicrobianas frente a bacterias estrechamente relacionadas con la especie productora (Tagg et al., 1976). Esta definición estaba influida por los estudios sobre las colicinas de *Escherichia coli*, las primeras bacteriocinas descritas (Gratia, 1925) y que eran las más conocidas en aquel momento. En la actualidad este concepto se ha modificado, ya que se ha comprobado que en algunos casos también pueden tener acción bactericida frente a cepas distanciadas filogenéticamente de la especie bacteriocinogénica (Sablon et al., 2000).

Definiciones posteriores del término bacteriocina, como la de Koninsky (1982), las describen como agentes antimicrobianos de naturaleza peptídica cuya síntesis no es letal para la célula productora. Klaenhammer (1988) las considera 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. Como rasgo común a todas las bacteriocinas cabe citar que son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal que pueden sufrir modificaciones postraduccionales.

Existen numerosas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas y cada una de ellas exhibe un espectro de inhibición particular. Algunas inhiben únicamente el crecimiento de cepas relacionadas taxonómicamente con la cepa productora, como las lactococinas A, B y M, activas solamente frente a *Lactococcus* (Ross et al., 1999). Otras bacteriocinas, en cambio, inhiben a un amplio rango de bacterias, si bien es cierto que la acción inhibitoria de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas suele restringirse a otras bacterias Gram-positivas. Con respecto a las bacterias Gram-negativas, los mohos y las levaduras, las bacteriocinas de las bacterias lácticas tienen difícil el acceso a su lugar de acción, la membrana plasmática. Existen algunas excepciones a este comportamiento general. Así, la nisina A es activa frente a diversas bacterias Gram-negativas de importancia médica, como *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter* o *Neisseria* (Mota-Meira et al., 2000). Además, la congelación, el calentamiento suave, la exposición al ácido láctico y/o EDTA o la presión hidrostática facilita la actuación de las bacteriocinas sobre otras bacterias Gram-negativas (Kalchayanand et al., 1992; Stevens et al., 1992; Kalchayanand et al., 1998; Arqués et al., 2005).

Hacer una clasificación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas es una tarea ardua dada la gran variedad existente, pero necesaria para facilitar su estudio. Tradicionalmente se han clasificado en tres grandes grupos, a partir del criterio establecido por Klaenhammer (1993) y atendiendo a algunas características comunes, según se muestra en la Tabla II.1 (Klaenhammer, 1993; Cleveland et al., 2001; Nes y Holo, 2000). La mayor parte de las bacteriocinas que se conocen hasta el momento están incluidas en las clases I y II. El resto de las bacteriocinas son, en algunas ocasiones difíciles de clasificar, puesto que sus características se podrían ajustar a más de un grupo. La propuesta más reciente hecha por Cotter et al. (2006) considera, además de las clases I y II ya mencionadas, otras dos clases, la III que incluiría las bacteriocinas de gran tamaño y la IV para los péptidos cíclicos. Según este autor, la clase III se dividiría a su vez en dos grupos según su modo de acción: las

bacteriolíticas (IIIa) del tipo de la zoocina A y las que poseen un modo de acción no lítico, como la helveticina J (Cotter et al., 2006).

En la clase I (lantibióticos) se incluyen bacteriocinas termoestables formadas por uno o dos péptidos de pequeño tamaño molecular (<5 kDa) modificados postraduccionalmente. Contienen aminoácidos poco frecuentes como la deshidroalanina (DHA) y la deshidrobutirina (DHB), originados por la deshidratación postraduccional de la serina y la treonina, respectivamente. La condensación de estos residuos DHA y DHB con el grupo sulfhidrilo de las cisteínas de la molécula origina, respectivamente, lantionina y β -metil-lantionina.

Los lantibióticos se dividen en dos subgrupos atendiendo a su estructura y modo de acción. Los lantibióticos de tipo A se caracterizan por ser péptidos flexibles y cargados positivamente que actúan a nivel de membrana (Wiedemann et al., 2001 y 2004; Patton y van der Donk, 2005). A este tipo pertenece la nisina, la más estudiada de todas las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas. Inicialmente su actividad se atribuyó a la formación de poros como consecuencia de su unión inespecífica a la membrana celular, mediante interacción electrostática. Sin embargo, el hecho de que estas bacteriocinas sean activas a concentraciones muy bajas (en el rango nanomolar) hizo sospechar la existencia de algún receptor específico para su unión a la membrana. En el caso de la nisina, el lípido II parece tener dicha función (Wiedemann et al., 2001). De hecho, los poros se forman de manera muy específica tras la unión de ocho moléculas de nisina a cuatro moléculas de lípido II y son mucho más estables que los formados en vesículas artificiales en ausencia del lípido II (Hasper et al., 2004). Al bloquearse la disponibilidad del lípido II queda inhibida la síntesis de la pared celular en la bacteria sensible, ya que es uno de los precursores esenciales. Por otra parte, los lantibióticos de tipo A tienen efectos adicionales como, por ejemplo, inducir autólisis o inhibir la germinación de esporos bacterianos, ambos descritos para la nisina. Todos estos efectos explican, por una parte, que su

Tabla II.1. Clasificación general de las bacteriocinas de las bacterias lácticas

Clase	Características	Subclase	Ejemplos	Bacteria productora	Referencias
I	Lantibióticos: contienen lantionina y β -metil-lantionina	Tipo A: Lineales moléculas alargadas, flexibles <5 kDa	Nisina A	<i>Lactococcus lactis</i>	Gross y Morell (1971)
		Tipo C: Multicomponentes	Lacticina 3147 Plantaricina W	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	McAuliffe et al. (1998) Holo et al. (2001)
II	Péptidos no modificados, termoestables, <10kDa	Subclase IIa: bacteriocinas de la familia de la pediocina (actividad frente a <i>Listeria</i>)	Pediocina PA-1 Mesentericina Y105	<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Gonzalez y Kunka (1987) Ennahar et al. (1996) Hècharc et al. (1992)
		Subclase IIb: dos componentes	Plantaricina S Lactococinas Ga1 y Gb	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Jiménez-Díaz et al. (1995) Niessen-Meyer et al. (1992)
		Subclase IIc: otras bacteriocinas de la subclase II	Lactococina A Enterocina P	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Holo et al. (1991) Cintas et al. (1997)
III	Proteínas termolábiles, >30 kDa		Helveticina J Enterocina MMT05	<i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Joerger et al. (1990) Ghairi et al. (2004)
IV	Bacteriocinas con componente glucídico o lipídico		Leuconocina S Lactocina 27	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>	Lewus et al. (1992) Upreti y Hinsdill (1975)
V	Bacteriocinas cíclicas		Enterocina AS-48 Gassericina A	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactobacillus gasseri</i>	Gálvez et al. (1986) Kawai et al. (2004)

actividad antimicrobiana sea tan potente y, por otra, que la sensibilidad dependa de la especie o cepa bacteriana (Hécharad y Sahl, 2002; Patton y van der Donk, 2005).

Los lantibióticos de tipo B tienen una estructura secundaria más rígida. Son péptidos globulares que actúan inhibiendo algunas de las reacciones enzimáticas de la célula diana (Sahl y Bierbaum, 1998). Sin embargo, todavía no se ha descrito la producción de lantibióticos de tipo B en las bacterias lácticas. También se han descrito lantibióticos de bacterias lácticas constituidos por dos péptidos que actúan sinérgicamente, como la lactacina 3147 o la plantaricina W (Ryan et al., 1996; Holo et al., 2001), y que podrían constituir una nueva subclase de bacteriocinas, los lantibióticos de tipo C (Holo et al., 2001; Cotter et al., 2006).

La clase II engloba pequeños péptidos (<10 kDa) termoestables y no modificados postraduccionalmente, que tienen un alto contenido en aminoácidos poco voluminosos (como la glicina) lo cual les confiere un elevado grado de libertad conformacional. Además, tienen un fuerte carácter catiónico, con un pI elevado (entre 8 y 11), como la mayoría de las bacteriocinas de bacterias lácticas (Jack et al., 1995). Esta clase se subdivide a su vez en tres subclases.

La clase IIa, también denominada “familia de la pediocina” porque la pediocina PA-1 fue el primer miembro que se descubrió, constituye el grupo más numeroso de las bacteriocinas de la clase II, con más de 30 integrantes hasta el momento. Este tipo de bacteriocinas se ha encontrado en muchos géneros bacterianos, no sólo pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* y *Leuconostoc*) sino también en *Bifidobacterium*, *Bacillus* y *Listeria* (Eijsnik et al., 2002). Esta familia se caracteriza por su intensa actividad frente a microorganismos del género *Listeria*, así como por tener una alta homología en sus secuencias, sobre todo en el extremo N-terminal (Aymerich et al., 1996; Nes y Holo, 2000; Ennahar et al., 2000). Todas ellas, a excepción de la acidocina A, presentan dos residuos de cisteína conservados y unidos mediante un puente disulfuro dando lugar a un anillo formado por seis residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal (Cleveland et al., 2001). Actúan formando poros en la membrana plasmática gracias a que casi todas poseen una región C-terminal que puede adoptar una estructura anfifílica, situándose la parte hidrofílica en lo que sería el interior de un canal y la parte hidrofóbica

hacia el exterior en contacto con la bicapa de fosfolípidos de la membrana (Diep y Nes, 2002). Su estructura y modo de acción se aborda con más detalle en el siguiente apartado.

La clase IIb contiene bacteriocinas cuya actividad depende de la acción complementaria de dos péptidos. En algunos casos, como en el de la lactococina G, para que la bacteriocina sea activa es necesaria la presencia de ambos péptidos. En otros, uno de los dos péptidos es activo pero su actividad se incrementa notablemente en presencia del otro; éste es el caso de la lacticina F (Allison et al., 1994) o la plantaricina S (Jiménez-Díaz et al., 1995).

La clase IIc abarca aquellas bacteriocinas de la clase II cuya peculiaridad impide clasificarlas en ninguno de los tipos anteriores. Así encontramos en este grupo a la carnobacteriocina A (Worobo et al., 1994), la enterocina B (Casaus et al., 1997), la enterocina Q (Cintas et al., 2000), la lactococina A (Holo et al., 1991), la lactococina 972 (Martínez et al., 1996) y la plantaricina A (Hauge et al., 1998).

Las bacteriocinas de la clase III son termolábiles, tienen gran tamaño molecular (>30 kDa) y carecen de aminoácidos modificados en su estructura, como la helveticina J o la enterocina MMT05 (Joerger y Klaenhammer, 1986; Ghrairi et al., 2004). Se desconoce el modo de acción exacto de este grupo, aunque difiere del de las dos clases anteriores, ya que no interfieren con la actividad de la membrana. Estas bacteriocinas han sido poco estudiadas y son las que despiertan menos interés en la industria en la actualidad.

Algunos autores han propuesto otras dos clases, la IV y la V. La clase IV comprende bacteriocinas de las que apenas se conoce nada sobre su estructura o función, excepto que requieren lípidos o carbohidratos para ser activas. En esta clase se incluirían, entre otras, la leuconocina S (Lemus et al., 2002) y la lactocina 27 (Upreti y Hinsdill, 1975). La clase V está formada por bacteriocinas de estructura circular, pero que no están modificadas postraduccionalmente, como la enterocina AS-48 (Maqueda et al., 2004), o la gassericina A (Kawai et al., 2004).

Como se ha comentado anteriormente, a medida que aumenta el número de bacteriocinas caracterizadas, se comprueba que algunas no se adaptan de forma adecuada a ninguno de los grupos anteriores o que podrían incluirse en más de uno. Es posible, por tanto,

que sea necesario replantearse los criterios para la clasificación de estos péptidos antimicrobianos (Cotter et al., 2006).

II.2. PEDIOCINA PA-1

La pediocina PA-1 probablemente sea, después de la nisina, la bacteriocina más estudiada en relación con la industria alimentaria por el control que ejerce sobre patógenos como *Listeria monocytogenes* (Jack et al., 1995). Por otra parte, no sería de extrañar que en un futuro no muy lejano esta bacteriocina adquiriese importancia en el ámbito médico para controlar las infecciones intestinales causadas por bacterias patógenas multirresistentes. En un estudio reciente se ha descrito la capacidad que tiene la pediocina PA-1 para modular la microbiota intestinal y reducir la colonización de ratones infectados con enterococos resistentes a la vancomicina (Millette et al., 2008a).

Las primeras referencias a la pediocina PA-1 se remontan a los años 80, cuando dos grupos de investigadores describieron, por separado, la producción de una bacteriocina en dos pediococos de origen cárnico, *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 y *P. acidilactici* H. Su caracterización confirmó que se trataba de la misma molécula, que se denomina habitualmente como pediocina PA-1 (González y Kunka, 1983; Bhunia et al., 1988). Posteriormente se ha descubierto que las bacteriocinas producidas por diversas cepas de *P. acidilactici*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus plantarum* también son idénticas a la pediocina PA-1 (Bennik et al., 1997; Christensen y Hutkins, 1992; Daba et al., 1994; Ennahar et al., 1996; Hoover et al., 1988; Luchansky et al., 1992; Mathys et al., 2007; Ray y Hoover, 1993; Rodríguez et al., 1997; Schved et al., 1993). Hasta el momento es la única bacteriocina de su subclase que es producida por diferentes especies del mismo género e incluso por diferentes géneros de bacterias lácticas (Miller et al., 2005). Curiosamente, cabe señalar que *Bacillus coagulans* I₄ produce una bacteriocina denominada coagulina que tan sólo se diferencia de la pediocina PA-1 en un aminoácido (Le Marrec et al., 2000).

El hecho de que se hayan aislado bacterias lácticas productoras de pediocina PA-1 a partir de alimentos muy diversos (productos cárnicos, lácteos y vegetales) e incluso del

intestino humano (Millette et al., 2008b), y en lugares muy distantes geográficamente, como Canadá, EE.UU., España, India, Israel o Noruega, da una idea del grado de conservación y difusión de esta propiedad (Rodríguez et al., 2002a).

II.2.1. Características moleculares

La pediocina PA-1 es un péptido de 44 aminoácidos que no se modifican postraduccionalmente (Henderson et al., 1992; Marugg et al., 1992; Motlagh et al., 1992a; Nieto Lozano et al., 1992) (Figura II.2). Tiene carga neta positiva a pH 6,0 (entre +8 y +3, según los autores) y pI básico (entre 8,6 y 10, también según los autores) (Chen et al., 1997^a; 1997b; Jack et al., 1995; Henderson et al., 1992; Nieto Lozano et al., 1992). 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 et al., 1996).

El alineamiento de las secuencias de las bacteriocinas de la clase IIa (Figura II.3) revela un elevado grado de homología entre ellas, especialmente en el extremo N-terminal (Dridier et al., 2006; Fimland et al., 2005; Nes y Holo, 2000). La comparación de sus estructuras primarias sugiere la existencia de, al menos, dos módulos funcionales: uno en la región N-terminal, con una secuencia aminoacídica relativamente bien conservada y de carácter hidrofílico, y otro en la porción C-terminal, cuya secuencia está mucho menos conservada y tiene carácter hidrofóbico y anfifílico (Fimland et al., 1998).

En la región N-terminal, que comprende los primeros 16 residuos de aminoácidos, se encuentra la secuencia consenso **YGNGV/L**, denominada “caja de la pediocina”. Este extremo conservado, que se caracteriza por tener una estructura de lámina β y un marcado carácter catiónico (Figura II.2), es el responsable de la unión de la bacteriocina a la superficie de las células sensibles. Las diferencias en esta región podrían explicar la distinta actividad que muestran las bacteriocinas de esta subclase. En este extremo de la secuencia también están muy conservados dos residuos de cisteína (Cys9, Cys14), que forman un puente disulfuro, y un residuo de triptófano (Trp18). Los residuos de triptófano tienden a disponerse en las interfases membrana-agua, como se ha puesto de manifiesto en otras proteínas de

membrana. Por ello, es muy probable que estos tres aminoácidos contribuyan a estabilizar la estructura terciaria de la pediocina PA-1 (Fimland et al., 2005).

Pediocina PA-1

KYYGNGVTCGKHSCSVDWGKATTCI IINNGAMAWATGGHQGNHKC

hélice α

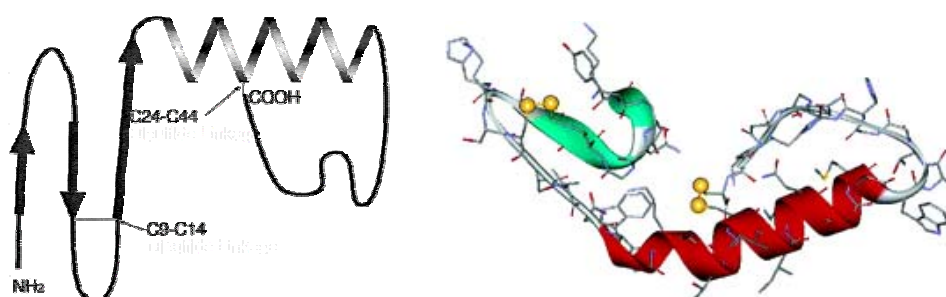


Figura II. 2. Secuencia primaria y estructuras secundaria y terciaria de la pediocina PA-1. En la estructura secundaria, las líneas entre los residuos Cys9-Cys14 y Cys22-Cys44 representan los dos puentes disulfuro, las flechas indican las estructuras β y la cinta plegada simboliza la hélice α . En la estructura terciaria, las esferas amarillas representan los grupos implicados en los dos puentes disulfuro, la cinta verde la estructura de lámina β y la cinta roja la estructura de hélice α . Imágenes tomadas de Watson et al. (2001) y de Kaur et al. (2004).

El residuo conservado de ácido aspártico (o asparagina en otras bacteriocinas de la clase IIa) en la posición 17 actúa como una bisagra, separando esta región N-terminal del extremo C-terminal y permitiendo el necesario movimiento de uno con respecto al otro (Fimland et al., 2005; Johnsen et al., 2005). En el extremo C-terminal se localiza el dominio más hidrofóbico, siendo esta parte la que penetra en la parte hidrofóbica de la membrana celular de esas bacterias sensibles y la que determina la especificidad de estas bacteriocinas de la clase IIa (Fimland et al., 1996; Fimland et al., 2005; Johnsen et al., 2005). De hecho, la construcción de bacteriocinas híbridas, combinando los dos dominios de varios miembros de la familia de la pediocina, ha permitido comprobar que la especificidad de los péptidos obtenidos se correspondía con la de la bacteriocina de la que procedía el extremo C-terminal (Fimland et al., 1996; Johnsen et al., 2005).

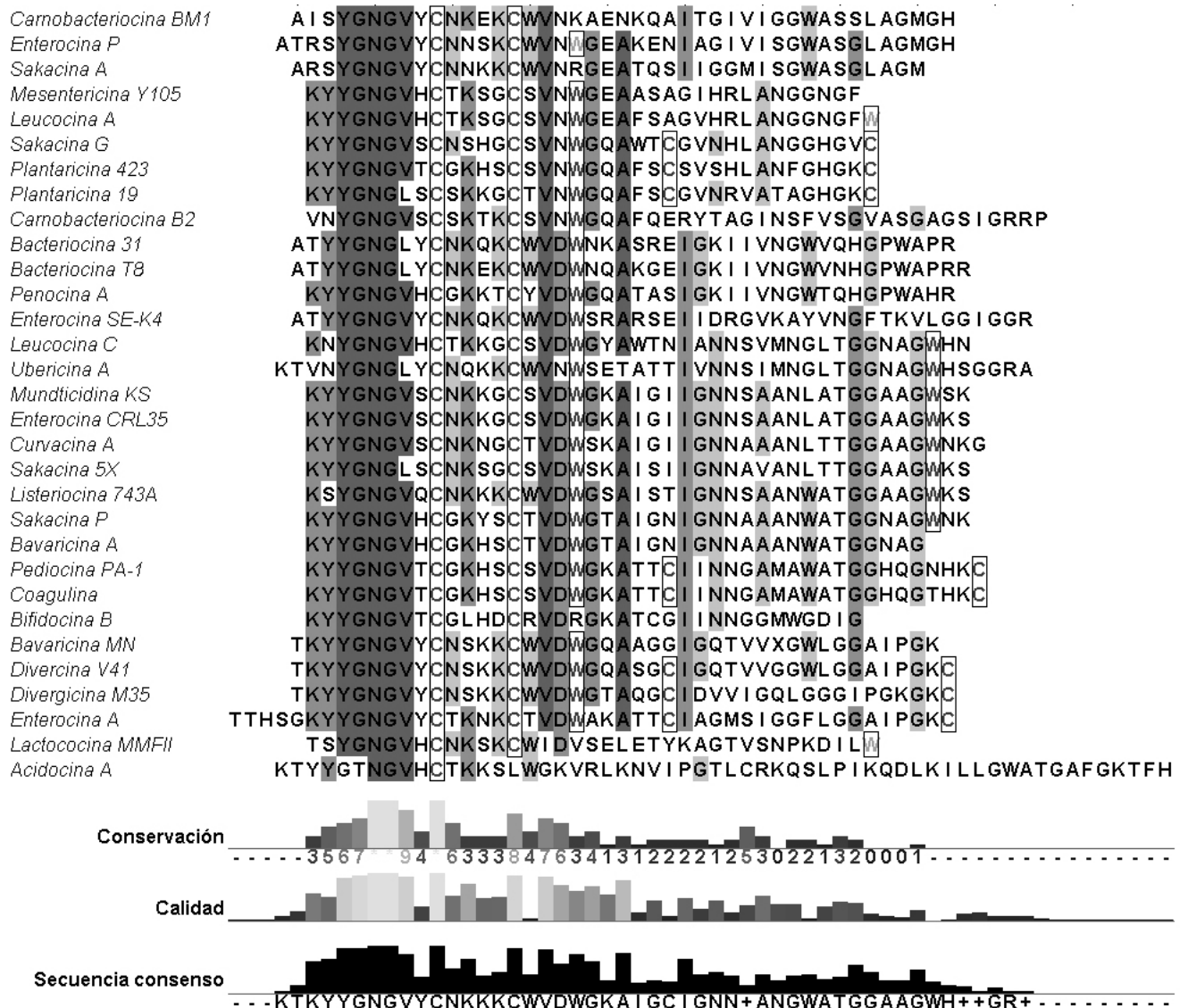


Figura II.3. Alineamiento de las secuencias de las bacteriocinas maduras de la clase IIa, según el programa Clustalw2, con el editor Jalview 2.2.1. La intensidad del color azul muestra el porcentaje de identidad de los residuos en las distintas secuencias. Los residuos enmarcados en cajas negras están implicados en la estabilización de la estructura del péptido. La leucocina A es idéntica a la leucocina B, la pisciococina VIa es idéntica a la piscicolina 126, la sakacina A es idéntica a la curvacina A, la carnobacteriocina BM1 es idéntica a la pisciococina VIIb, la pediococina PA-1 es idéntica a la pediococina AcH y a la pediococina SJ-1. La secuencia de la pisciococina CS526 se ha omitido por poseer varias indeterminaciones.

Un rasgo muy importante de la pediocina PA-1, que comparte con otras de su subclase (enterocina A, divercina V41, divergicina M35, plantaricinas 423 y 19 y sakacina G), es que contiene dos cisteínas adicionales en el extremo C-terminal (Cys24 y Cys44; Figura II.4). El análisis de espectrometría de masas de la pediocina PA-1 ha revelado una masa molecular experimental de 4.623 Da, lo que confirma que sus cuatro residuos de cisteína están oxidados y unidos, dos a dos, mediante puentes disulfuro (Fimland et al., 1996). Estos dos enlaces disulfuro presentes en ambos extremos de la pediocina PA-1 se forman espontáneamente, tanto en la pediocina PA-1 natural como en la obtenida por síntesis química, y son cruciales para su actividad biológica (Ennahar et al., 2000; Fimland et al., 1996; Richard et al., 2006).

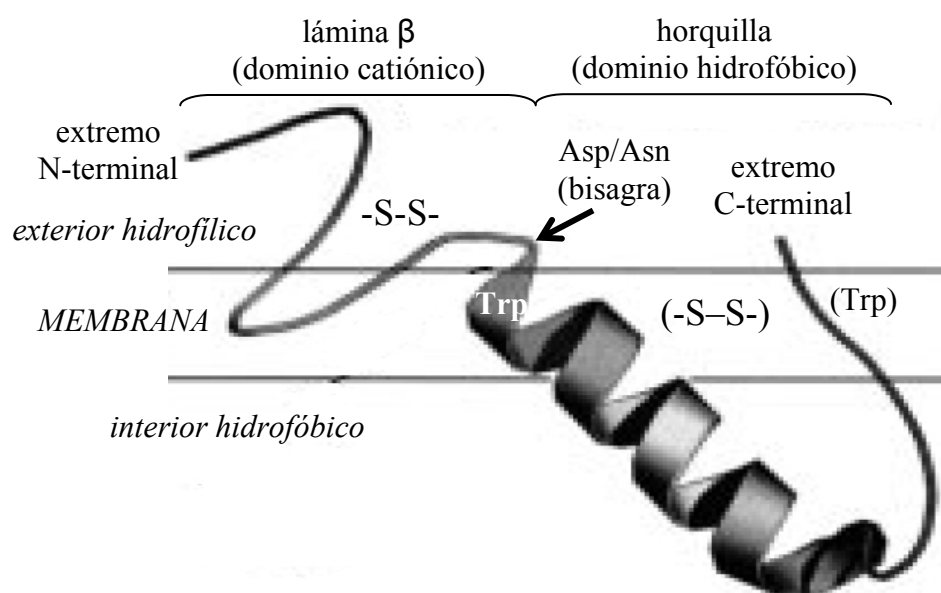


Figura II.4. Orientación en la membrana de las bacteriocinas de la clase IIa. El puente disulfuro y el residuo de triptófano del extremo C-terminal no están presentes en todas las bacteriocinas de esta subclase. Adaptado de Johnsen et al. (2005).

El primer modelo sobre la estructura secundaria y terciaria de la pediocina PA-1 se debe a Chen et al. (1997a). Estos autores describieron cómo podría ser la estructura tridimensional de los 19 residuos de aminoácidos presentes en el extremo N-terminal. Sin embargo, el elevado grado de libertad conformacional que presentaba el extremo C-terminal no permitió describir en aquel momento su estructura. Este primer modelo predecía una estructura de lámina β formada por tres cadenas antiparalelas en el extremo N-terminal. Cuatro de los residuos del motivo YGNGV se encuentran precisamente en el giro β entre la primera y

segunda cadena (Gly4-Asn5-Gly6-Val7), mientras que en la vuelta entre la segunda y tercera cadena se localizan dos residuos cargados positivamente (Lys11 e His12). Esta estructura de lámina β está estabilizada por el puente disulfuro conservado Cys9-Cys14. Es de destacar que esta disposición originaría una zona hidrofóbica determinada por los residuos Val7, Cys9, Cys14, Val16 y Trp18. Los trabajos realizados con otras bacteriocinas de la clase IIa (leucocina A y sakazina P) utilizando técnicas de resonancia magnética nuclear (NMR) han confirmado que este modelo es aplicable todas ellas (Fimland et al., 2005).

El residuo Asp17 marca la separación entre esta lámina β y una hélice α que está localizada en el centro de la molécula y tiene carácter anfifílico (Figura II.5). Esta hélice está formada por 14 aminoácidos, desde Trp18 hasta Met31, orientándose los residuos hidrofóbicos a un lado de la misma (Kaur et al., 2004). La cola con los restantes 13 residuos que conforman esa región C-terminal no tiene una estructura secundaria definida, pero se pliega sobre la hélice α creando una estructura similar a una horquilla, que puede penetrar en la membrana celular de la célula diana (Figura II.4) (Ennahar et al., 2000; Johnsen et al., 2005). De esta forma, entre los residuos Cys24 y Cys44, localizados en la mitad de la hélice α y en el extremo de la molécula, respectivamente, se puede formar un segundo puente disulfuro que estabiliza esta gran horquilla y es, además, responsable de la termoestabilidad de la bacteriocina (Kaur et al., 2004). La importancia de este segundo puente disulfuro se había puesto de manifiesto en ensayos realizados con la sakacina P. Esta bacteriocina sólo contiene un puente disulfuro (Cys9-Cys14) de forma natural. La construcción de una variante sintética de la sakacina P con un segundo puente disulfuro en el otro extremo de la molécula (Cys24-Cys44) reveló que tenía una actividad y una estabilidad notablemente superiores a las de la bacteriocina original (Uteng et al., 2003). A pesar de que entre las secuencias aminoacídicas del extremo C-terminal de las bacteriocinas de la clase IIa existen diferencias notables, la estructura de hélice α con un lado hidrofóbico descrita para la pediocina PA-1 parece estar muy conservada (Figura II.5).

Por otra parte, la metionina presente en la posición 31 también es importante para la actividad de la pediocina PA-1, puesto que la oxidación de su átomo de azufre desestabiliza la bacteriocina al formarse agregados que carecen de actividad (Johnsen et al., 2000).

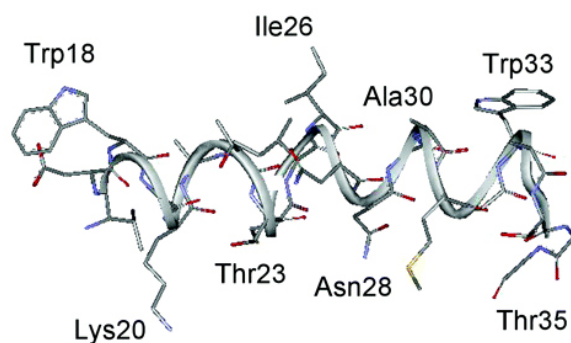


Figura II.5. Estructura de hélice α con carácter anfipático formada por 14 residuos del extremo C-terminal de la pediocina PA-1. Fuente: Kaur et al. (2004).

Estudios de espectroscopía de dicroísmo circular y espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier han puesto de manifiesto que la pediocina PA-1 tiene una disposición muy desordenada en solución acuosa a pesar de contar con dos puentes disulfuro (Watson et al., 2001). Sin embargo, a diferencia de otras bacteriocinas relacionadas, posee en ese ambiente una pequeña proporción de estructura β (20% de lámina β y 15% de giro β). Esta disposición permitiría que los aminoácidos catiónicos conservados del extremo N-terminal, que son necesarios para la interacción electrostática inicial con las bacterias sensibles, quedasen orientados hacia el exterior de la molécula. La presencia de una interfase hidrocarbano-agua, con una estructura similar a una membrana biológica, disminuye el desorden de la molécula al inducir que el 32% de los aminoácidos formen una hélice α , al tiempo que se mantienen las estructuras β antes mencionadas.

II.2.2. Organización genética

Las cepas que producen pediocina PA-1 de forma natural descritas hasta el momento poseen los determinantes genéticos para la biosíntesis de esta bacteriocina localizados en plásmidos cuyo tamaño oscila entre 8,9 y 11 kb (Bhunja et al., 1994; Ennahar et al., 1996; González y Kunka, 1987; Hoover et al., 1988; Jager y Harlander, 1992; Motlagh et al., 1992a; Ray et al., 1989; Rodríguez et al., 1997; Miller et al., 2005). En estos plásmidos, los determinantes genéticos necesarios para la producción de la pediocina PA-1 ocupan un fragmento de aproximadamente 3,5 kb (Figura II.6) que contiene 4 marcos abiertos de lectura (genes *pedA*, *pedB*, *pedC* y *pedD*) con idéntica secuencia y organización en todas las cepas

productoras de esta bacteriocina (Marugg et al., 1992; Mathys et al., 2007; Miller et al., 2005).

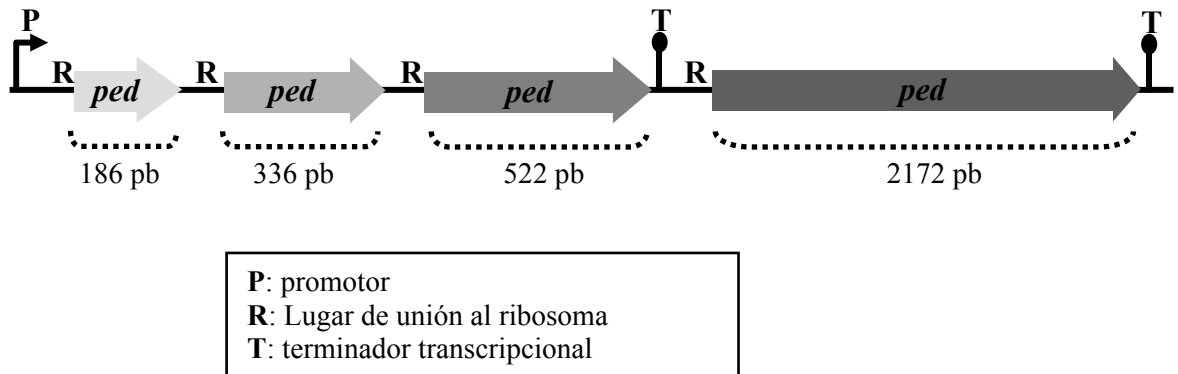


Figura II.6. Representación esquemática del operón de la pediocina PA-1

Los cuatro genes están dispuestos dentro de un mismo operón (operón *ped* o *pap*), bajo el control de un promotor situado delante del gen *pedA*. Las secuencias -35 (TTGACA) y -10 (TAGAAT) del promotor se ajustan a las secuencias consenso de los promotores constitutivos de las bacterias Gram-positivas (Marugg et al., 1992). La transcripción del operón de la pediocina origina dos tipos de mRNA. 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*). Este hecho está en concordancia con la existencia de dos terminadores transcripcionales *rho*-independientes detrás de los genes *pedC* y *pedD* (Motlagh et al., 1994; Venema et al., 1995).

El operón *coa*, que codifica la producción de coagulina en *B. coagulans*, tiene la misma organización y una elevadísima homología de secuencia que el operón *ped*, presente en al menos 5 cepas de *Pediococcus* y *Lactobacillus* productoras de pediocina PA-1. Sin embargo, no existe homología entre los promotores ni entre las secuencias que flanquean a ambos operones en los plásmidos presentes en los tres géneros bacterianos, lo cual indica que la dispersión de los genes productores de pediocina PA-1 se ha producido hace no mucho tiempo, probablemente por conjugación (Le Marrec et al., 2000; Miller et al., 2005).

El gen *pedA* es el gen estructural y codifica un péptido de 62 aminoácidos, la prepediocina PA-1. El gen de inmunidad, *pedB*, se encuentra inmediatamente a continuación

y codifica una proteína de 112 aminoácidos (ped-im) que está involucrada en la protección de la cepa productora frente a su propia bacteriocina. Y, por último, los genes *pedC* y *pedD* están implicados en el procesado y secreción de la bacteriocina al exterior de la célula (Bukhtiyarova et al., 1994; Marugg et al., 1992).

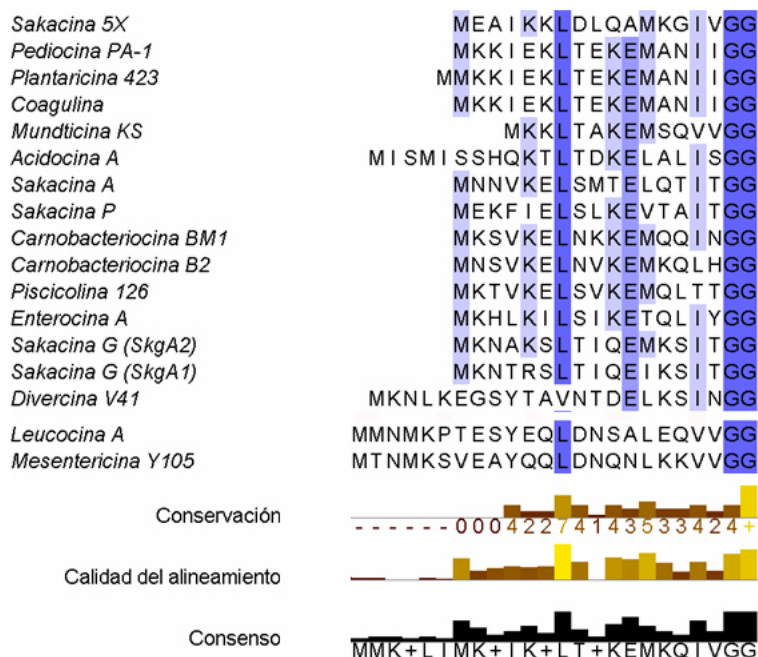
La proteína PedD (724 aminoácidos) pertenece al grupo de transportadores exclusivos del tipo ABC (del inglés, *ATP-Binding Cassette*) y, por lo tanto, interviene en el transporte de la bacteriocina a través de membrana citoplasmática de las células productoras. Su secuencia tiene un elevado grado de homología con las de muchos otros transportadores de tipo ABC (Fath y Kolter, 1993). La proteína PedC (174 aminoácidos), que pertenece al grupo de proteínas accesorias requeridas en los procesos de traslación asociados a transportadores de tipo ABC, es esencial para la secreción de la pediocina PA-1, aunque se desconoce su función exacta. Ambas proteínas, PedD y PedC, son similares a las implicadas en el transporte de la lactococina A en *Lactococcus lactis* y de la hemolisina A en *Escherichia coli* (Bukhtiyarova et al., 1994; Gilson et al., 1990; Håvarstein et al., 1995; Marugg et al., 1992; Stoddard et al., 1992; Venema et al., 1995). Aunque la utilización de transportadores del tipo ABC es muy común entre las bacteriocinas de la clase IIa, un número reducido de bacteriocinas emplean la ruta general de secreción (*sec*), como la enterocina P (Cintas et al., 1997), la enterocina 31 (Tomita et al., 1996) o la bacteriocina T8 (De Kwaadsteniet et al., 2006).

En otros miembros de la clase IIa, los genes encargados de la síntesis, el procesado y la secreción de las bacteriocinas tienen una organización semejante, aunque generalmente algo más compleja. Estos genes están agrupados en uno, dos o tres operones, que generalmente también se localizan en plásmidos, excepto algunos casos (enterocina A, divercina V41, sakacina P y carnobacteriocinas B2 y BM1) en los que se encuentran en el cromosoma bacteriano. La disposición más compleja descrita hasta el momento la tienen las bacteriocinas con regulación transcripcional, en las que los genes se agrupan en tres operones: el primero contiene el gen estructural y el de inmunidad, el segundo los genes de transporte y secreción y el tercero aquellos que intervienen en la autorregulación mediante el fenómeno de percepción de quórum (Ennahar et al., 2000). Para las bacteriocinas que emplean la ruta general de secreción ni siquiera se conoce el número exacto de genes implicados en su producción (Drider et al., 2006).

II.2.3. Biosíntesis y regulación

Todas las bacteriocinas de la clase IIa se sintetizan en forma de precursor o prebacteriocina, en la que la bacteriocina está unida a una secuencia líder N-terminal o péptido señal (de 15 a 30 aminoácidos según la bacteriocina), que es imprescindible para la secreción de la bacteriocina al medio exocelular (Figura II.7). Este líder contiene una secuencia consenso consistente en dos residuos de glicina en su extremo C-terminal, por lo que habitualmente se denominan líderes “doble glicina”. Se considera que estos dos residuos conservados de glicina actúan como una señal de reconocimiento para su procesado y transporte a través de la membrana (Håvarstein et al., 1994; 1995). La secuencia líder de la pediocina PA-1 consta de 14 aminoácidos y muestra una intensa homología con la de otras bacteriocinas. En ciertas posiciones (-4, -7, -12 y -15) siempre se encuentra un aminoácido hidrofóbico mientras que en las posiciones -5, -6 y -11 siempre se disponen residuos hidrofílicos (Figura II.7). Esta similitud entre los líderes doble glicina hace suponer que exista cierta similitud en las proteínas encargadas de su transporte, lo cual permitiría la expresión heteróloga de una bacteriocina de la clase IIa empleando el sistema de transporte de otra bacteriocina relacionada que pudiera ser más eficiente (Ennahar et al., 2000).

Tradicionalmente se ha considerado que una de las dos principales funciones de esta secuencia líder es evitar que la bacteriocina sea biológicamente activa cuando se encuentra en el interior de la célula productora (evitando la interacción de la bacteriocina con la membrana). Así lo confirmaban los resultados obtenidos durante la caracterización del operón de la pediocina PA-1 por Venema et al. (1995). Sorprendentemente, pocos años más tarde se describió que, a diferencia de lo que se observaba en otras bacteriocinas relacionadas, la prepediocina PA-1 tenía casi la misma actividad biológica que la bacteriocina madura (Ray et al., 1999). Estos investigadores postularon que, en ese caso, la célula productora debía disponer de otros mecanismos para defenderse de la acción letal de la prebacteriocina. Entre ellos citan como posibles: un mecanismo rápido y eficiente de translocación de la prebacteriocina al exterior celular, mantener los residuos de cisteína en estado reducido y/o una rápida destrucción por parte de las proteasas intracelulares de las moléculas de prebacteriocina que no se secreten inmediatamente (Ray et al., 1999).

Tipo “doble glicina”:**Tipo ruta general de secreción:**

<i>Enterocina P</i>	MRKKLFLSLALIGIFGLVVTNFGTKVDA
<i>Enterocina SE-K4</i>	MKKKLVKGLV ICGMIGIGFTALGTNVEA
<i>Listeriocina 743A</i>	MKKAALKF I I V I A I L G F S F S F F S I Q S E A

Figura II.7. Alineamiento de las secuencias líder de algunas bacteriocinas de la clase IIa, según el programa ClustalW2 con el editor Jalview 2.2.1. La intensidad del color azul muestra el porcentaje de identidad de los residuos en las distintas secuencias.

La segunda función asignada a esta secuencia líder es la de proporcionar la señal de reconocimiento al sistema de transporte de la bacteriocina. Como se ha indicado anteriormente, el transporte y procesado de las bacteriocinas que poseen un líder doble glicina se realiza mediante transportadores dedicados del tipo ABC y sus proteínas accesorias. Puesto que en la misma célula se pueden encontrar simultáneamente varios transportadores ABC, la presencia de una secuencia de reconocimiento específica es fundamental para asegurar que el transporte eficaz de la bacteriocina por su transportador específico (Drider et al., 2006).

Los transportadores ABC son una superfamilia de proteínas dedicadas a la secreción de diversas sustancias que tienen en común la presencia de un gran dominio de 200 aminoácidos en el extremo C-terminal, que se caracteriza por ser muy hidrofílico y estar muy conservado, donde se une el ATP. Además, los transportadores ABC encargados del

transporte y secreción de bacteriocinas que poseen un líder doble glicina forman una pequeña subfamilia con un alto grado de homología en sus extremos, siendo ambos fundamentales para su actividad. En el extremo N-terminal se encuentra un dominio citosólico (de unos 150 aminoácidos) con actividad proteolítica encargado de separar el líder de la bacteriocina por el lugar adyacente al motivo Gly-Gly y liberar la bacteriocina madura. En este extremo N-terminal se han identificado dos motivos conservados: el motivo “*cisteína*” (QX₄D/ECX₂AX₃MX₄Y/FGX₄I/L) y el motivo “*histidina*” (HY/FY/VVX₁₀I/LXDP) donde se encuentran dos aminoácidos implicados en la actividad tiol proteinasa (Håvarstein et al., 1995). La intervención de este dominio N-terminal de PedD en la eliminación del líder de la pediocina PA-1 por proteólisis intracelular fue demostrada por Venema et al. (1995). La región que existe entre ambos extremos de estos transportadores ABC tiene una secuencia aminoacídica menos conservada y forma el dominio transmembrana (Håvarstein et al., 1995). La topología de membrana de PedD parece similar a la de LcnC, que posee cuatro segmentos transmembránicos en vez de los seis típicos en otros transportadores ABC (Franke et al., 1996).

Por último, para la secreción y el transporte de la pediocina PA-1 a través de la membrana se requiere la proteína accesoria PedC. Por analogía con la proteína accesoria HlyD, que se extiende entre las dos membranas de *E. coli* formando un canal para la secreción de la hemolisina A (Schüleín et al., 1992), Venema et al. (1995) especularon que PedC estaría involucrada en la formación de canales entre la membrana plasmática y la pared celular de las células productoras de pediocina PA-1. Franke (1998) ha postulado un papel similar para LcnD, la proteína accesoria de la lactococina A.

El trabajo de Håvarstein et al. (1995) con el péptido α de la lactococina G demostró que la secreción de ésta y otras bacteriocinas, entre las que se incluye la pediocina PA-1, es un proceso bifásico. En primer lugar, el dominio proteolítico de PedD se une a la prepediocina, desencadenando la hidrólisis del ATP que induce cambios conformacionales en el transportador. La hidrólisis de la secuencia líder en el lado citosólico de la membrana se acompaña del transporte de la bacteriocina a través del complejo formado por el dominio transmembránico de PedD y PedC en la membrana citoplasmática.

II.2.4. Espectro antimicrobiano

La producción de bacteriocinas es una característica muy extendida y conservada entre las bacterias. Esto indica que es un rasgo ventajoso para la bacteria productora, ya que le permite adquirir una posición dominante en un determinado nicho ecológico al eliminar a otras bacterias competidoras (Deegan et al., 2006). A diferencia de las bacteriocinas de la clase I, que tienen un espectro de acción bastante amplio, en la clase II suele ser más limitado. Una de las posibles razones quizá sea la necesidad de un receptor en la bacteria sensible. Sin embargo, la pediocina PA-1 puede considerarse una excepción porque es activa frente a un número nada despreciable de bacterias Gram-positivas relacionadas (Tabla II.2), como algunas especies de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium* o *Enterococcus*. Además, también tiene actividad frente a otras bacterias Gram-positivas más lejanas filogenéticamente, entre las que se encuentran algunas causantes de toxiinfecciones alimentarias y/o alterantes de los alimentos, como *Bacillus*, *Brochotrix*, *Clostridium*, *Listeria* y *Staphylococcus* (Ennahar et al., 2000). Es preciso aclarar que la sensibilidad depende de la especie e incluso de la cepa. Merece la pena destacar que las mismas concentraciones de esta bacteriocina no tienen ningún efecto en diversas especies que frecuentemente forman parte de cultivos iniciadores, como las del género *Lactococcus* (Eijsink et al., 1998; Guyonnet et al., 2000). Sin embargo, hasta el momento, uno de los rasgos que más se destacan de la pediocina PA-1, así como de otras bacteriocinas de la clase IIa, es su intensa actividad frente a *L. monocytogenes* (Muriana, 1996). En la Tabla II.2 se indica el espectro antimicrobiano de la pediocina PA-1 según han indicado diversos autores.

Con respecto a las bacterias Gram-negativas, sus cubiertas celulares impiden el acceso de las bacteriocinas a la membrana plasmática. Sin embargo, es suficiente alterar la permeabilidad de sus membranas externas para permitir la acción antibacteriana de las bacteriocinas. Uno de los ejemplos más clásicos es el empleo del quelante EDTA, que une iones magnesio del lipopolisacárido y altera la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, permitiendo el paso de las bacteriocinas (Stevens et al., 1991). Este modo de acción también explica que las bacterias Gram-negativas sean sensibles a las bacteriocinas después de haber sido sometidas a algunos nuevos métodos de conservación que debilitan o forman poros en sus cubiertas celulares, como las altas presiones hidrostáticas (Kalchayanand et al., 1998).

Tabla II.2. Espectro antimicrobiano de la pediocina PA-1^a

Bacterias Gram-positivas	
Células vegetativas	
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Lactobacillus leichmanni</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Brochotrix thermosphacta</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>
<i>Carnobacterium divergens</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
<i>Carnobacterium piscicola</i>	<i>Lactobacillus viridescens</i>
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ^c
<i>Clostridium divergens</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Clostridium laramiae</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Listeria innocua</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Listeria ivanovii</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Lactobacillus bifermmentum</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i> ^d
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Esporos	
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	
<i>Clostridium botulinum</i> tipo E	
<i>Clostridium laramiae</i>	
Bacterias Gram-negativas^b	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
<i>Pseudomonas putida</i>	
<i>Salmonella typhimurium</i>	
<i>Salmonella anatum</i>	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	

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

^bTras ser sometidas a tratamientos subletales

^cHay algunas cepas sensibles, aunque la mayoría son resistentes

^dCepas no productoras de pediocina PA-1

Es muy difícil comparar la actividad de unas bacteriocinas con otras porque, aunque se han realizado muchos ensayos, las condiciones empleadas son difícilmente comparables. Por otra parte, a pesar de la homología entre las secuencias de las bacteriocinas de la familia de la pediocina, existe variabilidad tanto en la especificidad de las bacterias sensibles como en la intensidad de su actividad (Eijsink et al., 1998; Fimland et al., 1996; Richard et al., 2006).

Este hecho se ha relacionado con las diferencias que existen en las secuencias de estas bacteriocinas (Johnsen et al., 2005). Al comparar la actividad antimicrobiana de cuatro bacteriocinas puras de la clase IIa (pediocina PA-1, enterocina A, sakacina P y curvacina A) frente a un amplio espectro de microorganismos indicadores se puso de manifiesto que las dos primeras eran las que inhibían a un mayor número de cepas y las que tenían valores de concentraciones inhibitorias mínimas más bajos (Eijsink et al., 1998).

Posteriormente, Guyonnet et al. (2000) confirmaron estos resultados al comparar la actividad de seis bacteriocinas purificadas pertenecientes a la clase IIa. De nuevo, la pediocina PA-1 y la enterocina A, junto con la divercina V41, fueron las más activas frente a *Listeria ivanovii*. La característica común de estas tres bacteriocinas es la posesión de dos puentes disulfuro, mientras que las bacteriocinas con menor actividad tienen tan sólo uno. Más recientemente, Richard et al. (2006) estudiaron la acción inhibitoria de ocho miembros de la clase IIa empleando la misma técnica analítica y 23 bacterias Gram-positivas como microorganismos indicadores. En seis de las ocho bacteriocinas ensayadas (pediocina PA-1, enterocina P, curvacina A, sakacina A, mesentericina Y105 y bavaricina A) se confirmó que su espectro de actividad era relativamente amplio. Probablemente el resultado más destacable de este vasto estudio sea, precisamente, la comprobación de que existe una fuerte correlación entre la intensidad de la actividad inhibitoria y la presencia de un puente disulfuro en el extremo C-terminal de la molécula de la bacteriocina. Con la única excepción del pI, ningún otro parámetro físico-químico ni la estructura primaria de las bacteriocinas (número de aminoácidos en la bacteriocina madura, masa molecular, número de residuos cargados positiva o negativamente y carácter alifático o hidrofóbico) influía en la actividad inhibitoria de la bacteriocina. Este segundo puente disulfuro es muy importante para la estabilización de la estructura secundaria del extremo C-terminal, así como para reconocer el receptor y determinar la especificidad de acción (Fimland et al., 1996; Kaur et al., 2004).

Para muchas aplicaciones, por ejemplo controlar la microbiota alterante en un producto cocido y envasado, generalmente es más conveniente que las bacteriocinas tengan actividad frente a un amplio espectro de bacterias. En cambio, en algunos casos concretos puede interesar lo contrario, como por ejemplo en productos lácteos fermentados, en cuyo caso es interesante que la bacteriocina no disminuya la actividad del cultivo iniciador. En

estos casos, el empleo de pediocina PA-1 resulta muy interesante porque no tiene actividad frente a la mayor parte de las cepas de *Lactococcus*.

II.2.5. Modo de acción

El modo de acción de la pediocina PA-1 en las bacterias sensibles es bactericida y se debe a la permeabilización de la membrana como consecuencia de la formación de poros. Pero no todas las bacteriocinas tienen el mismo modo de acción. Así, por ejemplo, la nisina no se limita a formar poros, sino que su mecanismo de acción incluye también la inhibición de la biosíntesis de la pared celular gracias a su capacidad de unir el lípido II y la inducción de autólisis, entre otros. Esta multiplicidad de acción de la nisina, y otras bacteriocinas relacionadas, hace que sea muy efectiva incluso a concentraciones ínfimas (nM) (Hèchard y Sahl, 2002; Patton y van der Donk, 2005).

Las bacteriocinas de la clase IIa, en cambio, actúan fundamentalmente mediante la formación de complejos de poración por los que se pierden algunos componentes intracelulares: iones, aminoácidos y otros compuestos de bajo peso molecular (Deegan et al., 2006). Como consecuencia se disipa la fuerza protón-motriz, reduciéndose o perdiéndose totalmente el potencial eléctrico transmembrana ($\Delta\Psi$) y el gradiente de protones (ΔpH), como se ha comprobado para la pediocina PA-1 y otras bacteriocinas relacionadas (Bhunja et al., 1991; Chen y Montville, 1995; Chikindas et al., 1993; Jack et al., 1995). Todos aquellos procesos celulares que requieren energía, como por ejemplo la síntesis de ATP y algunos sistemas de transporte, resultan profundamente afectados. Sin embargo, y a diferencia de los lantibióticos, la pediocina PA-1 no provoca la salida de ATP hacia el exterior celular, aunque sí un rápido agotamiento de las reservas intracelulares al intentar la célula sensible recuperar la fuerza protón-motriz (Chen y Montville, 1995).

La permeabilización de la membrana mediada por las bacteriocinas se lleva a cabo en tres etapas: unión a la membrana, inserción y agregación de monómeros para formar complejos de poración. Los primeros estudios sobre el modo de acción de la pediocina PA-1 sugirieron que para su actividad *in vivo* era necesaria la presencia de un receptor específico en la membrana de la bacteria sensible (Chikindas et al., 1993; Venema et al., 1995). Estudios posteriores demostraron que la unión inicial de la pediocina PA-1 a la membrana era

inespecífica y sin intervención del motivo consenso YGNGV/L, presente en todas las bacteriocinas de la familia de la pediocina (Chen et al., 1997a). Dicha unión inicial estaría mediada por interacciones electrostáticas entre los residuos de aminoácidos cargados positivamente en la bacteriocina y los fosfolípidos presentes en la membrana de dicho microorganismo, siendo esencial para esa unión el carácter aniónico de los lípidos (Chen et al., 1997a; 1997b). La observación de que la pediocina PA-1 no sólo es capaz de permeabilizar vesículas de lípidos obtenidos de *L. monocytogenes*, sino también vesículas de fosfolípidos puros, parecía reforzar la idea de que no era necesario un receptor proteico. Por otra parte, la presencia de ácido lipoteicoico, que se caracteriza por tener una fuerte carga negativa, 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. Sin embargo, Fimland et al. (1998) mostraron claramente que un fragmento sintético de 15 residuos de aminoácidos del extremo C-terminal de la pediocina PA-1 inhibía su actividad y la de otras bacteriocinas relacionadas. Estos investigadores sugirieron que este fragmento competía con las bacteriocinas por un receptor en las células sensibles.

Los estudios realizados con mutantes de *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis* resistentes a las bacteriocinas de la clase IIa han proporcionado mucha información sobre el modo de actuación de estas bacteriocinas a nivel molecular. Los primeros resultados obtenidos indicaron que el gen *rpoN* estaba implicado en la sensibilidad de estas bacterias, ya que los mutantes en este gen en ambas especies tenían un fenotipo resistente a bacteriocinas de la clase IIa. El gen *rpoN* codifica la subunidad σ^{54} de la RNA polimerasa, un factor sigma alternativo que controla la transcripción de un grupo de genes, que tienen un promotor distinto del habitual. Es decir, los resultados obtenidos indicaban que el gen *rpoN* controlaba la expresión de la molécula a la que se unían las bacteriocinas de la clase IIa (Robichou et al., 1997; Dalet et al., 2000). La resistencia a las bacteriocinas de la clase IIa también se conseguía en *L. monocytogenes* y *E. faecalis* mediante mutaciones en el operón *mpt*, que codifica una permeasa específica de manosa (EII_t^{Man}) del sistema de fosfotransferasa de azúcares dependiente de fosfoenolpirúvico (PTS) (Gravesen et al., 2002). La expresión del operón *mpt* no depende del factor sigma más habitual (σ^{70}) sino de σ^{54} , en concordancia con los resultados obtenidos anteriormente. La permeasa EII_t^{Man} de *L. monocytogenes* está formada por tres subunidades: IIAB, que se encuentra en el lado citoplasmático y está implicada en la fosforilación del azúcar que se va a transportar, y IIC y IID, que se encuentran

inmersas en la membrana y son las encargadas del transporte del azúcar de un lado a otro de la membrana. Curiosamente, el nivel de expresión del operón *mpt* está estrechamente relacionado con la sensibilidad a la bacteriocina (Dalet et al., 2001; Hèchard et al., 2001). Aunque los primeros resultados se obtuvieron con la mesentericina Y105 y la leucocina A, al estudiar en profundidad los mecanismos de resistencia de *Listeria* se ha indicado que este rasgo podría hacerse extensivo a otras bacteriocinas de la clase IIa (Dalet et al., 2001; Gravesen et al., 2002; Ramnath et al., 2000). De hecho, la resistencia de *Listeria* a las bacteriocinas de la clase IIa supone un coste energético ya que lleva aparejado una menor actividad de las enzimas encargadas del transporte de la glucosa y suelen mostrar una menor velocidad de crecimiento (Dykes y Hastings, 1998; Naghmouchi et al., 2007; Vadyvaloo et al., 2002). En la Figura II.8 se muestra cómo se podría producir la interacción de una bacteriocina de la clase IIa con la permeasa de la manosa.

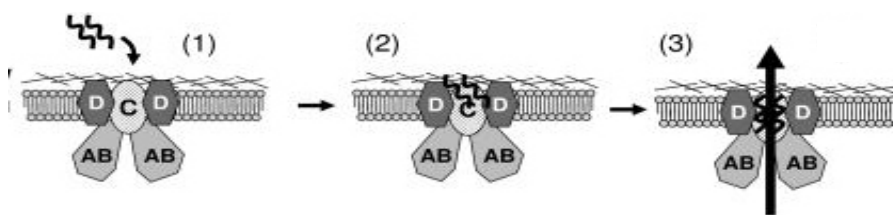


Figura II.8. Representación esquemática de la interacción de una bacteriocina de la clase IIa con el receptor, la permeasa específica de manosa (EII_t^{Man}) que consta de tres subunidades IIAB (en el lado citosólico de la membrana) y IIC y IID (inmersas en la bicapa lipídica). La bacteriocina se une a la subunidad IIC y dispara la permeabilización de la bacteria, provocando finalmente la muerte celular. La bacteriocina está representada como una línea ondulada. Adaptado de Diep et al. (2007).

La expresión de distintas combinaciones de los tres genes del operón *mpt* de *L. monocytogenes* en una cepa de *Lactococcus lactis* resistente a varias bacteriocinas de la clase IIa permitió comprobar que basta con la expresión del gen *mptC* (que codifica la subunidad IIC de la permeasa EII_t^{Man}) para inducir sensibilidad a ese tipo de bacteriocinas (en concreto, la leucocina A, la enterocina A y la pediocina PA-1). El efecto observado no se podía atribuir a una alteración de la membrana ocasionada por la presencia de las proteínas inducidas (Ramnath et al., 2004). Otros investigadores, en cambio, si han encontrado modificaciones en la composición lipídica de la membrana celular en variantes de *L. monocytogenes* y en la

fluidez de la membrana de cepas de *L. innocua* resistentes a bacteriocinas de clase IIa (Naghmouchi et al., 2007).

Con respecto a los complejos de poración, el modelo más aceptado sugiere que las estructuras de hélice α de las bacteriocinas se dispondrían atravesando la membrana de las bacterias sensibles como si fueran las duelas de un barril (Figura II.9). El lado hidrofóbico de las hélices α interaccionaría con las cadenas de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana y el lado hidrofílico formaría parte del canal del poro. Sin embargo, no se descarta que las moléculas de bacteriocina pudieran disponerse sobre la superficie de la membrana, como una alfombra, interfiriendo con su organización bicapa (Moll et al., 1999). No existen datos concluyentes sobre la arquitectura ni la estequiometría exactas ni si se producen interacciones entre las moléculas de bacteriocina que se encuentran en la membrana.

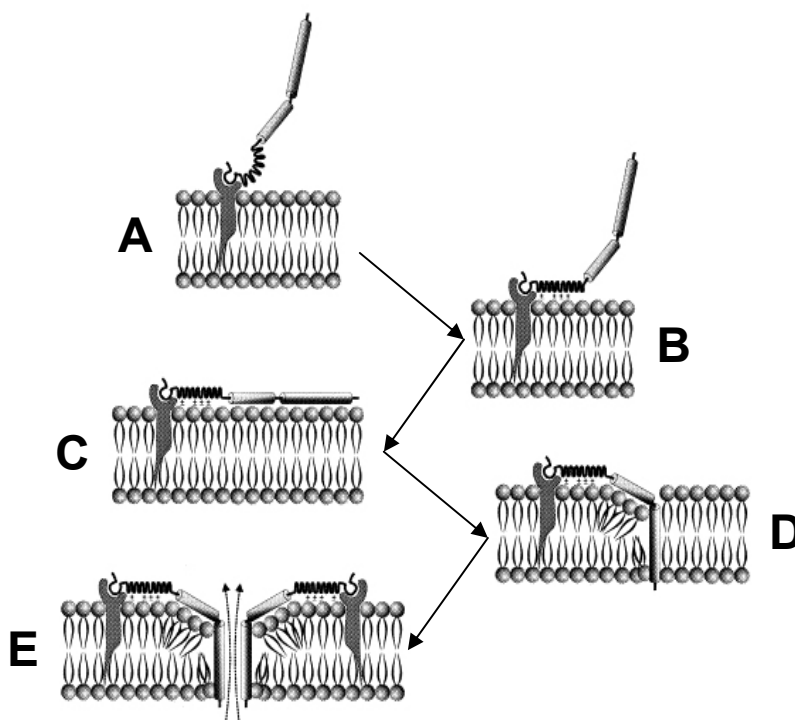


Figura II.9. Representación esquemática de la interacción de las bacteriocinas de la clase IIa con la membrana plasmática de las células sensibles hasta formar un poro hidrofílico. A. Reconocimiento del receptor. B. Interacción electrostática con la membrana citoplasmática. C. Interacción hidrofóbica. D. Reorientación e inserción de la bacteriocina en la bicapa lipídica. E. Agregación y formación del poro que permite la salida de componentes intracelulares. Las partes sombreadas de la bacteriocina se corresponden con las zonas hidrofóbicas, mientras que las claras lo hacen con las hidrofílicas. Adaptado de Ennahar et al. (2000).

La pediocina PA-1 actúa sinérgicamente con otras bacteriocinas de la clase I (nisina, lacticina 481), de la subclase IIb (lactacina F) y de la clase III (lactacina B) (Hanlin et al., 1993; Mulet-Powell et al., 1998; Naghmouchi et al., 2007). Curiosamente, la lacticina 481, que muestra un marcado carácter sinérgico cuando se combina con 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 clase IIa, como la enterocina A, la curvacina A y la sakacina P, lo cual es lógico ya que todas las bacteriocinas de esta subclase tienen una gran similitud en cuanto a su estructura y modo de acción (Eijsink et al., 1998).

También se ha constatado acción sinérgica de tres bacteriocinas de la familia de la pediocina (curvacina A, pediocina PA-1, sakacina P) con la pleurocidina, un péptido antimicrobiano de síntesis ribosomal pero de origen piscícola (Cole et al., 1997). La pleurocidina es capaz de permeabilizar la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, permitiendo así el acceso de las bacteriocinas a la membrana interna. Es decir, ésta podría ser una alternativa para aumentar el espectro de bacterias sensibles a las bacteriocinas. Estos péptidos antimicrobianos de origen eucariota se diferencian de las bacteriocinas por tener un espectro de acción más amplio, que incluye tanto a microorganismos Gram-positivos como Gram-negativos. Sin embargo, dicha acción requiere emplear concentraciones mucho mayores, aproximadamente de un orden de magnitud. Estos péptidos no tendrían interés en la práctica porque, además, su producción tiene un elevado coste ya que la fuente natural de producción no es rentable y la síntesis química automatizada sería muy costosa.

II.2.6. Inmunidad de las células productoras

Uno de los aspectos más desconocidos de las bacteriocinas es la protección de las células productoras frente a sus propias bacteriocinas. En general, la expresión de las bacteriocinas de la clase IIa se acompaña de la de una proteína de inmunidad, codificada en un gen contiguo. La protección que proporciona esta proteína de inmunidad a la célula productora de la bacteriocina suele ser bastante específica, ya que sólo es extensible a otras bacteriocinas muy relacionadas con la que produce la propia bacteria. Esta especificidad se ha atribuido a la escasa homología que existe entre las proteínas de inmunidad de las bacteriocinas de la clase IIa y que contrasta con la elevada homología que se observa entre las

secuencias de las bacteriocinas correspondientes (Aymerich et al., 1996; Drider et al., 2006; Eijsink et al., 1998). Hasta el momento, y dentro del grupo de las bacteriocinas de la clase IIa, se ha identificado la secuencia de unas supuestas 20 proteínas de inmunidad, que se pueden agrupar claramente en función de su homología (Drider et al., 2006). Tienen entre 88 y 115 aminoácidos, de los cuales entre el 25 y el 30% son residuos cargados, lo que confiere a la molécula un fuerte carácter hidrofílico. Por ello se consideran proteínas citosólicas, habiéndose confirmado que su interacción con la membrana, cuando se produce, es relativamente débil (Johnsen et al., 2004).

En las bacterias productoras de pediocina PP-1, que se diferencia de la pediocina PA-1 en tan solo un aminoácido, se ha purificado y cristalizado la proteína de inmunidad PedB para determinar su estructura tridimensional y compararla con la de las proteínas de inmunidad de la carnobacteriocina B2 (ImB2) y de la enterocina A (EntA-im) (Kim et al., 2007). Curiosamente, y a pesar de la escasa homología de las secuencias, las tres son proteínas globulares y comparten la misma estructura tridimensional: un dominio compacto formado por un manojo de cuatro hélices α antiparalelas unidas entre sí mediante unos pequeños bucles de 4 a 7 aminoácidos. Esta estructura está estabilizada por las interacciones hidrofóbicas que se establecen entre las hélices α , que forman un núcleo de carácter hidrofóbico en el centro de la proteína, quedando los residuos hidrofílicos y cargados en el exterior (Kim et al., 2007). Esta disposición concuerda con que la proteína de inmunidad tenga una localización citosólica. La predicción de la estructura de otras proteínas de inmunidad apunta fuertemente a que esta estructura de cuatro hélices α está muy conservada en las bacteriocinas de la clase IIa. Las principales diferencias se encuentran en el extremo C-terminal, donde se encuentran precisamente varios aminoácidos polares y cargados, sin una estructura claramente definida en algunos casos, que podrían estar implicados en el reconocimiento específico de la bacteriocina correspondiente (Kim et al., 2007). Estudios realizados con proteínas de inmunidad híbridas ya habían señalado que ese extremo de la molécula reconoce el extremo C-terminal de la bacteriocina y es el responsable de la especificidad de la inmunidad (Johnsen et al., 2004 y 2005). Sin embargo, no parece haber una interacción directa entre la proteína de inmunidad y su bacteriocina. La bacteriocina está embebida en la membrana, mientras que la proteína de inmunidad sólo puede interactuar con los lípidos polares de la superficie de la membrana, una disposición que dificulta la interacción entre la proteína de inmunidad y la bacteriocina (Johnsen et al., 2004; Fimland et al., 2005; Kim et al., 2007).

Aunque no se conoce con detalle el modo de acción de las proteínas de inmunidad de las bacteriocinas de la clase IIa, si se sabe que para ejercer la protección han de producirse intracelularmente. La adición extracelular de la bacteriocina y de la proteína de inmunidad a células sensibles no ejerce ninguna protección (Kim et al., 2007). La ausencia de interacción directa entre la bacteriocina y la proteína de inmunidad ha sugerido la existencia de un mediador que impida la actividad de la bacteriocina. Este mediador podría ser la propia membrana o un componente presente en ella. Se ha postulado que la proteína de inmunidad podría interactuar con el poro formado por la bacteriocina, impidiendo la salida de componentes intracelulares. Otra posibilidad es que la proteína de inmunidad interactúe con el receptor de la bacteriocina, alterando su conformación o escondiendo el sitio de unión. Recientemente se ha comprobado que EntiP, SaiA y LciA, las proteínas de inmunidad de varias bacteriocinas de la clase II (enterocina P, sakacina A y lactococina A, respectivamente) forman complejos con los componentes IIC y IID de EII_t^{Man} , pero sólo cuando la bacteriocina correspondiente también forma parte del complejo (Diep et al., 2007). La propuesta que se deriva de estas observaciones es que, en las bacteriocinas de clase II, la proteína de inmunidad interactúa directamente con el complejo receptor-bacteriocina y bloquea los pasos posteriores que dan lugar a la permeabilización de la membrana y, por último, a la muerte celular (Diep et al., 2007) (Figura II.10). Sin embargo, es difícil explicar la especificidad de la inmunidad si todas las bacteriocinas de la clase IIa interactúan con el mismo receptor (Drider et al., 2006).

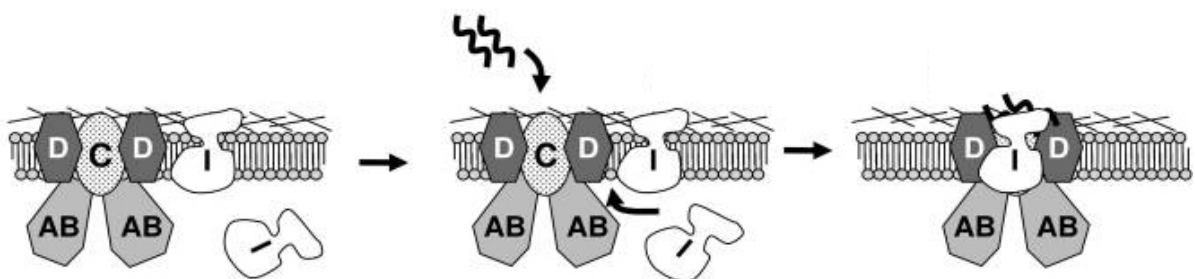


Figura II.10. Modelo de inmunidad propuesto para bacteriocinas de la clase II. A. En las células inmunes, y en ausencia de bacteriocina, la proteína de inmunidad (I) no tiene una asociación especial con EII_t^{Man} . B. Cuando hay bacteriocina en el medio extracelular, la proteína de inmunidad se aproxima y une fuertemente a las proteínas IIC y IID de EII_t^{Man} (receptor de la bacteriocina) C. El complejo bacteriocina-proteínas IIC y IID-proteína de inmunidad impide la muerte celular. Fuente: Diep et al. (2007).

Por otra parte, se ha descrito la existencia de varios genes de inmunidad, sin relación aparente con la producción de una determinada bacteriocina, que podrían contribuir a reforzar la autoprotección de las células productoras (Drider et al., 2006). Otros factores como, por ejemplo, la presencia de proteasas con capacidad para degradar la bacteriocina también podrían contribuir a la autoinmunidad de las células productoras.

II.2.7. Aplicación de la pediocina PA-1 en los alimentos

La aplicación de bacteriocinas en los alimentos debe considerarse en el contexto de las características de la sociedad actual y de lo que ésta demanda a la industria alimentaria. El consumidor exige disponer de alimentos seguros, nutritivos y de la mayor calidad organoléptica posible, siendo eso uno de los objetivos prioritarios de la industria alimentaria. Para ello, y entre otras disposiciones, pone en práctica numerosas medidas para prevenir o reducir la presencia de microorganismos indeseables, como establecen los planes de APPCC. Sin embargo, y a pesar de ello, en algunas ocasiones se producen brotes de toxiinfecciones de origen alimentario. Por lo tanto, para la industria alimentaria sería deseable disponer de mejores alternativas para controlar el desarrollo de microorganismos patógenos, sobre todo teniendo en cuenta que progresivamente la distribución de los productos alimenticios se ha ido prolongando en el espacio y en el tiempo. La industria alimentaria también ha de reducir las elevadas pérdidas económicas que se producen como consecuencia de la alteración indeseable de los productos elaborados y, en la medida de lo posible, los costes de procesado. Todo ello implica, en cierta medida, no sólo extremar las precauciones siguiendo unas buenas prácticas de fabricación, sino también emplear métodos de conservación eficaces que aseguren la más alta calidad microbiológica de los alimentos.

Por otra parte, la industria alimentaria también debe atender otras demandas de los consumidores, que quieren alimentos procesados que no requieran mucho tiempo para su preparación, pero que sean seguros, tengan una buena calidad nutritiva y organoléptica, una vida útil larga y, al mismo tiempo, aspecto de “frescos”. Dicho de otra forma, los consumidores desean que sus productos hayan sufrido un procesado mínimo y no contengan conservantes “artificiales”. Es decir, hay un claro contraste entre algunas demandas de los consumidores y lo que ha de poner en práctica la industria alimentaria para asegurar la calidad higiénico-sanitaria de los productos que elabora. La bioconservación, mediada por las

bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, puede ser una posible alternativa para satisfacer a ambas partes. Y, de hecho, es una práctica que se lleva realizando intencionada o inadvertidamente durante siglos (Stiles, 1996). Tampoco se debería olvidar que muchos de los países en vías de desarrollo no tienen acceso generalizado o fácil a ciertos métodos clásicos de conservación de los alimentos, como la aplicación de frío o los tratamientos térmicos. Sería de gran interés para ellos disponer de otros métodos de conservación con menor requerimiento energético. También en este caso la bioconservación, y en concreto las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, sería un método adecuado para mejorar la calidad de los alimentos.

Las bacteriocinas de las bacterias lácticas tienen muchas propiedades que las hacen interesantes para su empleo en la industria alimentaria. Por una parte, no tienen efectos indeseables para nuestra salud, porque carecen de toxicidad, no son activas frente a células eucariotas y son degradadas por las proteasas digestivas por lo que no tienen efecto frente a la microbiota intestinal, como se ha comprobado recientemente con la nisina (Bernbom et al., 2006). Por otra, tienen un espectro de inhibición relativamente amplio, que incluye no sólo a bacterias patógenas sino también a otras alterantes, su modo de acción es bactericida (actuando generalmente en la membrana plasmática) y, por ello, no tienen resistencia cruzada con los antibióticos y, finalmente, son tolerantes a un amplio rango de condiciones de acidez y calor (Gálvez et al., 2007).

El principal interés que tiene la aplicación de pediocina PA-1 en los alimentos deriva de su intensa actividad frente a *L. monocytogenes*. Aunque este microorganismo no es la primera causa de toxiinfección alimentaria (en Europa la incidencia anual oscila entre 2 y 10 casos por millón), hay que destacar que si lo es en cuanto a tasa de hospitalización (alrededor del 90%) y de mortalidad (entre el 20 y el 30%) en sus brotes, especialmente entre ancianos, niños, embarazadas y otros adultos inmunodeprimidos. La Comisión Científica sobre Riesgos Biológicos (BIOHAZ) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ha indicado recientemente que el número de casos de listeriosis en Europa ha aumentado desde el año 2000 (con 1.583 casos y un 8% de mortalidad en 2006). El grupo más vulnerable es el de los adultos de más de 60 años. La mayoría de los casos descritos están asociados al consumo de platos preparados, especialmente con productos cárnicos, y queso en los que *L. monocytogenes* se había multiplicado a lo largo de la vida útil del producto. Esta comisión

advierte que la industria alimentaria no sólo debe observar el cumplimiento del criterio microbiológico (ausencia en 25 g de producto o ≤ 100 ufc/g, dependiendo del alimento, en el momento del consumo), sino que debe hacer énfasis en reducir al mínimo la contaminación inicial de los productos y la multiplicación de *L. monocytogenes* durante la vida útil de los mismos (EFSA, 2007b).

L. monocytogenes se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, incluyendo las materias primas alimentarias, y destaca por su extraordinaria resistencia a condiciones ambientales desfavorables. Puede crecer en un amplio rango de pH (entre 4,1 y 9,6) y de temperatura (entre 1 y 45°C), en aerobiosis y anaerobiosis, en presencia de alta concentración de sal y a baja a_w (hasta 0,9) y, además, tiene capacidad para formar biofilms (Gandhi y Chikindas, 2007). Todas estas características hacen que *L. monocytogenes* sea un grave problema en la seguridad alimentaria a nivel mundial. Tanto es así que la legislación alimentaria en algunos países, como por ejemplo EE UU, ha establecido para los alimentos más críticos (como los platos preparados) el nivel de tolerancia cero, aunque hay propuestas para aumentarlo a 100 ufc/g en aquellos productos en los que no se pueda multiplicar (Gandhi y Chikindas, 2007).

II.2.7.1 Adición de pediocina PA-1 o de un fermentado que la contenga

En general, las bacteriocinas en la industria alimentaria se pueden emplear añadiéndolas en forma más o menos purificada, como un fermentado o mediante la inclusión del cultivo productor de la bacteriocina (Stiles, 1996). En el caso de añadir la bacteriocina purificada, a efectos legislativos, se necesita la correspondiente autorización para su uso como conservante. Hasta el momento la única bacteriocina cuyo uso está autorizado en más de 50 países es la nisina producida por *Lactococcus lactis*. Su empleo en alimentos está aprobado por la OMS desde 1969, en la Unión Europea se incluyó como conservante alimentario (E234) en 1983 y la FDA de EE UU la aprobó en 1988 (EFSA, 2006). Un estudio reciente realizado con ratas colonizadas con microflora intestinal humana ha demostrado que la ingestión de nisina no altera de forma indeseable el perfil de la microbiota intestinal. Además, la nisina administrada por vía oral se degradaba o inactivaba durante su tránsito por el intestino (Bernbom et al., 2006).

Los productos alimenticios en los que se puede utilizar nisina en la UE son postres a base de semolina y tapioca (3 mg/kg), queso fundido y queso curado o madurado (12,5 mg/kg) y, por último, queso *Mascarpone* y *clotted cream* (10 mg/kg), según se recoge en el RD 142/2002. En otros países, la nisina se emplea, sobre todo, para la conservación de quesos procesados y conservas vegetales, aunque también se ha descrito su aplicación en productos cárnicos, huevo líquido, hielo para la conservación del pescado fresco, alimentos infantiles, productos de panadería, mayonesa, cerveza y vino (Delves-Broughton, 2005). Los preparados que la contienen reciben distintas denominaciones comerciales como, por ejemplo, Nisaplin™ y Novasin® (Danisco), Crisin® (Chr. Hansen) o NisinPro (ChiHonBio).

El coste económico de la obtención de bacteriocina purificada y, sobre todo, la dificultad de conseguir la autorización legal para su empleo en esa forma hace que esta opción no sea muy atractiva para el resto de las bacteriocinas. La segunda opción consiste en añadir un fermentado que contenga la bacteriocina. Así, por ejemplo, la empresa canadiense *Quest* fue la primera en comercializar el ALTA 2341, un fermentado que contenía pediocina PA-1. Actualmente los productos ALTA™ (ALTA 1701, 2351 y 2345), comercializados por Kerry Bio-Sciences (Irlanda), consisten en fermentados de un cultivo iniciador de un *P. acidilactici* productor de pediocina, y están recomendados especialmente para productos cárnicos y lácteos. Estos preparados tienen como ventaja, desde el punto de vista legal, que se pueden emplear como ingredientes, puesto que alguno de los componentes del fermentado puede aportar alguna funcionalidad al alimento. Además, en estos fermentados la actividad de la bacteriocina cuenta con la ayuda adicional de otros metabolitos, que también tienen actividad antibacteriana y son producidos por las bacterias lácticas durante la fermentación como, por ejemplo, los ácidos orgánicos (Gálvez et al., 2007). El fermentado ALTA 1701, por ejemplo, contiene ácido propiónico procedente de una fermentación propiónica adicional.

El primer ensayo realizado para comprobar la utilidad de la pediocina PA-1 en un sustrato alimenticio fue realizado por Pucci et al. (1988) en un producto lácteo. En ese momento era una idea atractiva, teniendo en cuenta que poco tiempo antes se habían desarrollado varios brotes de listeriosis asociados al consumo de distintos tipos de queso. Estos investigadores comprobaron que la adición de un fermentado conteniendo pediocina PA-1 permitía controlar de una manera eficaz el desarrollo de *L. monocytogenes* en alimentos ácidos mantenidos en refrigeración. La pediocina PA-1 tenía un efecto bactericida rápido (<24

h) y mantenía un bajo recuento de *Listeria* durante la primera semana de almacenamiento a 4°C, aunque a partir del séptimo día la población de *Listeria* aumentaba (Pucci et al., 1988). Esta rapidez de actuación de la pediocina PA-1 frente a *Listeria* fue corroborada por diversos investigadores en varios sustratos lácteos y cárnicos (carne de ternera, salchichas, queso “Cottage”, helado y leche en polvo reconstituida) (Degnan et al., 1993; Motlagh et al., 1992b). En algunos casos, al minuto y medio de añadir la bacteriocina ya era evidente que la población de *L. monocytogenes* se reducía en 2 ciclos logarítmicos (Degnan et al., 1993). Además, se puso de manifiesto que la acción de la bacteriocina dependía de su concentración y, sobre todo, de la cepa diana, ya que la misma cantidad de pediocina PA-1 (1350 unidades arbitrarias/ml) reducía la población de *L. monocytogenes* ScottA, *L. monocytogenes* Ohio2 y *L. ivanovii* ATCC 19119 en 1, 3 y 7 ciclos logarítmicos, respectivamente (Motlagh et al., 1992b).

Poco tiempo después, se probó la eficacia de la pediocina PA-1 frente a microorganismos alterantes (*Clostridium laramiae*, *Lactobacillus* spp. y *Leuconostoc*) en sustratos cárnicos (Kalchayanand, 1990). En ese estudio, la combinación de pediocina PA-1 con el envasado al vacío y la refrigeración logró reducir durante 12 semanas el número de bacterias alterantes en carne de ternera (Kalchayanand, 1990). Casi al mismo tiempo, se evaluó la utilidad de la pediocina PA-1 frente a *L. monocytogenes* en una muestra de carne de ternera irradiada y refrigerada (5°C). La acción de la bacteriocina redujo la población de *Listeria* entre 1 y 2 ciclos logarítmicos, manteniéndose en esos niveles durante 28 días (Nielsen et al., 1990).

En los estudios realizados hasta el momento, la pediocina PA-1 es muy efectiva inmediatamente después de su adición, como ya se ha mencionado, pero pierde su actividad antimicrobiana con el tiempo. Esta pérdida se ha atribuido en los productos cárnicos, al menos en parte, a su degradación por las proteasas de la carne o a la adsorción a las proteínas o a la grasa (Murray y Richard, 1997). Para aumentar el potencial de su aplicación en este tipo de productos, se ha propuesto su encapsulación en liposomas o su adición junto con un emulgente como, por ejemplo, el Tween 80 como modo de protección de la bacteriocina (Degnan et al., 1993). Por otra parte, en productos cárnicos que reciben algún tratamiento térmico, la utilización de bacteriocina tiene la ventaja de que es resistente a la acción del calor (Goff et al., 1996). Es decir, una buena parte de su actividad se retiene después de este

tratamiento tecnológico y protegería al producto de una posible contaminación posterior o de abusos en la temperatura de almacenamiento.

La efectividad de la pediocina PA-1 semipurificada o del fermentado ALTA 2341 se ha probado en diversos sustratos alimenticios. La mayor parte de los estudios se han hecho en productos cárnicos y el principal objetivo consistía en controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* (Tabla II.3). Las aplicaciones de pediocina PA-1 en otros productos (huevo, productos lácteos y productos vegetales) son mucho más escasas (Gálvez et al., 2007; Muriana, 1996). Por otra parte, la comparación en el mismo sustrato (carne de cerdo) de la actividad antimicrobiana de varias bacteriocinas reveló que la pediocina PA-1 suele ser más activa que la nisina A, pero menos que otras como, por ejemplo, la piscicolina (Jack et al., 1996; Murray y Richard, 1997).

La pediocina PA-1 añadida al agua que se emplea para higienizar hortalizas crudas cortadas (repollo, coliflor y brotes de judías *mung*) es una alternativa al tratamiento con hipoclorito. El hipoclorito no inactiva completamente muchos patógenos y, además, sus restos pueden ser origen de compuestos químicos clorados secundarios con actividad carcinogénica. En este tipo de sustratos alimenticios, la pediocina fue más efectiva que la nisina, consiguiendo reducciones de entre 2 y 4 ciclos logarítmicos, aunque no eliminó completamente a *L. monocytogenes* (Bari et al., 2005). La incorporación de pediocina durante la fermentación del *kimchi*, un producto coreano elaborado a base de col china, impide el crecimiento de *Listeria* durante al menos 16 días (Choi y Beuchat, 1994).

La pediocina PA-1 también se ha utilizado unida a células muertas productoras de esta bacteriocina (*P. acidilactici* H o *Lactobacillus plantarum* WHE92) en carne de pollo cruda sometida a irradiación y en un embutido crudo loncheado, respectivamente. Esta es una forma sencilla de concentrar y purificar parcialmente la bacteriocina, ya que con sólo ajustar la acidez del medio de cultivo en el que se encuentra la bacteria productora a pH 6,0, la bacteriocina libre del medio se adsorbe a la superficie de las células productoras. En ambos casos, se comprobó que la pediocina así incorporada en la muestra era activa, manteniendo a la población de *L. monocytogenes* en niveles muy bajos, pero sin llegar a su completa destrucción (Goff et al., 1996).

Tabla II.3. Aplicación de pediocina PA-1 en la conservación de diversos alimentos

Sustrato	Forma en la que se añade	Microorganismo diana	Efecto	Referencia
Sustrato lácteo (queso <i>cottage</i> , nata y crema de queso)	Sobrenadante concentrado de <i>P. acidilactici</i> PAC 1.0 (10-100 UA ^a /g o ml)	<i>L. monocytogenes</i> (2-3 log ufc/ml)	<2 log ufc/ml, 7d, 4°C	Pucci y col. (1988)
Sustratos lácteos (a base de leche en polvo desnatada o mantequilla) y sustratos cárnicos (pastas elaborada con músculo de ternera o sebo de vacuno)	Pediocina AcH (30000 UA/ml)	<i>L. monocytogenes</i> (dos cepas, 6,1 log ufc/ml)	Reducción de 2 log ufc/ml Rapidez de la acción de la bacteriocina (1,5 min)	Degnan y col. (1993)
Queso blanco	ALTA 2431 (0,6 – 2,5%)	<i>L. monocytogenes</i> (6 log ufc/ml)	Reduce el crecimiento, pero no elimina completamente el patógeno; rapidez de la acción	Glass y col. (1995)
Huevo líquido			Reducción de 1 log ufc/ml durante calentamiento a 65°C	Muriana (1996)
Piezas cárnicas esterilizadas por irradiación	Sobrenadante de un cultivo de <i>P. acidilactici</i> (LACTACEL 110) (500-5000 UA /ml)	<i>L. monocytogenes</i> Scott A	Reducción de 1-2 log ufc/g, 21 d, 5°C	Nielssen y col. (1990)
Carne de pechuga de pavo (25% en agua)	Pediocina (5000 AU/ml)	<i>L. monocytogenes</i> (4,5 log ufc/g)	Rápida reducción de 0,9 log ufc/g	Schlyter y col. (1993)
Pechuga de pollo cocinada	ALTA 2341 (0,25-1% w/w aplicado por inyección)	Bacterias aerobias totales	Reducción de 2-3 log ufc/g, 5 semanas, 2°C	Rozum y Maurer (1997)
Carne de cerdo	Sobrenadante concentrado (× 10) de <i>P. acidilactici</i> (500-5000 UA/ml)	<i>L. monocytogenes</i> y <i>Clostridium perfringens</i>	Reducción de 1-3 log ufc/g, 3d a 15°C ó 2,5-3,5 log ufc/g, 21 d, 4°C (<i>L. monocytogenes</i>). Escaso efecto sobre <i>Cl. perfringens</i>	Nieto-Lozano y col. (2006)

Tabla II.3 (cont.). Aplicación de pediocina PA-1 en la conservación de diversos alimentos

Sustrato	Forma en la que se añade	Microorganismo diana	Efecto	Referencia
Carne de cerdo		<i>L. innocua</i> Lin11	Reduce el recuento, 2d, 5°C	Murray y Richard (1997)
Salchichas tipo frankfurt	ALTA 2341 (3000-6000 UA/salchicha)	<i>L. monocytogenes</i> (mezcla de 5 cepas) (3 log ufc/g)	Reducción de 1,5-2 log ufc/g; se mantiene 14 d, 10°C o 49 d, 4°C	Chen y col. (2004b)
Pasta de jamón de york	ALTA 2341 (2048 UA/g)	<i>L. monocytogenes</i> 4A (10 ³ ufc/g)	Inhibición 7 d, 10°C; a 14 d hay crecimiento limitado. Más efectivo que nisina, pero menos que piscicolina	Jack y col. (1996)
Carne		<i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria ivanovii</i>	Reducción de 3 log ufc/g (<i>L. monocytogenes</i>) y 7 log ufc/g (<i>L. ivanovii</i>), 28 días, 4°C; 1 log ufc/g, 28 d, 10°C	Motlagh y col. (1992b)
Carne de cangrejo azul esterilizada	ALTA 2341 (2000-20000 AU/ml)	<i>L. monocytogenes</i> (mezcla de tres cepas) (5,5 log ufc/g)	Reducción de 2-3 log ufc/ml, 6 h, 4°C. Se mantiene inhibición 6 días, 4°C	Degnan y col. (1994)
Hortalizas crudas cortadas	Sobrenadante concentrado de cultivo (100 AU/ml)	<i>L. monocytogenes</i> (mezcla de cepas) (4-5 log ufc/g)	Reducción de 2-4 log ufc/g tras 1 min lavado por inmersión	Bari y col. (2005)

^aUA: unidades arbitrarias

Una propuesta muy atractiva para la aplicación de la pediocina PA-1 en la industria alimentaria es a través de la tecnología del envasado bioactivo. En los últimos años se ha desarrollado la idea de que la función del envase puede ir más allá de la de ser una mera barrera inerte frente a las condiciones ambientales. El fundamento del envasado activo es la inclusión en los envases de ciertos compuestos que contribuyan a alargar la vida útil, mejorar la seguridad o las características organolépticas de los alimentos. Estas funciones de los envases activos se consiguen gracias a su capacidad para secuestrar oxígeno, absorber humedad, generar dióxido de carbono o etanol o por mostrar propiedades antimicrobianas. De todas ellas, esta última es la que más interés ha despertado, sobre todo en la industria cárnica, e incluye la posibilidad de utilizar como compuestos antimicrobianos a las bacteriocinas. Es decir, en vez de añadir la bacteriocina directamente al alimento, ésta se incluye en el material de envasado que va a estar en contacto directo con él. La bacteriocina difundiría gradualmente desde el envase hacia el alimento. Una ventaja importante es que al encontrarse incluida en el material del envase, estaría protegida de la acción de algunos constituyentes del alimento (como, por ejemplo, las proteasas de la carne) o de la adsorción a la proteína o la grasa (Gálvez et al., 2007).

Existen bastantes estudios sobre la incorporación en materiales de envasado de nisina, directamente en la matriz del polímero o como una cubierta superficial. Sin embargo, la información disponible sobre otras bacteriocinas es escasa, aunque igualmente prometedora (Gálvez et al., 2007). El único trabajo realizado sobre el empleo pediocina PA-1 en tripas de celulosa o bolsas de plástico recubiertas con la bacteriocina demostró una notable efectividad para inhibir completamente el crecimiento superficial de *L. monocytogenes* en varios tipos de productos cárnicos a lo largo de 12 semanas a 4°C (Ming et al., 1997). La utilidad, en este caso, sería impedir la proliferación de la contaminación superficial que se produce como consecuencia del contacto del producto ya tratado térmicamente con la superficie de los equipos de procesado. Existe al menos una posible aplicación comercial de la inclusión de pediocina en materiales para el envasado de alimentos, como se describe en la patente americana 5573797 de Viskasa Co., una empresa dedicada a la comercialización de tripas para productos cárnicos (Aymerich et al., 2008).

Por último, la pediocina PA-1 y otras bacteriocinas no sólo tienen interés para mejorar la seguridad de los alimentos, sino que también pueden ser de gran ayuda para mejorar la

calidad de los productos fermentados y/o acortar su tiempo de maduración. El objetivo entonces, aunque depende de cada aplicación, puede ser controlar la flora secundaria, que en ciertas ocasiones es responsable de alteraciones organolépticas en los productos, o promover la lisis del cultivo iniciador para liberar sus enzimas intracelulares, implicadas en la formación de compuestos aromáticos y sápidos (Ávila et al., 2005; Ávila et al., 2006; Martínez-Cuesta et al., 2001; Peláez y Requena, 2005).

II.2.7.2. El empleo de pediocina PA-1 en sistemas de barreras

Debe destacarse que a pesar de que la casi totalidad de los estudios realizados *in vitro* confirman que la pediocina PA-1 exhibe una potente actividad frente a bacterias sensibles, su aplicación en diferentes tipos de alimentos sólo permite una modesta reducción de 1 a 3 ciclos logarítmicos en las poblaciones de los microorganismos diana, tal y como se muestra en la Tabla II.3 (Muriana, 1996; Schillinger et al., 1996; Szabo y Cahill, 1999). Esta limitada actividad antimicrobiana de la pediocina PA-1 en los alimentos puede deberse a varios factores, entre los que se encuentran aquellos que afectan a la cepa productora (como un ambiente inadecuado para su adaptación, una pérdida espontánea de su habilidad para producir la bacteriocina, la infección por fagos o el antagonismo con otros microorganismos) y los que influyen en el mecanismo de acción de la bacteriocina (por ejemplo, la aparición de resistencias en las bacterias sensibles, su unión a componentes o ingredientes del alimento, su baja solubilidad o estabilidad en el sustrato alimentario y la presencia de la microbiota propia del producto) (Muriana, 1996; Schillinger et al., 1996).

Un aspecto que se ha de vigilar especialmente es la aparición de bacterias resistentes, un hecho bastante común cuando se emplean bacteriocinas de la clase IIa. En el caso de la pediocina PA-1 se ha descrito que la frecuencia de aparición de bacterias resistentes llega ser de 10^{-4} a 10^{-6} (Dykes y Hastings, 1998; Ennahar et al., 2000). Esto quiere decir que esta bacteriocina, y se puede ampliar a todas las bacteriocinas en general, no se debería utilizar como única medida frente el crecimiento de bacterias indeseables en los alimentos, ya que su protección podría ser insuficiente. Tradicionalmente se ha indicado que una alternativa sería utilizar dos bacteriocinas, pertenecientes a distintas clases, porque la probabilidad de aparición de bacterias resistentes a ambas bacteriocinas es mucho menor. Sin embargo, estudios recientes indican lo contrario, que el desarrollo de resistencia a una bacteriocina

puede hacerse extensivo no sólo a otras de su misma clase, sino también a las de otras clases, al menos *in vitro* (Gravesen et al., 2004; Naghmouchi et al., 2007). El empleo conjunto de dos bacteriocinas de la clase IIa nunca se ha considerado de gran interés debido al desarrollo de resistencias cruzadas, al tener las células sensibles la misma molécula receptora (Rasch y Knøchel, 1998).

Combinar el empleo de bacteriocinas con otros métodos de conservación (control de pH, temperatura, sal, altas presiones hidrostáticas, pulsos eléctricos o condiciones de almacenamiento) si se considera como una opción muy prometedora (Deegan et al., 2006; Muriana, 1996; Stiles, 1996). Esta estrategia, conocida como “sistema de barreras múltiples” o “teoría de los obstáculos”, podría compatibilizar la obtención de alimentos más seguros con una reducción considerable de las cantidades de aditivos químicos y/o de la intensidad de los tratamientos tecnológicos (Leistner, 1992). De este modo, podríamos disponer de alimentos que conservan mejor sus propiedades nutritivas y organolépticas, al tiempo que tienen una excelente calidad higiénica que les permite tener una larga vida útil. Las diversas combinaciones de tratamientos que se han ensayado a lo largo de los años han sido revisadas por Gálvez et al. (2007). En la Tabla II.4 se han resumido aquellas en las que la pediocina PA-1 se ha empleado como una barrera más en la estrategia de conservación de un producto.

Cabe destacar que se ha comprobado, mediante experimentos realizados *in vitro*, que cuando *L. monocytogenes* se somete a estrés osmótico (6,5% NaCl, w/v) se hace insensible a la acción de la pediocina PA-1. Igualmente la pediocina PA-1 era mucho menos activa sobre bacterias sometidas previamente a estrés térmico con temperaturas de refrigeración (5°C) (Jydegaard et al., 2000). Se desconoce si estos efectos son debidos a cambios en la conformación de la bacteriocina, a la dificultad de la interacción electrostática entre la bacteriocina y la membrana bacteriana o a cambios en la cubierta celular de las bacterias. Sería interesante comprobar si esos resultados son extrapolables en la práctica a los alimentos, dado que es muy común en la industria alimentaria aplicar refrigeración y adicionar sal en muchos productos. Es posible que la limitada acción antibacteriana que generalmente se observa durante la aplicación de bacteriocina en productos alimenticios concretos se deba, al menos en parte, a que casi siempre se hace en combinación con el empleo de refrigeración.

Tabla 4. Aplicación de la pediocina PA-1 en sistemas de barreras o tratamientos combinados

Método de conservación adicional	Origen de la pediocina	Sustrato	Referencia
Ácidos orgánicos:			
Diacetato sódico (3%, p/v)	ALTA 2341 (3% p/p)	Salchichas tipo frankfurt	Uhart et al. (2004)
Lactato sódico (6%, p/v)	Pediocina purificada de <i>P. acidilactici</i> LET 01	Hortalizas cortadas frescas	Bari et al. (2005)
Ácido cítrico (10 mM)			
Lactato sódico (2%)			
Sorbato potásico (0,02%)	ALTA 2341 (0,5-3% w/w)	Pollo cocinado	Barakat y Harris (1999)
Ácido fítico (0,02%)			
Lactato sódico + MAP	Pediocina (5000 UA/ml)	Carne de pavo	Schlyter et al. (1993)
Diacetato sódico (0,3 - 0,5% p/p)	ALTA 2341 (2,5%)	Queso	Glass et al. (1995)
Ácido acético			
Otras bacteriocinas:			
nisina, lacticina 481, lacticina F	Sobrenadante de cultivo con pediocina PA-1	Medio de cultivo	Mulet-Powell et al. (1998)
Envasado en atmósferas modificadas:			
100 % CO ₂ y vacío	ALTA 2341 (0,1 – 1% p/p)	Salmón ahumado	Szabo y Cahill (1999)
Tratamientos térmicos:			
71, 81 ó 96°C durante 30, 60 ó 120 segundos	ALTA 2341 (3000-6000 UA/salchicha)	Salchichas tipo frankfurt	Kalchayanand et al. (1992) Chen et al. (2004a)
Otros tratamientos:			
Irradiación (1-2 kGy)	ALTA 2341 (3000-6000 UA/salchicha)	Salchichas tipo frankfurt	Chen et al. (2004b)
Pulsos eléctricos (12,5 kV/cm ² , 25 µF, 4°C)	Pediocina PA-1 (5000 UA/ml)	Peptona	Kalchayanand et al. (1994)
Alta presión hidrostática (30000-50000 lb/in ² , 1 min, 22°C)	Pediocina PA-1 (5000 UA/ml)	Peptona	Kalchayanand et al. (1994)
Alta presión hidrostática (138-345 MPa, 5-15 min, 25-50°C)	Pediocin PA-1 (3000 UA/ml)	Peptona	Kalchayanand et al. (1998)
Alta presión hidrostática (400 MPa, 10 min, 17°C)	Pediocina concentrada de <i>P. acidilactici</i>	Modelo cárnico preparado con jamón cocido enlatado	Garriga et al. (2002)

UA: unidades arbitrarias

Ya en la primera aplicación de la pediocina PA-1 a sustratos alimentarios se indicó que el ácido láctico, que se encontraba de forma natural en los productos lácteos que se estaban ensayando, tenía un efecto sinérgico con la bacteriocina (Pucci et al., 1988). Los ácidos orgánicos y sus sales, sobre todo cuando el pH del alimento es ácido, son muy efectivos potenciando la actividad de las bacteriocinas. En un medio ácido aumenta la solubilidad de las bacteriocinas, y por tanto su capacidad para difundir, y se podría facilitar su translocación a través de la pared celular al aumentar la carga neta de la molécula (Gálvez et al., 2007). La acción sinérgica de la pediocina PA-1 y diversos ácidos orgánicos se ha puesto de manifiesto en varios alimentos, como por ejemplo productos cárnicos, queso y hortalizas (Tabla II.4) (Barakat y Harris 1999; Bari et al.2005; Glass et al.1995; Schlyter et al.1993; Uhart et al.2004).

En este contexto de barreras múltiples, también se han empleado conjuntamente varias bacteriocinas, con la idea de reducir la cantidad de cada una de las bacteriocinas y, al mismo tiempo, impedir la aparición de bacterias resistentes (aunque esto último sea dudoso, como ya se ha mencionado anteriormente). De las distintas combinaciones ensayadas cabe destacar que la pediocina PA-1 suele tener un efecto sinérgico con bacteriocinas de otras clases (nisina, lactacina 481, lactacina F y lactacina B), por lo que sería factible emplear como bioconservante una mezcla de distintas bacteriocinas (Hanlin et al., 1993; Mulet-Powell et al., 1998). El mismo efecto se ha comprobado no sólo *in vitro*, sino también en un sustrato alimenticio, carne, con una mezcla de una bacteriocina de la clase IIa (enterocina CRL35) y otras pertenecientes a otras clases: nisina y lactococina 707. El empleo conjunto de estas tres bacteriocinas impidió la aparición de células resistentes en *L. monocytogenes* y *L. innocua* (Vignolo et al., 2000).

Aunque sólo se han descrito las combinaciones recogidas en la literatura científica para la pediocina PA-1 y algunos compuestos con actividad antibacteriana, existen otras muchas posibilidades. Otros compuestos efectivos al ser empleados conjuntamente con varias bacteriocinas en distintos sistemas son el nitrito (que permite reducir la cantidad necesaria para impedir la producción de toxina botulínica en sistemas cárnicos), varios quelantes como el citrato, fosfatos, el maltol o el etil maltol (que amplían la acción de las bacteriocinas a las bacterias Gram-negativas), el etanol, la monolaurina, varios ésteres de ácidos grasos con sacarosa, la reuterina, diversos aceites esenciales que contienen compuestos fenólicos

(carvacol, eugenol, timol, ácido cinámico o geraniol, entre otros), la lisozima, el sistema lactoperoxidasa o la lactoferrina (Gálvez et al., 2007).

Los alimentos conservados mediante la aplicación de tratamientos térmicos también se podrían beneficiar de la actividad de las bacteriocinas desde el punto de vista de los sistemas de barreras múltiples. Las bacterias que han sido sometidas a un tratamiento térmico son más sensibles a la acción de las bacteriocinas, como se ha demostrado para la pediocina PA-1 y la nisina (Kalchayanand et al., 1992). Y, al contrario, la acción de algunas bacteriocinas reduce la resistencia térmica de las bacterias (Boziaris et al.1998). Es decir, el empleo conjunto de bacteriocina y un tratamiento térmico permitiría reducir la intensidad de este último, lo que se traduciría en una mínima modificación de las propiedades sensoriales del alimento al tiempo que se logra una calidad microbiológica adecuada. Las bacteriocinas también podrían ofrecer una protección adicional frente a la proliferación de las endosporas que sobreviven al tratamiento térmico (Galvez et al., 2007). En el caso concreto de productos cárnicos cocidos, como las salchichas de tipo frankfurt, la combinación de pediocina y una pasterización del producto envasado es un tratamiento muy efectivo para controlar una posible contaminación del producto terminado con *L. monocytogenes*, incluso durante un posible abuso de la temperatura de almacenamiento (Chen et al., 2004a). Estos mismos autores comprobaron en el mismo producto que también se producía un efecto sinérgico, e incluso más potente que el recién descrito, entre la pediocina PA-1 y la irradiación (hasta 2,3 kGy) en relación con la inhibición de *L. monocytogenes* (Chen et al., 2004b). En ambos casos se comprobó que los tratamientos aplicados carecían de repercusiones negativas en las características organolépticas de las salchichas.

El envasado en atmósferas modificadas es otra posible barrera a aplicar en combinación con las bacteriocinas, por su alta complementaridad. El CO₂ empleado en este método de conservación es muy efectivo frente a las bacterias Gram-negativas, mohos y levaduras, que son poco sensibles a la acción de las bacteriocinas. La acción conjunta de la pediocina PA-1 contenida en el extracto ALTA 2341 y el envasado en una atmósfera de CO₂ puro o al vacío permite controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en salmón ahumado (Szabo y Cahill, 1999).

Sin lugar a dudas, los métodos de conservación no térmicos tienen ahora un gran interés para la industria alimentaria puesto que no dan lugar a los cambios indeseables en las propiedades funcionales, nutritivas y organolépticas de las materias primas alimentarias que suelen estar asociados con los tratamientos térmicos clásicos. De entre estos métodos alternativos, la aplicación de altas presiones hidrostáticas y los pulsos eléctricos de alta intensidad son los más estudiados y, de hecho, ya se aplican a nivel industrial para el tratamiento de diversos alimentos. Entre otros efectos, ambos tratamientos desestabilizan la membrana e interfieren con el metabolismo celular de las bacterias que se encuentran en los alimentos a tratar. Sin embargo, para lograr en los alimentos una estabilidad microbiológica que les permita tener una vida útil razonablemente prolongada suelen requerirse tratamientos tan intensos que son económicamente inviables o provocan modificaciones indeseables, como por ejemplo, en la textura.

El empleo de las bacteriocinas como una barrera adicional con este tipo de métodos de conservación no térmicos puede ser muy interesante, puesto que permitiría disminuir la intensidad de dichos tratamientos y/o contrarrestar el efecto protector del alimento. Además, como uno de sus puntos clave de actuación es la membrana celular, cuya integridad dañan, se potencia la eficacia bactericida de las bacteriocinas, que llegan a destruir incluso bacterias Gram-negativas como, por ejemplo, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium* y *Serratia liquefaciens* (Kalchayanand et al., 1994). Por otra parte, estos investigadores han comprobado que el efecto sinérgico de la combinación de pediocina PA-1 y nisina se potencia en gran medida cuando se emplean con altas presiones, siendo efectivo *in vitro* incluso frente las esporas de *Clostridium* que han germinado por las altas presiones (Kalchayanand et al., 1998; 2004). El análisis con microscopía de barrido electrónico de las bacterias sometidas a la acción conjunta de una mezcla de pediocina PA-1 y nisina y/o a alta presión (345 Mpa, 5 minutos, 25°C) reveló que en *L. monocytogenes* se produce el colapso de la pared celular y de la membrana que conduce, finalmente, a la lisis celular en cualquiera de las distintas combinaciones de tratamiento. En cambio, en *Salmonella typhimurium* y en *E. coli* O157:H7 sólo se producían graves alteraciones de la cubierta celular cuando las bacterias eran sometidas a altas presiones, con o sin la presencia conjunta de nisina y pediocina PA-1 (Kalchayanand et al., 2004).

II.2.7.3. Adición de un cultivo productor de pediocina PA-1

A pesar de los resultados satisfactorios que se obtienen al añadir la bacteriocina más o menos purificada a los alimentos, tanto desde el punto de vista legal como desde el económico, una opción más interesante es la adición de un cultivo productor de la bacteriocina, bien como cultivo iniciador o como adyuvante. Así tendríamos un producto dotado de su propio sistema de conservación, como si fuera una fábrica “viva”, y sin necesidad de aprobación legal. De hecho, ésta es la aplicación que ha aglutinado una gran parte de la investigación realizada en los últimos años (Drider et al., 2006). Por supuesto, se ha de escoger el cultivo adecuado para cada aplicación, teniendo en cuenta las peculiaridades de cada producto y, además, controlar que su metabolismo no modifique indeseablemente las características del producto final. En la Tabla II.5 se enumeran algunas aplicaciones de los cultivos productores de pediocina PA-1 en la industria alimentaria.

Entre los posibles problemas que puede plantear la aplicación de un cultivo bacteriocinogénico se encuentran la pérdida espontánea de dicha capacidad o la baja producción en el alimento, la susceptibilidad a la infección por fagos y el antagonismo con otras bacterias presentes de forma natural en ese sustrato (Gálvez et al., 2006).

Dado que la mayor parte de las cepas productoras de pediocina PA-1 han sido aisladas de carne o productos cárnicos, esta estrategia no debería entrañar grandes dificultades en esos sustratos, ya que es de esperar que sea fácil disponer de cepas adaptadas a ese sustrato. Y, como se ha comprobado en diversas ocasiones, la presencia de bacterias productoras de bacteriocinas es algo bastante habitual en los productos cárnicos. Así lo han demostrado, por ejemplo, Budde et al. (2003) en un estudio en el que aislaron bacterias productoras de bacteriocinas de casi la mitad de unos 50 productos cárnicos envasados al vacío. No cabe duda de que la capacidad de producir una bacteriocina puede ser de gran utilidad para lograr la implantación en el producto de su bacteria productora.

En los productos cárnicos fermentados una opción relativamente sencilla sería emplear un cultivo iniciador que posea la capacidad de producir bacteriocina. La fermentación y el descenso del pH ($\text{pH} < 4,9$), y el secado en el caso de los productos curados, controla en cierta forma el crecimiento de *L. monocytogenes*. La pediocina PA-1 producida *in situ* por el cultivo

Tabla II.5. Utilización de cultivos productores de pediocina PA-1 en alimentos

Bacteria	Alimento	Referencia
<i>Pediococcus acidilactici</i> JD1-23	Embutido	Berry et al. (1990)
<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC1.0 (como cultivo iniciador)	Embutido curado	Foegeding et al. (1992)
<i>Pediococcus acidilactici</i> (como cultivo coadyuvante)	Salchichas	Berry et al. (1991)
<i>Pediococcus acidilactici</i> JBL1095	Salchichas (carne de ternera, exudado)	Yousef et al. (1991)
<i>Pediococcus acidilactici</i> JBL1095	Salchichas (ternera, envasadas al vacío)	Degnan et al. (1992)
<i>Pediococcus acidilactici</i> JBL1095	Salchichas (de carne de pavo)	Luchansky et al. (1992)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Salchichas (de carne de pollo)	Baccus-Taylor et al. (1993)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Leche	Raccach y Geshell (1993)
<i>Lactobacillus plantarum</i> WHE92 (cultivo adjunto)	Queso Munster	Ennahar et al. (1998)

iniciador a lo largo de la fermentación contribuiría adicionalmente a obtener un producto seguro, especialmente en aquellos casos en los que no se llegasen a alcanzar esas condiciones (Baccus-Taylor et al., 1993; Berry et al., 1990; Foegeding et al., 1992). Sin embargo, muchas de las bacterias que producen bacteriocinas de la clase IIa no son adecuadas para llevar a cabo las fermentaciones tradicionales porque no tienen la capacidad de producir ácido láctico con rapidez (Drider et al., 2006).

Los cultivos productores de bacteriocina también se pueden emplear en productos cárnicos no fermentados como cultivos adyuvantes, para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes a lo largo de su vida útil. Mientras que la adición de bacteriocina tiene un efecto muy rápido, como hemos visto anteriormente, el empleo de un cultivo productor de bacteriocina probablemente proporcione protección a largo plazo y, además, en situaciones de mayor riesgo. En varios ensayos se ha comprobado que *P. acidilactici* JBL1095, una cepa productora de pediocina PA-1, ni se multiplica ni produce pediocina cuando se emplea como cultivo coadyuvante en productos cárnicos cocidos

envasados al vacío y almacenados a 4°C. Sin embargo, a 25°C, como ejemplo de un almacenamiento incorrecto, esa bacteria se multiplica y proporciona una buena protección frente a la contaminación con *L. monocytogenes* (Degnan et al., 1992; Luchansky et al., 1992; Yousef et al., 1991). Otros investigadores, en cambio, mostraron que la inoculación simultánea de *P. acidilactici* JD1-23, productor de pediocina PA-1, con *Listeria* en salchichas tipo Frankfurt prevenía el crecimiento del patógeno durante al menos 60 días durante el almacenamiento al vacío y a 4°C (Berry et al., 1991).

Con respecto a las aplicaciones en la industria láctea, hay que tener en cuenta que los pediococos no pueden fermentar la lactosa y tienen dificultad para adaptarse a productos lácteos. A pesar de ello, si se emplea un inóculo elevado de *P. acidilactici* (10^9 ufc/ml de leche) se puede controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en ese tipo de sustratos (Raccach y Geshell, 1993). La construcción de pediococos con capacidad de fermentar la lactosa sería una posible solución y, de hecho aunque por otros motivos, ya se ha logrado introduciendo por electroporación un plásmido procedente de un lactococo. Sin embargo, existe otra opción que no requiere ningún tipo de manipulación y es emplear la cepa *Lactobacillus plantarum* WHE92, aislada previamente de queso Munster y que produce de forma natural pediocina PA-1 (Ennahar et al., 1996). Esta cepa de lactobacilo cuenta, además, con la ventaja adicional de producir pediocina PA-1 incluso cuando el pH del medio es de 6,0, un valor bastante frecuente en la industria láctea, cosa que no se observa con los pediococos productores de esta bacteriocina. Su presencia desde el comienzo del periodo de maduración en la superficie de un queso inoculado con *L. monocytogenes* impidió su crecimiento, sin interferir en la maduración (Ennahar et al., 1996). Sin embargo, es necesario tener en cuenta que cuando se emplea esta estrategia es muy frecuente el desarrollo de mutantes resistentes a la pediocina que, al no tener bacterias competidoras, se pueden mantener en el producto durante un tiempo muy prolongado. El empleo de cepas productoras de varias bacteriocinas, de nuevo, puede ser muy ventajoso para limitar la posible aparición de bacterias resistentes a las bacteriocinas, a pesar de que en principio no se considere un problema especialmente preocupante para la industria alimentaria (Deegan et al., 2006).

Actualmente existen en el mercado varias bacterias que se comercializan precisamente como cultivos bioprotectores y que persiguen mejorar la calidad microbiológica de diversos alimentos, especialmente productos cárnicos. Entre ellos se pueden citar Bactoferm F-Lc de

Christian Hansen (Dinamarca), que contiene *P. acidilactici* y *Lactobacillus curvatus* productores de pediocina y sakacina A, respectivamente, o Fargo 25 de Kerry Biosciences (EE UU), un cultivo liofilizado de *P. acidilactici* en medio lácteo.

Por último, hay que resaltar que, al igual que con las bacteriocinas, el empleo de los cultivos de pediococos productores de pediocina PA-1 casi siempre se ha enfocado desde el punto de vista de la seguridad microbiológica, pero no se debe olvidar el posible papel que pueden jugar para controlar el crecimiento de bacterias alterantes o incluso mejorar sus propiedades sensoriales. Como ejemplo de esto último, Danisco comercializa un cultivo liofilizado de *P. acidilactici* (Choozit™ Lyo. Flav 43), recomendado como cultivo adjunto en la elaboración de queso Cheddar y otros tipos semiduros, para acelerar y potenciar los rasgos aromáticos gracias a la producción de bacteriocinas (Deegan y col, 2006).

II.2.8. Expresión heteróloga de la pediocina PA-1

El empleo de sistemas de expresión heteróloga obedece a diversos objetivos. Desde el punto de vista de la investigación básica, permite estudiar más fácilmente la función y/o el modo de acción de ciertas proteínas y péptidos. Por otro, desde el industrial, facilita el control transcripcional y/o traduccional sobre la expresión del gen recombinante o hace posible conseguir un nivel de producción mayor que el obtenido a partir de las fuentes nativas (Makrides, 1996).

Aunque las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son muy interesantes para la bioconservación de los alimentos, su eficacia y/o la de las cepas productoras puede verse seriamente comprometida por diversos factores. Entre ellos se incluye el que su espectro de acción en algunas ocasiones puede ser bastante reducido, la incapacidad de obtener buenos protocolos de purificación que permitan unos rendimientos aceptables, la aceptabilidad de la cepa productora como microorganismo QPS, la adaptabilidad de la cepa bacteriocinogénica a diferentes sustratos alimentarios o la posibilidad de aparición de bacterias resistentes (Rodríguez et al., 2002b). En este contexto, la producción heteróloga de bacteriocinas puede ser una alternativa atractiva para evitar algunas de las situaciones adversas anteriormente citadas. Además, esta estrategia también se puede utilizar para construir cepas

multibacteriocinogénicas o conferir propiedades antimicrobianas a cepas de interés tecnológico, como las que forman parte de cultivos iniciadores.

II.2.8.1. Hospedadores heterólogos

El diseño de un sistema de expresión eficiente para producir proteínas o péptidos recombinantes depende de muchos factores, entre los cuales se pueden citar: las características del hospedador heterólogo, los elementos genéticos utilizados (como por ejemplo, las señales de transcripción y de traducción, los genes o los vectores), la localización y el nivel de expresión del producto final, la existencia de modificaciones postraduccionales y/o la legislación vigente, en el caso de proteínas comerciales (Makrides, 1996). De todos estos factores, la elección de un hospedador heterólogo apropiado puede resultar crítico para la expresión del gen de interés.

Desde los inicios de la microbiología molecular, *E. 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. Se conocen bien muchos de sus procesos biológicos, existe un número casi ilimitado de herramientas genéticas disponibles para su manipulación y la expresión es rápida. 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, el empleo de codones de *E. coli* difiere del de las bacterias lácticas. Baste recordar que el contenido de G+C en los genes de *E. coli* es de aproximadamente un 50%, mientras que en los de las bacterias lácticas es el 35%. Y, precisamente, el empleo de codones se ha identificado como el factor más importante, aunque no el único, a la hora de obtener una expresión génica satisfactoria en procariotas (Gustafsson et al., 2004). 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 mRNA 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. Algunas proteínas de gran tamaño y las de membrana no se expresan o lo hacen en forma insoluble, como cuerpos de inclusión. Estos cuerpos de inclusión también se forman cuando la expresión de la proteína recombinante supera la capacidad de transporte de la célula y tienen el inconveniente de que es necesario incluir etapas adicionales para recuperar su actividad biológica. Además, los péptidos o proteínas heterólogas pueden degradarse por la acción de las enzimas proteolíticas de *E. coli*. Otra desventaja de la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* es la acumulación de lipopolisacárido, que se debe eliminar antes de su empleo (Makrides, 1996). Finalmente, es importante considerar que *E. coli* no sólo no está considerado como microorganismo GRAS/QPS sino que, por el contrario, se debe considerar como patógeno o potencialmente patógeno. En consecuencia, cuando se desean producir proteínas heterólogas con fines alimentarios deben emplearse hospedadores alternativos.

Los inconvenientes citados anteriormente se pueden superar eligiendo otras bacterias alternativas aunque, en última instancia, la utilidad de unas y otras depende de la disponibilidad de herramientas para su manipulación genética. 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 han trabajado y están trabajando en la expresión génica en este tipo de organismos, esta situación ha mejorado sustancialmente. Muchas bacterias lácticas se consideran 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). El carácter de grado alimentario incluye incluso a algunos de los sistemas de selección disponibles. Esto quiere decir que las bacteriocinas, u otras proteínas, expresadas heterológamente en las bacterias lácticas se pueden emplear directamente en forma de extractos celulares crudos o con tan sólo una sencilla purificación.

Por otra parte, la manipulación genética de las bacterias lácticas que se utilizan en la mayoría de los laboratorios, y en especial de *L. lactis*, es relativamente sencilla. Además, poseen otras características adecuadas para la expresión y secreción de proteínas recombinantes, como son una limitada actividad proteolítica, el reducido número de proteínas

que secretan y la secuenciación completa del genoma de varias especies. Tampoco producen cuerpos de inclusión ni esporas. Además, se multiplican fácilmente llegando a alcanzar densidades celulares elevadas (aproximadamente tienen un tiempo de duplicación de 1 hora en las fermentaciones) sin necesidad de aireación, utilizando simplemente agitación (Kunji et al., 2005).

Algunas bacterias lácticas, como *L. lactis*, son muy versátiles y 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, así como con la secuenciación completa de su genoma (Le Loir et al., 2005). De hecho, ya se ha descrito la producción heteróloga a escala industrial de una proteína (la lisostafina, con actividad antibacteriana) en *L. lactis*, comprobándose que el escalado, la producción y el posterior procesado del producto eran simples y permitían obtener una proteína muy purificada y con actividad biológica (Mierau et al., 2005).

Las levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, también se han empleado desde 1980 en numerosas ocasiones para la producción heteróloga de proteínas, tanto en el ámbito académico como en el biofarmacéutico o industrial. Al igual que las bacterias, se multiplican con mucha facilidad y las técnicas necesarias para su manipulación genética no son mucho más complejas que las empleadas en procariotas. Pero, a diferencia de las bacterias, tienen la ventaja de que en caso necesario pueden llevar a cabo algunas modificaciones postraduccionales como glicosilaciones, formación de puentes disulfuro o procesado proteolítico, propias de los sistemas eucariotas. La primera levadura seleccionada para desarrollar sistemas de producción heteróloga fue *S. cerevisiae* que, junto con *E. coli*, es uno de los microorganismos mejor caracterizado, tanto genética como fisiológicamente. Además, el hecho de que sea considerado como un microorganismo seguro para su uso en humanos favoreció la elección de este hospedador para la producción heteróloga de proteínas de interés. Sin embargo, el bajo rendimiento de producto, la escasa estabilidad de los plásmidos, la dificultad del escalado industrial, la excesiva glicosilación de los productos y su escasa capacidad secretora han fomentado la búsqueda de otras alternativas.

Entre las levaduras “no convencionales” empleadas para la producción heteróloga de proteínas puede citarse a *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorfa*, *Kluyveromyces lactis*,

Schwanniomyces occidentalis y *Yarrowia lipolytica*. De entre ellas cabe destacar a *P. pastoris* porque une a los rasgos antes mencionados para *S. cerevisiae* su escasa capacidad fermentativa, haciendo posible su multiplicación hasta alcanzar densidades de cultivo extraordinariamente elevadas. Por ello es más apreciada que *S. cerevisiae* como huésped, habiéndose empleado desde 1984 para la producción heteróloga de más de 300 proteínas.

II.2.8.2. Expresión heteróloga de bacteriocinas en *Escherichia coli*

El primer hospedador utilizado para la producción heteróloga de varias bacteriocinas, incluyendo la pediocina PA-1, fue *E. coli* (Marugg et al., 1992; Bukhtiyarova et al., 1994). En estos primeros trabajos, el operón de la pediocina PA-1 se subclonó y expresó con éxito en *E. coli*, permitiendo su análisis funcional. En ambos casos, la expresión heteróloga se basó en el empleo de los sistemas de transporte y secreción de las propias bacteriocinas. En otras ocasiones se han empleado los sistemas de transporte y secreción de proteínas propios de *E. coli*, por ejemplo el sistema dedicado ABC de la colicina V para la producción heteróloga de la divergicina A (van Belkum et al., 1997). Posteriormente, Coderre y Somkuti (1999) consiguieron expresar la pediocina PA-1 en *E. coli* utilizando el operón completo de la bacteriocina pero, en este caso, bajo el control del promotor ST_{P2201}, un promotor de *Streptococcus thermophilus*.

Dependiendo del tipo de bacteriocina y/o el sistema de expresión utilizado en *E. coli* se han observado algunas de las limitaciones señaladas en el apartado anterior. Por ejemplo, es habitual que el nivel de producción sea bajo, como se ha descrito para la mesentericina Y105 (Biet et al., 1998) o la pediocina PA-1 (Miller et al., 1998; Venema et al., 1995). Otro de los problemas descritos es la toxicidad de la bacteriocina recombinante por acumulación del péptido activo en el espacio periplásmico del hospedador (Biet et al., 1998). Además, cuando se trata de péptidos relativamente grandes, la actividad proteolítica del hospedador puede dar lugar a pequeños péptidos no activos o de muy baja actividad, como se ha observado con la brococina C, una bacteriocina de la clase IIb formada por dos péptidos de 59 y 43 residuos de aminoácidos (Garneau et al., 2003). Una posible solución es la formación de quimeras con proteínas de secreción de *E. coli*, que contengan un péptido señal que sea reconocido por el sistema *sec* de esta bacteria. Esta estrategia se ha utilizado para la expresión heteróloga de carnobacteriocina B2 y pediocina PA-1, mediante la fusión con la proteína de

unión a maltosa (MBP, del inglés *Maltose Binding Protein*), cuyo péptido señal es reconocido por el sistema *sec* de *E. coli* (Quadri et al., 1997; Miller et al., 1998). En este último estudio, por ejemplo, la secreción de la pediocina PA-1 empleando la secuencia señal de la MBP permitió obtener una cantidad adecuada de diversas bacteriocinas mutantes en *E. coli*, muy útiles para estudiar la relación entre estructura y función de esta bacteriocina (Miller et al., 1998).

Recientemente se han ensayado nuevas estrategias para mejorar la expresión heteróloga de bacteriocinas en *E. coli*. Por una parte, y para superar el principal obstáculo que suele presentarse cuando las proteínas proceden de bacterias poco relacionadas, Richard et al. (2004) construyeron un gen sintético que codificaba la divercina V41 recombinante teniendo en cuenta los codones que empleaba preferentemente la cepa de *E. coli* utilizada como hospedador. Además, el sistema de expresión empleado permitía obtener la bacteriocina fusionada a la tiorredoxina en el citoplasma, de tal forma que no sólo era más soluble, sino también menos susceptible a la degradación proteolítica. La tiorredoxina contribuye, al mismo tiempo, a mantener un bajo potencial redox intracelular en el hospedador, permitiendo así la formación del puente disulfuro necesario para la actividad de la bacteriocina. Además, este sistema de expresión permite también una fácil purificación, recuperándose la bacteriocina madura con un simple paso de hidrólisis química. Este mismo sistema mediante el cual la bacteriocina se expresa como una proteína de fusión junto a la tiorredoxina se ha empleado para la piscicolina 126 y la pediocina PA-1, también con muy buen rendimiento en *E. coli* (Gibbs et al., 2004).

Una opción aún más avanzada es la propuesta por Ingham et al. (2005) para bacteriocinas cuya secuencia sea conocida y que no requieran modificaciones postraduccionales, como las pertenecientes a la clase II. Este sistema de expresión desarrollado para *E. coli* está basado en la clonación del gen sintético para la bacteriocina de interés en el mismo marco de lectura que el péptido señal de una peptidato liasa (PelB) y junto a un gen híbrido compuesto de una inteína y un dominio de unión a quitina. Al tratarse de un gen sintético, se pueden emplear los codones optimizados para *E. coli*. El péptido señal de PelB facilita la secreción, el dominio de unión a la quitina simplifica la purificación de la bacteriocina, empleando una resina de quitina, y la inteína lleva a cabo la autohidrólisis para obtener la bacteriocina nativa, sin necesidad de realizar una hidrólisis enzimática o química

(con bromuro de cianógeno). Este sistema de expresión ha sido utilizado para la producción heteróloga en *E. coli* de piscicolina 126, divercina V41, enterocina P y pediocina PA-1 (Ingham et al., 2005). Otra alternativa similar, ensayada para la pediocina PA-1 pero que se podría hacer extensiva a otras bacteriocinas de la clase IIa, es la expresión de la bacteriocina con la dihidrofolato reductasa de ratón y una cola de histidina para facilitar su posterior purificación (Moon et al., 2005).

II.2.8.3. Expresión heteróloga de bacteriocinas en bacterias lácticas

El empleo de bacterias relacionadas filogenéticamente como hospedadores para la producción heteróloga de bacteriocinas puede aminorar algunos problemas frecuentes que surgen cuando el hospedador es un microorganismo poco relacionado, como ya se ha mencionado. Entre estos problemas cabe citar el que el hospedador no reconozca los promotores, un distinto alfabeto de codones o la necesidad de factores adicionales como las proteínas de inmunidad y el sistema de secreción (Ingham et al., 2005). Actualmente, las bacterias lácticas, y especialmente *L. lactis*, constituyen la primera elección para la expresión heteróloga de bacteriocinas, incluso a escala industrial. Hasta la fecha, los trabajos que han utilizado diferentes especies de bacterias lácticas como hospedadores para la producción heteróloga de bacteriocinas se basan en la expresión de sus genes nativos o en el intercambio de líderes y/o sistemas de secreción de otras bacteriocinas (Rodríguez et al., 2002b). Sin duda alguna, y por su interesante actividad antimicrobiana, la producción heteróloga de pediocina PA-1 fue uno de los principales objetivos que se plantearon varios investigadores que trabajaban en el campo de las bacteriocinas.

II.2.8.3.1. Expresión de genes nativos

Teóricamente, el procedimiento más sencillo para la expresión y la secreción de una bacteriocina en un hospedador heterólogo es utilizar todos los genes necesarios para su biosíntesis. De hecho, ésta fue la estrategia seguida en los primeros trabajos relacionados con la expresión heteróloga de bacteriocinas en bacterias lácticas. Venema et al. (1995) clonaron el operón completo de la pediocina PA-1 (operón *ped*), incluyendo su propio promotor, en *Pediococcus pentosaceus* PPE1.2. La expresión heteróloga de la pediocina en este hospedador, una cepa sensible a la pediocina de forma natural, hizo posible el análisis

funcional del operón *ped*. La sustitución del promotor de la pediocina por el promotor lactocócico P32 permitió aumentar la producción de pediocina PA-1, que fue hasta cuatro veces superior a la obtenida en el productor natural (*P. acidilactici* PAC1.0) (Chikindas et al., 1995). En este mismo trabajo, además, se logró expresar pediocina PA-1 en *L. lactis*, aunque con niveles más bajos (no llegaba ni al 1% del observado en el productor natural). No obstante, el nivel de producción dependía del número de copias del plásmido. Cabe destacar que cuando se sustituyó el promotor P32 por el promotor original del operón *ped*, no se detectó pediocina en los sobrenadantes de las cepas recombinantes de *L. lactis*. Estos mismos autores construyeron otro plásmido que contenía los cuatro genes necesarios para la biosíntesis de la lactococina A. La transformación de *P. acidilactici* PAC1.0 con este último plásmido resultó en la coproducción de pediocina PA-1 y lactococina A.

Aunque el trabajo de Chikindas et al. (1995) demostró que se puede producir pediocina PA-1 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 et al. (1998) seleccionaron como hospedador heterólogo a *L. lactis* MM210, una cepa empleada industrialmente en la elaboración de queso Cheddar. La actividad anti-*Listeria* del lactococo recombinante se comprobó durante la elaboración de 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, siendo los recuentos finales de 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.

Otras bacterias lácticas de interés industrial, por su capacidad para fermentar la lactosa, en las que se ha conseguido la expresión heteróloga de la pediocina PA-1 son *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus thermophilus* (Coderre y Somkuti, 1999). En este caso el operón *ped* estaba bajo el control del promotor ST_{P2201}, de *S. thermophilus*. El nivel de producción de pediocina PA-1 era variable y dependía del hospedador, perdiéndose gradualmente en algunos

casos con los subcultivos seriados de las cepas transformadas. Esta estabilidad dependiente de cepa había sido observada en otros plásmidos de la misma familia (Soleiman y Somkuti, 1993).

II.2.8.3.2. Intercambio de líderes y/o sistemas de secreción

La secreción y el procesado de la mayoría de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas requieren un sistema dedicado integrado por un transportador de tipo ABC y una proteína accesoria. La explotación de las grandes homologías en la secuencia aminoacídica existentes tanto entre los líderes como entre los transportadores de la mayor parte de las bacteriocinas de la clase II, e incluso con algunos lantibióticos, constituye una estrategia atractiva para la producción heteróloga de bacteriocinas (Rodríguez et al., 2002b).

Uno de los primeros trabajos que emplearon esta estrategia para desarrollar un sistema de expresión capaz de producir pediocina PA-1 en *L. lactis* fue el de Horn et al. (1998). Este sistema estaba constituido por un vector de expresión, que portaba el promotor de la lactococina A y un gen híbrido en el que la secuencia que codifica el líder la lactococina A estaba fusionada a la secuencia que codifica la pediocina PA-1 madura, y por el hospedador heterólogo *L. lactis* IL1403, que posee en su cromosoma dos genes (*lcnC'* y *lcnD'*) análogos a los que codifican las proteínas del sistema de transporte dedicado de la lactococina A. La transformación de *L. lactis* IL1403 con pFI2126 dio lugar a una cepa recombinante (*L. lactis* FI9043) que secretó pediocina PA-1 activa, aunque en una cantidad muy inferior a la del productor natural *P. acidilactici* 347. No obstante, los niveles de producción de pediocina fueron superiores a los observados en la misma cepa de *L. lactis* con el promotor y el sistema de transporte dedicado de la pediocina PA-1 (Chikindas et al., 1995), como se describió anteriormente.

Estos mismos investigadores intentaron aumentar la producción de pediocina PA-1 en *L. lactis* IL1403 situando los genes encargados del transporte de la lactococina A (genes *lcnCD*) junto al gen híbrido “líder de la lactococina A/pediocina PA-1 madura”. Esta disposición de los genes necesarios para la biosíntesis de la bacteriocina mejoró los niveles de producción hasta unos valores muy próximos a los observados en el pediococo original. En este mismo trabajo, y empleando una cepa de *L. lactis* productora de nisina A, se consiguió la

coproducción de nisina y pediocina; aunque se mantuvo la misma producción de nisina que en la cepa original, la cantidad de pediocina PA-1 fue inferior a la detectada en la cepa recombinante que únicamente producía pediocina. Es de destacar que éste fue el primer trabajo en el que se planteó la posibilidad de coproducir las dos únicas bacteriocinas aceptadas como bioconservantes de los alimentos (Horn et al., 1999).

La enterocina A también se puede producir, e incluso coproducir con la pediocina PA-1, utilizando el sistema de transporte de la lactococina A codificado en el cromosoma de *L. lactis*. El nivel de producción de ambas bacteriocinas representó tan sólo un 4-8% de la producida por las cepas naturales, *E. faecium* T136 y *P. acidilactici* 347, a pesar de que la expresión de sus genes estaba bajo el control de un promotor fuerte. Este bajo rendimiento puede deberse al bajo número de copias de los genes cromosómicos *lcnC'D'* y/o a que el producto de estos genes no sea completamente idéntico a las proteínas de transporte de la lactococina A. En cualquier caso, como ambas bacteriocinas pertenecen a la clase IIa y su estructura, modo de acción y espectro antimicrobiano son muy similares, carecen de acción sinérgica y su coproducción no es un objetivo relevante a nivel práctico (Martínez et al., 2000).

Basándose en los resultados obtenidos en trabajos anteriores, Horn et al. (2004) han desarrollado un sistema de expresión que permite la producción de pediocina PA-1 y colicina V en cepas de *L. lactis* bajo el control del promotor inducible de la nisina (*PnisA*). En este sistema, el gen híbrido “líder de la lactococina/pediocina PA-1 madura” se encuentra en un plásmido, mientras los genes *lcnCD* necesarios para el transporte y la secreción están en un plásmido distinto. La cepa de *L. lactis* utilizada como hospedador heterólogo lleva en su cromosoma dos genes (*nisKR*) cuya expresión es necesaria para que se inicie la transcripción de los genes regulados por *PnisA*. Este sistema permite la expresión heteróloga en *L. lactis* de pediocina PA-1. Pero, además, si el hospedador heterólogo es una cepa de *L. lactis* productora de nisina, se coproducen ambas bacteriocinas, pediocina PA-1 y nisina. En ningún caso la cantidad de pediocina producida superaba el 20-30% de lo observado en *P. acidilactici* 347, aunque la cantidad de nisina si era igual que en la cepa original. Este mismo sistema se empleó para la colicina V, alcanzándose unos niveles de producción del 25-35% con respecto a los observados en la cepa de *E. coli* ATCC 14763. De todos estos resultados, cabe destacar que, por primera vez, se ha obtenido una bacteria láctica que produce una bacteriocina de un

microorganismo Gram-negativo (colicina V) simultáneamente con otra de bacterias Gram-positivas (nisina).

Una estrategia similar a la descrita por Horn et al. (1999) se ha aplicado recientemente para producir pediocina PA-1 en *Lc. mesenteroides* (Morrisset y Frère, 2002), empleando el líder y los genes encargados del transporte de la mesentericina Y105 (*mesCDE*). Nuevamente, los niveles de producción de la pediocina fueron muy similares a los del pediococo parental.

Otro hospedador en el que se ha ensayado la producción heteróloga de bacteriocinas es *Lactobacillus sakei* Lb790 (Axelsson et al., 1998). En este caso se utilizaban los genes involucrados en la activación transcripcional del promotor así como los necesarios para la secreción y el procesado de la sakacina A (genes *orf4sapKRTE*) en un plásmido. Un segundo plásmido portaba el gen estructural y el de inmunidad de la sakacina P, la pediocina PA-1 o la piscicolina 61, bajo el control de sus propios promotores o del promotor de la sakacina A. La producción de sakacina, pediocina o piscicolina fue muy similar o, incluso, superior a la obtenida en las respectivas cepas parentales sobre todo cuando se empleaba el promotor de la sakacina A.

II.2.8.3.3. Aplicaciones y perspectivas futuras de la producción heteróloga de bacteriocinas en bacterias lácticas

Hasta el momento, la utilización de bacterias lácticas es una de las pocas alternativas válidas para la que aplicación de estas bacteriocinas recombinantes sea aceptada por la industria alimentaria. Sin embargo, no hay que descartar el empleo de otros hospedadores heterólogos en un futuro próximo, siempre y cuando se demuestre que no poseen determinantes genéticos que puedan ser perjudiciales para la salud del consumidor.

En estos últimos años se han desarrollado algunos vectores de expresión para la producción de proteínas recombinantes en bacterias lácticas. Sin embargo, un aspecto muy importante relación a la aplicación en la industria alimentaria es que los sistemas de expresión heteróloga puedan recurrir a vectores de “grado alimentario”, es decir, vectores que no requieran compuestos dañinos y carezcan de antibióticos como marcadores de selección. En caso contrario, existiría la posibilidad de transferencia a la microbiota intestinal, poniendo en

peligro la terapia antibiótica en humanos. Se ha propuesto que los sistemas de grado alimentario deberían estar constituidos por vectores de expresión que contengan únicamente DNA procedente del hospedador heterólogo GRAS, o al menos, de otro hospedador que también sea considerado como seguro. Con ello se conseguiría algo similar a un sistema de “autoclonación” lo cual facilitaría la autorización para su uso (de Vos, 1999).

Entre los posibles marcadores de selección para sistemas de grado alimentario se encuentran los que confieren un nuevo fenotipo y los que complementan una función dañada. En la primera clase están aquellos basados en la utilización de azúcares poco habituales, como por ejemplo la melibiosa o la rafinosa, y los marcadores que confieren resistencia o inmunidad a determinadas sustancias consideradas seguras, como la nisina o la lactacina F. En cuanto al segundo tipo, se puede emplear cualquier función vital que se pueda inactivar para obtener un mutante auxotrófico y complementar posteriormente con genes codificados en un plásmido (ejemplo, auxotrofías para lactosa, timidina o pirimidina) (de Vos, 1999). Existe una tercera opción que consiste en emplear dos plásmidos, codificando uno de ellos la resistencia a un antibiótico. Inicialmente se necesitan los dos plásmidos, pero en las células transformadas al eliminar la presión selectiva desaparece el vector que no lleva la resistencia a antibiótico. Es decir, el microorganismo final obtenido es de grado alimentario (Cotter et al., 2003).

Otro aspecto de gran interés es el desarrollo de sistemas de expresión controlada que permiten la expresión del gen independientemente del crecimiento del hospedador (Kuipers et al., 1997). De todos los sistemas de expresión controlados descritos hasta la fecha, el más fiable y utilizado es el que responde a mínimas dosis de nisina, conocido como sistema NICE (del inglés, *Nisin-Controlled-Expression*) (Kuipers et al., 1998). Los elementos imprescindibles en cualquier sistema NICE son una cepa que contenga los genes *nisRK* encargados de la regulación del operón de la nisina, la nisina que actúa como molécula inductora y el gen de interés que debe estar controlado por el promotor de la nisina. Una vez que se poseen todos estos elementos, la inducción controlada es un proceso sencillo. La presencia de nisina extracelular (0,1-5 ng/ml) se traduce en una autofosforilación de la proteína NisK que transfiere su grupo fosfato a la proteína NisR para iniciar la transcripción de los genes bajo el control del promotor de la nisina, que llegan a inducirse hasta 1000 veces por encima de su nivel basal de expresión.

Otra ventaja que ofrecen los sistemas NICE para la producción heteróloga de proteínas es su flexibilidad, puesto que la relación dosis-respuesta entre la concentración del inductor y la producción de la proteína de interés es lineal. Además, son muy versátiles, puesto que se han utilizado con éxito para la expresión de una gran variedad de proteínas de interés no sólo para la industria alimentaria, sino también para el ámbito médico y biotecnológico, y en un gran número de bacterias lácticas como recoge la revisión de Mierau y Kleerebezem (2005).

La mayoría de los sistemas de expresión heteróloga se basan, por lo general, en vectores que portan determinados marcadores de selección. Estos vectores que pueden ser bastante inestables, ya que requieren de una presión selectiva constante. Este inconveniente se podría solucionar mediante la utilización de los llamados sistemas de integración cromosómica. Su aplicación práctica es dudosa, puesto que el número de copias por bacteria sería muy reducido. De momento, este sistema se ha empleado para integrar el operón completo de la nisina en *Bacillus subtilis* para estudiar con detalle los mecanismos de modificación postraducional de este antibiótico (Yuksel y Hansen, 2007). Por otro lado, casi todas las bacterias lácticas utilizadas como hospedadores heterólogos pertenecen al grupo de las denominadas “cepas de laboratorio”. Estas cepas de laboratorio pueden servir de referencia en los primeros ensayos, pero una vez que ya han sido evaluados, sería importante sustituirlas por otras aceptables para uso industrial. A este respecto, algunos autores ya han mostrado la posibilidad de utilizar cepas de bacterias lácticas de valor comercial para la expresión heteróloga de bacteriocinas (Buyong et al., 1998).

Por tanto, de todo lo expuesto en este apartado se deduce que la aplicación práctica de las bacteriocinas expresadas heterológamente pasa por la utilización de vectores de grado alimentario y de cepas consideradas como seguras o de interés en la industria alimentaria. No conviene olvidar que el uso de organismos modificados genéticamente capaces de producir bacteriocinas se podría enfrentar a importantes barreras legales, además de la oposición de las industrias y consumidores, por lo que la construcción de bacterias lácticas que contengan exclusivamente material genético de grado alimentario sería el primer paso para intentar comprender la ventaja que supone la utilización de este tipo de microorganismos (Rodríguez et al., 2002b). No obstante, sería necesario optimizar los sistemas de expresión antes de cualquier tipo de aplicación práctica. Es obvio que la mayoría de los sistemas desarrollados

hasta este momento para la producción heteróloga de bacteriocinas ofrecen ciertas limitaciones, como por ejemplo, los niveles de producción que alcanzan o la versatilidad que ofrecen para su aplicación en diferentes hospedadores.

Otro escollo muy importante para la aplicación industrial de las bacteriocinas es la viabilidad económica de su producción a gran escala. Para ello se están haciendo esfuerzos en varios sentidos. Por un lado, es necesario buscar cepas que sean capaces de producir bacteriocinas en medios de bajo coste. La caracterización de *P. acidilactici* C20, una cepa productora de pediocina PA-1, reveló que poseía una galactosidasa β inducible por lactosa, lo que le confería la capacidad de fermentar lactosa. Este rasgo metabólico permite aprovechar un subproducto de la industria láctea, el suero de quesería, como medio para producir pediocina con un buen rendimiento y a un bajo coste (Halami y Chandrashekar, 2005). También es necesario desarrollar métodos simples para la purificación a gran escala de bacteriocinas.

II.3. ENTEROCOCOS

II.3.1. Perspectiva histórica

El género *Enterococcus* pertenece al Filum *Firmicutes*, Clase *Bacilli*, Orden *Lactobacillales* y Familia *Enterococcaceae*; esta última incluye, además, los géneros *Melissococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus* (Garrity y Holt, 2001). Sin embargo, la taxonomía de las especies que integran este género ha sufrido numerosos cambios durante el siglo pasado, tal y como se describe a continuación.

La primera descripción de un miembro de este género fue realizada por Thiercelin (1899) con relación a un diplococo Gram-positivo aislado de una muestra intestinal humana. Poco después, Thiercelin y Jouhaud (1903) acuñaron el término “enterococo” (*entérocoque*) para referirse a este tipo de bacterias. Andrewes y Horder (1906) propusieron la denominación de *Streptococcus faecalis* para una bacteria aislada de un paciente con endocarditis ya que, a pesar de este origen, consideraron que se trataba de un microorganismo característico del intestino humano. Durante la siguiente década varios autores incluyeron

nuevos aislados dentro de la especie *S. faecalis*. Orla-Jensen (1919) describió cepas de dos nuevas especies (*S. glycerinaceus* y *S. faecium*) que fueron prácticamente ignoradas durante muchos años. De hecho, hasta finales de los años 30, todos los aislados fecales que compartían unas mínimas características comunes con la bacteria descrita por Andrewes y Morder siguieron considerándose como *S. faecalis* (Murray, 1990).

Sherman (1937) advirtió que el término “enterococo” se había empleado para designar, no sólo a los aislados que pertenecían estrictamente a la especie *S. faecalis*, sino a cualquier estreptococo de origen fecal. En consecuencia, propuso un nuevo esquema de clasificación en la que los estreptococos se estructuraban en cuatro grupos: piogénicos, viridans, lácticos y enterococos. Este último término quedaba reservado para aquellos estreptococos capaces de crecer entre 10 y 45 °C, en presencia de un 6,5% de cloruro sódico y/o a pH 9,6. Además, tenían que hidrolizar la esculina en presencia de bilis y sobrevivir a 60°C durante 30 min. Esta clasificación guardaba cierta correlación con la clasificación serológica propuesta a principios de los años 30 por Lancefield, basada en la presencia de un antígeno en la pared celular. Así, los enterococos reaccionaban con los antisueros del grupo D, los estreptococos lácticos con los del grupo N, los piógenos con los de los grupos A, B, C, E, F o G y los viridans no se podían agrupar siguiendo este criterio. Sherman incluyó cuatro especies dentro de los enterococos (*S. faecalis*, *S. zymogenes*, *S. liquefaciens* y *S. durans*) pero añadió que, dado las grandes similitudes existentes entre las tres primeras, quizás sería más apropiada la siguiente terminología: *S. faecalis* (no hemolítica, no proteolítica), *S. faecalis* var. *zymogenes* (hemolítica, proteolítica), *S. faecalis* var. *liquefaciens* (no hemolítica, proteolítica), *S. faecalis* var. *hemolyticus* (hemolítica, no proteolítica) y *S. durans*. Décadas después, se observó que la hemólisis es una propiedad totalmente inadecuada para distinguir entre especies ya que está mediada por un plásmido y puede ser transferida a cepas no hemolíticas (Ike et al., 1987).

Sherman consideró que las especies *S. glycerinaceus* y *S. faecium*, propuestas por Orla-Jensen, eran indistinguibles de *S. faecalis*. No obstante, a lo largo de las décadas de los 40 y los 50, varios estudios mostraron que los aislados que se habían identificado originalmente como *S. faecium* realmente poseían ciertas propiedades bioquímicas que los diferenciaban de *S. faecalis* y, así, esta especie se incorporó a la nomenclatura oficial a mediados de los años 60 (Barnes, 1956; Hartman et al., 1966).

Paralelamente, entre los años 30 y los 80 se fueron aislando numerosos enterococos a partir de las más diversas fuentes (alimentos, animales, vegetales, muestras humanas), incluyendo algunos que, con relación a *S. faecalis*, manifestaban propiedades “atípicas” como motilidad, pigmentación y/o reactividad no sólo con el antisuero del grupo D sino con otros, como el del grupo Q. Los nuevos aislados se fueron clasificando y reclasificando en forma de distintas especies, subespecies y variedades, la mayoría de las veces sin un criterio muy definido, lo que provocó un período de gran confusión taxonómica (Murray, 1990).

A partir de los años 80, la progresiva generalización de las técnicas genéticas como herramienta esencial en el campo taxonómico, ha contribuido decisivamente a clarificar la situación. Así, la aplicación de las técnicas de hibridación DNA-DNA y de secuenciación del 16S rRNA reveló que *S. faecalis* y *S. faecium*, por una parte, y los streptococos del grupo N, por otra, eran lo suficientemente distintos del resto de estreptococos como para ser transferidos a dos nuevos géneros: el género *Enterococcus* y el *Lactococcus*, respectivamente (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1984). Desde entonces, se han añadido al género *Enterococcus* otras especies de tal manera que en la actualidad está integrado por 28 especies: *E. asini*, *E. avium*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hiraе*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. saccharolyticus*, *E. saccharominimus*, *E. solitarius*, *E. sulfureus* y *E. villorum* (Foulquie Moreno et al., 2006). El análisis comparativo de los genes 16S rRNA de las diferentes especies ha permitido la distinción de ocho grupos: grupo *E. faecium*, grupo *E. avium*, grupo *E. gallinarum*, grupo *E. dispar*, grupo *E. saccharolyticus*, grupo *E. cecorum*, grupo *E. faecalis* y grupo *Tetragenococcus*. Entre las diferentes especies del género *Enterococcus*, *E. faecalis* y *E. faecium* siguen siendo las más representativas, jugando papeles muy importantes en numerosos alimentos y en hospedadores humanos y animales, ya sea como probióticos, como comensales o, en ocasiones, como patógenos oportunistas.

En un futuro próximo, se podrían producir algunas reclasificaciones ya que, por ejemplo, no se observan suficientes diferencias entre *E. casseliflavus* y *E. flavescens* para que sean clasificadas separadamente (Descheemaeker et al., 1997; Devriese y Pot, 1995) y, además, existe cierta controversia sobre otras dos especies, *E. avillorum* y *E. porcinus* (De Graef et al., 2003).

II.3.2. Aislamiento e identificación de enterococos

El hecho de que los enterococos se encuentren entre los microorganismos a considerar en numerosas muestras alimentarias, clínicas y ambientales ha propiciado que su aislamiento, enumeración e identificación sea una tarea habitual en muchos laboratorios. En lo que respecta a su aislamiento, se han propuesto más de cien medios de cultivo que, frecuentemente, incluyen substratos cromogénicos diferenciales o sustancias inhibitoras del crecimiento de otros grupos bacterianos (Reuter, 1992). Entre los más empleados destacan el Slanetz Bartley (Slanetz y Bartley, 1957) y el agar Kanamicina Esculina Azida (KAA) (Mossel et al., 1978), ya sea en su formulación original o con diversas modificaciones. No obstante, no existe ningún medio ideal o universal para el aislamiento y enumeración de enterococos ya que todos ellos tienen ciertos inconvenientes en términos de selectividad y/o capacidad de recuperación, tal y como concluyeron Garg y Mital (1991) y Domig et al. (2003a) en sus excelentes revisiones sobre este tema.

Una vez aislados, los presuntos enterococos deben ser caracterizados e identificados. La diferenciación e identificación bacteriana es un área en pleno desarrollo que se basa en una combinación de métodos “clásicos” y “avanzados”. En muchos casos, las diferencias fenotípicas (morfología, pruebas bioquímicas) no son suficientes para establecer relaciones filogenéticas y puede conducir a una clasificación errónea de los enterococos (Domig et al., 2003b). Por este motivo, es necesario emplear técnicas de identificación basadas en la composición única de los ácidos nucleicos de las distintas bacterias. De hecho, la “taxonomía polifásica” combina la información fenotípica y genotípica y forma la base de la Sistemática Bacteriana actual.

Por lo que respecta a las características fenotípicas, existen ciertas características que parecen comunes para todas las especies de enterococos (Devriese y Pot, 1995). Los miembros del género *Enterococcus* son cocos ovoides, Gram-positivos, con un bajo contenido de G+C (<50 mol%) en su DNA y que se disponen solos, en parejas o formando cadenas cortas. Estas características morfológicas se pueden visualizar con una alta reproducibilidad cuando crecen en agar BHI a 37°C. En general, son organismos anaerobios aerotolerantes ya que, aunque carecen de catalasa, poseen superóxido dismutasas y peroxidasas que degradan el

oxígeno y el peróxido de hidrógeno generados en condiciones de aerobiosis en las que, de hecho, muestran un crecimiento excelente cuando el resto de condiciones son favorables. El metabolismo de carbohidratos de los enterococos es típicamente homofermentativo (ruta de Embden-Meyerhof-Parnas) y conduce a la producción de ácido L-láctico como producto final predominante. Por otra parte, todas las especies poseen un peptidoglicano del tipo lisina-D-asparagina, a excepción de *E. faecalis* en el que es del tipo lisina-alanina²⁻³ (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1987).

En el caso de los enterococos “típicos” (*E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae* y *E. mundtii*), su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 32 y 37°C aunque la mayor parte de las especies pueden crecer a temperaturas de entre 10 y 45 °C. Además, también pueden crecer en presencia de un 6,5% de cloruro sódico, de un 40% de bilis y/o a pH 9,6. No obstante, muchas de las especies descritas recientemente muestran algunas propiedades que difieren de las que tradicionalmente se habían considerado características de los enterococos. Por ejemplo, *E. dispar*, *E. sulfureus*, *E. malodoratus* y *E. moraviensis* no crecen a 45°C (Collins et al., 1984; Martínez-Murcia et al., 1991; Svec et al., 2001) mientras que *E. cecorum* y *E. columbae* no lo hacen a 10°C (Devriese et al., 1993). Además, *E. avium*, *E. saccharominimus*, *E. cecorum* y *E. columbae* no crecen, o lo hacen pobremente, en presencia de un 6,5% de cloruro sódico (Devriese et al., 1993; Vancanneyt et al., 2002). Todas las especies reaccionan con el antisuero del grupo D de Lancefield con la excepción de *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. pseudoavium*, *E. saccharolyticus* y *E. sulfureus* (Hardie y Whiley, 1997). A este respecto conviene señalar que, en las últimas décadas, aproximadamente un tercio de los leuconocots aislados de materiales clínicos se clasificaron erróneamente como enterococos debido a que reaccionaban con el antisuero del grupo D (Facklam y Elliott, 1995). Finalmente, existen dos especies pigmentadas, *E. casseliflavus* y *E. mundtii*, y dos móviles, *E. casseliflavus* y *E. gallinarum* (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1987). En estas últimas, la motilidad puede variar dependiendo de la composición del medio de cultivo (Toth y Van Horn, 1999). La Tabla II.6 muestra las principales características fisiológicas de diversas especies de enterococos.

Actualmente, existe un amplio abanico de métodos para identificar y/o tipar enterococos, cada uno de ellos con un poder discriminatorio definido. El biotipado es uno de los sistemas más empleados para la diferenciación bacteriana y se ha basado tradicionalmente

Tabla II.6. Características fisiológicas de las distintas especies de enterococos

Especie	Crecimiento a:		Crecimiento en presencia de:				Hidrólisis esculina	Antígeno Grupo D
	10°C	45°C	pH 9.6	NaCl (6,5%)	Bilis (40%)	Azida sódica (0,04%)		
<i>E. asini</i>	(+)	(+)	n.d.	-	+	n.d.	+	+
<i>E. avium</i>	V	+	+	V	V/+	n.d.	+	+
<i>E. casseliflavus</i>	+	+	+	V/+	+	+	+	+
<i>E. cecorum</i>	-	+	(+)	-	(+)	-	+	-
<i>E. columbae</i>	-	n.d.	n.d.	-	(+)	-	+	-
<i>E. dispar</i>	+	-	n.d.	+/-	+	-	+	-
<i>E. durans</i>	+	+	+	+	+	+	+	(+)
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	+	+	+	V
<i>E. flavescens</i>	V/-	V/+	n.d.	+	+	+	+	+
<i>E. gallinarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. haemoperoxidus</i>	+	-	n.d.	+	+	+	+	+
<i>E. hirae</i>	+	+	+	+	+	+	+	V
<i>E. malodoratus</i>	+	-	+	+	+	n.d.	+	+
<i>E. moraviensis</i>	+	-	n.d.	+	+	+	+	+
<i>E. mundtii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. porcinus</i>	+	+	n.d.	+	n.d.	n.d.	+	+
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	+	+/-	V/+	n.d.	+	-
<i>E. raffinosus</i>	(+)	+	+	+	V/+	n.d.	+	n.d.
<i>E. ratti</i>	+	+	n.d.	+	n.d.	n.d.	+	(+)
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	n.d.	(+)	+	n.d.	+	-
<i>E. solitarius</i>	+	+	n.d.	+	+	n.d.	+	+
<i>E. sulfureus</i>	+	-	n.d.	+	+	n.d.	+	-
<i>E. villorum</i>	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	+	+	n.d.

n.d., no determinado; (+), débilmente positivo; V, variable; +/-, resultados contradictorios en la literature. *E. solitarius* parece pertenecer realmente al género *Tetragenococcus* (Devriese y Pot, 1993).

en la determinación del perfil de fermentación de carbohidratos y del de actividades enzimáticas. Para ello, se suelen emplear *kits* que no sólo permiten su obtención de una forma rápida, cómoda y semicuantificable, sino también su comparación con los perfiles existentes en bases de datos. Sin embargo, los *kits* disponibles en la actualidad sólo permiten la identificación presuntiva de un número muy limitado de especies del género *Enterococcus* e, incluso en tales casos, los resultados deben ser considerados como meramente orientativos, siendo necesarias pruebas fenotípicas y genotípicas adicionales. Para ello, diversos autores han propuesto claves para la identificación fenotípica de las especies de *Enterococcus* (Devriese et al., 1996; Facklam y Collins, 1989; Facklam y Sahm, 1995; Manero y Blanch, 1999; Reed et al., 1999) pero todavía no existe un acuerdo sobre cuales son las pruebas estrictamente necesarias para su clasificación inequívoca.

Alternativamente, existen otras técnicas de biotipado que permiten una identificación más precisa. Entre ellas destacan la comparación de los perfiles de proteínas totales obtenidos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y la electroforesis de isoenzimas (MLEE). Ambas técnicas son reproducibles y tienen un alto poder discriminatorio pero, en lo concerniente a los enterococos, la MLEE parece más adecuada cuando se trata de establecer relaciones entre un elevado número de aislados (Tomayko y Murray, 1995). El resto de pruebas de tipado basadas en propiedades fenotípicas, como los ensayos de susceptibilidad a ciertos antimicrobianos, el serotipado o el análisis de ácidos grasos de cadena larga, tienen un uso mucho más restringido. Finalmente, y como se ha comentado anteriormente, la disponibilidad de técnicas de biología molecular ha contribuido decisivamente a que la identificación de enterococos sea cada vez más rápida y exacta. Entre los métodos genotípicos que se han empleado para tal fin destacan los análisis de restricción (REA) del DNA cromosómico, la comparación de perfiles plasmídicos, la electroforesis de campo pulsado (PFGE), el ribotipado, el tipado de secuencias multilocus (MLST), las técnicas de hibridación y toda la gama de sistemas basados en la PCR. La aplicación de todas estas técnicas a la identificación y tipado de enterococos ha sido revisada en detalle por Domig et al. (2003b).

II.3.3. Los enterococos en hospedadores sanos

En los últimos años, se ha puesto en evidencia que la hipótesis tradicional sobre la colonización del intestino neonatal, que consideraba que tanto el feto *in utero* como la leche materna eran estériles, era errónea. De hecho, se han podido detectar bacterias propias del aparato digestivo de la madre en muestras de corioamnion, líquido amniótico y/o sangre de cordón umbilical de niños sanos en los que las membranas placentarias estaban intactas (Bearfield et al., 2002; Dasanayake et al., 2005; Hitti et al., 1997; Jiménez et al., 2005). Entre estas bacterias destacan estreptococos, estafilococos y enterococos. La capacidad de translocación intestinal de ciertos enterococos sin causar efectos perjudiciales para el hospedador ha sido puesta de manifiesto tanto *in vitro* como *in vivo* (Berg, 1995; Berg y Garlington, 1979; Fernández et al., 2004; Jiménez et al., 2005; Rodríguez et al., 2001). Es más, la translocación de bacterias lácticas en la cavidad oral de mujeres embarazadas con una placenta completamente normal deriva en la presencia de estas bacterias en el líquido amniótico, un proceso que tiene una clara influencia beneficiosa en el proceso de gestación ya que se ha asociado a una menor tasa de prematuridad (Dasanayake et al., 2005).

Todo ello sugiere que estas bacterias pueden acceder desde el aparato digestivo a la circulación sistémica y, posteriormente, aparecer en fluidos como el líquido amniótico o la leche materna. En este sentido, la administración por vía oral de una cepa de *E. faecium* marcada genéticamente a ratonas preñadas permitió observar la transferencia de la cepa marcada tanto al intestino fetal (bajo nivel de transferencia) como a la glándula mamaria de las madres (alto nivel de transferencia) (Fernández et al., 2004). Precisamente, en estos últimos años también se ha puesto de manifiesto que la leche materna es una fuente constante de bacterias comensales para el intestino del lactante, encontrándose en concentraciones relativamente elevadas ($>10^4$ ufc/ml) y siendo particularmente rica en estreptococos, estafilococos y bacterias lácticas, entre las que destacan los enterococos (Beasley y Saris, 2004; Heikkilä y Saris, 2003; Martín et al., 2003; Ng et al., 2004). Recientemente, se ha confirmado que la concentración de lactobacilos y enterococos es significativamente más elevada en la microbiota de lactantes que en la de niños alimentados con fórmulas (Ahrné et al., 2005; Rinne et al.,

2005). La aplicación de técnicas moleculares basadas en los genes que codifican el 16S rRNA ha confirmado que la leche materna es una buena fuente de enterococos (Martín, 2005).

En las primeras semanas de vida, bacterias anaerobias facultativas (estreptococos, enterococos, estafilococos, lactobacilos, enterobacterias) colonizan el TGI del neonato. Parece significativo que se trate precisamente de los grupos bacterianos más representativos de la microbiota de la leche materna (Martín, 2005). Estas bacterias crearían un ambiente reductor favorable para la colonización de bacterias anaerobias (bifidobacterias, bacteroides y clostridios). Cuando se inicia la fase de destete, se van introduciendo progresivamente alimentos sólidos y, paralelamente, se va reduciendo la ingesta de leche materna hasta su completa sustitución. Estas circunstancias producen grandes cambios en la composición de la microbiota intestinal infantil, de tal manera que, en poco tiempo, desaparecen las diferencias entre la microbiota de los lactantes y la de los alimentados con fórmulas (Mackie et al., 1999; Stark y Lee, 1982). En general, se estima que los grupos microbianos dominantes en la microbiota intestinal de los niños de dos años son similares a los de los adultos (Favier et al., 2002). En cualquier caso, la microbiota intestinal parece ser específica de cada individuo y las poblaciones dominantes suelen permanecer estables a lo largo del tiempo.

Finalmente, los enterococos son característicos de otras mucosas humanas, como la mucosa vaginal en la que, junto con los lactobacilos, contribuyen a evitar infecciones. Todo ello sugiere que los enterococos son habitantes normales de las mucosas de hospedadores sanos, en las que desempeñarían funciones biológicas que están aún por esclarecer. Tal es así que, de hecho, la ausencia de estas bacterias en el intestino y la vagina de humanos sanos debería considerarse como una verdadera anomalía.

II.3.4. Los enterococos como probióticos

Posiblemente, el término “*probiótico*” fue empleado por primera vez por Vergio (1954) cuando comparaba los efectos adversos (“*antibiotika*”) que los

antibióticos ejercían sobre la microbiota intestinal con las acciones beneficiosas (“*probiotika*”) ejercidas por otros factores que no pudo determinar. Una década más tarde, Lilly y Stillwell se referían a los probióticos como sustancias que producían ciertos protozoos que promovían el crecimiento de otros microorganismos (Lilly y Stillwell, 1965). Fuller (1989) los redefinió como “suplementos alimenticios integrados por microorganismos vivos que afectan beneficiosamente al hospedador que los consume mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal”. Más recientemente, la FAO y la OMS los han definido como “organismos vivos que ingeridos a dosis definidas ejercen efectos beneficiosos para la salud” (FAO/WHO, 2002). Esta última definición es más amplia y tiene en cuenta los resultados de recientes investigaciones que demuestran la existencia de efectos probióticos que no se restringen al ámbito intestinal.

Las bacterias lácticas y las bifidobacterias ocupan el lugar más destacado entre los microorganismos empleados con fines probióticos pero también se utilizan con este fin otras bacterias, como *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*, y levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*. Dentro de las bacterias lácticas, los dos géneros más empleados hasta la fecha con este fin son *Lactobacillus* (el más destacado en este sentido) y el que nos ocupa: *Enterococcus* (Holzapfel et al., 1998). Diversas cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* se han empleado y se siguen empleando como probióticos humanos en diferentes presentaciones. Además, algunos estudios han puesto en evidencia la presencia de enterococos en alimentos y suplementos probióticos cuya presencia no se hacía constar en el etiquetado (Temmerman et al., 2003). Por otra parte, estas bacterias también se han aplicado como probióticos en animales; por ejemplo, desde el año 2004 la Unión Europea ha autorizado como aditivos en piensos animales 10 preparaciones que, globalmente, contienen 9 cepas de *E. faecium* (Comisión Europea, 2004).

Entre las cepas de enterococos empleadas como probióticos, *E. faecium* SF68 (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basilea, Suiza) es una de las más estudiadas. Diversos estudios clínicos han demostrado su eficacia en la prevención de diarreas asociadas a antibioterapia (Wunderlich et al., 1989) y en el tratamiento de diarreas infantiles (Bellomo et al., 1980). Más recientemente, esta cepa se ha aplicado en dos hospitales

belgas para tratar a adultos con diarrea aguda, observándose una reducción significativa en la duración del proceso (Buydens y Debeuckelaere, 1996). Resulta significativo que la empresa MD Foods (Aarhus, Dinamarca) ha vendido desde hace muchos años diversos productos lácteos que contienen concentraciones elevadas de *E. faecium* SF68 ($>10^8$ ufc/ml) (gama GAIO) sin que se haya descrito ningún efecto adverso hasta la fecha. Un estudio reciente evaluó la relación entre el consumo de un producto GAIO y el tratamiento con vancomicina y la conclusión fue que la cepa *E. faecium* SF68 presente en el producto fue incapaz de adquirir resistencia a la vancomicina durante el periodo de estudio (Lund et al., 2000).

E. faecium PR88 (*E. faecium* Fargo 688; Quest International, Naarden, Holanda) es otra de las cepas evaluadas en ensayos clínicos humanos. Su consumo se ha asociado a una mejora de los síntomas del síndrome de colon irritable (Allen et al., 1996). Esta cepa se ha empleado para la producción de un queso Cheddar probiótico y su aplicación no sólo no afecta negativamente a las propiedades organolépticas del queso sino que incluso mejora su aroma y sabor (Gardener et al., 1999). Por otra parte, la cepa *E. faecium* CRL 183 ha mostrado su potencial probiótico *in vitro*, especialmente en lo referente a actividad hipocolesterolémica (Rossi et al., 1999). Finalmente, existe un producto en el mercado (Ecoflor, Walthers Health Care, Den Haag, Holanda) que contiene una cepa de *E. faecium* que, según el productor, posee numerosas actividades beneficiosas para el hospedador aunque no existen evidencias científicas al respecto.

El empleo de enterococos como probióticos es un tema controvertido debido a su papel como patógenos oportunistas y a la posible transferencia de genes que codifican resistencias a antibióticos (ver secciones siguientes). No obstante, existen evidencias científicas del potencial probiótico y de la seguridad de diversas cepas. De hecho, los enterococos forman parte de la microbiota natural de la leche materna y de la existente en el intestino de lactantes sanos, una población particularmente sensible a las infecciones. Además, estas bacterias son predominantes en numerosos alimentos fermentados consumidos por la población general, desde niños hasta ancianos, sin que se hayan asociado a problemas sanitarios. De momento, las compañías más representativas del sector no comercializan productos que contengan cepas de

enterococos para evitar cualquier polémica interesada pero es posible que esta situación se reconsidere a medio y largo plazo, cuando existan las herramientas y las condiciones necesarias para una evaluación objetiva de su seguridad.

II.3.5. Los enterococos como patógenos oportunistas

Tradicionalmente, los enterococos se habían considerado como bacterias comensales que habitaban el tracto intestinal de personas y animales, en buena sintonía con sus hospedadores y con otros miembros de la microbiota intestinal, y realmente es lo que sucede en la mayoría de los casos. Sin embargo, en las últimas décadas se ha observado una creciente implicación de los enterococos en casos de infecciones humanas. De hecho, estas bacterias se encuentran actualmente entre los agentes que con mayor frecuencia causan infecciones nosocomiales y, en tales circunstancias, pueden provocar bacteriemias, endocarditis e infecciones del tracto urinario, del sistema nervioso central, intraabdominales y/o pélvicas (Endtz et al., 1999; Franz et al., 2003). No obstante, no se debe generalizar esta consideración a todos los enterococos ya que la incidencia de factores de virulencia y de resistencia a antibióticos depende de cada cepa (Eaton y Gasson, 2001; Franz et al., 2002; Temmerman et al., 2003). Vancanneyt et al. (2002) compararon los genotipos de numerosas cepas de *E. faecium* aisladas de muestras humanas, animales y alimentarias, y encontraron que los aislados humanos involucrados en infecciones clínicas podrían englobarse en un mismo subgrupo, distinto de todos los demás. Pillai et al. (2002) también han sugerido la existencia de subpoblaciones virulentas entre las cepas de *E. faecalis*. En consecuencia, la seguridad de cualquier cepa de *Enterococcus* spp. de interés clínico o industrial debe ser evaluada de forma individual y meticulosa.

Hasta hace poco tiempo, se pensaba que las infecciones enterocócicas se adquirían endógenamente, es decir, a partir de la propia flora del paciente; sin embargo, en los últimos años los análisis de casos clínicos han demostrado que prácticamente todas las cepas involucradas tenían un origen exógeno (Keyser, 2003). En este sentido, actualmente se sabe que las infecciones por enterococos suelen seguir un proceso que consta de dos etapas (Keyser, 2003); inicialmente, se produce una colonización asintomática de los pacientes con cepas que poseen factores de virulencia

y resistencia a antibióticos y que son endémicas en un hospital o unidad hospitalaria; seguidamente, esta población exógena crece, a menudo favorecida por la eliminación de competidores debida a la antibioterapia, y puede conducir a una enfermedad adicional en pacientes de riesgo. Conviene destacar que, incluso en pacientes inmunodeprimidos, los enterococos por sí solos son a menudo incapaces de causar enfermedad y requieren para ello la presencia simultánea de una flora patógena compleja (Keyser, 2003).

Generalmente, los enterococos existentes en ámbitos hospitalarios poseen uno o más factores de virulencia y son resistentes a diversos antibióticos lo que, unido a su robustez intrínseca, les permite sobrevivir y distribuirse rápidamente tanto en el ambiente como en los pacientes. Sin embargo, únicamente en circunstancias muy particulares, los enterococos son capaces de invadir los tejidos de un hospedador y desarrollar un proceso patológico (Keyser, 2003). En este sentido, los principales factores de riesgo asociados a infecciones enterocócicas son la existencia de enfermedades subyacentes graves, los estados de inmunosupresión, las estancias prolongadas en hospitales (especialmente en unidades de cuidados intensivos), la aplicación de catéteres vasculares o urinarios y/o los tratamientos antibióticos prolongados. Frecuentemente, todas esas circunstancias suelen concurrir en los casos de infecciones por enterococos por lo que, en general, se consideran microorganismos de baja patogenicidad e irrelevantes para personas de cualquier edad con un estado de salud normal. Pero la posible patogenicidad de los enterococos no sólo depende de factores relacionados con el hospedador sino también de la cepa implicada. En este sentido, la adquisición de nuevas propiedades puede permitir que una cepa colonice nuevos nichos y sea potencialmente virulenta. Este hecho se puso de manifiesto con la identificación del islote de patogenicidad (PAI) de *E. faecalis* (Shankar et al., 2002), cuya existencia refleja claramente las diferencias genéticas existentes entre cepas potencialmente patógenas y cepas comensales.

II.3.6. Factores de virulencia de los enterococos

Un factor de virulencia es una molécula efectora que aumenta la capacidad de un microorganismo para causar enfermedad más allá de la capacidad intrínseca de su

especie (Murray, 1992). Todavía no se conocen bien los factores de virulencia de los enterococos aunque tanto la reciente identificación de islotes de patogenicidad como la secuenciación del genoma de cepas clínicas de *E. faecalis* y *E. faecium* pueden contribuir a una mejor comprensión en los próximos años (Shankar et al., 2002; Tendolkar et al., 2003). La Tabla II.7 recoge los factores de virulencia de los enterococos propuestos hasta la fecha y en las siguientes secciones se procederá a su descripción.

Tabla II.7. Principales determinantes genéticos de virulencia descritos en enterococos

Gen(es)	Papel de la(s) proteína(s) expresada(s)
<i>agg</i>	Proteína de agregación involucrada en la adherencia a células eucariotas, agregación celular y conjugación
<i>gelE</i>	Toxina; metaloendopeptidasa extracelular, hidroliza gelatina, colágeno, hemoglobina y otros compuestos bioactivos
<i>cylM</i>	Modificación postraducciona l de la citolisina (hemolisina-bacteriocina que lisa un amplio espectro de células de eucariotas y de bacterias Gram-positivas)
<i>cylB</i>	Transporte de la citolisina
<i>cylA</i>	Activación de la citolisina
<i>esp_{fs}</i> ; <i>esp_{fm}</i>	Proteína asociada a la pared celular involucrada en la evasión al sistema inmune por parte de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> , respectivamente; puede estar asociada con los genes <i>cyl</i> en islotes de patogenicidad
<i>efaA_{fs}</i> ; <i>efaA_{fm}</i>	Adhesinas de pared celular, que se expresan en <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> , respectivamente
<i>cpd</i> , <i>cob</i> , <i>ccf</i> , <i>cad</i>	Feromonas sexuales, quimiotáxicos para leucocitos humanos; facilitan los procesos de conjugación

Fuente: Eaton y Gasson (2001)

II.3.6.1. Citolisina

Inicialmente, Sherwood et al. (1949) describieron que algunos estreptococos β -hemolíticos del grupo D inhibían el crecimiento de otras bacterias. Posteriormente, este mismo fenómeno fue observado por otros autores, tal y como se recoge en diversas revisiones sobre el tema (Haas y Gilmore, 1999; Jett et al., 1994). Brock y Davies (1963) y Granato y Jackson (1969) proporcionaron evidencias irrefutables de que la actividad β -hemolítica y la actividad bacteriocinogénica eran debidas a una misma molécula. Más tarde, Gilmore et al. (Gilmore et al., 1990) propusieron que la hemolisina/bacteriocina de *E. faecalis* se denominara citolisina (Cyl; del inglés, *Cytolysin*) para evitar posibles confusiones. El análisis de la citolisina de *E. faecalis* reveló que se trataba de un lantibiótico que poseía una característica diferencial con respecto a otros lantibióticos ya que no sólo era capaz de lisar bacterias sino también eritrocitos y otras células eucariotas (Gilmore et al., 1994). La presencia de citolisina parece estar relacionada con una mayor virulencia de las cepas que la producen (Chow et al., 1993; Dupont et al., 1998; Jett et al., 1992) aunque los resultados no son concluyentes y habrá que esperar a que futuros estudios esclarezcan su implicación en las infecciones enterocócicas.

Los determinantes genéticos para la biosíntesis de la citolisina pueden estar codificados en plásmidos de gran tamaño dependientes de feromonas o en el cromosoma, dentro de un islote de patogenicidad. La biosíntesis de este lantibiótico es un proceso complejo que implica a los productos de la expresión de ocho genes: *cyIR1*, *cyIR2*, *cyLL*, *cyLS*, *cyIM*, *cyIB*, *cyIA* y *cyII* (Coburn et al., 1999; Gilmore et al., 1990; Haas et al., 2002; Ike et al., 1990; Shankar et al., 1999). Estos genes se encuentran organizados en dos transcritos divergentes, cada uno de ellos con su propio promotor: (1) el transcrito estructural (*cyLLLSMBAI*) y (2) el regulador (*cyIRIR2*) (Figura II.11). La expresión de los genes estructurales (*cyLL* y *cyLS*) origina los precursores de las dos subunidades de la citolisina propiamente dicha (Cyl_L y Cyl_S, de 68 y 63 aminoácidos, respectivamente) que sufren una modificación post-traducciona por acción de CylM, un polipéptido de 993 aminoácidos (fruto de la expresión del gen *cyIM*) que introduce modificaciones características de los lantibióticos como la

presencia de los aminoácidos lantionina y β -metil-lantionina (3). Posteriormente, las subunidades resultantes (Cyl_L* y Cyl_S*) son reconocidas y secretadas por CylB, una proteína de tipo ABC resultante de la expresión de *cyiB* (Gilmore et al., 1990; Gilmore et al., 1994). Durante el proceso de transporte se elimina el péptido líder existente en el extremo N-terminal de Cyl_L* (24 aminoácidos) y de Cyl_S* (36 aminoácidos), generándose las subunidades Cyl_L' y Cyl_S', respectivamente. Tras la secreción de las subunidades modificadas y procesadas, la proteína CylA (codificada en el gen *cyiA*) se encarga de la eliminación de los seis aminoácidos N-terminales de Cyl_L' y de Cyl_S', dando lugar a las subunidades activas de la citolisina (Cyl_L'' y Cyl_S'') (Booth et al., 1996; Shankar et al., 1999). CylA es una serín proteasa similar a la subtilisina que se expresa en forma de preproenzima y que no necesita la participación de CylB para su transporte ya que presumiblemente se secreta a través de la ruta de secreción general (Sec). Por su parte, el producto del gen *cyiI* confiere autoprotección para la propia célula productora de citolisina (Coburn et al., 1999).

El operón de la citolisina (*cyiL_LL_SMBAI*) está reprimido por las actividades de las proteínas CylR1 y CylR2, codificadas en el operón regulador (*cyiR1R2*) (Haas et al., 2002). CylR1 es una proteína de 94 aminoácidos, sin homología con otras proteínas conocidas y con tres dominios transmembrana. El gen *cyiR2* codifica una proteína de 66 aminoácidos (CylR2) con un lugar de unión al DNA. La existencia de dos repeticiones (IR1 e IR2) en la región intergénica que separa los genes *cyiR1* y *cyiL_L* parece ser determinante en la regulación de la síntesis de la citolisina. Dado que la repetición IR1 se solapa con el lugar de inicio de la transcripción del operón *cyiR1R2* y con una zona de la región -35 del promotor del operón *cyiL_LL_SMBAI*, la unión entre IR1 y CylR2 bloquea el acceso de la RNA polimerasa al citado promotor reprimiendo la transcripción del operón estructural. A su vez, el receptor transmembrana CylR1 interaccionaría intracelularmente con CylR2 estabilizando el complejo represor. Dicha represión queda anulada mediante un proceso de percepción de quórum en el que Cyl_S'' juega el papel de molécula autoinductora (Shankar et al., 2004). La posición de CylR1 en la membrana le permite interaccionar con el péptido inductor Cyl_S'', unión que desestabiliza el complejo CylR1-CylR2 y que, finalmente, libera a CylR2 de su lugar de unión, posibilitando la transcripción de los genes

estructurales de la citolisina. La Figura II.11 muestra una representación esquemática de la biosíntesis de la citolisina de *E. faecalis*.

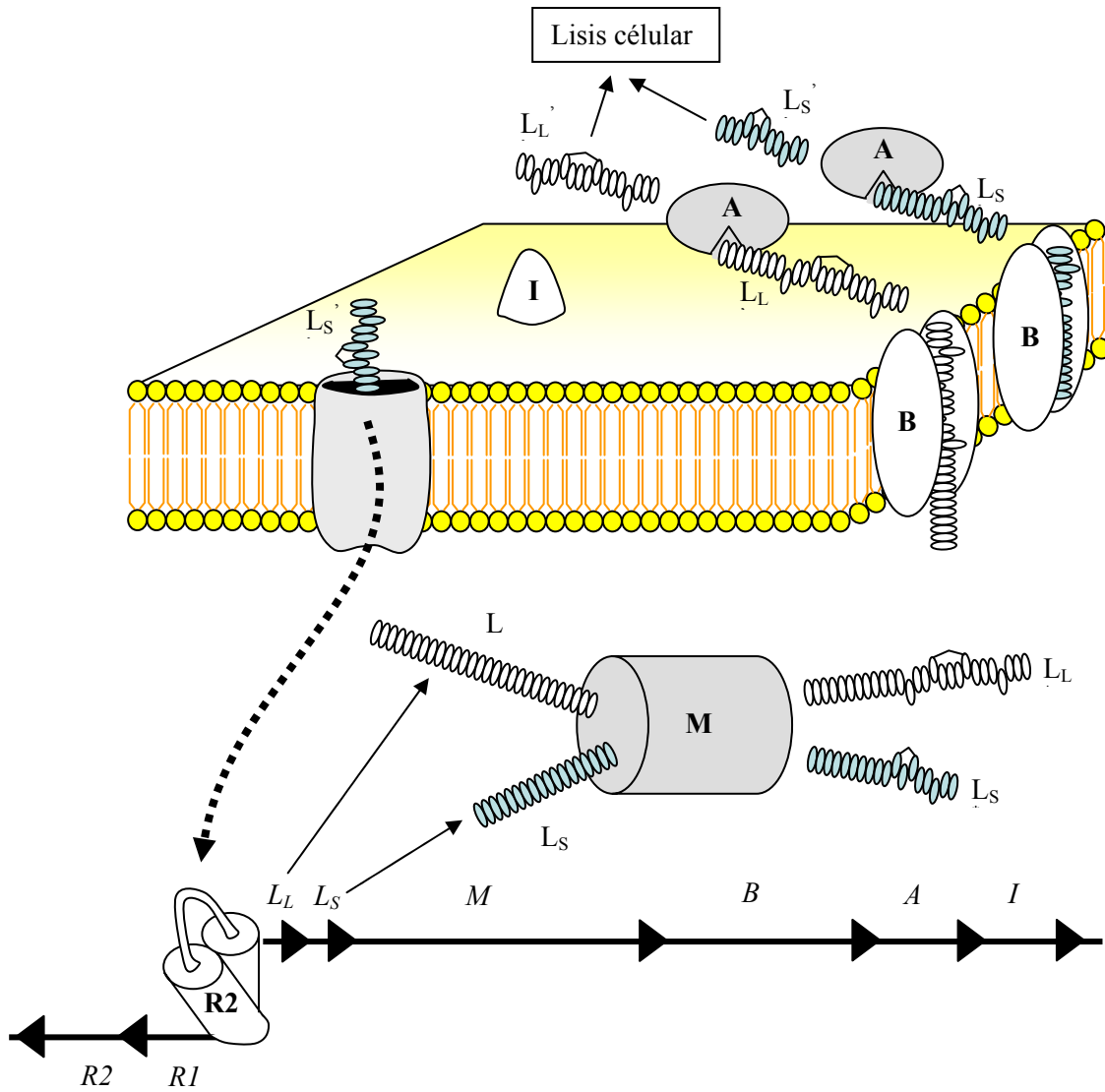


Figura II.11. Representación esquemática del proceso de biosíntesis de citolisina. Los detalles se explican en el texto. Adaptado de Shepard y Gilmore (2002).

II.3.6.2. Gelatinasa

La gelatinasa (GeIE) es una metaloendopeptidasa extracelular producida por *E. faecalis* con capacidad para degradar diversos sustratos, como la gelatina, fragmentos insolubles de colágeno, la cadena β de la insulina, la hemoglobina o la endotelina-1. La GeIE influye en la longitud de las cadenas en las que se suelen disponer las células enterocócicas mediante la activación de una autolisina y también participa en la degradación de la fibrina polimerizada lo que sugiere que podría facilitar la difusión de los enterococos en un hospedador (Waters et al., 2003). Además, su secreción afecta notablemente al nivel de feromonas activas ya que, por ejemplo, la feromona sexual cCF10 es prácticamente indetectable en el sobrenadante de las cepas de *E. faecalis* que expresan *gelE*. Este hecho favorece la diseminación de *E. faecalis* cuando la densidad celular es elevada (Waters et al., 2003). Recientemente, se ha asociado la pérdida de funcionalidad de *gelE* con la incapacidad de *E. faecalis* para translocar a través de células T84 derivadas de carcinoma de colon (Zeng et al., 2005).

El gen *gelE* está localizado en un operón en el que también se localiza el gen *sprE*, que codifica una serín proteasa (SprE) (Figura II.12). Delante de ellos se encuentra el sistema regulador Fsr (del inglés, *E. faecalis* Regulator), constituido por los genes *fsrA*, *fsrB* y *fsrC*, que codifican un regulador de respuesta, un péptido inductor y una proteína sensora, respectivamente (Figura II.12). La expresión del gen *fsrA* se encuentra bajo el control del promotor homónimo (constitutivo y débil), la de *fsrBC* bajo el del promotor *fsrB* y, finalmente, la de *gelE* y *sprE* mediante el promotor *gelE*. La expresión de los genes regulados por los dos últimos promotores depende de un proceso de percepción de quórum (Qin et al., 2000; 2001). La molécula que actúa como autoinductora del sistema es un péptido de estructura cíclica denominado feromona activadora de la biosíntesis de la gelatinasa (GBAP; del inglés Gelatinase Biosynthesis-Activated Pheromone) (Nakayama et al., 2001). La acumulación extracelular de GBAP es detectada por FsrC, una histidín quinasa que, a su vez, activa al regulador de respuesta y al factor de transcripción FsrA, que induce la transcripción y la subsiguiente producción de GeIE y SprE (Hancock y Perego, 2004).

Diversos estudios con modelos animales han sugerido la posible participación del sistema Fsr (incluyendo GelE y SprE) en la patogenia de la infección enterocócica (Mylonakis et al., 2002; Qin et al., 2000; Sifri et al., 2002). Además, el sistema regulador Fsr puede desempeñar un papel en la formación de biofilms (Hancock y Perego, 2004). No obstante, a pesar de la elevada prevalencia del locus *fsr* en aislados clínicos de *E. faecalis* (Pillai et al., 2002), su presencia no es una característica exclusiva de las cepas potencialmente patógenas, por lo que no parece una propiedad que *per se* pueda conducir a una infección (Roberts et al., 2004).

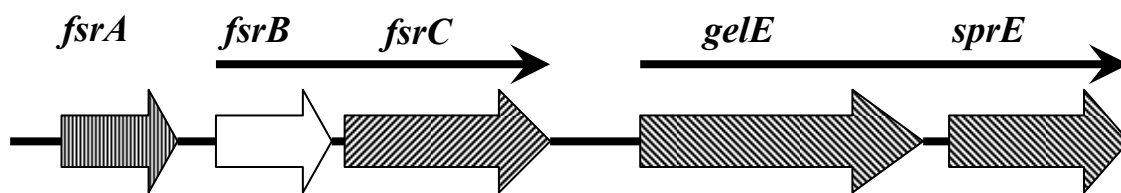


Figura II.12. Organización de los genes *gelE* y *sprE* y del sistema regulador Fsr.
Fuente: Nallapareddy et al. (2000a).

II.3.6.3. Sustancia de agregación y feromonas

La sustancia de agregación (AS; del inglés *Aggregation Substance*) es una proteína de superficie propia de ciertas cepas de *E. faecalis*, cuya expresión es inducida por feromonas sexuales (Tabla II.8). Esta proteína promueve la formación de agregados durante la conjugación bacteriana (Clewel, 1993). Se trata de un componente importante del sistema de intercambio genético dependiente de feromonas y, en este sentido, permite un contacto eficiente entre las células donantes y las receptoras, facilitando la transferencia de plásmidos (Clewel, 1993). En ensayos *in vitro* se ha observado que la AS actúa como mediador en la adhesión de *E. faecalis* a células del túbulo renal (Kreft et al., 1992) y, además, aumenta la internalización o translocación de los enterococos a través de enterocitos humanos (Wells et al., 2000). *In vivo*, la AS puede contribuir a la patogénesis de la infección enterocócica mediante diversos mecanismos como la adhesión a las células del hospedador y a las proteínas

de la matriz extracelular, el aumento de la hidrofobicidad de la superficie celular y los procesos de evasión del sistema inmunitario derivados de su interacción con macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares (Mundy et al., 2000).

Tabla II.8. Secuencia aminoacídica de las principales feromonas sexuales descritas en *E. faecalis*.

Péptido	Secuencia
cCF10	H-Leu-Val-Thr-Leu-Val-Phe-Val-OH
cPD1	H-Phe-Leu-Val-Met-Phe-Leu-Ser-Gly-OH
cAD1	H-Leu-Phe-Ser-Leu-Val-Leu-Ala-Gly-OH
cAM373	H-Ala-Ile-Phe-Ile-Leu-Ala-Ser-OH
cOB1	H-Val-Ala-Val-Leu-Val-Leu-Gly-Ala-OH
iCF10	H-Ala-Ile-Thr-Leu-Ile-Phe-Ile-OH
iPD1	H-Ala-Leu-Ile-Leu-Thr-Leu-Val-Ser-OH
iAD1	H-Leu-Phe-Val-Val-Thr-Leu-Val-Gly-OH
iAM373	H-Ser-Ile-Phe-Thr-Leu-Val-Ala-OH
iOB1	H-Val-Ala-Val-Leu-Val-Leu-Gly-Ala-OH

Fuente: Maqueda et al. (1997)

La AS (Figura II.13) contiene dos motivos RGD (Arg-Gly-Asp) que son comunes entre las proteínas que se unen a las integrinas, una familia de receptores presentes en células eucariotas como leucocitos, trombocitos, células endoteliales y células epiteliales (Sartingen et al., 2000; Süßmuth et al., 2002). La presencia de estos motivos explica el papel de la AS en la unión de los enterococos a las células eucariotas y a las proteínas de la matriz extracelular. Precisamente, la adherencia de los enterococos a las proteínas de la matriz extracelular (fibronectina, trombospondina, vitronectina y colágeno de tipo I) puede ser un factor importante en la patogénesis de las infecciones enterocócicas ya que estas proteínas son más abundantes en epitelios o endotelios dañados y se ha observado que la incidencia y severidad de las endocarditis

producidas por enterococos es mucho mayor cuando existe un daño endotelial previo (Franz et al., 2003).

Por su parte, las feromonas de los enterococos son péptidos de pequeño tamaño codificados en plásmidos (Franz et al., 2003) (Tabla II.8). La presencia de plásmidos regulados por feromonas ha sido descrita tanto en *E. faecalis* como *E. faecium* y en ambas especies se encuentran relacionados con determinantes de virulencia. Hasta el momento, se han descrito cuatro plásmidos feromona-dependientes que codifican la AS en *E. faecalis* mientras que en *E. faecium* los plásmidos regulados por feromonas se relacionan con genes que codifican resistencia a la vancomicina (Castro et al., 2004). El hecho de que algunos genes indeseables estén codificados en plásmidos que responden a feromonas que generalmente sólo se encuentran en *E. faecalis* podría explicar la mayor incidencia de factores de virulencia en cepas de esta especie y su marcado predominio (80-90%) entre los enterococos involucrados en infecciones humanas (Kayser, 2003). Adicionalmente, las feromonas secretadas por las células productoras provocan una respuesta inflamatoria en el hospedador, inducen la secreción de peróxido de hidrógeno y son quimiotácticas para leucocitos humanos por lo que también podrían considerarse por sí mismas como posibles factores de virulencia (Eaton y Gasson, 2001).

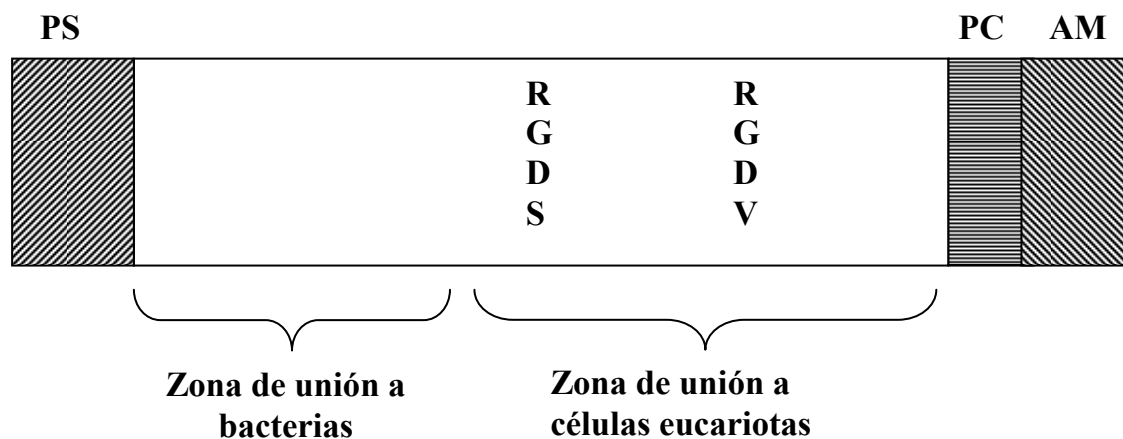


Figura II.13. Sustancia de agregación (AS) de *E. faecalis*. PS: péptido señal; PC: dominio de unión a la pared celular; AM: dominio de anclaje a la membrana; RGD(S/V): secuencia de reconocimiento para las integrinas Fuente: Castro et al. (2004).

II.3.6.4. Proteína de superficie de enterococos

La proteína de superficie extracelular de los enterococos (Esp) es una adhesina que se describió inicialmente en *E. faecalis* MMH594, una cepa muy virulenta y resistente a la gentamicina (Shankar et al., 1999). Esta proteína se encuentra codificada en el gen *esp* que contiene 5622 nucleótidos y cuya expresión resulta en un producto de 1873 aminoácidos. Su extremo N-terminal no muestra similitudes con proteínas conocidas y, posiblemente, es la región que interacciona con las células del hospedador (Shankar et al., 1999). Esp posee una estructura muy característica incluyendo un número variable de bloques repetitivos bien conservados (Figura II.14). Así, su región central supone aproximadamente el 50% de la proteína y está constituida por tres unidades repetitivas (A, B y C). El número de repeticiones oscila entre una y tres en el caso de la unidad A y entre tres y nueve en el de la unidad C. Globalmente, Esp muestra una estructura similar a la de la proteína C-alfa de los estreptococos del grupo B (Wastfelt et al., 1997) y a la de la proteína Bap de *Staphylococcus aureus*, asociada a la formación de biofilms (Cucarella et al., 2001).

La presencia de Esp parece estar asociada a la propagación de los enterococos en pacientes con trasplantes hepáticos (Waar et al., 2002) y a su persistencia en el tracto urinario de animales de experimentación (Shankar et al., 2001). Por otra parte, la expresión de Esp aumenta la hidrofobicidad celular y favorece la adhesión de las células productoras a superficies bióticas o abióticas y la creación de biofilms (Tendolkar et al., 2003; Toledo-Arana et al., 2001) aunque existen otros factores que contribuyen a su formación. Los biofilms desempeñan un papel importante en el origen de muchas infecciones crónicas, como las endocarditis bacterianas, y pueden suponer un importante problema en pacientes con válvulas cardíacas o catéteres (Parsek y Singh, 2003).

La proteína Esp no es exclusiva de *E. faecalis* ya que se ha descrito una variante de esta proteína, Esp_{fm}, en aislados clínicos de *E. faecium* (Eaton y Gasson, 2002). Sin embargo, entre los aislados de origen alimentario, la incidencia de Esp es muy distinta dependiendo de la especie. Así, es muy elevada en los de *E. faecalis* y

extremadamente rara en los de *E. faecium*, sin que se haya podido obtener una explicación hasta la fecha (Eaton y Gasson, 2001; Franz et al., 2001).

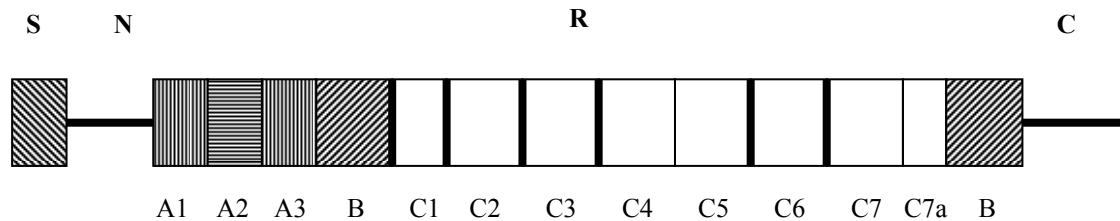


Figura II.14. Proteína Esp de *E. faecalis*. S: péptido señal; N y C: dominios N- y C-terminal, respectivamente; R: dominio con secuencias repetidas A-C. Fuente: Castro et al. (2004).

II.3.6.5. Adhesina de unión al colágeno

La adhesina de unión al colágeno (Ace, del inglés “*Adhesin of Collagen from E. faecalis*”) es una proteína con una gran similitud estructural y funcional con la proteína de unión al colágeno de *Staphylococcus aureus* (Cna) y forma parte de los componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz (MSCRAMMs, del inglés “*Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecules*”) (Nallapareddy et al., 2000a; Rich et al., 1999). Esta adhesina es capaz de interactuar con proteínas de la matriz extracelular como el colágeno (tipos I y IV) y la laminina, favoreciendo la unión de los enterococos a las células del hospedador (Nallapareddy et al., 2000b). El gen que codifica la adhesina Ace es ubicuo entre los aislados de *E. faecalis*, independientemente de que tengan un carácter comensal o patógeno (Duh et al., 2001), y parece expresarse durante el proceso infeccioso. De hecho, la mayoría de los sueros de pacientes con endocarditis enterocócica reaccionan con anticuerpos anti-Ace (Nallapareddy et al., 2000a). No obstante, todavía no se han identificado los factores del hospedador que pueden regular la expresión del gen *ace in vivo*.

Recientemente, se ha identificado un homólogo del gen *ace* en *E. faecium*, recibiendo el nombre de *acm* (Nallapareddy et al., 2003). El mismo estudio reveló que todos los aislados de *E. faecium* analizados poseían el citado gen pero que algunos carecían del fenotipo de unión al colágeno debido a diferentes deleciones y mutaciones dentro del gen o de su promotor putativo.

II.3.6.6. Adhesinas EfaA_{fs} y EfaA_{fm}

Otras moléculas consideradas como posibles factores de virulencia son los antígenos EfaA_{fs} y EfaA_{fm} producidos por *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente. El antígeno EfaA_{fs} muestra una gran homología con ciertas adhesinas estreptocócicas, como PsaA, SsaB, FimA o ScaA. Se cree que EfaA_{fs} interviene en la adhesión de *E. faecalis* a las células del endocardio mientras que aún se desconoce la función de EfaA_{fm} (Franz et al., 2003; Singh et al., 1998).

II.3.6.7. Carbohidratos de la pared celular y polisacáridos capsulares

Los componentes de las cápsulas bacterianas suelen jugar un papel importante en la patogenia de las enfermedades infecciosas ya que debido a su complejidad y a su capacidad para conferir resistencia a la fagocitosis pueden intervenir en los procesos de evasión del sistema inmunitario del hospedador. Recientemente, se ha identificado el operón (*cpsABCDEFGHIJK*) responsable de la biosíntesis del polisacárido capsular más común entre los aislados clínicos de *E. faecalis* (Hancock y Gilmore, 2002). La inactivación insercional de los genes *cps* origina mutantes con mayor sensibilidad a la fagocitosis *in vitro* y menor capacidad para persistir en los ganglios linfáticos de ratones (Hancock y Gilmore, 2002). Además, también se han purificado y caracterizado otros polisacáridos capsulares presentes en la superficie de *E. faecalis* y *E. faecium*, que poseen actividad opsonizante en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Huebner et al., 1999; 2000; Hufnagel et al., 2004). No obstante, se desconoce realmente la implicación de las cápsulas de los enterococos en su posible patogenicidad ya que se ha observado que las personas sanas poseen anticuerpos frente a polisacáridos capsulares de distintos serotipos de *E. faecalis* (Hufnagel et al., 2005).

II.3.6.8. Superóxido extracelular

Los enterococos tienen la peculiaridad de producir cantidades sustanciales de superóxido, una característica particularmente asociada con aislados sanguíneos de *E. faecalis*. Actualmente se conoce la ruta bioquímica que conduce a la producción de superóxido en *E. faecalis* y se ha demostrado su producción *in vivo* en el colon de ratas (Huycke et al., 2001). El superóxido producido por *E. faecalis* parece ejercer un fuerte estrés oxidativo en el epitelio intestinal y, además, podría estar implicado en los procesos de translocación a través de dicho epitelio y/o en la inestabilidad cromosómica asociada a pólipos intestinales y cáncer colorectal (Huycke y Moore, 2002; Huycke et al., 2002).

II.3.7. Resistencia a antibióticos y mecanismos de transferencia

Los enterococos son intrínsecamente resistentes a muchos de los agentes antimicrobianos empleados para tratar infecciones humanas aunque es más preocupante su capacidad para adquirir y transferir resistencias (Mundy et al., 2000). Estas bacterias están provistas de elegantes mecanismos de intercambio genético, a través de los cuales han adquirido un alto nivel de resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos y glucopéptidos (Rice, 2000; Walsh, 2000). Como se ha comentado previamente, la adquisición de resistencias frente a gran parte de los antibióticos que se están utilizando, unida a la fortaleza intrínseca de estos microorganismos, les concede una ventaja selectiva para su persistencia en los ambientes hospitalarios (Shepard y Gilmore, 2002). La Tabla II.9 muestra las principales resistencias a antibióticos mostradas por los enterococos hasta la fecha.

Desde hace mucho tiempo, se conoce la resistencia (nivel bajo) de los enterococos a los antibióticos β -lactámicos (Krogstad y Pargwette, 1980), así como el hecho de que generalmente *E. faecium* es menos sensible que *E. faecalis* a este tipo de agentes. Además, los enterococos pueden mostrar un nivel alto de resistencia a estos antibióticos cuando la proteína de unión a penicilina (PBP5) está alterada y presenta baja afinidad hacia las penicilinas (Ligozzi et al., 1996). En general, la producción de

β -lactamasa por parte de estas bacterias es rara (Murray, 1992) aunque existen evidencias genéticas que sugieren una posible adquisición de los determinantes genéticos de dicha enzima a partir de *S. aureus* (Smith y Murray, 1992). Más recientemente, se ha descrito un nuevo mecanismo de resistencia a β -lactámicos en *E. faecium* en el que se evita la reacción de DD-transpeptidación que ocurre durante la etapa final de la síntesis del peptidoglicano (Mainardi et al., 2000).

Por lo que respecta a la resistencia intrínseca a los aminoglucósidos, la de nivel bajo se ha atribuido a la incapacidad de estos agentes para atravesar la membrana celular de los enterococos mientras que la de nivel alto (muy común entre estas bacterias) se debe a la producción de diversas enzimas modificadoras de aminoglucósidos, entre las que destacan fosfotransferasas, acetiltransferasas y nucleotidiltransferasas (Chow, 2000). En el caso particular de la estreptomycin, la resistencia ocurre debido a un cambio en la estructura de la subunidad 30S del ribosoma (Eliopoulos et al., 1984).

Las resistencias a niveles elevados de glucopéptidos (vancomicina, teicoplanina y avoparcina) resultan de particular interés ya que la vancomicina es uno de los últimos recursos para el tratamiento de infecciones originadas por bacterias multirresistentes (Franz et al., 2003). Se producen a través de la adquisición de elementos genéticos transponibles (fenotipos VanA, VanB, VanD, VanE y VanG) o mediante un determinante cromosómico no transferible (fenotipo VanC) (Leclercq y Courvalin, 1997). Entre estos cinco fenotipos, VanA y VanB son los más extendidos. El VanA es particularmente prevalente en *E. faecium* y confiere resistencia cruzada a vancomicina, teicoplanina y avoparcina. VanB confiere resistencia a niveles variables de vancomicina pero no frente a la teicoplanina. El gen *vanC* se localiza en enterococos con motilidad (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens*), a los que confiere resistencia a bajos niveles de vancomicina. Finalmente los fenotipos VanD, VanE y VanG parecen de menor relevancia clínica y sólo se han detectado en algunas cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* (Dutka-Malen et al., 1995; Kayser, 2003; Klare et al., 2003; McKessar et al., 2000). Aunque se ha descrito la transferencia de genes de resistencia a vancomicina a una cepa probiótica de *E. faecium* (Lund y Edlund, 2001),

otras cepas se han mostrado totalmente incapaces para participar en procesos de conjugación (Eaton y Gasson, 2001). En este sentido, Franz et al. (2003) consideran que, en muchos estudios, las tasas de transferencia de genes a cepas de *E. faecium* son muy exageradas ya que las condiciones en las que se realizan los experimentos no son representativas de las que pueden existir en ambientes naturales. No obstante, se trata de un tema del que habrá que estar muy pendiente en los próximos años, como demuestra el reciente aislamiento de cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina mediante mecanismos transferibles similares a los existentes en los enterococos (Weigel et al., 2003).

En Europa, los principales reservorios de enterococos resistentes a vancomicina (VRE, del Inglés "*Vancomycin Resistant Enterococci*") parecen ser los animales de abasto. El empleo durante algunas décadas de dosis subterapéuticas de avoparcina como promotor del crecimiento ha contribuido a su aparición y expansión ya que la resistencia frente a este agente confiere resistencia cruzada a la vancomicina (Wegener et al., 1997). En este sentido, Jensen et al. (1999) aislaron cepas de *E. faecium* resistentes a vancomicina a partir de cerdos y de pacientes hospitalizados en Dinamarca y observaron que aislados de ambas fuentes mostraban perfiles de campo pulsado similares. No obstante, en Europa las infecciones con VRE son raras. Por el contrario, en EE.UU. donde no se empleó la avoparcina en alimentación animal, es difícil detectar VRE en animales, alimentos derivados o en humanos sanos (Hayes et al., 2003). Sin embargo, en dicho país, el empleo de vancomicina en terapéutica humana ha favorecido la diseminación de VRE en los ambientes hospitalarios, constituyendo una de las principales causas de infección en pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades subyacentes (Kayser, 2003; Lund et al., 2002).

Tabla II.9. Principales resistencias adquiridas a antibióticos en enterococos

Antibiótico	Genes de resistencia	Espectro de resistencia
Penicilinas	<i>pbp5</i>	penicilinas y cefalosporinas
Aminoglicósidos	<i>blaZ</i>	penicilinas
	<i>aph(2'')-Ib</i>	G, T, K, N, D
	<i>aph(2'')-Ic</i>	G, T, K, D
	<i>aph(2'')-Id</i>	G, T, K, N, D
	<i>aph(3')-IIIa</i>	K
	<i>aac(6')-Ie + aph(2'')-Ia</i>	Todos excepto STR
	<i>aac(6')-Ii</i>	T, K, N, SIS
	<i>ant(4')-Ia</i>	T, A, K, D
	<i>ant(6)-Ia</i>	STR
	<i>ant(3'')-Ia</i>	STR
	<i>ant(9)-Ib</i>	STR
	mutaciones en genes 30S rRNA	STR
Glicopéptidos	Operón <i>vanA</i>	V, TPL, AVO (nivel alto)
	Operón <i>vanB</i>	V, (AVO)
	<i>vanB+pbp5</i>	V, AMP
	Operón <i>vanC₁</i>	V (bajo)
	Operón <i>vanC_{2/3}</i>	V (bajo)
	Operón <i>vanD</i>	V (moderado), TPL (moderado-bajo)
	Operón <i>vanE</i>	V (moderado)
	Operón <i>vanG</i>	V (moderado)
	Mutación gen <i>ddl</i>	Asociado a cepas <i>vanB⁺</i>
Macrólidos	<i>ermB</i>	AZT, CLR, L y CLI (alto); StrB
	<i>mef(A)</i>	E, AZT y CLR (bajo)
		lincosamidas y StrB
	<i>msrC</i>	macrólidos, lincosamidas y StrB
Lincosamidas	<i>lnu(B)</i>	L, CLI
Estreptograminas	<i>lsa</i>	Lincosamidas, StrA, StrA/B
	<i>vat(E)</i>	StrA
	<i>vat(D)</i>	StrA, Q/D, VIR
	<i>vat(A)</i>	StrA, Q/D, VIR
	<i>erm(B)</i>	StrB, Q/D
	<i>vgb(A)</i>	StrB, Q/D, VIR
Cloranfenicol	<i>cat_{pIP501}</i>	Cm
	<i>cat_{pSC7}</i>	Cm
	<i>cat_{pC194}</i>	Cm
	<i>cat_{pC221}</i>	Cm
Tetraciclinas	<i>tet(K)</i>	TET
	<i>tet(L)</i>	TET
	<i>tet(M)</i>	TET, MIN
	<i>tet(O), tet(S)</i>	TET, MIN
	<i>tet(U)</i>	TET, MIN
Quinolonas	<i>gyrA, parC</i>	quinolonas
Oxazolidinonas	G2576T	linezolida
Evernimomicinas	<i>emtA</i>	EVE, AVI

Abreviaturas: A, amikacina; AMP, ampicilina; AVI, avilamicina; AVO, avoparcina; AZT, azitromicina; CLI, clindamicina; CLR, claritromicina; Cm, cloranfenicol; D, dibekacina; E, eritromicina; EVE, evernimicina; G, gentamicina; K, kanamicina; L, lincomicina; MIN, minociclina; N, netilmicina; Q/D, quinupristina/dalfopristina; SIS, sisomicina; STR, estreptomina; StrA, estreptograminas tipo A; StrB, estreptograminas tipo B; T, tobramicina; TET, tetraciclinas; TPL, teicoplanina; V, vancomicina; VIR, virginiamicina. Fuente: Klare et al. (2003).

II.3.8. Aplicaciones de los enterococos en los quesos

Los enterococos se encuentran en numerosos alimentos fermentados tradicionales, entre ellos en una gran variedad de quesos elaborados en países mediterráneos a partir de leche cruda o pasteurizada, en los que representan una parte importante de la microbiota (Centeno et al., 1996; Coppola et al., 1988; Fernández del Pozo et al., 1988; García et al., 2002; Litopoulou-Tzanetaki, 1990; Menéndez et al., 1998; Núñez y Martínez Moreno, 1976; Ordóñez et al., 1978; Pérez-Elortondo et al., 1999; Pouillet et al., 1993; Tzanetakis y Litopoulou-Tzanetaki, 1992). Su contribución al desarrollo de las características sensoriales ha sido puesta de manifiesto en distintas variedades de queso y, de hecho, se han empleado como integrantes de cultivos iniciadores (Centeno et al., 1999; Coppola et al., 1988, 48, Litopoulou-Tzanetaki et al., 1993; 69, Sarantinopoulos et al., 2002a). Sin embargo, otros trabajos indican que niveles altos de enterococos en queso pueden deteriorar las propiedades organolépticas del producto (López-Díaz et al., 1995; Thompson y Marth, 1986). El interés en la aplicación de los enterococos en leche y productos lácteos se ha renovado por la producción, en algunas cepas, de enterocinas activas frente a bacterias patógenas o alterantes, así como por sus propiedades probióticas. Su utilización, fundamentalmente como cultivos adjuntos, se ha orientado hacia su contribución a la mejora de las propiedades organolépticas y de la calidad microbiológica del queso.

El hábitat natural de los enterococos es el tracto gastrointestinal del hombre y los animales (Franz et al., 1999). Se encuentran además en agua, suelo, vegetales, insectos, etc. Su ubicuidad, supervivencia y persistencia en distintos ambientes están favorecidas por su elevada resistencia a condiciones adversas (pH, temperatura, salinidad, etc.), que les permite mantenerse o multiplicarse en diversos sustratos. Por ello, sobreviven a las condiciones habituales de producción de alimentos y pueden contaminar el producto durante su procesado.

La presencia de enterococos en productos lácteos se consideró durante mucho tiempo como una consecuencia directa de la falta de higiene durante la producción y procesado de la leche. Los enterococos contaminarían la leche, bien por contacto directo con material fecal de origen animal o humano, o bien indirectamente a través

del agua, de la superficie del animal o de equipos e instalaciones contaminadas (Gelsomino et al., 2001; 2002). Sin embargo, deben ser considerados como parte de la microbiota natural de la leche y de una amplia variedad de productos lácteos, a los que también se pueden incorporar durante su elaboración (Giraffa, 2003). El hecho de que los enterococos formen parte de la microbiota natural de la glándula mamaria humana durante el periodo de lactancia (Heikkilä y Saris, 2003; Martín et al., 2003; Ng et al., 2004) abre nuevas perspectivas sobre el posible origen de los enterococos que se encuentran en la leche y productos lácteos.

Los niveles de enterococos en el queso varían en función de la contaminación de la leche, la supervivencia en el ambiente de la quesería y las condiciones particulares de elaboración y maduración de cada variedad (Foulquié Moreno et al., 2006). La presencia y multiplicación de los enterococos en el queso resulta favorecida por su elevada adaptabilidad a diversos sustratos y a condiciones ambientales adversas, incluida la pasteurización, que les permite soportar las condiciones habituales de la fabricación y convertirse en parte importante de la microbiota fermentadora del producto. Se ha descrito la presencia de enterococos en numerosas variedades de queso de leche cruda o pasterizada (Tabla II.10) en niveles de 10^4 - 10^6 ufc/g en la cuajada hasta 10^5 - 10^7 ufc/g en queso maduro, donde pueden convertirse en el grupo microbiano predominante (Centeno et al., 1996, Coppola et al., 1988; Fontecha et al., 1990; Núñez y Martínez Moreno, 1976; Ordóñez et al., 1978). El 17% de un total de 4379 aislados de 35 productos lácteos, en su mayoría quesos elaborados con leche cruda, fueron identificados como *Enterococcus* por Cogan et al. (1997). La especie aislada con mayor frecuencia es *E. faecalis* (Andrighetto et al., 2001; Arizcun et al., 1997; Centeno et al., 1996, 26, Suzzi et al., 2000), seguida de *E. faecium* y *E. durans*, más abundantes en algunos quesos como Feta y Kefalotyri (Litopoulou-Tzanetaki, 1990; Tzanetakis y Litopoulou-Tzanetaki, 1992). *E. casseliflavus* también ha sido descrito como predominante en leche y queso (Gelsomino et al., 2001; 2002).

El papel de los enterococos en la maduración del queso es controvertido. Si bien en los quesos industriales frescos o tiernos, elaborados con leche pasterizada y cultivos iniciadores, la existencia de elevadas concentraciones de enterococos suele conducir a la alteración de sus propiedades organolépticas (Franz et al., 1999; Giraffa

y Carminati, 1997), numerosos estudios han demostrado que estas bacterias pueden ejercer una influencia muy positiva en muchos de los quesos tradicionales. Así, se ha demostrado el potencial de los enterococos para su empleo como cultivos iniciadores o adjuntos en quesos Cheddar (Dahlberg y Kosikowski, 1948; Jensen et al., 1975), Feta (Litopoulou-Tzanetaki et al., 1993; Sarantinopoulos et al., 2002a), Cebreiro (Centeno et al., 1999) y Mozzarella (Parente et al., 1989; Villani y Coppola, 1994), entre otros. En la mayoría de estos estudios, el empleo de enterococos se asoció a un aumento de la proteólisis, el contenido en ácidos grasos volátiles libres, diacetilo y acetoina, entre otros compuestos, así como a una mejora de las propiedades organolépticas de los quesos.

Tabla II.10. Principales estudios sobre enterococos realizados en quesos españoles

Tipo de queso	Especie	Referencia
Armada	Cabra	Tornadijo et al. (1995)
Arzúa	Vaca	Centeno et al. (1995)
Casar de Cáceres	Oveja	Pouillet et al. (1993)
Cebreiro	Vaca	Centeno et al. (1996; 1999); Menéndez et al. (1998)
Idiazábal	Oveja	Arizcun et al. (1997)
La Serena	Oveja	Fernández del Pozo et al. (1988)
Majorero	Cabra	Fontecha et al. (1990)
Manchego	Oveja	Núñez y Martínez Moreno (1976); Ramos et al. (1981)
Roncal	Oveja	Arizcun et al. (1997)
San Simón	Vaca	García et al. (2002)
Queso de Tenerife	Cabra	Zárate et al. (1997)
Tetilla	Vaca	Menéndez et al. (2001)

El número de cepas diferentes en los cultivos iniciadores disponibles comercialmente es limitado, por lo que existe un interés considerable en el aislamiento

de cepas nuevas a partir de orígenes naturales como leche cruda, quesos artesanales o plantas (Cogan et al., 1997; Wouters et al., 2002). Por otra parte, existe una demanda creciente por los consumidores de productos de calidad, con características organolépticas mejoradas. Los enterococos son parte importante de la microbiota secundaria de muchas variedades de queso, con potencial para desarrollar propiedades organolépticas atractivas y/o con capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y alterantes, por lo que se ha sugerido que su papel en la maduración del queso debería ser reevaluado (Cogan et al., 1997; Giraffa et al., 1997).

II.3.8.1. Características tecnológicas de los enterococos

De entre todas las propiedades bioquímicas de los enterococos, se revisarán a continuación las que se consideran de mayor relevancia en relación con su aptitud tecnológica para la elaboración de productos lácteos fermentados.

II.3.8.1.1. Actividad acidificante

La capacidad de producir ácido en las primeras fases de elaboración del queso es probablemente la propiedad más importante de los cultivos iniciadores. El descenso de pH contribuye a la expulsión del suero y reduce el contenido en humedad, factores que previenen el desarrollo de la microbiota alterante (Cogan et al., 1997). En general, los enterococos se caracterizan por una actividad acidificante baja cuando crecen en leche. Ni siquiera las cepas aisladas de queso poseen la capacidad de bajar rápidamente el pH de la leche para alcanzar valores tecnológicamente adecuados. Así, por ejemplo, Andrighetto et al. (2001) registraron valores de pH en leche inferiores a 5,2, tras una incubación de 16 h a 37°C, únicamente con el 20% de las 124 cepas aisladas de quesos italianos analizadas. Otros trabajos con enterococos de origen lácteo confirman estos resultados, con solo un pequeño porcentaje de cepas capaces de alcanzar en leche valores de pH inferiores a 5,0-5,2 tras 16-24 h a 37°C (Abeijón et al., 2006; Durlu-Ozkaya et al., 2001; Sarantinopoulos et al., 2001a). Los aislados de *E. faecalis* presentan un mayor potencial acidificante en comparación con *E. faecium* y *E. durans* (Suzzi et al., 2000).

Esta deficiente capacidad acidificante en leche de los enterococos determina que no se puedan considerar como cultivos iniciadores adecuados en la fabricación del queso (Huggins y Sandine, 1984), sino tan sólo como cultivos adjuntos al iniciador.

II.3.8.1.2. Actividad proteolítica

La hidrólisis de las caseínas juega un papel esencial en el desarrollo de la textura del queso. Además, contribuye decisivamente al aroma y sabor de este producto, a través de los péptidos y de los aminoácidos liberados, que pueden así ser degradados posteriormente, dando lugar a la formación de cientos de compuestos aromáticos (Parente y Cogan, 2004). Los agentes fundamentales de esta proteólisis son las enzimas proteolíticas endógenas de la leche, el coagulante utilizado en la fabricación, así como las proteinasas de pared y las peptidasas intracelulares de las bacterias lácticas que se liberan tras su lisis.

En general, la actividad proteinásica y peptidásica de los enterococos se considera baja, siendo entre ellos superior en la especie *E. faecalis* (Andrighetto et al., 2001; Arizcun et al., 1997; Consentino et al., 2004; Macedo y Malcata, 1997; Suzzi et al., 2000; Tsakalidou et al., 1994; Villani y Coppola, 1994). Los enterococos aislados de alimentos tienen, dentro de su escasa actividad, mayor capacidad proteolítica que los aislados de muestras veterinarias o humanas (Sarantinopoulos et al., 2001a). No obstante, esta característica depende notablemente de la cepa analizada y de las condiciones del ensayo. Se han encontrado diferencias considerables en la actividad proteolítica incluso entre los enterococos procedentes de una misma variedad de queso (Cogan et al., 1997).

Los estudios realizados con enterococos han puesto de manifiesto que no poseen una actividad proteolítica extracelular destacable, excepto algunos aislados pertenecientes a la especie *E. faecalis* var. *liquefaciens* (Dovat et al., 1970; García de Fernando et al., 1991). Sin embargo un desarrollo excesivo de cepas de esta especie da lugar a defectos en el queso, fundamentalmente un sabor amargo y una textura blanda, como consecuencia de una intensa actividad proteolítica (Cantoni et al., 2000).

En algunas cepas de *E. faecium* de origen lácteo se ha observado una destacable actividad peptidásica, a pesar de que su actividad proteolítica era escasa (Andrighetto et al., 2001; Ayad et al., 2004). Esta actividad peptidásica se considera interesante para la elaboración de productos lácteos (Ayad et al., 2004), dado que el catabolismo de los aminoácidos tiene un papel fundamental en la formación del aroma.

El aumento de la concentración de aminoácidos, por otra parte, puede tener implicaciones negativas en la seguridad de los consumidores. Esto se debe a que su descarboxilación conduce a la formación de aminas biógenas, fundamentalmente tiramina e histamina, en el queso. Estas aminas biógenas se relacionan con problemas toxicológicos en individuos susceptibles cuando se encuentran en concentraciones elevadas en los alimentos (Ten Brink et al., 1990). Muchas bacterias lácticas poseen aminoácido descarboxilasas y producen aminas biógenas a partir de los aminoácidos libres en quesos cuando tiene lugar una proteolisis muy elevada (Leuschner et al., 1998). Sin embargo, el contenido en aminas biógenas de los quesos es muy variable y depende de la variedad, del periodo de maduración, del proceso de elaboración y de la microbiota presente.

La capacidad para producir tiramina está ampliamente distribuida entre los enterococos (Bover-Cid y Holzapfel, 1999; Consentino et al., 2004; Delgado y Mayo, 2002; Le Jeune et al., 1995) pero no es exclusiva de los aislados de origen lácteo. Esta propiedad metabólica está también presente en cepas de origen humano y veterinario (Sarantinopoulos et al., 2001a). Los enterococos tienen escasa o nula capacidad para descarboxilar otros aminoácidos distintos a la tirosina. Así, por ejemplo, la facultad de los enterococos para generar histamina parece ser bastante inferior a la de algunas bacterias Gram-negativas (Tham, 1988). Por lo tanto, se han considerado poco relevantes en cuanto a una posible intoxicación histaminérgica como consecuencia de consumo de queso (Tham et al., 1990). La formación de tiramina requiere unas condiciones ambientales adecuadas, como las que se encuentran en muchos alimentos fermentados o alterados (Bover-Cid y Holzapfel, 1999). Por el contrario, las condiciones existentes en las mucosas humanas distan mucho de ser adecuadas para su formación. Por este motivo, es lógico pensar que los problemas toxicológicos asociados a las aminas biógenas derivan del consumo de alimentos en los que se han

formado y acumulado y no de la ingestión de cepas potencialmente formadoras de estos compuestos.

II.3.8.1.3. Actividad lipolítica

La hidrólisis de la grasa láctea se debe, de forma análoga a la proteólisis, a la acción de la lipasa de la leche, las enzimas lipolíticas de la microbiota y, según la variedad de queso, las esterasas pregástricas añadidas. Las esterasas y lipasas de los enterococos participan, por tanto, en el desarrollo del aroma y sabor de los quesos mediante la liberación de ácidos grasos que, especialmente en el caso de los de cadena corta, pueden ser convertidos en otros compuestos con gran intensidad aromática y sávida, como metilcetonas, lactonas y tioésteres. Por otra parte, hay que tener en cuenta que los ácidos grasos libres son susceptibles a la oxidación, originando así otros compuestos que modifican notablemente el aroma del queso, como los aldehídos insaturados. La lipólisis es limitada (<1.5%) en quesos de tipo Suizo y semiduros y elevada (5-25%) en Parmigiano Reggiano, Pecorino y otros quesos italianos, quesos madurados con mohos o quesos de cabra (Beuvier y Buchin, 2004). Aunque los fenómenos de lipólisis no están directamente involucrados en la reología del queso, los glicéridos parciales resultantes son sustancias tensioactivas que influyen en la organización molecular y, por tanto, ejercen un efecto adicional sobre la textura.

A pesar de que las bacterias lácticas, en general, se han considerado tradicionalmente poco lipolíticas, algunos autores (Macedo y Malcata, 1997; Tsakalidou et al., 1994) han constatado que los aislados de *Enterococcus* poseen una mayor actividad lipolítica que otras bacterias lácticas. Por otra parte, las actividades esterásica y lipásica de los enterococos dependen de la cepa, de las condiciones de crecimiento y de las condiciones del ensayo (Carrasco de Mendoza et al., 1992).

Dentro del género *Enterococcus*, se observa mayor actividad lipolítica y esterolítica en *E. faecalis* que en *E. faecium* o *E. durans* (Sarantinopoulos et al., 2001a). Los enterococos hidrolizan tributirina, exhibiendo *E. faecalis* mayor actividad, mientras que los aislados de *E. faecium* son más activos frente a los sustratos sintéticos que emplean habitualmente para ensayar la actividad esterásica (Sarantinopoulos et al.,

2001a). Algunos autores han puesto en evidencia que los enterococos aislados de ciertas variedades de queso, como Semicotto Caprino o Fiore Sardo, no muestran actividad lipolítica cuando se emplea tributirina como sustrato (Consentino et al., 2004; Suzzi et al., 2000). Es conveniente señalar que, hasta la fecha, se desconoce con exactitud hasta qué punto se pueden extrapolar los resultados sobre la actividad lipolítica obtenidos empleando sustratos artificiales (tributirina o esteres de ácidos grasos con compuestos cromogénicos) a lo que ocurre en la realidad, en un sustrato mucho más complejo como la grasa de la leche, compuesta de una gran variedad de triacilglicéridos.

Por otra parte, algunos estudios han revelado que no existe una única enzima responsable de la actividad lipolítica, sino que las bacterias disponen de un sistema esterásico bastante complejo. La detección de actividad esterásica en algunos aislados de *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. durans*, tras la separación de las proteínas intracelulares mediante electroforesis en condiciones no desnaturizantes, ha puesto en evidencia la existencia de hasta cinco bandas con distinta especificidad (Abeijón et al., 2006; Sarantinopoulos et al., 2001a).

II.3.8.1.4. Metabolismo del citrato

La utilización de citrato por las bacterias lácticas es otra característica tecnológica de interés, ya que da lugar a compuestos del aroma y sabor, como diacetilo, acetaldehído, acetoína o 2,3-butanodiol (Hughenholtz, 1993), y dióxido de carbono que contribuye a la textura de algunos productos lácteos fermentados (Kimoto et al., 1999). Esta capacidad siempre está ligada a la presencia de plásmidos que contienen el gen que codifica el transportador del citrato presente en el medio hacia el interior de la célula (Bandell et al., 1998). El metabolismo del citrato ha sido estudiado con gran detalle en *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (Hughenholtz, 1993; Palles et al., 1998), pero el conocimiento es bastante más limitado en el género *Enterococcus* (Coventry et al., 1978; Parente y Hill, 1992; Sarantinopoulos et al., 2001b). Sin embargo, en algunas cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* se ha comprobado la producción de acetaldehído, etanol, diacetilo y acetoína cuando crecen en leche, lo

que avala su posible participación en la formación del aroma y sabor del queso (Andrighetto et al., 2001; Sarantinopoulos et al., 2001a).

La mayoría de las bacterias lácticas son capaces de metabolizar citrato, aunque se ha comprobado que existe cierta diversidad en relación con esta capacidad para utilizar el citrato. Tradicionalmente se ha considerado que los enterococos requieren la presencia de otra fuente alternativa de energía, como glucosa o lactosa, para metabolizar el citrato (Freitas et al., 1999; Sarantinopoulos et al., 2003). Sin embargo, en algunos casos se ha comprobado que aunque el citrato puede metabolizarse en presencia de lactosa, no ocurre lo mismo si en el medio existe glucosa o fructosa (Sarantinopoulos et al., 2001b). Esto se debe a que la glucosa (o, en su caso, la fructosa) ejerce represión por catabolito en el metabolismo del citrato; es decir, el citrato presente en el medio sólo comienza a metabolizarse una vez agotada la glucosa (o la fructosa) del medio. Otros azúcares como la galactosa y la sacarosa, en cambio, no tienen el mismo efecto (Rea y Cogan, 2003a; 2003b). Aunque se han caracterizado numerosos aislados de *E. faecalis* (Sarantinopoulos et al., 2001a) y *E. faecium* (Abeijón et al., 2006) capaces de metabolizar citrato, esta propiedad está más ampliamente difundida en *E. durans* (Consentino et al., 2004).

Recientemente se han aportado pruebas concluyentes sobre la importancia del metabolismo del citrato que llevan a cabo los enterococos durante la elaboración de queso. Los niveles de diacético y acetoina en el queso Cebreiro elaborado con *E. faecalis* eran superiores a los del queso elaborado sin la participación de enterococos (Centeno et al., 1999). El catabolismo del citrato presente en la leche podría, en consecuencia, explicar el papel de los enterococos en el desarrollo de las características organolépticas propias de los quesos mediterráneos (Foulquié Moreno et al., 2006). Esto ha motivado la inclusión de estos microorganismos en los cultivos iniciadores de algunas variedades (Litopoulou-Tzanetaki et al., 1993; Parente et al., 1989).

II.3.8.1.5. Producción de bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos activos frente a otras bacterias generalmente próximas filogenéticamente a la cepa productora. Debido a su naturaleza

peptídica las bacteriocinas pueden ser degradadas por enzimas digestivas, resultando inocuas para el hombre y su microbiota intestinal. Además, sus propiedades fisicoquímicas confieren a estos compuestos resistencia a los tratamientos térmicos y gracias a su pequeño tamaño pueden difundir con relativa facilidad en los alimentos. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas presentan un gran interés para su uso en quesería como bioconservantes. La nisina, producida por algunas cepas de lactococos, es la más estudiada y se emplea actualmente como conservante en más de 40 países (Rodríguez, 1996).

La producción de bacteriocinas es una propiedad muy extendida entre los enterococos (Giraffa, 1995), siendo muchas de ellas activas frente a *Listeria monocytogenes*. Este hecho podría deberse, al menos parcialmente, no sólo a la estrecha relación filogenética existente entre *Enterococcus* y *Listeria* (Stackebrandt y Teuber, 1988), sino también a que se encuentran con frecuencia en los mismos nichos ecológicos (Rodríguez et al., 1997). Desde que en 1955 se describió la primera sustancia tipo bacteriocina en los entonces denominados estreptococos del grupo D (Kjems, 1955), se han publicado numerosos estudios reclamando la detección, caracterización y/o identificación de enterocinas, un tema que ha sido revisado recientemente por Foulquié Moreno et al. (2006). La primera enterocina que se purificó a homogeneidad fue la enterocina AS-48 producida por un enterococo de origen humano (*E. faecalis* S-48) (Gálvez et al., 1989). La mayor parte de las bacteriocinas de enterococos pertenecen a las subclases IIa (familia de la pediocina) y IIc (bacteriocinas con características singulares que no pueden incluirse en ninguno de los otros grupos descritos). Pero también se ha descrito la producción de una bacteriocina de la clase I (lantibióticos) con actividad hemolítica, y de bacteriocinas de la clase III (bacteriocinas de gran tamaño molecular), como la enterolisina A (2003a).

La producción de enterocinas se ha detectado en cepas aisladas de muy diversas fuentes incluyendo no sólo alimentos (queso, carne, pescado y vegetales), sino también animales y el hombre. Es frecuente que una misma enterocina se identifique en enterococos de distintos orígenes y especies, como se recoge en el trabajo publicado por Foulquié Moreno et al. (2003a). Así, se han aislado enterococos productores de enterocina AS-48 de leche cruda (Rodríguez et al., 2000), comprobándose que es una

bacteriocina muy frecuente en enterococos y que la producen tanto *E. faecalis* como *E. faecium* (Joosten et al., 1997). Son numerosos los autores que han aislado cepas de *E. faecium* bacteriocinogénicas de productos lácteos (Ennahar et al., 2001; Farias et al., 1996; Giraffa et al., 1995a; Parente y Hill, 1992; Vlaemynck et al., 1994).

Dado que la capacidad de producir bacteriocinas es una propiedad relevante, tanto desde el punto de vista higiénico-sanitario como desde el tecnológico, la aplicación de cepas productoras de enterocinas en forma de cultivos y/o de las propias enterocinas ha despertado gran interés. Este interés se ha traducido en diversos estudios que, en general, han demostrado la eficacia de este enfoque para mejorar la calidad microbiológica de los quesos (Tabla II.11). No obstante, todavía no se conoce bien la funcionalidad de tales cepas (y/o de sus bacteriocinas) tras un escalado industrial, aspecto que se deberá evaluar en los próximos años (Foulquié Moreno et al., 2006).

Tabla II.11. Estudios de aplicación de enterocinas como agentes bioconservantes en quesos

Cepa	Enterocina	Aplicación	Referencia
<i>E. faecalis</i> B114	Desconocida	Camembert	Sulzer y Busse (1991)
<i>E. faecium</i> 7C5	Enterocina 7C5	Taleggio	Giraffa y Carminati (1997)
<i>E. faecalis</i> INIA 4	Enterocina 4	Manchego	Joosten et al. (1995)
<i>E. faecalis</i> INIA 4	Enterocina 4	Manchego	Núñez et al. (1997)
<i>E. faecium</i> CCM 4231	Enterocina CCM 4231	Saint-Paulin	Lauková et al. (2001)
<i>E. faecalis</i> TAB 28	Enterocina AS-48	Hispánico	Rodríguez et al. (2001)
<i>E. faecium</i> FAIR-E 198	Enterocinas A y/o P	Feta	Sarantinopoulos et al. (2002b)
<i>E. faecium</i> RZS C5	Enterocina RZS C5	Cheddar	Foulquié Moreno et al. (2003b)
<i>E. faecium</i> DPC 1146	Enterocina DPC 1146	Cheddar	Foulquié Moreno et al. (2003b)
<i>E. faecium</i> TAB 52	Enterocina I	Queso de leche cruda	Arqués et al. (2005); Rodríguez et al. (2005)

II.3.8.2. Los enterococos como cultivos adjuntos en la maduración

En numerosos trabajos se ha propuesto la inclusión de enterococos en los cultivos iniciadores empleados para la elaboración de numerosas variedades de quesos, como Cheddar (Dahlberg y Kosikowski, 1948; Jensen et al., 1975), Feta (Litopoulou-Tzanetaki et al., 1993; Sarantinopoulos et al., 2002a), Cebreiro (Centeno et al., 1996; Centeno et al., 1999) y Mozzarella (Coppola et al., 1988; Perente et al., 1989; Villani y Coppola, 1994). En todos los casos se ha empleado *E. faecalis*, excepto en Feta, donde se han ensayado *E. faecium* y *E. durans*, las especies mayoritarias en ese tipo de queso (Litopoulou-Tzanetaki et al., 1993; Sarantinopoulos et al., 2002a).

El empleo de *E. faecalis* como adjunto al cultivo iniciador comercial para la fabricación de queso Cheddar mejoró en varios estudios la calidad del sabor, además de reducir el periodo de maduración, comprobándose un aumento de la proteólisis y de los niveles de compuestos volátiles (Dahlberg y Kosikowski, 1948; Jensen et al., 1975). Esto mismo se observó también cuando se utilizó una cepa probiótica de *E. faecium* en la elaboración de este tipo de queso (Gardiner et al., 1999). Más recientemente, cepas de *E. durans* y *E. faecium* se han empleado en la elaboración de Feta comprobándose una mayor proteólisis y lipólisis (Litopoulou-Tzanetaki et al., 1993; Sarantinopoulos et al., 2002a). En queso Cebreiro se confirmó, además, una mayor concentración de diacetilo y acetoína al emplear enterococos en su fabricación (Centeno et al., 1999). Todos estos ejemplos confirman la ventaja de incluir enterococos como adjuntos al cultivo iniciador para la fabricación de diversas variedades de queso.

El efecto lítico de las bacteriocinas abre las puertas a una interesante aplicación que consiste en la aceleración de la maduración del queso, al potenciar la liberación de enzimas intracelulares del cultivo iniciador que contribuyan a la proteólisis y la lipólisis secundarias. Como consecuencia, aumentaría la concentración de aminoácidos y ácidos grasos libres y, en última instancia, incrementaría el sabor y aroma del queso. De hecho, la presencia de la enterocina AS-48, producida por *E. faecalis* INIA 4, durante la elaboración de queso Hispánico potenció la proteólisis, aumentó la concentración de diversos compuestos volátiles y condujo a un desarrollo más rápido

del aroma y sabor. Además, un panel de catadores otorgó al queso elaborado mejor puntuación de calidad e intensidad de sabor (Garde et al., 1997; Oumer et al., 2001).

II.3.8.3. Los enterococos en bioprotección

Otro aspecto relevante del empleo de enterococos en la elaboración de queso sería su papel como bioconservantes o bioprotectores. Es evidente el interés que existe en la industria alimentaria por el control de la vida útil y la seguridad de los alimentos mediante la aplicación de métodos naturales y/o menos drásticos que permitan obtener productos de la máxima calidad, no sólo desde el punto de vista higiénico sino también desde el nutritivo y organoléptico. En la elaboración de distintos tipos de quesos se ha investigado la utilidad de emplear diversas enterocinas, bien mediante la producción *in situ* por un cultivo iniciador o adjunto o bien añadidas como aditivo. Este es un aspecto relevante considerando que la leche cruda es buen sustrato para la producción de enterocinas, por lo que las cepas bacteriocinogénicas contarían con una ventaja adaptativa para competir con la microbiota nativa (Rodríguez et al., 1997). Varios autores han confirmado la producción de enterocinas durante la elaboración de queso, así como su estabilidad durante la maduración del mismo (2003b; Giraffa y Carminati, 1997; Giraffa et al., 1995b; Núñez et al., 1997). En dos cepas de *E. faecium* (RZS C5 y DPC 1146), empleadas como cultivos adjuntos para la elaboración de queso Cheddar, no sólo se detectó la producción de enterocina desde el principio de la fermentación, sino que dicha bacteriocina persistió en el producto durante todo el periodo de maduración (2003b). La producción de enterocinas se ha comprobado también en otras variedades de queso como, por ejemplo, Manchego y Taleggio (Giraffa et al., 1995b; Núñez et al., 1997; Rodríguez et al., 2001). Es de destacar que el empleo de *E. faecium* y *E. faecalis* puede controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en estas dos variedades de queso. En el caso del queso Taleggio, *E. faecium* 7C5 evitó por completo el crecimiento en superficie del patógeno (Giraffa y Carminati, 1997) y en queso Manchego elaborado con *E. faecalis* INIA 4 se consiguieron reducciones de *L. monocytogenes* de 3 unidades logarítmicas a las 8 h y de 6 unidades logarítmicas a los 7 d de la elaboración (Núñez et al., 1997). Sin embargo, en queso Feta elaborado con *E. faecium* FAIR-E 198 como adjunto no se detectó bacteriocina activa (Sarantinopoulos et al., 2002b).

La adición directa de un preparado de bacteriocina parece que puede ser incluso más efectiva que el empleo de cultivo iniciador. Esto es lo que se ha comprobado durante la elaboración de un queso de cabra, donde se consiguió reducir la población de *L. monocytogenes* hasta 9 unidades logarítmicas al final de la maduración mediante el empleo de enterocina CRL35 (Farias et al., 1999). También la enterocina CCM 4231 inhibió al patógeno durante la elaboración de queso Saint-Paulin (Lauková et al., 2001).

Las limitaciones que puede tener del uso de bacteriocinas son, por una parte, su espectro inhibitorio reducido, su naturaleza proteica, que les hace susceptibles de interaccionar con enzimas proteolíticas o con otras proteínas, y su carácter generalmente hidrofóbico, que permite que puedan interaccionar con la grasa de los productos lácteos. Todo esto hace que disminuya su eficacia. Otra limitación de las bacteriocinas es la aparición de resistencias en los microorganismos diana. Entre las soluciones planteadas para paliar estas limitaciones y potenciar el efecto antimicrobiano se encuentra la aplicación de diversos tratamientos combinados. Este tipo de tratamientos tienen una gran eficacia para mejorar la calidad higiénica del queso, como se ha demostrado en varias ocasiones. Por ejemplo, en queso Hispánico elaborado con *E. faecium* TAB 52 (productor de enterocina I) o con *E. faecalis* TAB 28 (productor de enterocina AS-48) como adjuntos al cultivo iniciador, la aplicación de tratamientos de altas presiones inactivó totalmente a *L. monocytogenes* (Arqués et al., 2005) y *E. coli* O157:H7 (Rodríguez et al., 2005).

II.4. EL QUESO

El queso se puede definir sencillamente como el producto fresco o madurado obtenido mediante la coagulación de la leche de ciertos mamíferos y la posterior separación del suero. Es difícil situar con exactitud el origen de este producto ya que es muy anterior a la tradición escrita, pero es muy probable que los primeros quesos surgieran como consecuencia de la acidificación causada por el crecimiento natural de las bacterias lácticas durante el almacenamiento de la leche. Además, las dos fracciones resultantes, la cuajada y el suero, se podían aprovechar como alimento. El

empleo de estómagos animales para transportar y almacenar la leche permitió obtener una cuajada formada gracias a la acción conjunta de las enzimas presentes en las paredes del estómago y de la acidificación de las bacterias contaminantes. En estas cuajadas la sinéresis era mucho mejor que en las obtenidas únicamente por acidificación y permitía obtener un producto con menor contenido de humedad y, por lo tanto, más estable. La transformación de la leche en queso es, por ello, una forma de bioconservación: la proteína de la leche y su grasa se concentran unas diez veces, al eliminarse el agua en forma de suero, y la lactosa se transforma en ácido láctico por las bacterias lácticas.

Desde sus orígenes el queso y su tecnología de elaboración han sufrido una profunda evolución hasta llegar a la inmensa variedad de productos que se producen en grandes industrias con un elevado grado de tecnificación. Sin embargo, en muchos países, como por ejemplo los mediterráneos, la industria quesera es relativamente heterogénea, coexistiendo empresas pequeñas y medianas de carácter local y artesanal, junto a grandes industrias muy tecnificadas. El volumen productivo en España es bastante más bajo que el de otros países europeos y, como ocurre en Francia, este sector se caracteriza por la diversidad de sus productos: existen más de 100 variedades de quesos tradicionales, de los cuales 18 tienen el reconocimiento de Denominación de Origen Protegida e Indicación Geográfica Protegida.

II.4.1. Tecnología del queso

En esencia, el queso se elabora a partir de una materia prima sencilla (leche de un número limitado de especies) mediante un protocolo de fabricación constituido por unos principios generales aplicables a la mayoría de las variedades existentes. Sin embargo, es un producto dinámico y durante su elaboración y maduración tienen lugar diversos cambios bioquímicos, responsables de las peculiaridades del producto final. La elaboración del queso se puede dividir en líneas generales en cinco fases: control de las propiedades de la materia prima, coagulación de la leche, desuerado de la cuajada, moldeado y maduración, a excepción de los quesos frescos, que se consumen sin la última (Figura II.15). A continuación se hace una breve descripción de estas fases, a

partir de la información recogida en dos textos clásicos en la materia (Eck, 1990; Fox, 1987).

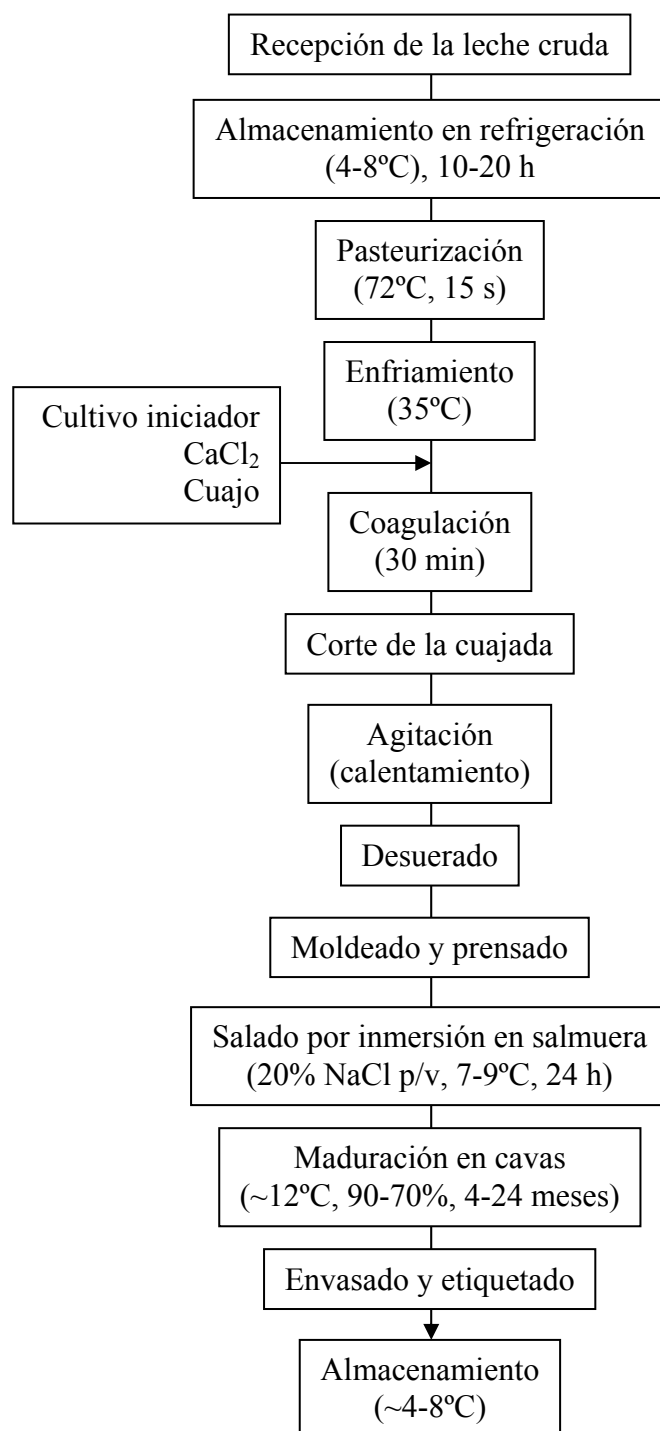


Figura II.15. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de un queso tipo.

La elaboración del queso comienza con la selección de la leche, que ha de tener la más alta calidad química y microbiológica, evitando la procedente de vacas con mastitis y con residuos de antibióticos. Generalmente la recepción de la leche se acompaña de una primera limpieza (centrifugación o filtración) para eliminar material extraño que pudiera estar presente. Cuando se realiza una centrifugación se eliminan, además, las esporas de *Clostridium tyrobutiricum*. Estas esporas resisten el tratamiento térmico al que se somete la leche y su germinación durante la maduración del queso está asociada a defectos en el flavor, por la producción de ácido butírico, y a la hinchazón tardía por el CO₂ generado.

Hasta su empleo, la leche cruda se almacena en refrigeración, pero debe evitarse un almacenamiento prolongado ya que favorece el crecimiento indeseable de microorganismos psicrotrofos, generalmente asociados con defectos en el aroma y la textura de los quesos. También es necesario hacer una normalización para ajustar la relación materia grasa:proteína y, en ciertas variedades, una homogenización para obtener una distribución uniforme de los glóbulos grasos.

Aunque para algunas variedades de queso todavía se utiliza leche cruda, para la gran mayoría la leche generalmente se pasteuriza (72°C, 15 segundos) antes de su empleo. Este tratamiento térmico es obligatorio para aquellos quesos que se vayan a consumir con menos de dos meses de maduración. Este tratamiento destruye la microbiota natural de la leche cruda pero, sobretodo, asegura la eliminación de los microorganismos patógenos que pudiera haber y facilita la obtención de quesos con una calidad uniforme. Sin embargo, los conocedores de una determinada variedad de queso siempre aseguran que este tratamiento térmico de la leche tiene un efecto indeseable en la calidad organoléptica del producto final.

Una vez pasterizada y enfriada la leche (30-35°C), se pasa a la cuba de cuajar, donde se añade el cultivo iniciador, el cloruro cálcio para compensar las pérdidas de calcio iónico soluble sufridas durante el tratamiento térmico y el cuajo. Ésta será la primera etapa clave que determinará las características del producto terminado. En ella se producen profundas modificaciones fisico-químicas en las micelas de caseína como consecuencia del ácido láctico generado por el cultivo iniciador y la actividad de las

enzimas proteolíticas presentes en el cuajo, que conducen a la formación de un gel denominado “cuajada”.

La producción de ácido láctico, con su descenso de pH asociado, provoca la desmineralización de las caseínas (desplazamiento progresivo del calcio y del fosfato inorgánico hacia la fase acuosa) que provoca la desorganización de su estructura cuaternaria. Cuando el pH se acerca al punto isoeléctrico (pH 4,6), se neutralizan las cargas y disminuye notablemente la hidratación de las caseínas, lo cual tiene como consecuencia la formación de un coágulo débil. La producción de ácido a una velocidad adecuada y en momento preciso afecta diversos aspectos clave de la elaboración del queso como son, entre otros, la actividad del cuajo durante la coagulación, la cantidad de cuajo residual que queda en la cuajada, la fuerza y la sinéresis de la cuajada y el crecimiento de otras bacterias en el queso. Evidentemente, el ácido láctico originado depende del tipo y cantidad de cultivo iniciador, así como de la temperatura empleada. Es importante recordar que el cultivo iniciador continúa produciendo ácido láctico significativamente durante la maduración de algunos quesos.

En la mayoría de los quesos, la cuajada no se forma como consecuencia del ácido producido por las bacterias lácticas, sino que se debe a la hidrólisis enzimática del enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la κ -caseína. Se libera, así, el caseinomacropéptido (residuos 106-169 de la κ -caseína) que, por su componente glucídico, contribuye en gran medida a la estabilidad de las micelas de caseína. Al separarse el caseinomacropéptido, entre las micelas se pueden establecer los enlaces que darán lugar a la formación del gel. Antiguamente el cuajo se obtenía del estómago de rumiantes lactantes. Este cuajo contiene una mezcla de quimosina y pepsina, siendo la primera la responsable de la hidrólisis específica del enlace indicado de la κ -caseína. Debido a su elevado coste económico, existen en el mercado numerosas alternativas como otros cuajos de origen animal o los coagulantes microbianos. Sin embargo, en estos momentos la mejor opción la constituyen los cuajos recombinantes, ya comercializados, que se obtienen por expresión del gen de la quimosina de ternero en *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger* o *E. coli*. Ciertas variedades de queso, como la Torta del Casar de Cáceres, se caracterizan por emplear un cuajo vegetal.

La coagulación tarda entre 15 y 60 minutos, dependiendo de la temperatura y la cantidad de enzima adicionada, obteniéndose un coágulo bastante estable si se deja en reposo. Pero, cuando se rompe o corta, se produce rápidamente la sinéresis o expulsión de parte del suero contenido en el gel. La rotura mecánica del coágulo se realiza generalmente con cuchillos o liras, y el tamaño del grano de la cuajada dependerá de la variedad de queso que se esté elaborando. Así, por ejemplo, para obtener un queso más húmedo los granos de la cuajada deben ser más grandes. La cuajada se mantiene en contacto con el suero durante un periodo de tiempo variable, en el cual para algunas variedades de queso se puede producir incluso un calentamiento con agitación para favorecer la sinéresis. A continuación es necesario separar el lactosuero expulsado de los granos de cuajada, lo cual se hace por decantación y filtración, antes de colocarlos en el molde del queso. El desuerado, como se denomina a la sinéresis más la evacuación del lactosuero, no se limita a obtener un coágulo con una determinada cantidad de agua, sino que también regula la cantidad de lactosa que queda en la cuajada.

Una vez introducida en los moldes, la cuajada se somete a un prensado más o menos intenso en función del tipo de queso. Si es un queso blando, con alto contenido en humedad, el prensado será suave; mientras que si queremos obtener un queso con vida útil larga, duro y con poca humedad se utilizará mayor presión. Cuando las piezas han adquirido cierta firmeza, se sacan de los moldes y se salan, generalmente por inmersión en una salmuera, aunque también se puede hacer por incorporación de la sal en la superficie o en la masa. El salado contribuye a la conservación, al inhibir en parte el crecimiento de bacterias indeseables, y a potenciar el sabor del queso, así como a reducir el contenido de humedad.

La etapa final del proceso de elaboración de un queso es la maduración, que tiene lugar durante el almacenamiento en condiciones controladas de temperatura (5-12°C) y humedad relativa (65-95%) por un tiempo variable dependiendo de la variedad, pero que puede llegar a superar los 18 meses en algunos casos. En esta etapa se produce un complejísimo conjunto de cambios bioquímicos en los que intervienen el cuajo, las enzimas propias de la leche y las bacterias del cultivo iniciador o adjuvantes y sus enzimas.

II.4.2. Cambios bioquímicos durante la maduración

Los principales cambios bioquímicos que tienen lugar durante la maduración del queso son la glucólisis, la proteólisis y la lipólisis. Como consecuencia de la hidrólisis de los principales constituyentes de la leche, se modifica la textura y se liberan compuestos aromáticos. Los productos de la hidrólisis son, a su vez, metabolizados por los microorganismos presentes en el queso y/o participan en reacciones químicas, aumentando notablemente, tanto en número como en diversidad, las moléculas aromáticas y sápidas generadas (Figura II.16). Además, hay una gran diversidad de cambios catabólicos secundarios como desaminaciones, descarboxilaciones, β -oxidaciones e incluso reacciones químicas como esterificaciones.

La mayor parte de la lactosa presente originalmente en la leche se elimina durante el desuerado, bien como tal o después de haber sido transformada en ácido láctico. Se estima que en los granos de cuajada sólo queda, como mucho, un 2% de la lactosa inicial. Esta lactosa residual se metaboliza rápidamente a ácido L(+)-láctico en las primeras horas de la maduración. Además, no es deseable un mayor porcentaje de lactosa residual porque podría ser metabolizada por otras bacterias lácticas distintas al cultivo iniciador y provocar alteraciones en el queso como, por ejemplo, gas. Por otra parte, las bacterias lácticas que se encuentran como microbiota secundaria también pueden favorecer la aparición del isómero D(-) del ácido láctico, por fermentación de la lactosa o por racemización del isómero L(+) a D(-), especialmente si la maduración no es a temperatura muy baja. Este isómero D(-) del ácido láctico es menos soluble y puede precipitar con el calcio, dando lugar a indeseables cristales de lactato cálcico en la superficie de los quesos. En las variedades de queso en las que intervienen mohos superficiales en la maduración, como *Geotrichum* o *Penicillium*, el ácido láctico generado se transforma rápidamente a CO₂ y H₂O, contribuyendo al típico incremento del pH (Fox et al., 1990).

La concentración de citrato en la leche es relativamente baja (~8 mM) y, aunque no sirve como fuente de energía para la mayoría de las bacterias presentes en el queso,

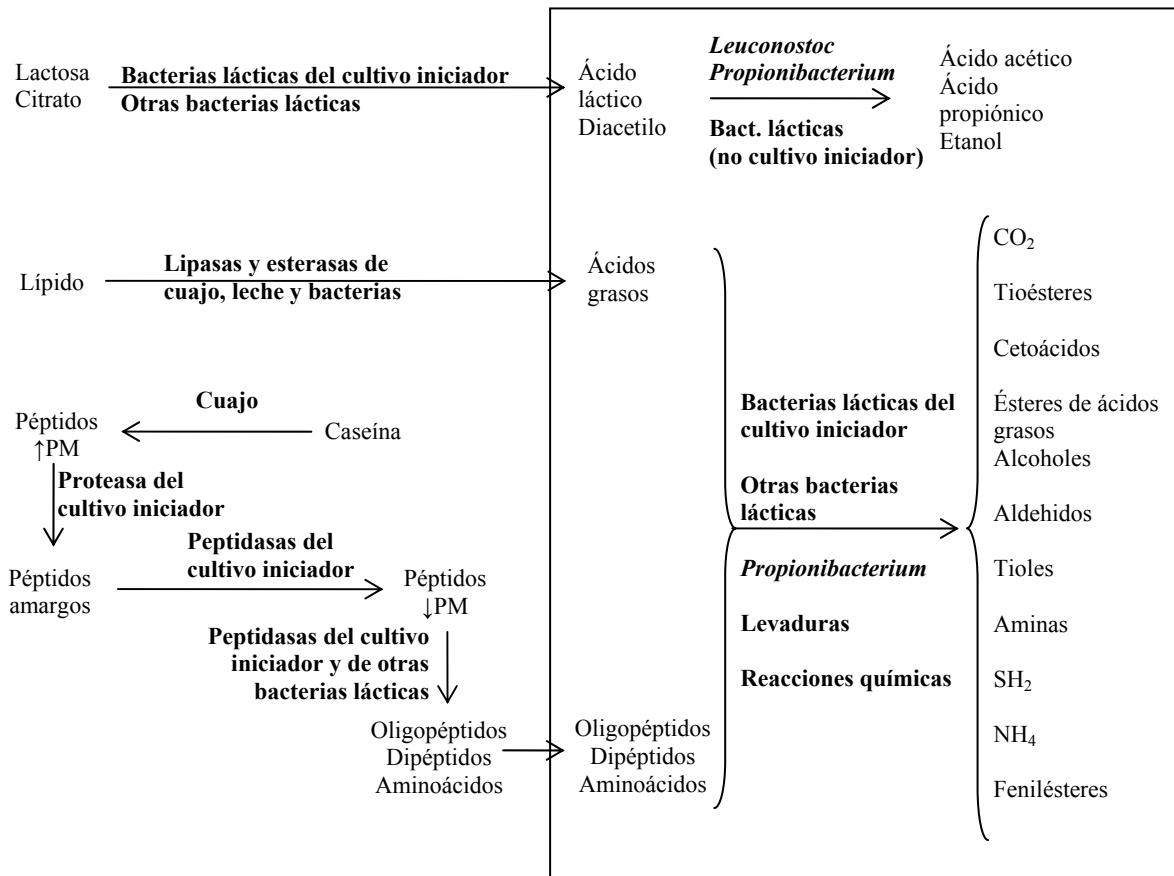


Figura II.16. Transformaciones bioquímicas básicas durante la maduración del queso.

algunas sí pueden metabolizarlo si existen otros sustratos fermentables. Como consecuencia del metabolismo del citrato se forma CO₂, responsable de la formación de los “ojos” típicos de ciertas variedades de queso como los de tipo suizo (*Edam*, *Gouda*), y diacetilo, un compuesto aromático muy potente y característico de quesos frescos tipo *Cottage*. En otras variedades de queso, estas mismas reacciones son indeseables, bien por modificar el flavor típico o por la aparición indeseada de ojos (Fox et al., 1990).

El sistema proteolítico descrito en el queso es muy complejo y está formado por el cuajo, la plasmina de la leche y las proteasas y peptidasas bacterianas. La acción

complementaria de todas estas enzimas proteolíticas genera una mezcla de aminoácidos y péptidos de pequeño tamaño que contribuyen de una manera directa y clara tanto al sabor como a la textura percibida en la boca. Además, la proteólisis proporciona un conjunto muy importante de sustratos que se metabolizarán o transformarán químicamente en compuestos aromáticos y sápidos (Figura II.16). De todas las enzimas proteolíticas mencionadas, las de las bacterias lácticas son las que tienen mayor peso en el perfil aromático y sávido típico de cada variedad de queso (Law, 2001).

En la leche se encuentran de forma natural varias enzimas con actividad proteolítica, aunque en relación con el queso sólo merece la pena destacar una serín-proteasa alcalina, idéntica a la plasmina sanguínea, que es bastante estable al calor y contribuye a hidrolizar, sobre todo, la caseína β . La parte residual del cuajo que queda atrapada en la cuajada, continúa actuando sobre las proteínas lácteas (especialmente la caseína α_{s1}) a lo largo de la maduración y, además, de forma bastante inespecífica. Como consecuencia de su acción se generan péptidos de tamaño relativamente grande (>1400). Estos péptidos no contribuyen al sabor propio del queso, en general, por su gran tamaño, excepto si tienen carácter amargo. Sin embargo, esta hidrólisis es fundamental para iniciar el ablandamiento de la textura inicial del queso (Law, 1987).

El sistema proteolítico de las bacterias lácticas asociadas con el ambiente lácteo ha sido caracterizado con bastante profundidad, tanto desde el punto de vista bioquímico como en sus aspectos genéticos, desde hace algo más de una década (Pritchard y Coolbear, 1993). Las bacterias lácticas, y en concreto lactococos y lactobacilos, son auxótrofas para varios aminoácidos (entre seis y catorce por cepa). Por ello, para llegar a tener un buen crecimiento en leche son totalmente dependientes de un sistema proteolítico eficiente que pueda liberar esos aminoácidos esenciales de los péptidos derivados de la caseína (Christensen et al., 1999). De hecho, considerando el conjunto de enzimas descritas en las bacterias lácticas se podrían liberar todos los aminoácidos presentes en los péptidos generados por la acción del cuajo (Law, 2001). A este complejo sistema proteolítico de las bacterias lácticas pertenecen las proteasas ligadas a la pared celular, que pueden actuar tanto sobre la caseína como sobre los primeros grandes péptidos derivados de ella. Algunas variantes de estas proteasas

generan péptidos amargos, mientras que otras generan péptidos con un buen impacto en el sabor del queso. Sobre estos péptidos puede actuar un amplio conjunto de peptidasas: di-, tri-, endo-, amino- y carboxi-peptidasas, con muy distintos tipos de especificidad, que también forman parte del sistema proteolítico. Es decir, estas peptidasas pueden degradar los péptidos amargos que generan el cuajo y las proteasas asociadas a la pared celular de las bacterias lácticas. Como los péptidos amargos se caracterizan por ser ricos en el aminoácido prolina, las endopeptidasas específicas por este residuo de aminoácido adquieren especial relevancia para reducir el amargor del queso (Lemieux y Simard, 1992). Como ejemplo de la complejidad que puede alcanzar este sistema, puede mencionarse que en *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 se han llegado a caracterizar, tras muchos años de dedicación, 12 enzimas proteolíticas distintas. Sorprendentemente, el análisis realizado en el primer borrador de la secuencia de su genoma ha revelado que, en realidad, el número de genes que codifican enzimas proteolíticas es de 28, sin incluir todos los múltiples sistemas de transporte de oligo-, di- y tripéptidos y aminoácidos (Cogan et al., 2007).

Algunos de los aminoácidos liberados influyen directamente en el sabor del queso, como por ejemplo la prolina (dulce) y el ácido glutámico (potenciador del sabor). En cambio, otros van a servir de intermediarios para la formación de otros compuestos aromáticos y sápidos, como es el caso de la cisteína, la metionina, la isoleucina, la valina y la fenilalanina, tras su descarboxilación, desaminación, transaminación, deshidratación o hidrólisis. Aunque en general no se dispone de información detallada sobre estas transformaciones, cabe destacar que la metionina da origen a diversos compuestos volátiles azufrados, como el metanotiol y sus ésteres, que se encuentran en la mayoría de los quesos, contribuyendo a su sabor y olor típicos. Las desaminasas y las transaminasas de las bacterias lácticas también pueden transformar aminoácidos insípidos en cetoácidos y precursores de ésteres que intensifican el aroma de ciertas variedades de queso (Law, 2001; Williams et al., 2001).

Ciertos aminoácidos libres pueden ser sustrato de las descarboxilasas de las bacterias lácticas y originar aminas biógenas, con importancia debido a su actividad biológica. La histamina (derivada de la histidina) y la tiramina (tirosina) se encuentran

entre las aminas más tóxicas para la salud de los consumidores, con efectos indeseables en el sistema nervioso central y el vascular, mientras que la putrescina (de la ornitina) y la cadaverina (de la lisina) modifican las propiedades organolépticas de los alimentos. La amina primaria que se encuentra con mayor frecuencia en el queso es la tiramina. Este producto también está implicado con cierta frecuencia, aunque menos que el pescado, en intoxicaciones histaminérgicas. Otras aminas biógenas que se llegan a encontrar ocasionalmente en el queso son la triptamina (triptófano), la putrescina y la cadaverina, que potencian los efectos tóxicos de otras aminas al inhibir la actividad de las enzimas con actividad destoxificante (Stratton et al., 1991).

La lipólisis es el tercero de los procesos fundamentales que tienen lugar durante la maduración del queso. Aunque menos estudiada, tiene un papel vital determinando el perfil aromático y sávido de algunas variedades de queso. Sin embargo, en general, parece más difícil definir su contribución específica a la textura e intensidad del aroma y sabor. Entre las enzimas implicadas en la lipólisis se encuentra la lipasa nativa de la leche, aunque sólo es relevante en los quesos elaborados con leche cruda, ya que se inactiva con la pasteurización. Por otra parte, también contribuyen las lipasas y esterases de origen microbiano. Tradicionalmente se ha considerado que las bacterias lácticas son poco lipolíticas y que su actividad lipásica es irrelevante en comparación con la esterásica (Holland et al., 2005). A pesar de que esta actividad lipolítica sea muy suave, tiene una contribución importante al desarrollo del aroma y sabor en el queso.

Los ácidos grasos libres contribuyen, por una parte, directamente al aroma de los quesos maduros, en especial los de cadena corta. En este sentido, destaca el ácido butírico, que a bajas concentraciones tiene ya un intenso olor a queso. Por otra parte, los ácidos grasos libres sirven de precursores de otros compuestos volátiles (metilcetonas, alcanos, lactonas, ésteres, etc.), igualmente importantes. Por ejemplo, muchos ésteres de ácidos grasos son esenciales para el sabor y aroma característico de algunos quesos, como los ésteres del ácido caproico en el queso de cabra y los tioésteres en el Camembert o los derivados del ácido linoleico liberado de los triacilglicéridos de la leche por la lipasa, responsables del característico aroma de los quesos con mohos blancos en superficie (Law, 2001). Conviene señalar que algunos de los compuestos derivados de los ácidos grasos tienen un umbral de percepción muy

bajo, por lo que bastaría con una ligera actividad esterásica o lipásica para que repercutiese en el flavor del queso (Choisy et al., 1990). Por otro parte, además, si su concentración fuese demasiado elevada o se desequilibrase el balance de los ácidos grasos podría resultar en detrimento del aroma y sabor de algunas variedades de quesos.

Dado que el proceso de maduración del queso, dependiendo de la variedad, puede prolongarse mucho, se han desarrollado diversas estrategias para conseguir el desarrollo de unas propiedades organolépticas adecuadas en un tiempo más corto. En estos momentos las opciones más interesantes son emplear temperaturas más elevadas durante la maduración, la adición de enzimas exógenos (proteasas, lipasas o mezclas de ambas) o el empleo de cultivos iniciadores atenuados para poder añadir mayor cantidad de bacterias sin modificar la velocidad de acidificación, de cultivos auxiliares y, en teoría, de cultivos iniciadores modificados genéticamente (Law, 2001).

II.4.3. Microbiología del queso

Es evidente que las características de la leche y los parámetros tecnológicos empleados durante la elaboración del queso van a tener una fuerte influencia en las características del producto final. Sin embargo, la microbiota del queso juega un papel clave en el desarrollo de las características clave de cada variedad (Fox y Wallace, 1997). Los microorganismos presentes habitualmente en el queso se pueden dividir en dos grandes grupos. En el primer grupo se encuentran las bacterias lácticas del cultivo iniciador, que están implicadas, sobre todo, en la producción de ácido durante la fabricación del queso, aunque, por supuesto, también intervengan en la maduración. En el grupo de los microorganismos secundarios están aquellos que no son responsables de la producción de ácido, pero que tienen un papel muy importante durante la maduración. En este segundo grupo se encuentran las bacterias lácticas que no pertenecen al cultivo iniciador (las denominadas en inglés, NSLAB o *non-starter lactic acid bacteria*), bacterias pertenecientes a otros grupos, levaduras y/o mohos. Todos estos microorganismos secundarios suelen ser característicos de cada variedad de queso o, como mucho, de variedades muy relacionadas (Beresford et al., 2001).

La principal función del cultivo iniciador es la producción de ácido durante la primera etapa de la elaboración del queso. Para esta función se consideran adecuadas aquellas bacterias que producen una cantidad suficiente de ácido para reducir el pH de la leche a un valor inferior a 5,3 al cabo de 6 horas de incubación a 30-37°C (Cogan et al., 1997). Esta acidificación de la leche pueden realizarla las bacterias lácticas que se encuentran de forma natural en la leche cruda, como se hacía antiguamente. Sin embargo, actualmente este modo de proceder sólo se mantiene en algunos quesos artesanales, ya que el comportamiento de la microbiota natural es con frecuencia impredecible e inadecuado para el proceder industrial. Por ello, generalmente se emplean cultivos iniciadores que contienen bacterias bien caracterizadas que dominan la fermentación y aseguran una adecuada velocidad de acidificación, así como una calidad uniforme. Desde que se descubrió que las bacterias lácticas eran las responsables de la acidificación de la leche durante la elaboración del queso, no ha cesado la investigación y la búsqueda de cepas lo más adaptadas posible a cada aplicación. La industria de los cultivos iniciadores ha ido desarrollándose hasta llegar a convertirse en una de las más avanzadas y sofisticadas industrias actuales.

El tipo de cultivo iniciador dependerá de los parámetros de fabricación de la variedad de queso que se desee elaborar. Las principales especies bacterianas que se suelen encontrar en los cultivos iniciadores se encuentran en la Tabla II.12, junto con sus principales características bioquímicas. Estos cultivos iniciadores pueden tener una composición definida, es decir un número conocido de cepas bacterianas, o indefinida en el caso de los cultivos mixtos en los que se desconoce el número y el tipo exacto de microorganismos presentes. Por otra parte, en función de la temperatura de crecimiento se distinguen cultivos iniciadores mesófilos y termófilos. Los primeros, con una temperatura óptima de crecimiento alrededor de 30°C, contienen fundamentalmente cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* y *L. lactis* ssp. *lactis*, entre las que se pueden incluir algunas cepas que metabolizan citrato para la producción de aroma, como por ejemplo *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc lactis* y *L. mesenteroides* ssp. *cremoris*. Los cultivos iniciadores termófilos, adecuados para la elaboración de quesos de pasta cocida, están formados por bacterias cuya temperatura óptima de crecimiento está alrededor de 40-45°C, como *Streptococcus thermophilus* y lactobacilos termófilos como *Lactobacillus delbrueckii*

ssp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* spp. *lactis* o *Lactobacillus helveticus*. Los enterococos, a pesar de no estar presentes, aparentemente, en los cultivos iniciadores, se aíslan con gran frecuencia y en gran número de muchas variedades de quesos. Algunas cepas de enterococos tienen una buena capacidad acidificante y un papel muy positivo en el desarrollo del aroma, especialmente en los quesos mediterráneos (Cogan *et al.*, 1997; Beresford *et al.*, 2001).

En cualquier caso, las bacterias del cultivo iniciador se multiplican en las primeras etapas de elaboración del queso hasta alcanzar 10^8 - 10^9 ufc/g en la mayoría de las variedades de queso, pero durante la maduración disminuyen como consecuencia de la acción de sus propias enzimas autolíticas (Thomas y Batt, 1969). En el primer mes, sólo queda aproximadamente el 1% de las bacterias viables presentes inicialmente. Es decir, las células intactas del cultivo iniciador fermentan la lactosa, eliminan el oxígeno y, probablemente, inicien reacciones para generar compuestos aromáticos; a continuación, las enzimas intracelulares (peptidasas y esterases, sobre todo) de las células autolisadas aceleran la hidrólisis de péptidos y lípidos generando más precursores de compuestos aromáticos (Crow *et al.*, 1995).

La microbiota secundaria tiene el comportamiento opuesto. La población inicial de bacterias lácticas que no pertenecen al cultivo iniciador es muy pequeña y generalmente es inferior a 10^3 ufc/g. Sin embargo, llegan a alcanzar entre 10^7 y 10^9 ufc/g entre los 3 y 9 meses de maduración, manteniéndose durante toda la maduración (Peterson y Marshall, 1990). Las bacterias de esta microbiota secundaria pertenecen generalmente a los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y, ocasionalmente, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Cogan *et al.*, 2007). Aunque forman una parte significativa de los microorganismos presentes en el queso durante la maduración no contribuyen a la acidificación en la elaboración del queso ni siquiera crecen bien en la leche. Las especies que se encuentran con mayor frecuencia en los quesos son lactobacilos homofermentativos facultativos de las especies *Lb. casei*/ *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. curvatus*, *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*, dependiendo de la variedad de queso. Dentro de una variedad es frecuente, incluso, encontrar varias especies simultáneamente, con cambios notables a lo largo del tiempo;

Tabla II.12. Principales características de las bacterias lácticas que se encuentran en los cultivos iniciadores

	Morfología	Ácido láctico producido en leche (%) ^a	Isómero del ácido láctico	Metabolismo del citrato	Producción de NH ₃ de la arginina	Crecimiento a:			Fermentación de ^b :		
						10°C	40°C	45°C	Glu	Gal	Lac
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Cocos	0,6	L	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Bacilos	2	DL	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	Bacilos	1,8	D	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis</i>	Bacilos	1,8	D	-	-/+ ^c	-	+	+	+	+/- ^c	+
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	Cocos	0,8	L	-	-	+	-	-	+	+	+
<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	Cocos	0,8	L	+/-	+	+	+	-	+	+	+
<i>Leuconostoc lactis</i>	Cocos	<0,5	D	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris</i>	Cocos	0,2	D	+	-	+	-	-	+	+	+

^aValores aproximados; los valores pueden variar dependiendo de las cepas.

^bGlu, glucosa; Gal, galactosa; Lac, lactosa.

^c-/+, la mayoría de las cepas son negativas; +/-, la mayoría de las cepas son positivas.

Adaptado de Bresdord et al. (2001).

en casi todos los casos analizados *Lb. paracasei* es la especie que suele predominar en las últimas etapas de la maduración (Beresford et al., 2001).

Existe cierta controversia acerca del origen de estas bacterias lácticas que no pertenecen al cultivo iniciador. Cuando se emplea leche cruda en la elaboración del queso, está claro que ése será su origen. En cambio, cuando se emplea leche pasteurizada para elaborar queso, éste también contiene bacterias lácticas distintas a las añadidas como cultivo iniciador. Es decir, se desconocen si se originan de una contaminación posterior al tratamiento térmico o si hay una pequeña proporción que sobreviven y se multiplican en el queso (Jordan y Cogan, 1993). Tampoco se sabe con exactitud qué fuente de energía emplean para su crecimiento, ya que la lactosa se ha agotado cuando esta microbiota secundaria comienza a multiplicarse. Otras posibles alternativas son el citrato y las glicoproteínas de la membrana del glóbulo graso (Beresford et al., 2001).

Sin embargo, si parece haber acuerdo unánime sobre el importante papel que juegan estas bacterias lácticas que no pertenecen al cultivo iniciador en el desarrollo del flavor del queso, especialmente contribuyendo a la proteólisis e intensificando el sabor (Cogan et al., 2007). Tanto es así que ya es habitual, en algunos casos, emplear lactobacilos como cultivos auxiliares en la elaboración del queso, con la idea de controlar la aparición de otras bacterias lácticas secundarias “salvajes”. De esta forma, y sin modificar el proceso de elaboración, se podría evitar la aparición de defectos y la inconsistencia de la calidad del producto final (Broadbent *et al.*, 2003).

El ecosistema microbiano del queso se completa con otros grupos como, por ejemplo, las propionibacterias, los micrococos, los estafilococos, *Brevibacterium linens* y otras corinebacterias, así como con mohos y levaduras, asociados a variedades concretas de quesos (Beresford *et al.*, 2001). La complejidad de este ecosistema y las interacciones que se establecen entre los distintos grupos en las especiales condiciones del queso hacen muy difícil que se tenga un control preciso de su maduración.

Desde el punto de vista higiénico, el queso madurado (por un periodo superior a los 60 días) se considera microbiológicamente seguro gracias a sus peculiares

características: pH ácido, baja a_w , presencia de sal, ausencia de O_2 , refrigeración y presencia de microorganismos fermentadores que compiten por el mismo nicho ecológico. La pasteurización de la leche que se emplea para la elaboración del queso es una forma muy eficaz de control de los microorganismos patógenos que pudiera haber en la materia prima. Cuando se emplea leche cruda para elaborar queso, en cambio, es necesario que transcurra un periodo de tiempo lo suficientemente prolongado durante la maduración (>60 días) para asegurar la destrucción de los microorganismos patógenos.

Durante la elaboración del queso existen varias situaciones que pueden plantear un riesgo particular de brote de intoxicación alimentaria. Por un lado, la inactivación total o parcial de las bacterias lácticas durante la fermentación tendría como consecuencia que los niveles de acidificación serían bajos y, por tanto, el pH alto. Estos fallos en la acidificación permitirían la supervivencia y multiplicación de los microorganismos patógenos y alterantes. Por otra parte, unas malas prácticas higiénicas de fabricación durante la manipulación posterior a la pasteurización, aunque sea correcta, pueden facilitar las contaminaciones cruzadas o el contacto con patógenos del ambiente o del equipo de procesado.

De los posibles patógenos asociados con el queso, los que representan una mayor preocupación para los fabricantes de queso son *L. monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *E. coli* O157:H7. La información disponible sugiere que *L. monocytogenes* es la más problemática. Se trata de un microorganismo Gram-positivo psicrotrofo que tiene una gran facilidad para crecer y/o sobrevivir en ambientes desfavorables: la adición de sal (hasta 30% de NaCl) o nitritos, la refrigeración o una baja a_w , son ineficaces de impedir el desarrollo de este microorganismo. El riesgo de este patógeno no debería tomarse a la ligera, ya que la mortalidad asociada es muy alta (la probabilidad de que la infección desemboque en muerte es del 33%). Así ocurrió durante la década de los 80 en EE UU: la aparición de graves brotes de listeriosis transmitida a través de alimentos contaminados causó gran alarma social. Además, la mayor parte de estos brotes se debieron al consumo de leches y quesos frescos contaminados.

A pesar de que los niveles necesarios de *L. monocytogenes* para causar la listeriosis rara vez se encuentran inicialmente en los alimentos (Notermans et al., 1998), como es capaz de reproducirse a temperaturas de refrigeración, incluso conservando los alimentos de manera adecuada, un número inicial relativamente bajo de este microorganismo, puede llegar a alcanzar los niveles que causan la enfermedad en un corto espacio de tiempo. A este respecto, y dada la elevada posibilidad de encontrar microorganismos del género *Listeria* en leche y productos lácteos como algunos quesos, sería muy interesante disponer de medios para controlar este microorganismo *in situ* desde las primeras etapas del proceso de elaboración.

Production of pediocin PA-1, and coproduction of nisin A and pediocin PA-1, by wild *Lactococcus lactis* strains of dairy origin

C. Reviriego^a, A. Fernández^a, N. Horn^b, E. Rodríguez^c, M.L. Marín^a,
L. Fernández^a, J.M. Rodríguez^{a,*}

^aDepartamento de Nutrición y Bromatología III, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^bFood Safety Science Division, BBSRC Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UA, UK

^cDepartamento Tecnología de Alimentos, INIA, Ctra. La Coruña Km 7, Madrid 28040, Spain

Received 15 November 2003; accepted 7 May 2004

Abstract

Heterologous production of pediocin PA-1 in nisin and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains, which had been previously selected because of their technological properties for cheese making, was investigated. Plasmid pFI2160, which contains a hybrid gene (*L-peda*) encoding the fusion between the lactococcin A leader and propediocin PA-1, and also the genes *lcnC* and *lcnD*, that encode the lactococcin A secretion apparatus, was introduced into *L. lactis* ESI 153 and *L. lactis* ESI 515 (Nis⁺). The pediocin production level of their respective transformants, *L. lactis* CL1 and *L. lactis* CL2 (Nis⁺), was approximately 600 and 400 ng mL⁻¹, respectively, which represents a 30% and a 20% of the quantity produced by the natural pediocin PA-1 producer *Pediococcus acidilactici* 347. Transformation of *L. lactis* ESI 515 with pFI2160 did not affect its ability to produce nisin. Pediocin bioassays showed the stability of pFI2160 in both heterologous hosts under selective and non-selective conditions.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Lactococcus lactis*; Pediocin PA-1; Nisin; Heterologous production

1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) usually play a key role in food fermentations, where they contribute not only to the development of the desired sensorial properties in the final products, but also to their microbiological safety (Stiles, 1996). As a consequence, a high number of LAB strains have found wide commercial applications as starter or bioprotective cultures. The bioprotective effect is based on the production of different antimicrobial compounds and, among them, bacteriocins have received considerable research attention during the last years (Cleveland, Montville, Nes, & Chikindas, 2001).

Pediocin PA-1 is a class II bacteriocin with a broad inhibitory spectrum and particularly effective against *Listeria monocytogenes* (Muriana, 1996). Most pediocin

PA-1-producing bacteria so far isolated are pediococci, organisms usually associated with vegetables and meat products but not suitable for production of dairy products both from a metabolic and a technological points of view. Therefore, the production of this bacteriocin by strains of dairy origin is a desirable objective and, as a consequence, strategies based on its heterologous production by *Lactococcus lactis* have been attempted (Chikindas, Venema, Ledebor, Venema, & Kok, 1995; Van Belkum, Worobo, & Stiles, 1997; Horn et al., 1998, 1999; Buyong, Kok, & Luchansky, 1998; Rodríguez, Martínez, Horn, & Dodd, 2003).

The significant amino acid homologies shared by leader peptides, and also by dedicated transporters, of most class II bacteriocins (Van Belkum et al., 1997; Håvarstein, Holo, & Nes, 1994; Håvarstein, Diep, & Nes, 1995) represent an attractive and alternative approach to produce pediocin PA-1 in heterologous hosts. Horn et al. (1999) reported production of pediocin PA-1 in the non-starter *L. lactis* strains

*Corresponding author. Tel.: +34-91-394-3747; fax: +34-91-394-3743.

E-mail address: jmrodrig@vet.ucm.es (J.M. Rodríguez).

IL1403, MG1614 and FI5876, by introducing a plasmid containing the following foreign genes: a hybrid gene (*L-peda*) containing an in-frame fusion of sequences encoding the lactococcin A leader and propediocin PA-1 under the control of the lactococcin A promoter, and the genes *lcnC* and *lcnD*, that encode the lactococcin A secretion apparatus (Stoddard, Petzel, Van Belkum, Kok, & McKay, 1992). Since *L. lactis* FI5876 is a nisin-producing strain, its transformants were able to coproduce nisin A and pediocin PA-1.

In this context, the objective of this study was to determine if this strategy can be also valid to get significant production of pediocin PA-1 in nisin and non-nisin-producing *L. lactis* strains that were previously selected because of their technological properties for cheese making (Cogan et al., 1997). Subsequently, the ability of the recombinant strains to inhibit the growth of *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese was evaluated (Rodríguez et al., 2004).

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms and culture conditions

The lactococcal host strains, *L. lactis* ESI 153 and *L. lactis* ESI 515 (Nis⁺), were originally isolated from artisanal raw milk cheeses (Cogan et al., 1997). They were selected because of their technological and/or antimicrobial properties, and have already been used as starter cultures in cheese manufacture (Gómez, Rodríguez, Gaya, Nuñez, & Medina, 1999; Rodríguez, Gaya, Nuñez, & Medina, 1998). *L. lactis* FI9267 was used as the source of pFI2160 (Horn et al., 1999). Lactococcal strains were routinely grown in MRS (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, UK) or M17 medium (Oxoid) supplemented with 0.5% (wt/vol) glucose (GM17 medium) at 32°C without agitation. *Pediococcus acidilactici* 347, a wild pediocin PA-1-producing strain (Rodríguez et al., 1997), was grown in MRS medium at 32°C without agitation. Agar plates were made by addition of 1.5% (wt/vol) agar to broth media. When appropriate, chloramphenicol (Cm; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was added (5 µg mL⁻¹) to the lactococcal cultures as selective agent. The lactococcal strains were stored at -80°C in GM17 broth containing 15% glycerol (vol/vol) and their authenticity was assessed by RAPD profiling (Section 2.3) and plasmid profiling (data not shown).

2.2. Bacteriocin assays

Pediocin PA-1 and nisin antimicrobial activities in cultures were assayed by a plate diffusion bioassay performed as previously described (Dodd, Horn, Zhang, & Gasson, 1992) with *L. lactis* MG1614 (pediocin-resistant, nisin-sensitive; Gasson, 1983), *Enterococcus*

faecium P21 (pediocin-sensitive, nisin-sensitive; Herranz et al., 2001) and *E. faecalis* TAB28 (pediocin-sensitive, nisin-resistant; Joosten, Rodríguez, & Núñez, 1997) as indicator organisms. *L. lactis* BB24 (Rodríguez et al., 1995) was used as a positive control for nisin production. Pediocin PA-1 production was quantified using a series of pediocin PA-1 standards, ranging from 0 to 5 µg mL⁻¹. Pure pediocin PA-1 was kindly provided by Dr. J.M. Martínez (Universidad Complutense de Madrid, Spain) and GM17 broth was the diluent used to prepare the standards. The pediocin PA-1 concentration in these standards was determined by a competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (CI-ELISA) using the polyclonal antibodies and the conditions described by Martínez et al. (1999). The zones of inhibition were measured and plotted against the logarithm of their concentration to give a standard curve from which test supernatant concentrations were estimated. The assays were performed in triplicate with four independent sets of cultures. Then, the standard deviation (SD) values were calculated.

2.3. Transformation of the *L. lactis* strains

Plasmid pFI2160 is a derivative of pTG262 (a lactococcal-*E. coli* shuttle vector that confers resistance to Cm) and contains the hybrid gene *L-peda* (an in-frame fusion between sequences encoding lactococcin A leader and pediocin PA-1 propeptide), and *lcnCD* genes (encoding the secretory machinery of lactococcin A) (Horn et al., 1998). Previously, it has been shown that pFI2160 is able to direct pediocin PA-1 production in *L. lactis* at a high level (Horn et al., 1999). *L. lactis* ESI 153 and ESI 515 were transformed with pFI2160 following the procedure described by Wells, Wilson, and Le Page (1993). Plasmid DNA isolation was carried using the Qiagen plasmid mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). To test the stability of pFI2160 either in the presence or in the absence of Cm, MRS subcultures of *L. lactis* ESI 153 and ESI 515 were made every 12 h for 5 days, and the supernatants were assayed for pediocin PA-1 production using the diffusion bioassay. RAPDs assays using primers ArgDei (5'-ACCYTRGAAGGYGGY-GATGTB-3') and OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3') (Veyrat, Miralles, & Pérez-Martínez, 1999) were performed to confirm isogenicity between *L. lactis* ESI 153 and CL1, and between ESI 515 and CL2. Such primers are designed to provide a high variability of RAPD profiles among LAB isolates.

3. Results and discussion

Transformation of *L. lactis* ESI 153 and ESI 515 with pFI2160 generated the *L. lactis* strains CL1 and CL2, respectively. The transformation efficiency of both

lactococcal host strains, measured as the number of recipient strains required to obtain one transformant, was low, ranging from 3×10^{-6} to 1×10^{-7} . Inhibition of the pediocin-sensitive indicator organisms *E. faecalis* TAB28 and *E. faecium* P21 by culture supernatants of strains CL1 and CL2 was detected in plate diffusion bioassays (Figs. 1 and 2). The pediocin production level of *L. lactis* CL1 and CL2 was approximately $600 (\pm 29)$ and $400 (\pm 18)$ ng mL⁻¹, respectively, which represents a 30% and a 20% of the quantity produced by the natural

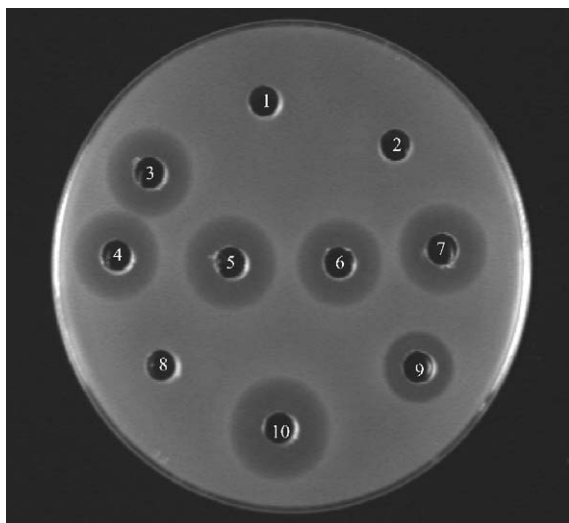


Fig. 1. Agar diffusion bioassay for detection of bacteriocin activity against *E. faecium* P21. Samples: 1, *L. lactis* ESI 153; 2, GM17 broth; 3–7, *L. lactis* ESI 153 transformants (5, CL1); 8, *L. lactis* MG1614 (Bac⁻); 9, *L. lactis* BB24 (Nis⁺); 10, *P. acidilactici* 347 (Ped⁺).

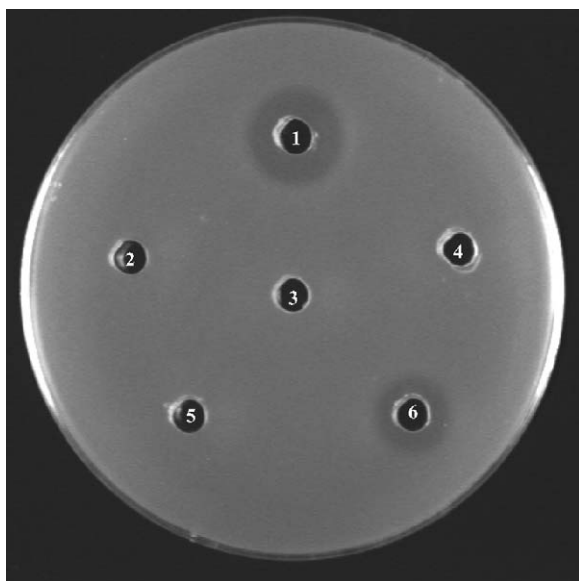


Fig. 2. Agar diffusion bioassay for detection of bacteriocin activity against *Enterococcus faecalis* TAB28. Samples: 1, *P. acidilactici* 347; 2, *L. lactis* BB24; 3, GM17 broth; 4, *L. lactis* MG1614; 5, *L. lactis* ESI 515; 6, *L. lactis* CL2.

producer *P. acidilactici* 347. Transformation of *L. lactis* ESI 515 with pFI2160 did not affect its ability to produce nisin (Fig. 3). Pediocin bioassays showed stability of pFI2160 in CL1 and CL2 after 10 subcultures, either under selective (Cm) or non-selective (no antibiotic added) conditions. RAPDs assays using primers ArgDei and OPL5 confirmed isogenicity between *L. lactis* ESI 153 and CL1, and between ESI 515 and CL2 (Fig. 4).

Production of pediocin PA-1 by strains of dairy origin has been previously attempted. Chikindas et al. (1995) achieved production and secretion of pediocin PA-1 in

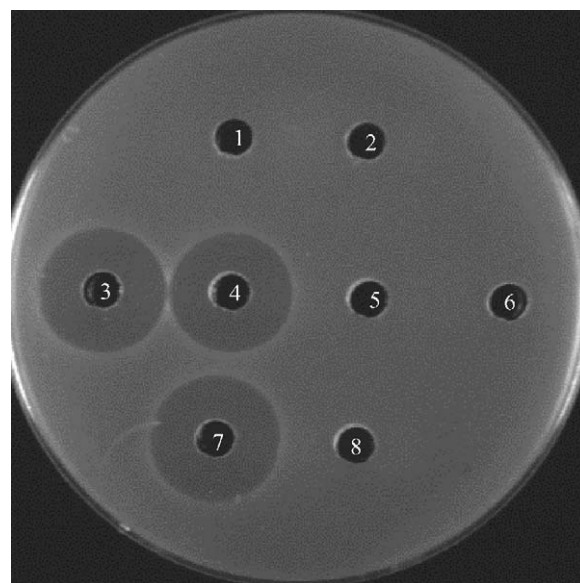


Fig. 3. Agar diffusion bioassay for detection of nisin activity against *L. lactis* MG1614. Samples: 1, *P. acidilactici* 347; 2, *L. lactis* MG1614; 3, *L. lactis* ESI 515; 4, *L. lactis* BB24; 5, *L. lactis* ESI 153; 6, *L. lactis* CL1; 7, *L. lactis* CL2; 8, GM17 broth.

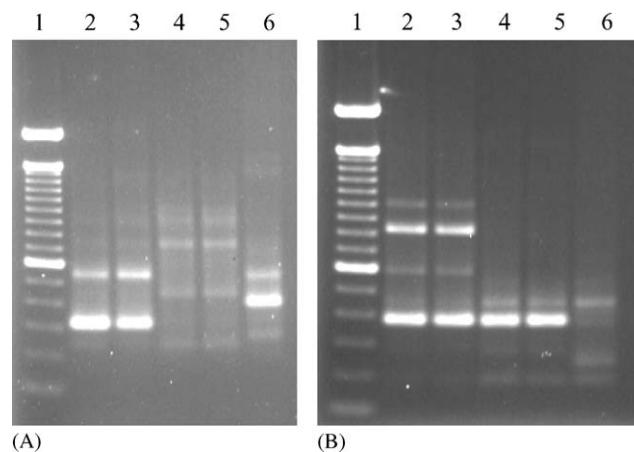


Fig. 4. RAPDs profiles obtained after amplification of genomic DNA using primers ArgDei (A) and OPL5 (B). Samples: 1, Standard (100 bp ladder, Gibco); 2, *L. lactis* ESI 153; 3, *L. lactis* CL1; 4, *L. lactis* ESI 515; 5, *L. lactis* CL2; 6, *P. acidilactici* 347.

L. lactis IL1403 and *L. lactis* LL108 (a *L. lactis* MG1363 derivative carrying several copies of *repA* in its chromosome) transformed with pMC117, a plasmid containing the *ped* operon under the control of the lactococcal promoter P32. However, such lactococcal hosts lack several properties required for application in the dairy industry since they are proteinase negative, lactose negative and incapable of adequate growth and acid production in milk. Therefore, to exploit the commercial potential of a pediocin-producing dairy starter culture, *L. lactis* MM210, a strain used in Cheddar cheese manufacture, was selected as a host for the *ped* operon-encoding plasmid (Buyong et al., 1998). The antilisterial ability of the recombinant *L. lactis* starter culture was tested in Cheddar cheeses coinoculated with the lactococcal strain and a mixture of three *L. monocytogenes* strains (Buyong et al., 1998). In the experimental cheese, the initial counts of the pathogen in the inoculated milk (10^3 cfu mL⁻¹) decreased by 1 log cycle within 1 week of ripening and then decreased by an additional log cycle within 3 months (final counts: 10 cfu g⁻¹). The presence of the plasmid encoding pediocin production in the lactococcal starter culture did not affect its technological properties. In control cheeses made with an isogenic, non-pediocin producing *L. lactis* strain, *Listeria* counts increased by approximately 4 log cycles after 2 weeks of ripening and then gradually decreased to about 10^3 cfu g⁻¹ after 6 months.

Pediocin PA-1 and lactococcin A are both class II bacteriocins and, hence, likely candidates for expression and secretion in *L. lactis* via heterologous translocators. Horn et al. (1998,1999) reported the heterologous production of pediocin PA-1 in *L. lactis* following such strategy. However, and similarly to Chikindas et al. (1995), the strains that they used as hosts are not suitable for cheese making. Therefore, in this work we applied the same strategy for heterologous production of pediocin PA-1 in *L. lactis* ESI 153 and ESI 515, two strains selected for their dairy technological properties (Cogan et al., 1997).

Since transformation of *L. lactis* ESI 515 did not affect its ability to produce nisin (Fig. 3), the new strain CL2 was able to coproduce nisin and pediocin PA-1. Previously, Horn et al. (1999) achieved coproduction of these bacteriocins in the non-starter strain *L. lactis* FI5876; however, the pediocin level was only 11% of that accounted by *P. acidilactici* 347. Therefore, the level of coproduced pediocin PA-1 has been improved in this work. The particular antimicrobial properties of pediocin PA-1 and nisin, and the beneficial effects of their coproduction are features that can be exploited by the food industry. The synergistic effects of these two bacteriocins against a variety of pathogens have been previously described (Hanlin, Kalchayanand, Ray, & Ray, 1993; Mulet-Powell, Lacoste-Armynot, Viñas, &

De Buochberg, 1998). In addition, the fact that they are completely unrelated bacteriocins can prevent the emergence of cross-resistances among initially sensitive bacteria (Rekhif, Atrih, & Lefebvre, 1994). Work is in progress to develop food-grade pediocin-producing *L. lactis* ESI 153 and ESI 515 derivatives by chromosomal integration of the genes involved in pediocin PA-1 biosynthesis, by using food-grade vectors, and/or by removal of the gene conferring Cm resistance from pFI2160.

4. Conclusions

Transformation of *L. lactis* ESI 153 and *L. lactis* ESI 515 with pFI2160 generated strains CL1 and CL2, respectively. Both showed pediocin PA-1 production, approximately 600 and 400 ng mL⁻¹, respectively. Transformation of the naturally nisin-producing strain *L. lactis* ESI 515 with pFI2160 did not affect its ability to produce nisin. Pediocin bioassays showed the stability of pFI2160 in both heterologous hosts under non-selective conditions. Therefore, the new strains are good candidates to study how their ability to produce significant amounts of pediocin PA-1 may affect the growth of selected pathogens during cheese making (see Rodríguez et al., 2004). If the results obtained were promising, it would open new perspectives since different approaches to obtain food-grade *L. lactis* strains with the same ability are currently in progress.

Acknowledgements

This work was partially supported by Grant AGL2002-04609-C02-02 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid, Spain.

References

- Buyong, N., Kok, J., & 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. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 4842–4845.
- Chikindas, M. L., Venema, K., Ledebuer, A. M., Venema, G., & Kok, J. (1995). Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. *Letters in Applied Microbiology*, *21*, 183–189.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, *71*, 1–20.
- Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P. S., Fernández, I., Gómez, M. J., Gómez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M., & Rodríguez, E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, *64*, 409–421.
- Dodd, H. M., Horn, N., Zhang, H., & Gasson, M. J. (1992). A lactococcal expression system for engineered nisins. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*, 3683–3693.

- Gasson, M. J. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *Journal of Bacteriology*, *154*, 1–9.
- Gómez, M. J., Rodríguez, E., Gaya, P., Nuñez, M., & Medina, M. (1999). Characteristics of Manchego cheese manufactured from raw and pasteurized ovine milk and with defined-strain or commercial mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science*, *82*, 2300–2307.
- Hanlin, M. B., Kalchayanand, N., Ray, P., & Ray, B. (1993). Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *Journal of Food Protection*, *56*, 252–255.
- Håvarstein, L. S., Diep, D. B., & Nes, I. F. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Molecular Microbiology*, *16*, 229–240.
- Håvarstein, L. S., Holo, H., & Nes, I. F. (1994). The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptide that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology*, *140*, 2383–2389.
- Herranz, C., Casaus, P., Mukhopadhyay, S., Martínez, J. M., Rodríguez, J. M., Nes, I. F., Hernández, P. E., & Cintas, L. M. (2001). *Enterococcus faecium* P21: A strain naturally occurring in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. *Food Microbiology*, *18*, 115–131.
- Horn, N., Martínez, M. I., Martínez, J. M., Hernández, P. E., Gasson, M. J., Rodríguez, J. M., & Dodd, H. M. (1998). Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococin A secretory apparatus. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 818–823.
- Horn, N., Martínez, M. I., Martínez, J. M., Hernández, P. E., Gasson, M. J., Rodríguez, J. M., & Dodd, H. M. (1999). Enhanced production of pediocin PA-1, and coproduction of nisin and pediocin PA-1, by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*, 4443–4450.
- Joosten, H. M. L. J., Rodríguez, E., & Núñez, M. (1997). PCR detection of sequences similar to the AS-48 structural gene in bacteriocin-producing enterococci. *Letters in Applied Microbiology*, *24*, 40–42.
- Martínez, J. M., Martínez, M. I., Suárez, A. M., Herranz, C., Casaus, P., Cintas, L. M., Rodríguez, J. M., & 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.
- Mulet-Powell, N., Lacoste-Armynot, A. M., Viñas, M., & De Buochberg, M. S. (1998). Interactions between pairs of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, *61*, 1210–1212.
- Muriana, P. M. (1996). Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *Journal of Food Protection*, *59S*, 54–63.
- Rekhif, N., Atrih, A., & Lefebvre, G. (1994). Selection of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains. *Current Microbiology*, *28*, 237–241.
- Rodríguez, E., Calzada, J., Arqués, J.L., Rodríguez, J.M., Nuñez, M., & Medina, M. (2004). Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *E. coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal*, doi:10.1016/j.idairyj.2004.05.004.
- Rodríguez, J. M., Cintas, L. M., Casaus, P., Horn, N., Dodd, H. M., Hernández, P. E., & Gasson, M. J. (1995). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology*, *78*, 109–115.
- Rodríguez, J. M., Cintas, L. M., Casaus, P., Martínez, M. I., Suárez, A., & Hernández, P. E. (1997). Detection of pediocin PA-1 producing pediococci by rapid molecular biology techniques. *Food Microbiology*, *14*, 363–371.
- Rodríguez, E., Gaya, P., Nuñez, M., & Medina, M. (1998). Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *39*, 129–132.
- Rodríguez, J. M., Martínez, M. I., Horn, N., & Dodd, H. M. (2003). Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *80*, 101–116.
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *70*, 331–345.
- Stoddard, G. W., Petzel, J. P., Van Belkum, M. J., Kok, J., & McKay, L. L. (1992). Molecular analyses of the lactococin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* WM4. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*, 1952–1961.
- Van Belkum, M. J., Worobo, R. W., & Stiles, M. E. (1997). Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: Colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, *23*, 1293–1301.
- Veyrat, A., Miralles, M. C., & Pérez-Martínez, G. (1999). A fast method for monitoring the colonization rate of lactobacilli in a meat model system. *Journal of Applied Microbiology*, *87*, 49–61.
- Wells, J. M., Wilson, P. W., & Le Page, R. W. (1993). Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Bacteriology*, *74*, 629–636.

Enhanced production of pediocin PA-1 in wild nisin- and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains of dairy origin

C. Reviriego^a, L. Fernández^a, O.P. Kuipers^b, J. Kok^b, J.M. Rodríguez^{a,*}

^a*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain*

^b*Department of Genetics, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Groningen, 9751 NN Haren, The Netherlands*

Received 6 October 2005; accepted 1 May 2006

Abstract

In this work, heterologous production of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis* ESI 153 and ESI 515 (Nis⁺), two strains selected because of their technological properties for cheesemaking, was achieved after transformation with plasmids pMC117, pRK119 and pCNC1, which contain the complete pediocin operon under the control of the strong P32 promoter. The pediocin production of the *L. lactis* ESI 153 derivatives containing pRK119 or pCNC1 was higher (approximately 165%) than that achieved by the natural pediocin PA-1 producer *Pediococcus acidilactici* 347. In the case of the *L. lactis* ESI 515 derivatives, those containing pRK119 or pCNC1 showed a pediocin production level similar (95–100%) to that of *P. acidilactici* 347.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Lactococcus lactis*; Pediocin PA-1; Nisin; Heterologous production

1. Introduction

The bacteriocin pediocin PA-1 is interesting as a food biopreservative because of its strong activity against *Listeria monocytogenes* (Muriana, 1996), a major biological hazard in the dairy industry. Therefore, production of pediocin PA-1 in strains of dairy origin is an attractive objective. Heterologous production of this bacteriocin by strains of *Lactococcus lactis* has been achieved using two strategies: introduction of the whole pediocin PA-1 operon (*pedABCD*) (Buyong, Kok, & Luchansky, 1998; Chikindas, Venema, Ledebøer, Venema, & Kok, 1995), or the exploitation of the amino acid homologies shared among leader peptides, and also among transporters of most class II bacteriocins (Horn et al., 1998; Horn et al., 1999; Horn, Fernández, Dodd, Gasson, & Rodríguez, 2004; Reviriego et al., 2005). However, the results of the studies cited above cannot be compared because of the different hosts, plasmids, promoters, substrates and antimicrobial assays employed.

In a previous study (Reviriego et al., 2005), pediocin-producing derivatives of the starter strains *L. lactis* ESI 153 and ESI 515 (CL1 and CL2, respectively) were constructed by introduction of pFI2160. This pTG262-derivative vector includes a fragment (*Lped-lcnCD*) that contains a hybrid gene encoding the lactococcin A leader fused to the mature part of pediocin PA-1, and the genes *lcnC* and *lcnD* that specify the lactococcin A secretion apparatus (Horn et al., 1999). The objective of this work was to elucidate if pediocin production could be enhanced in such hosts after transformation with plasmids harbouring the *ped* operon under the control of a stronger promoter. In addition, we investigated if chromosomal integration of the *ped* genes could be an alternative for pediocin PA-1 production in lactococcal hosts.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms and culture conditions

The lactococcal strains used in this study are listed in Table 1. *L. lactis* ESI 153 and ESI 515 (a nisin-producing strain; Nis⁺) were originally isolated from artisan raw milk

*Corresponding author. Fax: +34 91 3943743.

E-mail address: jmrodrig@vet.ucm.es (J.M. Rodríguez).

Table 1
Lactococcal strains used in this study

Strain	Host	Plasmid	Reference or source
MG1614			Gasson (1983)
LL108 (<i>repA</i> ⁺)	MG1363		Leenhouts et al. (1998)
LL108O	LL108	pORI280-GalA'(Ery ^R , pORI280 derivative, contains a <i>Bam</i> HI site between the initial and the final sequence of the <i>galA</i> gene of <i>L. lactis</i>)	W.A. Pool and A.R. Neves
LL108W	LL108	pWRC03 (Ery ^R , pORI280-GalA' derivative, contains the hybrid <i>L-peda</i> gene preceded by the lactococcal A promoter, <i>lcnC</i> and <i>lcnD</i>)	This study
IL1403MC	IL1403	pMC117 (Ery ^R , pMG36e derivative, contains the pediocin operon preceded by the P32 promoter)	Chikindas, Venema, Ledebouer, Venema, and Kok (1995)
MG1363RK	MG1363	pRK119 (Cm ^R , pMG36c derivative, contains the pediocin operon preceded by the P32 promoter)	R. Kemperman
MG1614CNC	MG1614	pCNC16 (Cm ^R , pTG262 derivative, contains the pediocin operon preceded by the P32 promoter)	This study
CR	MG1614	Plasmid free; the pWRC03 fragment containing <i>L-peda</i> , <i>lcnC</i> and <i>lcnD</i> has been integrated in the chromosome	This study
ESI 153			Cogan et al. (1997)
CL1	ESI 153	pFI2160 (Cm ^R , pTG262 derivative, contains the hybrid <i>L-peda</i> gene preceded by the lactococcal A promoter, <i>lcnC</i> and <i>lcnD</i>)	Reviriego et al. (2005)
MC1	ESI 153	pMC117	This study
RK1	ESI 153	PRK119	This study
CNC1	ESI 153	pCNC16	This study
ESI 515 (Nis ⁺)			Cogan et al. (1997)
CL2	ESI 515	pFI2160	Reviriego et al. (2005)
MC2	ESI 515	pMC117	This study
RK2	ESI 515	PRK119	This study
CNC2	ESI 515	pCNC16	This study

cheeses (Cogan et al., 1997), and have been successfully used as adjuncts and/or starter cultures in cheese manufacture (Rodríguez, Gaya, Nuñez, & Medina, 1998). Lactococcal strains were grown in M17 (Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with 0.5% (w/v) glucose (GM17 medium) or MRS (Oxoid) while *Pediococcus acidilactici* 347 (Rodríguez et al., 1997) was grown in MRS. Cultures were incubated at 32 °C without agitation. When appropriate, chloramphenicol (Cm; Sigma, St Louis, USA) or erythromycin (Ery; Sigma) was added (5 µg mL⁻¹) to the cultures.

2.2. Construction of lactococcal strains

Three plasmids harbouring the complete *ped* operon preceded by the P32 promoter (Table 1) were used to elucidate if pediocin production could be enhanced in ESI 153 and ESI 515: (1) pMC117, a pMG36e derivative (Chikindas et al., 1995); (2) pRK119, a pMG36c derivative kindly provided by R. Kemperman (University of Groningen, The Netherlands); and (3) pCNC16, a pTG262 derivative that was constructed as follows. A DNA fragment (3659-bp) containing the pediocin PA-1 operon under the control of the P32 promoter was obtained by PCR from pRK119 using primers operonF (5'-CGAAGATCTGATATGATAAGATTAATAGTT-3') and operonR (5'-CGAAGATCTCTATTCTTGATTATGAATT AAC-3'), which include *Bgl*II sites (underlined), and the Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Paisley, UK).

PCR conditions have been described previously (Reviriego et al., 2005). After digestion with *Bgl*II (New England Biolabs, Ipswich, USA), the fragment was cloned in the *Bam*HI site of pTG262 generating pCNC16.

Transformation of the lactococcal hosts with pCNC16, pMC117 and pRK119 as described by Wells, Wilson, and Le Page (1993) generated strains MC1, RK1 and CNC1, respectively, in the case of *L. lactis* ESI 153, and strains MC2, RK2 and CNC2, respectively, in that of ESI 515. Pediocin PA-1 and nisin antimicrobial activities were assayed by a diffusion bioassay with *Enterococcus faecalis* TAB28 (pediocin-sensitive; Joosten, Rodríguez, & Nuñez, 1997) and *L. lactis* MG1614 (nisin-sensitive; Gasson, 1983) as indicator organisms. The supernatants were obtained from cultures with a bacterial concentration of 1 × 10⁹ cfu mL⁻¹. *L. lactis* BB24 (Nis⁺; Rodríguez et al., 1995) and *P. acidilactici* 347 (Ped⁺) were used as positive controls.

Pediocin PA-1 activity in the culture supernatants was quantified by a microtiter plate assay system (Holo, Nilssen, & Nes, 1991) with *E. faecalis* TAB28 as indicator. The assays were performed in quadruplicate and the standard deviations (SD) values were calculated.

2.3. Chromosomal integration of the genes required for pediocin PA-1 biosynthesis in *L. lactis* MG1614

The fragment *Lped-lcnCD* was amplified from pFI2160 (Horn et al., 1999) with primers *FBgl*IIlcnC (5'-CGAAGATCTGAGGCAGTAAGTAATATTATTTTC-3') and

RBgIIIhybr (5'-CGAAGATCTGCATAATGCTAGCATT-TATGAT-3') (annealing at 50 °C), which include *BgIII* sites (underlined). The resulting 4099-bp fragment was cut with *BgIII* and cloned in the *Bam*HI site of the non-replicative vector pORI280-GalA' (Table 1) to generate pWRC03. This plasmid was introduced into *L. lactis* LL108 for maintenance purposes since this strain carries several copies of *repA* in its chromosome (Leenhouts, Bolhuis, Venema, & Kok, 1998); then, pWRC03 was introduced into *L. lactis* MG1614, a strain in which the plasmid can not replicate, enabling the integration of the genes required for pediocin PA-1 production into its chromosome. Integration of the fragment *Lped-lenCD* (4093 bp) in the chromosome of *L. lactis* MG1614 was assessed by PCR amplification using the primers FlcN (5'-GAGGCAGTAAGTAATATTATTTTC-3') and Rhybr (5'-GCATAATGCTAGCATTATGAT-3') (annealing at 50 °C).

3. Results and discussion

Pediocin production was detected in the culture supernatants of strains CL1, MC1, RK1, CNC1, CL2 MC2, RK2 and CNC2 (Fig. 1a). The smallest inhibition zones corresponded to CL1 and CL2 supernatants while those obtained by pRK119- or pCNC16-containing strains (RK1 and RK2 or CNC2 and CNC1, respectively) displayed the largest halos (Fig. 1a). These results were in agreement with those obtained with the microtitre plate assay (Table 2). Pediocin production by CL1 and CL2 (Table 1) had already been achieved through the leader/transporter exchange strategy (Reviriego et al., 2005). However, the pediocin activity observed in those cultures was notably lower than that displayed by the strains carrying the *ped* operon constructed in this study (Fig. 1a; Table 2). This may be a consequence of a higher biosynthetic capacity of strains containing the complete pediocin operon and/or the

effect of the strong P32 promoter since in pFI2160 the genes required for pediocin biosynthesis are under the control of the lactococcin A promoter. The highest pediocin production was achieved by strains RK1 and CNC1, which displayed 163% and 165%, respectively, of the activity displayed by *P. acidilactici* 347 (Table 2). The pediocin activity showed by *L. lactis* MC1 (pMC117), was more than ten times lower than that detected in RK1 (pRK119) supernatants (Table 2). Curiously, the main difference between pMC117 and pRK119 is the antibiotic resistance marker (Ery and Cm, respectively).

The presence in *L. lactis* ESI 515 of either pMC117, pRK119 or pCNC16 did not alter its nisin-producing phenotype (Fig. 1b), a finding that has been previously reported when this strain has been used as a host for pediocin PA-1 production (Horn et al., 1999, 2004; Reviriego et al., 2005). Pediocin production by strain MC2 (pMC117; 751 BU) was three times higher than in *L. lactis* MC1 (pMC117; 225 BU). In contrast, pediocin

Table 2
Pediocin PA-1 production by the strains used in this study

Strain	Pediocin PA-1 activity (BU ± SD)	%
<i>P. acidilactici</i> 347	1500 ± 29	100
<i>L. lactis</i> ESI 153	Nd ^a	—
<i>L. lactis</i> CL1	106 ± 12	7
<i>L. lactis</i> MC1	225 ± 15	15
<i>L. lactis</i> RK1	2447 ± 43	163
<i>L. lactis</i> CNC1	2478 ± 39	165
<i>L. lactis</i> ESI 515	Nd	—
<i>L. lactis</i> CL2	33 ± 7	2
<i>L. lactis</i> MC2	751 ± 22	50
<i>L. lactis</i> RK2	1503 ± 34	100
<i>L. lactis</i> CNC2	1427 ± 40	95
<i>L. lactis</i> CR	Nd	—

^aNd, not detected.

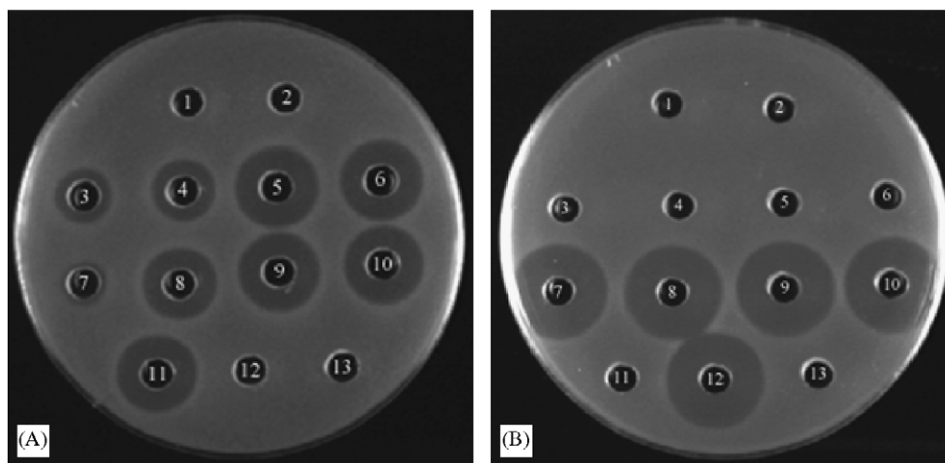


Fig. 1. Agar diffusion bioassay for detection of pediocin PA-1 activity against *Enterococcus faecalis* TAB28 (A) and nisin activity against *L. lactis* MG1614 (B). Samples: 1 and 2, *L. lactis* ESI 153; 3, *L. lactis* CL1; 4, *L. lactis* MC1; 5, *L. lactis* RK1; 6, *L. lactis* CNC1; 7, *L. lactis* CL2; 8, *L. lactis* MC2; 9, *L. lactis* RK2; 10, *L. lactis* CNC2; 11, *P. acidilactici* 347; 12, *L. lactis* BB24; 13, *L. lactis* MG1614.

activity in the supernatants of the ESI 515-derivatives (Nis⁺) carrying pRK119 (1503 BU) or pCNC16 (1427 BU) was lower than that found in the corresponding ESI 153-derivatives (Nis⁻) (2447 and 2478 BU, respectively) (Fig. 1; Table 2). A reduced pediocin production in nisin/pediocin co-producing lactococci strains, in comparison with non-nisin producing *L. lactis* strains, has been previously reported (Horn et al., 1999, 2004; Reviriego et al., 2005). Nevertheless, the level of pediocin production by *L. lactis* RK2 and CNC2 was approximately that observed in the wild strain *P. acidilactici* 347 (Fig. 1; Table 2). To our knowledge, this represents the first report of *L. lactis* strains technologically suited for cheese making with the ability to co-produce pediocin PA-1 and nisin at levels comparable to the respective parental strains (Table 2).

Finally, a DNA fragment carrying the genes required for production of pediocin PA-1 was successfully integrated in the chromosome of *L. lactis* MG1614. However, production of pediocin PA-1 could not be detected in the supernatants of the integrant, probably because of the sharp reduction in the copy number of the *ped* genes (1 per cell). Work is in progress to obtain pediocin-producing *L. lactis* ESI 153 and ESI 515 derivatives suited for dairy applications by the development of food-grade vectors.

4. Conclusions

L. lactis ESI 153 and ESI 515 derivatives carrying P32-*ped* operon-containing plasmids produced more pediocin PA-1 than *L. lactis* CL1 and CL2, in which a strategy based on leader/transporter exchange was used. The enhanced production of pediocin PA-1 in *L. lactis* RK1 and CNC1, and the high coproduction of pediocin PA-1 and nisin in *L. lactis* RK2 and CNC2, makes these new strains very attractive for the control of *L. monocytogenes* and other pathogens in dairy products.

Acknowledgments

We are grateful to M. Medina (INIA, Madrid), W.A. Pool and A.R. Neves (University of Groningen, The Netherlands), and R. Kemperman (University of Groningen, The Netherlands) for providing us with strains ESI 153, ESI 515, LL108O and MG1363RK. Plasmid pTG262 was provided by N. Horn (Institute of Food Research, Norwich, UK) and used under a materials transfer agreement. This work was partially support by grant AGL2002-04609-C02-02 from the Ministerio de Educación y Ciencia (Madrid, Spain).

References

- Buyong, N., Kok, J., & Luchansky, J. B. (1998). Use of genetically enhanced, pediocin-producing starter-culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 4842–4845.
- Chikindas, M. L., Venema, K., Ledebøer, A. M., Venema, G., & Kok, J. (1995). Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. *Letters in Applied Microbiology*, *21*, 183–189.
- Cogan, T. M., Barbosa, M., Buevier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P. S., Fernández, I., et al. (1997). Characterisation of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, *64*, 409–421.
- Gasson, M. J. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic acid streptococci after protoplast-induced curing. *Journal of Bacteriology*, *154*, 1–9.
- Holo, H., Nilssen, Ø., & Nes, I. F. (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: Isolation and characterisation of the protein and its gene. *Journal of Bacteriology*, *173*, 3879–3887.
- Horn, N., Fernández, A., Dodd, H. M., Gasson, M. J., & Rodríguez, J. M. (2004). Nisin-controlled production of pediocin PA-1 and colicin V in nisin- and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*, 5030–5032.
- Horn, N., Martínez, M. I., Martínez, J. M., Hernández, P. E., Gasson, M. J., Rodríguez, J. M., et al. (1998). Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococcin A secretory apparatus. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 818–823.
- Horn, N., Martínez, M. I., Martínez, J. M., Hernández, P. E., Gasson, M. J., Rodríguez, J. M., et al. (1999). Enhanced production of pediocin PA-1, and coproduction of nisin and pediocin PA-1, by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*, 4443–4450.
- Joosten, H. M. L. J., Rodríguez, E., & Nuñez, M. (1997). PCR detection of sequences similar to the AS-48 structural gene in bacteriocin-producing enterococci. *Letters in Applied Microbiology*, *24*, 40–42.
- Leenhouts, K., Bolhuis, A., Venema, G., & Kok, J. (1998). Construction of a food-grade multicopy integration system for *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *49*, 417–423.
- Muriana, P. M. (1996). Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *Journal of Food Protection*, *59S*, 54–63.
- Reviriego, C., Fernandez, A., Horn, N., Rodríguez, E., Marín, M. L., Fernández, L., et al. (2005). Production of pediocin PA-1, and coproduction of nisin A and pediocin PA-1, by wild *Lactococcus lactis* strains of dairy origin. *International Dairy Journal*, *15*, 45–49.
- Rodríguez, E., Gaya, P., Nuñez, M., & Medina, M. (1998). Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *39*, 129–132.
- Rodríguez, J. M., Cintas, L. M., Casaus, P., Horn, N., Dodd, H. M., Hernández, P. E., et al. (1995). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology*, *78*, 109–115.
- Rodríguez, J. M., Cintas, L. M., Casaus, P., Martínez, M. I., Suárez, A., & Hernández, P. E. (1997). Detection of pediocin PA-1 producing pediococci by rapid molecular biology techniques. *Food Microbiology*, *14*, 363–371.
- Wells, J. M., Wilson, P. W., & Le Page, R. W. (1993). Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Bacteriology*, *74*, 629–636.

A Food-Grade System for Production of Pediocin PA-1 in Nisin-Producing and Non-Nisin-Producing *Lactococcus lactis* Strains: Application To Inhibit *Listeria* Growth in a Cheese Model System

C. REVIRIEGO, L. FERNÁNDEZ, AND J. M. RODRÍGUEZ*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

MS 07-026: Received 16 January 2007/Accepted 15 June 2007

ABSTRACT

Food-grade heterologous production of pediocin PA-1 in nisin-producing and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains, previously selected because of their technological properties for cheese making, was achieved. Plasmid pGA1, which contains the complete pediocin operon under the control of the strong P32 promoter and is devoid of any antibiotic marker, was introduced into *L. lactis* ESI 153 and *L. lactis* ESI 515 (Nis⁺). Transformation of *L. lactis* ESI 515 with pGA1 did not affect its ability to produce nisin. The antimicrobial activity of the pediocin-producing transformants on the survival of *Listeria innocua* SA1 during cheese ripening was also investigated. Cheeses were manufactured from milk inoculated with 1% of the lactic culture and with or without approximately 4 log CFU/ml of the *Listeria* strain. *L. lactis* ESI 153, *L. lactis* ESI 515, and their transformants (*L. lactis* GA1 and GA2, respectively) were used as starter cultures. At the end of the ripening period, counts of *L. innocua* in cheeses made with the bacteriocin-producing lactococcal strains were below 50 CFU/g in the *L. lactis* GA1 cheeses and below 25 CFU/g in the *L. lactis* GA2 ones, compared with 3.7 million CFU/g for the controls without nisin or pediocin production.

Listeria monocytogenes represents a major biological hazard in the dairy industry (19) and, among the strategies suggested to avoid or reduce its presence in cheeses, the in situ production of the anti-*Listeria* bacteriocin pediocin PA-1 by wild strains of dairy origin constitutes an attractive research target (30). The potential of bacteriocin-producing wild lactic acid bacteria strains to control *Listeria* growth in different cheese varieties has been demonstrated previously. Nisin-producing lactococcal starters inhibited *L. monocytogenes* in Camembert (17) and *Listeria innocua* in a semihard cheese (26), and similar results have been achieved with bacteriocinogenic starter cultures producing lactacin 3147 (18), lactacin 481 (27), or enterococcal bacteriocins (22).

Direct application of pediocin PA-1-producing pediococci as an anti-*Listeria* tool is constrained by their inability to ferment lactose rapidly, which makes them metabolically and technologically unsuited for dairy fermentations (2). However, the fact that one of the main characteristic features of pediocin PA-1 is their strong activity against *Listeria* species (21) has led to the development of different strategies for the heterologous production of this bacteriocin in lactococci (1, 3, 12–14, 23). Although such attempts have been useful for research purposes, the resulting pediocin-producing lactococci could not be transferred to industries because, often, the selected lactococcal

hosts consisted of laboratory strains that lacked the properties required for food fermentations or because the genetic determinants for pediocin PA-1 biosynthesis were carried in non-food-grade vectors that harbored one or more genes conferring antibiotic resistance.

In a recent study, we found that *Lactococcus lactis* ESI 153 and ESI 515 could be successfully used as hosts for the heterologous production of pediocin PA-1 through the introduction of a plasmid conferring resistance to chloramphenicol (23). In addition, the pediocin-producing recombinant strains led to a significant inhibition of *L. monocytogenes* growth in cheeses without exerting adverse effects on their sensorial properties (25). These two strains were originally isolated from artisanal raw milk cheeses and, later, selected because of their technological properties for cheese making (4), and have been used in several trials as adjuncts and starter cultures in cheese manufacture (9, 25, 26). The achievement of pediocin production in such wild lactococcal hosts cannot be considered a trivial result, because many difficulties are usually found when transferring technology from laboratorial lactococci to industrial strains (15).

In this context, the objective of this study has been the development of a food-grade vector for the heterologous production of pediocin PA-1, its introduction in *L. lactis* ESI 153 and ESI 515, and an evaluation of their usefulness to control the growth of an *L. innocua* strain in experimental cheeses. Because *L. lactis* ESI 515 naturally produces nisin and the combination of pediocin PA-1 and nisin seems

* Author for correspondence. Tel: +34-91-3943837; Fax: +34-91-3943743; E-mail: jmrodrig@vet.ucm.es.

TABLE 1. *Lactococcal strains used in this study*

Host and strain	Plasmid	Reference or source
ESI 153		4
CL1	pFI2160 (Cm ^R , pTG262 derivative, contains the hybrid <i>L-peda</i> gene preceded by the lactococcal A promoters, <i>lcnC</i> and <i>lcnD</i>)	23
MC1	pMC117 (Ery ^R , pMG36e derivative, contains the pediocin operon preceded by the P32 promoter)	24
RK1	pRK119 (Cm ^R , pMG36c derivative, contains the pediocin operon preceded by the P32 promoter)	24
CNC1	pCNC16 (Cm ^R , pTG262 derivative, contains the pediocin operon preceded by the P32 promoter)	24
GA1	pGA1 (pCNC16 derivative, contains the pediocin operon preceded by the P32 promoter; devoid of antibiotic-resistant genes)	This study
ESI 515 (Nis ⁺)		4
CL2	pFI2160	23
MC2	pMC117	24
RK2	pRK119	24
CNC2	pCNC16	24
GA2	pGA1	This study

to inhibit the growth of *L. monocytogenes* and other gram-positive bacteria more efficiently than either of the bacteriocins alone (10, 20), the food-grade coproduction of both bacteriocins by an *L. lactis* ESI 515-derived strain was considered a particularly attractive target in this study.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and culture conditions. Lactococcal strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. The lactococcal host strains *L. lactis* ESI 153 and *L. lactis* ESI 515 (Nis⁺) were isolated from artisanal raw milk cheeses (4). The lactic acid bacteria used in this study were routinely grown in deMan Rogosa Sharpe agar (Oxoid, Basingstoke, UK) at 32°C without agitation. Agar plates were made by the addition of 1.5% (wt/vol) of agar to broth media. When appropriate, chloramphenicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.) was added (5 µg/ml). *L. innocua* SA1 (our own collection) was grown in brain heart infusion broth (Oxoid) and PALCAM agar plates (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at 32°C. Lactic acid bacteria strains were stored at -80°C in deMan Rogosa Sharpe broth containing 15% glycerol (vol/vol).

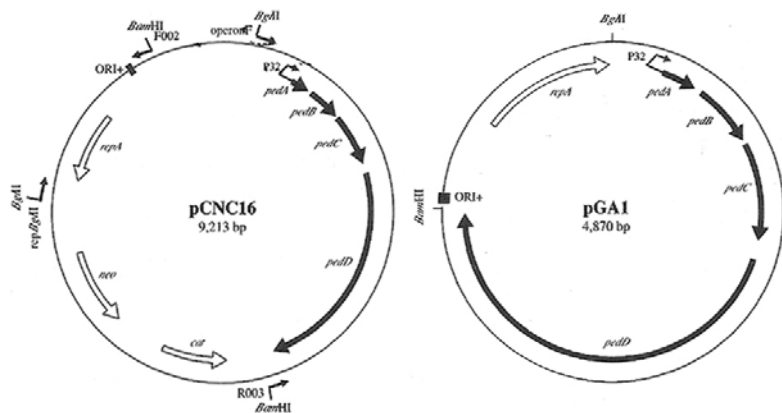
Construction of pGA1 and transformation of *L. lactis* ESI 153 and ESI 515. In a previous study, a DNA fragment containing the pediocin PA-1 operon (*pedABCD*) under the control of the P32 promoter (P32-*pedABCD*) was cloned into the *Bam*HI site of the lactococcal-*E. coli* shuttle vector pTG262 (13), generating pCNC16 (24). In this study, the P32-*pedABCD* fragment (3,658 bp) was amplified from plasmid pCNC16 with primers operonF (5'-CGAAGATCTGATGATAAAGATTAATAGTT-3') and R003 (5'-GCGGATCCCTATTCTTGATTATGAATTAAC-3'), which include *Bgl*III and *Bam*HI sites (underlined), respectively, with the Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Paisley, UK). PCR conditions were as follows: first, one cycle of 95°C for 5 min; then, 35 cycles of 95°C for 45 s, 50°C for 30 s, and 72°C for a time corresponding to 1 min/kb; and finally, an extension step of 72°C for 7 min. Parallel, pCNC16 also served as the template for amplification of a 1,234-bp fragment containing the lactococcal origin of replication and the gene encoding the replication protein RepA with primers F002 (5'-GCGGATCCAATTTGGAATTTGAAAAAATGGG-3') and rep*Bgl*III (5'-CGAAGATCTAAAT

AACTCTTTTCTTTGTTTGTCA-3'), which included *Bam*HI and *Bgl*III sites (underlined), respectively. Both PCR fragments were purified with the Qiaquick Rapid Purification kit (Qiagen, Hilden, Germany), submitted to a double digestion with *Bgl*III and *Bam*HI (New England Biolabs, Ipswich, Mass.) and, finally, ligated with T4 DNA ligase (New England Biolabs) to generate plasmid pGA1 (4,870 bp) (Fig. 1).

Lactococcal strains ESI 153 and ESI 515 were transformed with the recombinant plasmid following the procedure described by Wells et al. (32). Because both strains are naturally resistant to pediocin PA-1 and pGA1 is devoid of marker genes, the selection of recombinant colonies was based on their ability to produce the bacteriocin. For this purpose, electroporation mixtures were seeded on deMan Rogosa Sharpe agar plates, and once the colonies were clearly visible (approximately 24 h), replica plates were performed. Subsequently, 5 ml of soft (0.8%) agar containing approximately 6 log CFU/ml of the indicator strain, *Enterococcus faecalis* TAB 28 (16), was added to one set of replica plates. Plates containing colonies of *L. lactis* ESI 153 and *Pediococcus acidilactici* 347 were used as negative and positive controls, respectively. For routine PCR screening of potential recombinant clones, primers Fintped (5'-TGGGGTAAGGCTACCACTTG-3') and Rintped (5'-GGCGTTTGGTGTATGTTT-3') were used to amplify a 282-bp fragment comprising the end of *pedA* and the beginning of *pedB* with Biotools *Taq* DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) and the PCR program described above (annealing at 59°C). The new strains were called *L. lactis* GA1 (ESI 153 and pGA1) and GA2 (ESI 515 and pGA1).

Bacteriocin assays. Pediocin PA-1 and nisin antimicrobial activities in cultures were assayed by the agar diffusion bioassay described by Dodd et al. (5) with *E. faecalis* TAB28 (pediocin sensitive, nisin resistant) and *L. lactis* MG1614 (pediocin resistant, nisin sensitive (8)) as indicator organisms. *L. lactis* BB24 (28) and *P. acidilactici* 347 (29) were used as positive controls of nisin and pediocin PA-1 production, respectively. The lactococcal strains CL1, MC1, RK1, CNC1, CL2 MC2, RK2, and CNC2, which are other pediocin-producing ESI 153- or ESI 515-derived strains constructed in previous studies (23, 24), were also included for comparison. All the supernatants were obtained from cultures with a bacterial concentration of approximately 9 log CFU/ml.

FIGURE 1. Construction of plasmid pGA1 from pCNC16.



The microtiter plate assay system developed by Holo et al. (11) was employed to quantify the pediocin PA-1 activities present in the culture supernatants of all the strains investigated. One bacteriocin unit was defined as the reciprocal of the highest dilution causing 50% growth inhibition of the indicator organism *E. faecalis* TAB 28, measured as the reduction in culture density (A_{620}). The assays were performed in quadruplicate, and the standard deviation values were calculated. The pediocin PA-1 activity corresponding to the supernatants of the wild-type pediocin-producing strain *P. acidilactici* 347 was considered the 100% value.

Cheese model. Manufacture of cheese was carried essentially as described by Rodríguez et al. (25). Cheeses were made in three trials carried out on different days from pasteurized milk. In each trial, milk at 32°C with 0.01% CaCl_2 was distributed into 11 vats (1.5 liters per vat). Five vats were independently inoculated with 1% of a milk culture ($\sim 9 \log$ CFU/ml) of *L. lactis* ESI 153, *L. lactis* ESI 515, *L. lactis* GA1, *L. lactis* GA2, or *P. acidilactici* 347. Parallel, other five vats were coinoculated with each of the lactic acid bacteria strains as described above and also with *L. innocua* SA1 (final concentration, 4 log CFU/ml). Finally, the remaining vat was inoculated only with *L. innocua* SA1 and served as a control. This strain was selected as indicator to evaluate the anti-*Listeria* activity of the lactic acid bacteria strains because it is nonpathogenic and because preliminary assays showed that its sensitivity to pediocin PA-1 is very similar to that of some pathogenic *L. monocytogenes* strains, such as Scott A (data not shown). Rennet (Naturen Powder, Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark) was added as recommended to milk 20 min after the inoculation of cultures. The curds were cut 40 min after the rennet addition and heated at 38°C for 20 min. Whey was drained off, and curds were distributed into plastic cylindrical molds. One cheese (~ 190 g) was obtained from each vat. Cheeses were pressed for 4 h at room temperature, salted in 15% brine for 45 min, and kept at 20°C for 16 h. Then, cheeses were cut into five pieces, which were individually vacuum packed in Cryovac plastic bags and ripened at 12°C for 4 weeks.

Microbiological analysis. Initially, two samples (2 g) of curd were obtained from each vat before pressing. Later, cheeses were sampled at days 1 (prior vacuum packaging), 7, 14, 21, and 28. *L. innocua* counts were determined in duplicate on PALCAM agar plates (bioMérieux) incubated at 32°C for 48 h. At the end of the ripening period, 50 colonies of *L. innocua* SA1 were recovered from cheeses coinoculated with pediocin-producing lactococci and tested for their sensitivity to pediocin PA-1 with the supernatant of *P. acidilactici* 347 in the agar diffusion test described previously. A random amplified polymorphic DNA assay

with primer Arg Dei (5'-ACCYTRGAAGGYGGYGATGTB-3') was performed as described by Veyrat et al. (31) to confirm the identity of these 50 colonies grown in PALCAM agar plates. Parallel, 25 colonies of *L. lactis* GA1 and 25 of strain GA2 were recovered from the same cheeses and tested for pediocin PA-1 production. Cheese pH was measured in duplicate on the same sampling days with a Crison pH meter (GPL 22, Crison Instruments, Alella, Spain) provided with a Crison electrode (model 52-3,2, Crison). To detect nisin and pediocin PA-1 activities, the cheese extracts were prepared following the procedure of Rodríguez et al. (25). Then, bacteriocin assays were carried as described previously.

Statistical analysis. Microbiological data, recorded as CFU per gram, were transformed to logarithmic values before statistical analysis. Analysis of variance and the Duncan multiple range test were performed to determine significant differences in the logarithm of *Listeria* population densities at each time point by Statgraphics Plus 5.0 software (Manugistics, Inc., Rockville, Md.). Analysis was conducted with a significance level of $P < 0.01$.

RESULTS AND DISCUSSION

Transformation of *L. lactis* ESI 153 and ESI 515 with plasmid pGA1 generated the lactococcal strains GA1 and GA2, respectively. Inhibition of the pediocin-sensitive indicator strain *E. faecalis* TAB 28 by culture supernatants of *L. lactis* GA1 and GA2 was detected by plate diffusion bioassays and compared with that displayed by supernatants of strains CL1, MC1, RK1, CNC1, CL2 MC2, RK2, and CNC2, other pediocin-producing ESI 153- or ESI 515-derived strains constructed in previous studies (Fig. 2). The smallest inhibition zones corresponded to CL1 and CL2 supernatants, whereas those obtained by RK1, RK2, CNC1, and CNC2 displayed the largest halos (Fig. 2). Supernatants from strains MC1, MC2, GA1, and GA2 produced intermediate inhibition zones (Fig. 2). Similar results were obtained with supernatants of strains CL1, MC1, RK1, CNC1, CL2 MC2, RK2, and CNC2 in a previous study (24).

The pediocin activity in the culture supernatants of the different lactococcal strains was also determined by microtiter plate assays (Table 2), and the results were in agreement with those obtained by agar diffusion assays (Fig. 2). Interestingly, the antimicrobial activities of the ESI 153 derivative strains CNC1 (pCNC16) and GA1 (pGA1) supernatants were 165 and 17%, respectively, that found in the

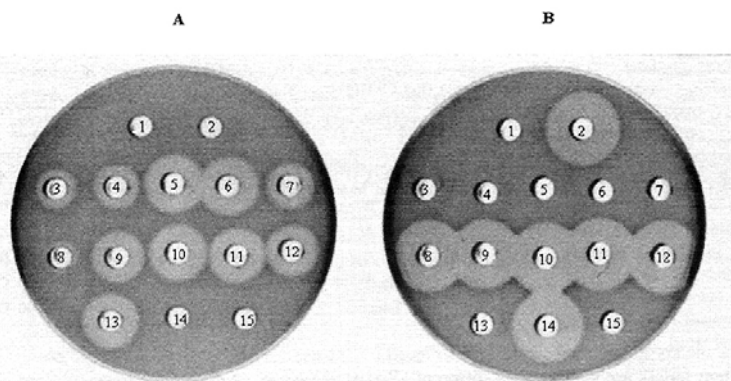


FIGURE 2. Agar diffusion bioassay for detection of pediocin PA-1 activity against *Enterococcus faecalis* TAB 28 (A) and of nisin activity against *L. lactis* MG 1614 (B). Samples: 1, *L. lactis* ESI 153; 2, *L. lactis* ESI 515; 3, *L. lactis* CL1; 4, *L. lactis* MC1; 5, *L. lactis* RK1; 6, *L. lactis* CNC1; 7, *L. lactis* GA1; 8, *L. lactis* CL2; 9, *L. lactis* MC2; 10, *L. lactis* RK2; 11, *L. lactis* CNC2; 12, *L. lactis* GA2; 13, *P. acidilactici* 347; 14, *L. lactis* BB24; 15, *L. lactis* MG 1614.

supernatants of *P. acidilactici* 347. Similarly, those corresponding to the supernatants of the ESI 515-derivative strains CNC2 (pCNC16) and GA2 (pGA1) supernatants were 95 and 35%, respectively, when compared with the pediococcal strain. The new plasmid pGA1 was designed to exclusively contain pTG262 lactococcal sequences and was generated from pCNC16 by ligation of two PCR-derived fragments, which provided the minimal genetic requirements for replication and pediocin production. Therefore, the removal of nonlactococcal sequences from pCNC16 led to an important reduction in pediocin PA-1 production. However, the generation of pGA1 can have practical consequences because, in contrast to pCNC16, it can be considered a food-grade plasmid. In addition, previous studies have shown that the heterologous production of pediocin PA-1 at a level of 10 to 30% that of *P. acidilactici* 347 can notably increase the anti-*Listeria* activity of nisin-producing lactococci (12, 14). In this context, transformation of ESI 515 with pGA1 did not alter the nisin-producing property of the host (Fig. 2), a finding that has

been previously observed after introduction of the genes required for the heterologous production of pediocin PA-1 in lactococci producing this lantibiotic (12, 14, 23). Anti-*Listeria* additive or synergistic effects resulting from the combination of pediocin PA-1 and nisin have been reported previously (10, 20).

Subsequently, the anti-*Listeria* activity of *L. lactis* ESI 153, ESI 515, GA1, and GA2 was tested in cheeses inoculated with *L. innocua* SA1. Values of pH were between 5.08 and 5.69 on day 1 and between 4.51 and 4.67 at the end of the ripening period. Counts of *L. innocua* SA1 in inoculated milk were approximately 4 log CFU/ml. In control cheeses, counts were 7.60 log CFU/g after 1 day and decreased during ripening to 6.57 log CFU/g after 28 days (Table 3). Nonbacteriocinogenic *L. lactis* ESI 153 and nisin-producing *L. lactis* ESI 515 reduced *L. innocua* counts, which, after 28 days, were 4.06 and 4.22 log units lower, respectively, than in control cheese (Table 3). The application of the food-grade pediocin-producing derivatives of *L. lactis* resulted in significantly ($P < 0.01$) higher rates of inactivation of *L. innocua*. The *L. innocua* numbers in cheese made with *L. lactis* GA1 (pediocin producer) and *L. lactis* GA2 (nisin and pediocin producer) were 4.87 and 5.17 log units lower than control cheese at the end of the ripening period. Interestingly, the *Listeria* reduction by strain GA1, which produces only a moderate amount of pediocin PA-1 (17% that of *P. acidilactici* 347), was higher than that achieved by strain ESI 515, a natural nisin-producing strain. This fact reflects the strong anti-*Listeria* activity of pediocin PA-1 (21). Bacteriocin activity in cheeses made with the different strains is shown in Table 4. Nisin activity could be detected throughout ripening in those cheeses inoculated with ESI 515 or GA2, whereas pediocin PA-1 activity was detected only in the extracts obtained from the cheeses inoculated with *L. lactis* GA1 and GA2. The ability of different lactic acid bacteria strains to produce bacteriocins during cheese ripening has been described previously (1, 7, 22, 25).

At the end of the ripening period, 50 *L. innocua* colonies were tested for sensitivity to supernatants of *P. acidilactici* 347, and all of them remained sensitive to pediocin PA-1; their identity to *L. innocua* SA1 was confirmed by the random amplified polymorphic DNA assay (data not

TABLE 2. Pediocin PA-1 activity in the culture supernatants of the strains used in this study

Strain	Pediocin PA-1 activity (BU) ^a	%
<i>P. acidilactici</i> 347	1,500	100
<i>L. lactis</i> ESI 153	ND ^b	—
<i>L. lactis</i> CL1	106	7
<i>L. lactis</i> MC1	225	15
<i>L. lactis</i> RK1	2,447	163
<i>L. lactis</i> CNC1	2,478	165
<i>L. lactis</i> GA1	255	17
<i>L. lactis</i> ESI 515	ND	—
<i>L. lactis</i> CL2	33	2
<i>L. lactis</i> MC2	751	50
<i>L. lactis</i> RK2	1,503	100
<i>L. lactis</i> CNC2	1,427	95
<i>L. lactis</i> GA2	525	35

^a Pediocin PA-1 activity as determined by a microtiter plate assay. One bacteriocin unit (BU) is the reciprocal of the highest dilution causing 50% growth inhibition of the indicator organism *Enterococcus faecalis* TAB 28.

^b ND, not detected.

TABLE 3. Survival of *Listeria innocua* SA1 in cheeses made from milk coinoculated with *L. innocua* SA1 and each of five pediocin-producing or nisin-producing lactic acid bacteria (LAB)

LAB strain	<i>L. innocua</i> (log CFU/g) ^a				
	1 day	7 days	14 days	21 days	28 days
<i>P. acidilactici</i> 347	4.02 ± 0.12 A ^b	3.65 ± 0.07 A	2.69 ± 0.13 A	1.87 ± 0.09 A	1.87 ± 0.05 A
<i>L. lactis</i> ESI 153	4.09 ± 0.11 A	3.78 ± 0.06 AB	3.60 ± 0.04 B	3.54 ± 0.14 B	2.51 ± 0.12 B
<i>L. lactis</i> GA1	4.03 ± 0.07 A	3.30 ± 0.06 C	2.70 ± 0.12 A	1.70 ± 0.05 A	1.70 ± 0.05 A
<i>L. lactis</i> ESI 515	4.17 ± 0.15 A	3.93 ± 0.09 B	3.51 ± 0.06 B	3.14 ± 0.10 C	2.35 ± 0.08 B
<i>L. lactis</i> GA2	3.65 ± 0.12 B	3.32 ± 0.08 C	2.63 ± 0.05 A	1.40 ± 0.05 D	1.40 ± 0.05 C
None	7.60 ± 0.13 C	7.27 ± 0.10 D	7.25 ± 0.14 C	7.04 ± 0.07 E	6.57 ± 0.06 D

^a *L. innocua* SA1 on PALCAM agar. Values are means ± standard deviations ($n = 3$).

^b Means in the same column followed by different letters are significantly different ($P < 0.01$).

shown). In addition, 25 colonies of strain GA1 and 25 of GA2 were isolated at the end of ripening, and all of them kept their pediocin production ability. Therefore, resistance to this bacteriocin and instability of the bacteriocinogenicity cannot explain the presence of the surviving *Listeria* in the lactic acid bacteria-inoculated cheeses. Probably, the *L. innocua* inoculum was too high, and there were not enough bacteriocin molecules available to completely inactivate the pathogen. Previously, Ennahar et al. (6) observed that the amount of pediocin PA-1 produced by *Lactobacillus plantarum* WHE92 in Munster cheese crust was insufficient to eliminate high numbers of *L. monocytogenes*, but at levels below 2 log CFU/g, the bacteriocin inactivated completely the pathogen.

In the past, pediocin PA-1 production by *L. lactis* strains has been generally achieved with well-characterized laboratory strains as hosts (3, 12–14); however, such lactococcal hosts are not suited for application in the dairy industry, because they are proteinase negative, lactose negative, or unable for adequate growth and acid production in milk. Although genetic manipulation of wild dairy lactococci is more difficult than that of laboratory strains, Buyong et al. (1) transformed *L. lactis* MM210, a starter strain used in Cheddar cheese manufacture, with pMC117, a plasmid containing the pediocin operon, under the control of the lactococcal promoter P32. These authors tested the anti-*Listeria* activity of the recombinant strain in Cheddar cheese and showed a 3-log reduction in the counts of a mixture of three *L. monocytogenes* strains within 3 months of ripening. More recently, heterologous pediocin PA-1

production was achieved in *L. lactis* ESI 153 and ESI 515, two strains previously selected because of their technological properties for cheese making (4), through a strategy based on exchange of the leader and transporter system of the bacteriocin lactococcin A (23). Later, their antimicrobial activity against *L. monocytogenes* was confirmed in experimental cheeses (25). However, such recombinant strains cannot be considered safe for food production because they carry plasmids with undesirable features, such as the presence of genes conferring antibiotic resistances. In contrast, *L. lactis* GA1 and GA2, the two new strains developed in this study, harbor a plasmid that exclusively contains lactococcal sequences and that is devoid of antibiotic resistance markers. Obviously, these strains are genetically modified organisms, and their industrial application should follow the corresponding regulatory requirements. Research is in progress to evaluate the potential of the culture supernatants of the recombinant strains for use as fermentates for protection against *Listeria* in ready-to-eat foods.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Drs. M. Medina and E. Rodríguez (Instituto Nacional de Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid, Spain) for providing us with strains ESI 153, ESI 515, and TAB 28. Derivatives of pTG262 are used under a materials transfer agreement (Dr. M. Gasson, Institute of Food Research, Norwich, UK). This study was partially supported by grant AGL2002-04609-C02-02 from the Ministerio de Educación y Ciencia (Madrid, Spain).

REFERENCES

- Buyong, N., J. Kok, and J. B. Luchansky. 1998. Use of genetically enhanced, pediocin-producing starter-culture, *Lactococcus lactis*

TABLE 4. Bacteriocin activity in cheese manufactured with different lactococci

Strain	Bacteriocin	Bacteriocin activity (mm) ^a							
		<i>L. lactis</i> MG 1614				<i>E. faecalis</i> TAB 28			
		7 days	14 days	21 days	28 days	7 days	14 days	21 days	28 days
<i>L. lactis</i> ESI 153	—	ND ^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>L. lactis</i> GA1	Pediocin	ND	ND	ND	ND	7	9	9	8
<i>L. lactis</i> ESI 515	Nisin	13	14	15	14	ND	ND	ND	ND
<i>L. lactis</i> GA2	Nisin, pediocin	15	17	18	17	ND	6	7	7

^a Bacteriocin activity (halo diameter in millimeters) as determined by an agar diffusion bioassay with *Lactococcus lactis* MG1614 (nisin sensitive) and *Enterococcus faecalis* TAB 28 (pediocin sensitive) as the indicator microorganisms.

^b ND, not detected.

- subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4842–4845.
- Caldwell, S. L., D. J. McMahon, C. J. Oberg, and J. R. Broadbent. 1996. Development and characterization of lactose-positive *Pediococcus* species for milk fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:936–941.
 - Chikindas, M. L., K. Venema, A. M. Ledebøer, G. Venema, and J. Kok. 1995. Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. *Lett. Appl. Microbiol.* 21:183–189.
 - Cogan, T. M., M. Barbosa, E. Buevier, B. Bianchi-Salvadori, P. S. Cocconcelli, I. Fernández, M. J. Gómez, R. Gómez, G. Kalantzopoulos, A. Ledda, M. Medina, and M. E. Rodríguez. 1997. Characterisation of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64:409–421.
 - Dodd, H. M., N. Horn, H. Zhang, and M. J. Gasson. 1992. A lactococcal expression system for engineered nisins. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3683–3693.
 - Ennahar, S., O. Assobhei, and C. Hasselmann. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *J. Food Prot.* 61:186–191.
 - Foulquié-Moreno, M. R., M. C. Rea, T. M. Cogan, and L. De Vuyst. 2002. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 81:73–84.
 - Gasson, M. J. 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic acid streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154:1–9.
 - Gómez, M. J., E. Rodríguez, P. Gaya, M. Nuñez, and M. Medina. 1999. Characteristics of Manchego cheese manufactured from raw and pasteurized ovine milk and with defined-strain or commercial mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Sci.* 82:2300–2307.
 - Hanlin, M. B., N. Kalchayanand, P. Ray, and B. Ray. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *J. Food Prot.* 56:252–255.
 - Holo, H., Ø. Nilssen, and I. F. Nes. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterisation of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173:3879–3887.
 - Horn, N., A. Fernández, H. M. Dodd, M. J. Gasson, and J. M. Rodríguez. 2004. Nisin-controlled production of pediocin PA-1 and colicin V in nisin- and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5030–5032.
 - Horn, N., M. I. Martínez, J. M. Martínez, P. E. Hernández, M. J. Gasson, J. M. Rodríguez, and H. M. Dodd. 1998. Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococcin A secretory apparatus. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:818–823.
 - Horn, N., M. I. Martínez, J. M. Martínez, P. E. Hernández, M. J. Gasson, J. M. Rodríguez, and H. M. Dodd. 1999. Enhanced production of pediocin PA-1, and coproduction of nisin and pediocin PA-1, by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4443–4450.
 - Johansen, E. 2003. Challenges when transferring technology from *Lactococcus* laboratory strains to industrial strains. *Gen. Mol. Res.* 2:112–116.
 - Joosten, H. M. L. J., E. Rodríguez, and M. Nuñez. 1997. PCR detection of sequences similar to the AS-48 structural gene in bacteriocin-producing enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.* 24:40–42.
 - Maisnier-Patin, S., S. N. Deschamps, S. R. Tatini, and J. Richard. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait* 72:249–263.
 - McAuliffe, O., C. Hill, and P. Ross. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture. *J. Appl. Microbiol.* 86:251–256.
 - McLauchlin, J., R. T. Mitchell, W. J. Smerdon, and K. Jewel. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol.* 92:15–33.
 - Mulet-Powel, N., A. M. Lacoste-Armynot, M. Viñas, and M. S. Siméon de Buochberg. 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.* 59S:54–63.
 - Núñez, M., J. L. Rodríguez, E. García, P. Gaya, and M. Medina. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *J. Appl. Microbiol.* 83:671–677.
 - Reviriego, C., A. Fernández, N. Horn, E. Rodríguez, M. L. Marín, L. Fernández, and J. M. Rodríguez. 2005. Production of pediocin PA-1, and coproduction of nisin A and pediocin PA-1, by wild *Lactococcus lactis* strains of dairy origin. *Int. Dairy J.* 15:45–49.
 - Reviriego, C., L. Fernández, O. P. Kuipers, J. Kok, and J. M. Rodríguez. 2007. Enhanced production of pediocin PA-1 in wild nisin- and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains of dairy origin. *Int. Dairy J.* 17:574–577.
 - Rodríguez, E., J. L. Arqués, P. Gaya, M. Nuñez, and M. Medina. 2001. Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocins and monitoring of bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization in semi-hard raw milk cheese. *J. Dairy Res.* 68:131–137.
 - Rodríguez, E., J. Calzada, J. L. Arqués, J. M. Rodríguez, M. Nuñez, and M. Medina. 2005. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *E. coli* O157:H7 in cheese. *Int. Dairy J.* 15:51–57.
 - Rodríguez, E., P. Gaya, M. Nuñez, and M. Medina. 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., L. M. Cintas, P. Casaus, N. Horn, H. M. Dodd, P. E. Hernández, and M. J. Gasson. 1995. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* 78:109–115.
 - Rodríguez, J. M., L. M. Cintas, P. Casaus, M. I. Martínez, A. Suárez, and P. E. Hernández. 1997. Detection of pediocin PA-1 producing pediococci by rapid molecular biology techniques. *Food Microbiol.* 14:363–371.
 - Rodríguez, J. M., M. I. Martínez, N. Horn, and H. M. Dodd. 2003. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 80:101–116.
 - Veyrat, A., M. C. Miralles, and G. Perez-Martínez. 1999. A fast method for monitoring the colonization rate of lactobacilli in a meat model system. *J. Appl. Microbiol.* 87:49–61.
 - Wells, J. M., P. W. Wilson, and R. W. Le Page. 1993. Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol.* 74:629–636.

HUMAN MILK IS A SOURCE OF LACTIC ACID BACTERIA FOR THE INFANT GUT

ROCÍO MARTÍN, MSc, SUSANA LANGA, MSc, CARLOTA REVIRIEGO, MSc, ESTHER JIMÉNEZ, MSc, MARÍA L. MARÍN, PhD, JORDI XAUS, PhD, LEONIDES FERNÁNDEZ, PhD, AND JUAN M. RODRÍGUEZ, PhD

Objectives To investigate whether human breast milk contains potentially probiotic lactic acid bacteria, and therefore, whether it can be considered a synbiotic food.

Study design Lactic acid bacteria were isolated from milk, mammary areola, and breast skin of eight healthy mothers and oral swabs and feces of their respective breast-fed infants. Some isolates (178 from each mother and newborn pair) were randomly selected and submitted to randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) polymerase chain reaction analysis, and those that displayed identical RAPD patterns were identified by 16S rDNA sequencing.

Results Within each mother and newborn pair, some rod-shaped lactic acid bacteria isolated from mammary areola, breast milk, and infant oral swabs and feces displayed identical RAPD profiles. All of them, independently from the mother and child pair, were identified as *Lactobacillus gasseri*. Similarly, among coccoid lactic acid bacteria from these different sources, some shared an identical RAPD pattern and were identified as *Enterococcus faecium*. In contrast, none of the lactic acid bacteria isolated from breast skin shared RAPD profiles with lactic acid bacteria of the other sources.

Conclusions Breast-feeding can be a significant source of lactic acid bacteria to the infant gut. Lactic acid bacteria present in milk may have an endogenous origin and may not be the result of contamination from the surrounding breast skin. (*J Pediatr* 2003;143:754-8)

Breast-feeding protects the newborn against infectious diseases.¹⁻³ This effect is probably a result of the combined action of breast milk components, such as maternal immunoglobulins, immunocompetent cells, or a variety of antimicrobial compounds.⁴ Breast milk also contains prebiotic substances, the so-called *bifidogenic factors*, which may selectively stimulate the growth of a limited number of beneficial bacteria in the gut.⁵⁻⁷ Although modern infant formulas are made to mimic human breast milk, they remain different from the natural biological fluid.⁸ As a consequence, differences in the gut microflora between breast-fed and formula-fed infants have been repeatedly observed.⁹⁻¹⁴

Studies on the microbiology of breast milk have been restricted to potential pathogenic bacteria, mainly related to clinical cases of mastitis. There is a surprising lack of studies on the isolation and analysis of commensal or potential probiotic bacteria from milk of healthy women. Neonates are particularly susceptible to infectious diseases.¹⁵ If bacteria with the ability to confer health benefits to human hosts were isolated from breast milk, they would be considered attractive probiotic organisms. These bacteria would fulfill some of the main criteria generally recommended for human probiotics,^{16,17} such as human origin; a history of safe, prolonged intake by infants; and adaptation to dairy substrates.

In the current study, we investigated the presence of lactic acid bacteria in breast milk of healthy women, which may affect the qualitative and quantitative composition of the neonate gut microflora. Lactic acid bacteria can be isolated from the neonatal gut.¹⁰⁻¹⁸ To elucidate the origin of such bacteria, we also isolated lactic acid bacteria from mammary areola and breast skin. In addition, lactic acid bacteria were isolated from infant feces and

From the Department of Nutrición y Bromatología III, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, and the Department de Immunology, Puleva Biotech, Granada, Spain.

Supported in part by a grant from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain, and by a grant from Puleva Biotech, Granada, Spain.

Submitted for publication Apr 28, 2003; revision received July 31, 2003; accepted Sept 9, 2003.

Reprint requests: Juan M. Rodríguez, PhD, Departamento de Nutrición y Bromatología III, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. E-mail: jmrodrig@vet.ucm.es.

Copyright © 2003 Mosby, Inc. All rights reserved.

0022-3476/2003/\$30.00 + 0

10.1016/j.jpeds.2003.09.028

KAA	Kanamycin aesculin azide	RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
PCR	Polymerase chain reaction	VRBA	Violet red bile agar

oral swabs to evaluate whether breast-feeding may play a role in bacterial colonization of the infant digestive tract.

METHODS

Written informed consent was obtained from the women and the parents of the children who provided the biological samples used in this study. The protocol was approved by the Ethical Committee of University Complutense of Madrid, Spain.

The volunteer mothers belonged to the staff of our university and were recruited among mothers who attended one of the two collaborating hospitals during their pregnancy and labor. They were enrolled in this study according with the following criteria: (1) healthy women without current or past underlying conditions; (2) normal, full-term pregnancy; and (3) absence of infant or maternal perinatal problems (including mastitis). The eight healthy pregnant women and their full-term breast-fed infants (seven vaginally delivered and one born by cesarian section) provided a wide variety of aseptically collected samples, including breast milk; swabs obtained from mammary areola, breast skin, and vagina of the mother; and infant feces and oral swabs. All the samples were collected by duplicate on the fourth day postpartum. To assure the quality of sample collection from mothers and infants, a team was formed in each hospital, which included a senior obstetrician and gynecologist, a senior pediatrician, and a senior microbiologist. The samples were collected in sterile tubes and stored on ice until delivery to the laboratory. The samples were processed 15 to 20 minutes after collection. Once diluted in sterile peptone water (when required), the samples were cultured in triplicate on de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS, Oxoid, Basingstoke, UK) and kanamycin aesculin azide (KAA; Oxoid) agar plates for isolation of lactic acid bacteria, and also in violet red bile agar (VRBA; Difco, Detroit, Mich) and Nutrient agar (Oxoid) plates for isolation of other bacterial groups, including Gram-negative bacteria. The plates were anaerobically incubated at 37°C for as long as 48 hours. Approximately 300 isolates from each mother and child pair were examined by phase-contrast microscopy to determine cell morphology and Gram-staining reaction, and were tested for oxidase and catalase activities. Subsequently, 78 rod-shaped and 100 coccoid-shaped isolates (per each mother and child pair) were randomly selected for further studies, as follows: 44 from breast milk (22 rods, 22 cocci), 50 from mammary areola swabs (25 rods, 25 cocci), 24 from breast skin swabs (four rods, 20 cocci), 38 from infant feces (19 rods, 19 cocci), and 14 from infant oral swabs (eight rods, 14 cocci). The rod-shaped bacteria were isolated among the colonies that grew on MRS plates, whereas the coccoid isolates were obtained from those growing on KAA plates.

The 178 isolates from each mother and child pair were divided into two independent groups on the basis of their morphology (100 cocci and 78 rods) and submitted to randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) polymerase chain reaction (PCR) analysis. Genomic DNA was isolated from 10 mL overnight MRS cultures by using the DNeasy

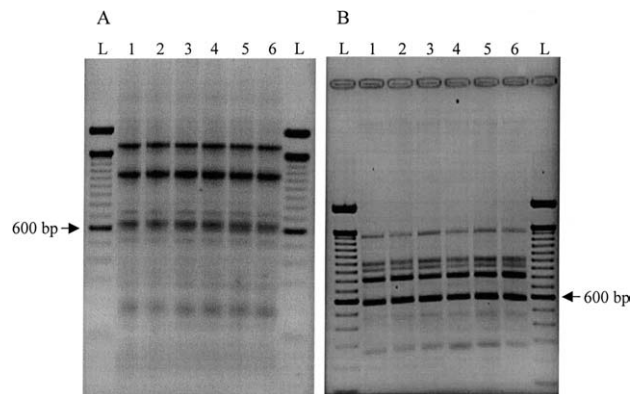


Figure. RAPD-PCR profiles obtained (A) with primer OPL5 from *L. gasseri* isolated from breast milk (lanes 1 and 2), mammary areola (lanes 3 and 4), infant feces (lane 5), and infant oral swabs (lane 6); and (B) with the primer pair E₁-E₂ from *E. faecium* isolated from breast milk (lanes 1 and 2), mammary areola (lanes 3 and 4), infant feces (lane 5), and infant oral swabs (lane 6). L represents the standard 100-bp ladder (Invitrogen, Paisley, UK).

tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the protocol recommended by the supplier for isolation of genomic DNA from Gram-positive bacteria. The DNA was used in subsequent PCR amplifications performed in Techne DNA Thermal Cyclers (Techne, Cambridge, UK). In the case of the rod-shaped isolates, PCR amplifications were performed as described by Veyrat et al¹⁹ by using either primer OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3'), ISSRev (5'-GGATCCAAGCAACGTTTCAA-3'), or ArgDei (5'-ACCYTRGAA-GGYGGYGATGTB-3'). In the case of the coccoid-shaped isolates, PCR reactions were performed following the procedure described by Knijff et al²⁰ using the primer pair A₁ (5'-GGGAAAACGACAATTGC-3') and A₂ (5'-GTA-CAATGCGGCCGTTA-3'). A total of 5 µL of the PCR mixtures was analyzed on a 1.2% (wt/vol) agarose (Sigma, St Louis, Mo) gel with ethidium bromide staining. A 100-bp ladder (Invitrogen, Paisley, UK) was used as a molecular weight standard. Gels were run for approximately 1 hour at 100 V, and the DNA was visualized and analyzed in a gel documentation system (Gel Doc 2000, Bio-Rad) by using the Diversity Database software package (Bio-Rad, Hercules, Calif).

Identification of the rod-shaped isolates that displayed identical RAPDs profiles with the three primers tested was performed by 16S rDNA sequencing at three independent laboratories: Department of Product Functionality, NIZO Food Research, Ede, The Netherlands; BCCM/LMG Bacteria Collection, University of Gent, Gent, Belgium; and Department of Food Safety, BBSRC Institute of Food Research, Norwich, United Kingdom. Identification of the coccoid-shaped isolates that shared the same RAPD pattern and that grew well on KAA agar plates was based on PCR species-specific detection of enterococcal *ddl* genes, which encode D-alanine:D-alanine ligases, following the protocol described by Dutka-Malen et al.²¹ For this purpose, four primers were used: E₁ (5'-ATCAAGTACAGTTAGTCTT-3'),

Table I. *L. gasseri* isolates that shared identical RAPD profiles

Mother and infant pair	No. identical isolates (% of MRS isolates tested)*							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Maternal samples								
Breast milk	5 (23)	7 (32)	8 (36)	6 (27)	4 (19)	5 (23)	9 (40)	4 (19)
Mammary areola	13 (52)	16 (64)	16 (64)	14 (56)	14 (56)	12 (48)	17 (68)	11 (44)
Breast skin	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Vaginal swab	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Infant samples								
Feces	6 (32)	7 (37)	8 (42)	5 (27)	5 (27)	7 (37)	9 (47)	5 (27)
Oral swab	2 (25)	6 (75)	5 (62)	3 (37)	2 (25)	2 (25)	6 (75)	1 (12)

*Identical isolate means that, within each mother and infant pair, all the isolates included in the table shared identical RAPD profiles, independently from their origin.

E_2 (5'-ACGATTCAAAGCTAACTG-3'), F_1 (5'-GCA-AGGCTTCTTAGAGA-3'), and F_2 (5'-CATCGT-GTAAGCTAACTTC-3'). The first pair (E_1 and E_2) specifically detects *Enterococcus faecium* strains, whereas the second (F_1 and F_2) is specific for *Enterococcus faecalis*.²¹ PCR results were confirmed by 16S rDNA sequencing.

RESULTS

Breast milk samples were collected from eight healthy women and inoculated on MRS, KAA, VRBA, and Nutrient agar plates. By using the first three media, lactic acid bacteria were isolated from all the samples, and the counts ranged from 2×10^4 to 1×10^5 cfu mL⁻¹, depending on the woman. No growth was obtained on VRBA agar plates, and no Gram-negative bacteria could be detected on Nutrient agar. Lactic acid bacteria were also isolated from maternal mammary areola (4×10^3 to 1×10^4 cfu per swab), breast skin (<20 cfu per swab), and vagina (1×10^3 to 5×10^3 cfu per swab), and from infant feces (6×10^7 to 4×10^8 cfu g⁻¹) and oral swabs (1×10^3 to 3×10^3 cfu per swab). Approximately 300 lactic acid bacteria from different biological samples provided by each mother and newborn pair by using MRS (pH 5.5) and KAA agar plates were initially isolated. The isolates were examined by phase-contrast microscopy to determine cell morphology and Gram-staining reaction, and were tested for oxidase and catalase activities. All the isolates were Gram-positive, catalase-negative, and oxidase-negative rods or cocci. Then, 78 rod-shaped and 100 coccoid-shaped isolates (from each mother and newborn pair) were randomly selected.

The RAPD-PCR analyses created a vast amount of data; therefore, only the most significant results are commented on. Within each mother and child pair, the 78 rod-shaped and 100 coccoid-shaped isolates showed a large variety of RAPD-PCR patterns. However, some rod-shaped lactic acid bacteria isolated from breast milk, mammary areola, infant feces, and infant oral swabs had identical RAPD profiles with the three primers tested (Table I, Figure, A). For

example, in the case of the mother and newborn pair B (as a representative example of all the pairs), seven breast milk isolates, 16 mammary areola isolates, seven infant feces isolates, and six infant oral swabs isolates displayed identical RAPD patterns (Table I). All these isolates were identified as *Lactobacillus gasseri*. Among the rod-shaped lactic acid bacteria isolated from breast milk that did not share identical RAPD profiles, one additional isolate was identified as *Lactobacillus fermentum*. The 16S rDNA sequencing results obtained by the different labs were completely coincident.

Similar results were obtained with the coccoid-shaped lactic acid bacteria. In the case of pair B, two isolates from breast milk, three from mammary areola, two from infant feces, and three from infant oral swabs showed identical RAPD profiles with the primer pair tested (Table II, Figure, B). These isolates were identified by species-specific PCR as *E. faecium*; this result was further confirmed by 16S rDNA sequencing. Among the cocci that did not have the same RAPD profiles, three additional breast milk isolates were randomly selected and identified as *E. faecium*. None of the breast skin and vaginal isolates displayed a RAPD pattern identical to any of those obtained with isolates from the other sources (data not shown).

DISCUSSION

We investigated the presence of lactic acid bacteria in human breast milk. From the approximately 300 isolates that were initially isolated from the different sources provided by each mother and newborn pair, 178 lactic acid bacteria were further selected, divided in two groups (78 rod-shaped and 100 coccoid-shaped isolates), and used for RAPD analyses. The primers used for RAPD analyses were selected because they are designed to provide a high variability of patterns in lactobacilli (primers OPL5, ArgDei, and ISSRev)¹⁹ and enterococci (primer pair A₁ and A₂).²⁰ However, within the different mother and newborn pairs, some rod-shaped isolates displayed the same RAPD profiles with the three independent primers, despite the fact that they had been isolated from

Table II. *E. faecium* isolates that shared identical RAPD profiles

Mother and infant pair	No. identical isolates (% of KAA isolates tested)*							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Maternal samples								
Breast milk	2 (9)	2 (9)	4 (18)	3 (14)	2 (9)	4 (18)	5 (23)	2 (9)
Mammary areola	3 (12)	3 (12)	6 (24)	4 (16)	4 (16)	4 (16)	7 (28)	2 (8)
Breast skin	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Vaginal swab	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Infant samples								
Feces	2 (11)	2 (11)	5 (26)	3 (16)	3 (16)	4 (21)	5 (26)	2 (11)
Oral swab	2 (14)	3 (21)	2 (14)	1 (7)	0 (0)	2 (14)	5 (36)	1 (7)

*Identical isolate means that, within each mother and infant pair, all the isolates included in the table shared identical RAPD profiles, independent from their origin.

different maternal and infant sources (excluding maternal breast skin and vagina; Figure, A); similarly, some coccoid isolates showed an identical RAPD pattern using the primer pair A₁ and A₂ (Figure, B). All these 36 rod-shaped and 14 coccoid-shaped isolates were identified as *L. gasseri* and *E. faecium*, respectively.

Among the lactic acid bacteria isolated from breast milk two species clearly predominated: *L. gasseri* and *E. faecium*. These species are considered among the probiotic bacteria^{16,17} and contain strains that are used in commercial probiotic products. Although enterococci are traditionally associated with food fermentations, and strains with histories of safe use are being commercially used, their use as probiotics requires careful safety evaluation, because both expressed and silent virulence genes have been identified among enterococcal strains.²² The *E. faecium* isolated from breast milk in this study were tested for the virulence determinants proposed by Eaton and Gasson,²² and none of them could be detected (unpublished data). Therefore, the breast milk of healthy woman can be considered a source of safe and potentially probiotic lactic acid bacteria that may play an important role in the prevention of neonatal infectious diseases. It is not surprising that all the lactobacilli that shared the same RAPD profile were identified as *L. gasseri*, independently from their origin, because this particular species can be regarded as a general mucosa-associated bacterium in human beings.²³ The presence of a few predominant bacterial species, such as *L. gasseri* and *E. faecium*, in breast milk may be one of the reasons why the gut microbiota of breast-fed infants is composed of a relatively narrow spectrum of Gram-positive bacterial species, and a more diverse microbiota develops only after dietary supplementation commences.¹⁰ As previously observed by different authors,^{6,9,10,12,13} the composition of the gut microflora is profoundly influenced by the diet of the infant, and the introduction of solid food and the withdrawal of breast milk coincide with major microbiota changes.¹⁰

None of the few lactic acid bacteria isolated from breast skin shared RAPD profiles with lactic acid bacteria isolated from breast milk or mammary areola (data not shown), which suggests that most breast milk lactic acid bacteria have an

endogenous origin and that cross-contamination with skin bacteria has, if any, a secondary role as a lactic acid bacteria source for the infant gut. Lactic acid bacteria present in colostrum and breast milk probably form a biofilm on the mammary areola, inside the mammary duct system, or both. The mammary gland prepares for lactation through a series of developmental steps during adolescence and pregnancy. The principal feature of mammary growth in pregnancy is a great increase in ducts and alveoli. Late in pregnancy, the lobules of the alveolar system are maximally developed, and small amounts of colostrum may be released for several weeks before delivery. In addition, the nipple and areola markedly enlarge, and the sebaceous glands become more prominent.⁸ These changes provide good conditions for biofilm formation. The increased lymph and blood supply of the mammary gland and the oxytocin release that causes contraction of the myo-epithelial cells that invest the mammary alveoli may also facilitate the presence of lactic acid bacteria in breast milk.⁸

None of the vaginal isolates tested shared RAPD profiles with lactic acid bacteria isolated from other sources of the same mother and infant pair; in addition, no remarkable differences were found between the results obtained from samples of the vaginally delivered infants and those obtained from the cesarean-born one (pair D; Tables I and II). Both observations give rise to questions on the role of vaginal flora in the early bacterial colonization of the newborn intestinal tract, and this subject should be addressed in future studies.

In conclusion, the results of this work indicate that breast milk contains lactic acid bacteria, is a natural source of lactic acid bacteria for the newborn through breast-feeding, and may be considered a synbiotic food. Pulsed-field gel electrophoresis profiling of the strains displaying identical RAPD patterns is in progress, and the preliminary results reinforce our findings. Work is in progress to elucidate the composition, origin, and significance of the neonatal gut microbiota and its relationships with the bacteria isolated from breast milk by using more powerful molecular techniques such as those based on 16S rRNA genes. In addition, we are also studying the probiotic potential of some of the lactic acid bacteria isolated from breast milk.

REFERENCES

1. Lopez-Alarcon M, Villalpando S, Fajardo A. Breast-feeding lowers the frequency and duration of acute respiratory infection and diarrhea in infants under six months of age. *J Nutr* 1997;127:436-43.
2. Malaty HM, Logan ND, Graham DY, Ramchatesingh JE. *Helicobacter pylori* infection in preschool and school-aged minority children: effect of socioeconomic indicators and breast-feeding practices. *Clin Infect Dis* 2001;32:1387-92.
3. Wright AL, Bauer M, Naylor A, Sutcliffe E, Clark L. Increasing breastfeeding rates to reduce infant illness at the community level. *Pediatrics* 1998;101:837-44.
4. Saavedra JM. Probiotic agents: clinical applications in infants and children. In: R  ih   NCR, Rubaltelli FF, editors. *Infant formula: closer to the reference*. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p. 15-27.
5. Dai D, Walker WA. Protective nutrients and bacterial colonization in the immature human gut. *Adv Pediatr* 1999;46:353-82.
6. Drasar BS, Roberts AK. Control of the large bowel microflora. In: Hill MJ, Marsh PD, editors. *Human microbial ecology*. Boca Raton: CRC Press (FL); 1990. p. 87-111.
7. McKellar RC, M  ddler HW. Metabolism of fructoligosaccharides by *Bifidobacterium* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 1989;31:537-41.
8. Beischer NA, Mackay EV, Colditz PB. *Obstetrics and the newborn*. Philadelphia (PA): WB Saunders Co; 1997.
9. Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol* 1984;28:975-86.
10. Favier CF, Vaughan EE, de Vos WM, Akkermans ADL. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:219-26.
11. Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo ACM, Raangs GC, Wagendorp AA, Klein N, Bondels JG, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:61-7.
12. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999;69:1035S-45S.
13. Simhon A, Douglas JR, Drasar BS, Soothill JF. Effect of feeding on infants' faecal flora. *Arch Dis Child* 1982;57:54-8.
14. Yoshioka H, Iseki K, Fugita K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics* 1983;72:317-21.
15. Morris JG, Potter M. Emergence of new pathogens as a function of changes in host susceptibility. *Emerg Infect Dis* 1997;3:435-41.
16. Collins JK, Thornton G, Sullivan GO. Selection of probiotic strains for human applications. *Int Dairy J* 1998;8:487-90.
17. Holzapfel W, Haberer P, Snell J, Schillinger U, Huis in't Veld J. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998;41:85-101.
18. Hall MA, Cole CB, Smith SL, Fuller R, Rolles CJ. Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Arch Dis Child* 1990; 64:185-8.
19. Veyrat A, Miralles MC, Pérez-Martínez G. A fast method for monitoring the colonization rate of lactobacilli in a meat model system. *J Appl Microbiol* 1999;87:49-61.
20. Knijff E, Dellaglio F, Lombardi A, Biesterveld S, Torriani S. Development of the Specific and Random Amplification (SARA)-PCR for both species identification of enterococci and detection of the *vanA* gene. *J Microbiol Methods* 2001;43:233-9.
21. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:24-7.
22. Eaton T, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:1628-35.
23. Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans ADL, de Vos WM. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol* 2002;68: 3401-7.

Screening of Virulence Determinants in *Enterococcus faecium* Strains Isolated From Breast Milk

Carlota Reviriego, MSc, Tracy Eaton, PhD, Rocío Martín, MSc, Esther Jiménez, MSc, Leónides Fernández, PhD, Michael J. Gasson, PhD, and Juan M. Rodríguez, PhD

Abstract

In a previous study, the authors isolated lactic acid bacteria from breast milk of healthy mothers. Since some of the identified isolates belonged to the species *Enterococcus faecium*, the objective of this work was to evaluate their safety. The enterococcal strains were screened by polymerase chain reaction (PCR) and Southern hybridization for the presence of virulence determinants. The potential of the strains to acquire plasmids by conjugation was investigated by screening for genes involved in conjugation processes. Parallel, phenotypic assays were performed. Presence of genes conferring resistance to vancomycin was assessed by PCR. PCR amplifications and Southern hybridizations revealed that all the strains were clear of the majority of potential virulence determinants. None of the strains showed gelatinase activity, hemolysin production, or aggregation phenotype, and none carried the *vanA* or *vanB* genes. These findings suggest that milk of healthy mothers may be a source of avirulent *E faecium* isolates to the newborns. *J Hum Lact.* 21(2):131-137.

Keywords: *Enterococcus faecium*, breast milk, virulence genes, safety

The knowledge of the commensal and/or potential probiotic bacteria that exist in milk of healthy women is very limited, but bacteria commonly isolated from this substrate include a relatively narrow spectrum of gram-positive bacteria, such as staphylococci, streptococci,

micrococci, lactobacilli, and enterococci.¹⁻⁴ Bacteria belonging to such genera can be easily isolated in fresh breast milk of healthy women from different countries, suggesting that they are components of the natural microbiota of this biological fluid.⁵⁻⁷ Once in the infant gut, such bacteria may contribute to the protective effect that breastfeeding confers against infectious diseases.^{8,9}

In a previous study,³ we isolated a variety of lactic acid bacteria from human milk and found that *Enterococcus faecium* was one of the predominant species since it was isolated from the samples provided by 9 of the 10 women included in the study at a relatively high level ($>10^3$ cfu ml⁻¹). The randomly selected enterococcal isolates (approximately 200) could be grouped into 7 different genotypes by randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis profiling. Enterococci form an essential part of the autochthonous microflora of humans, with *E faecium* and *Enterococcus faecalis* being the most common species in the human gastrointestinal tract.^{10,11} Traditionally, the isolation of these species in foods has been used as an indica-

Received for review, June 24, 2004; revised manuscript accepted for publication, October 14, 2004.

Carlota Reviriego, Rocío Martín, and Esther Jiménez are PhD students and Leónides Fernández and Juan M. Rodríguez are associate professors in the Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, Spain. Tracy Eaton is a researcher and Michael J. Gasson is the head of the Food Safety Science Division, BBSRC Institute of Food Research, Norwich, United Kingdom.

This study was partly supported by a grant from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) and by a grant of Puleva Biotech (Granada, Spain). Address correspondence to Juan M. Rodríguez, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

No reported competing interests.

J Hum Lact 21(2), 2005

DOI: 10.1177/0890334405275394

© Copyright 2005 International Lactation Consultant Association

tor of fecal contamination because of their widespread occurrence in the intestinal tract and their resistance in the environment. However, enterococci are now considered as normal components of the food microbiota and not only as indicators for poor hygiene.^{10,12} These microorganisms are important not only for the ripening and development of the specific organoleptic properties of a wide variety of fermented meat and cheeses but also for their microbiological safety through competition and production of antimicrobials. In fact, and similarly to other lactic acid bacteria, some enterococcal strains have found commercial applications as starter or protective cultures as well as probiotics in food and food supplements.

On the other hand, enterococci are opportunistic pathogens that cause nosocomial infections especially in patients (including neonates) who suffer from underlying diseases.¹³ Despite this apparently dualistic nature of enterococci,¹⁴ the incidence of virulence determinants and/or any other factor of clinical significance, such as the antibiotic resistance pattern or the gene transfer potential, appears to be strain specific among isolates studied so far.¹⁵⁻¹⁷ In a recent study, Vancanneyt et al¹⁸ compared the genotypes of *E faecium* strains from humans, animals, and foods and found that all human isolates involved in clinical infection fell into a well-defined subgroup, which suggests that there may be a genetic basis for strains associated with human disease. Pillai et al¹⁹ have also suggested that virulent subpopulations of *E faecalis* may exist. Therefore, the safety of any enterococcal strain of clinical or industrial interest should be carefully and individually evaluated.

Since breastfeeding can be a significant source of enterococci to the infant gut,^{2,3} which may affect the overall composition of the neonate gut microbiota and exert biological functions that are unknown at present, the objective of this study was to evaluate the presence or absence of several genetic and phenotypic traits of clinical significance among *E faecium* strains previously isolated from human milk of healthy donors.

Methods

E faecium Isolates

Seven *E faecium* strains (LC4 and LC27 from mother A; LJx4, LJx27, and LJx33 from mother B; and LM1a and LM22 from mother C) were included in this study. They were representative of the different *E faecium* genotypes isolated from human milk in a previous

Table 1. *Enterococcus* Virulence Determinants Screened in This Study*

Gene(s)	Role of Product in Virulence
agg	Aggregation protein involved in adherence to eukaryotic cells, cell aggregation, and conjugation
gelE	Toxin; extracellular metalloendopeptidase, hydrolyzes gelatin, collagen, hemoglobin, and other bioactive compounds
cylM	Posttranslational modification of cytolysin (hemolysin-bacteriocin, which lyses a broad range of eukaryotic and gram-positive cells)
cylB	Transport of cytolysin
cylA	Activation of cytolysin
espfs; espfm	Cell wall-associated protein involved in immune evasion by <i>E faecalis</i> and <i>E faecium</i> , respectively; may be associated with <i>cyl</i> genes on a pathogenicity island
efaAfs; efaAfm	Cell wall adhesins expressed in serum by <i>E faecalis</i> and <i>E faecium</i> , respectively
cpd, cob, ccf, cad	Sex pheromones, chemotactic for human leukocytes; facilitate conjugation

*Adapted from Eaton and Gasson.¹⁵

study.³ Enterococcal strains were routinely grown in brain heart infusion broth and agar (Oxoid, Basingstoke, UK) at 37°C.

Screening for Enterococcal Virulence Determinants

Control strains used in polymerase chain reaction (PCR) experiments and for probe generation were *E faecalis* strains F4 (*efaA_{fs}*⁺ *gelE*⁺ *agg*⁺ *cylMBA*⁺ *esp*⁺ *cpd*⁺ *cob*⁺ *ccf*⁺ *cad*⁺), P36 (*efaA_{fs}*⁺ *gelE*⁺ *agg*⁺ *cylMBA*⁺ *esp*⁺ *cpd*⁺ *cob*⁺ *ccf*⁺ *cad*⁺), and P4 (*efaA_{fs}*⁺ *gelE*⁺ *agg*⁺ *cylMBA*⁺ *cpd*⁺ *cob*⁺ *ccf*⁺ *cad*⁺) and *E faecium* P61 (*efaA_{fm}*⁺ *esp*⁺).¹⁵ The role of the respective gene products in virulence are listed in Table 1.

Genomic DNA was extracted from overnight enterococcal cultures by the Qiagen genomic DNA midi kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the supplier's instructions for bacteria, with the only modification that mutanolysin (10 U/μg⁻¹) was added to the lysis solution. DNA manipulations, including Southern transfer, were carried out using standard methods.²⁰ PCR primers for the virulence genes (Table 2) were selected according to the criteria of Eaton and Gasson.¹⁵ PCR amplifications were performed in 25-μl reaction mixtures using 25 ng of DNA and 20 pmol of each primer using puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences UK Ltd, Little Chalfont, UK). Samples were overlaid with

Table 2. Polymerase Chain Reaction Primers and Products Used for Detection of Virulence Determinants

Gene and Primers	Sequence (5' to 3')	Product Size, bp
<i>agg2</i>		
TE32	GTTGTTTTAGCAATGGGGTAT	1210
TE33	CACTACTTGTAATTCATAGA	
<i>efaA_{fm}</i>		
TE37	AACAGATCCGCATGAATA	735
TE38	CATTCATCATCTGATAGTA	
<i>cpd</i>		
TE51	TGGTGGGTATTTTTCAATTC	782
TE52	TACGGCTCTGGCTTACTA	
<i>cob</i>		
TE49	AACATTCAGCAAACAAAGC	1405
TE50	TTGCATAAAGAGTGGTCAT	
<i>ccf</i>		
TE53	GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG	543
TE54	AGCCGCTAAAATCGGTAATAAT	
<i>cad</i>		
TE42a	TGCTTTGTCAATGACAATCCG	1299
TE43a	ACTTTTTCCCAACCCCTCAA	
<i>efaA_{fs}</i>		
TE5	GACAGACCCTCACGAATA	705
TE6	AGTTCATCATGCTGTAGTA	
<i>gelE</i>		
TE9	ACCCCGTATCATTGGTTT	419
TE10	ACGCATTGCTTTTCCATC	
<i>cylM</i>		
TE13	CTGATGGAAAAGAAGATAGTAT	742
TE14	TGAGTTGGTCTGATTACATTT	
<i>cylB</i>		
TE15	ATTCCTACCTATGTTCTGTTA	843
TE16	AATAAACTCTTCTTTTCCAAC	
<i>cylA</i>		
TE17	TGGATGATAGTGATAGGAAGT	517
TE18	TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	
<i>esp_{fs}</i>		
TE34	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	933
TE36	GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	
<i>esp_{fm}</i>		
TE104	TTGCTAATGCAAGTCACGTCC	955
TE105	GCATCAACACTTGCATTACCGAA	

50 µl of mineral oil when necessary and subjected to an initial cycle of denaturation (95°C for 5 minutes), followed by 35 cycles of denaturation (95°C for 30 seconds), annealing (at an appropriate temperature for 30 seconds), and elongation (72°C for 1 minute). The target DNA fragments amplified by PCR (Table 2) were purified using a Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) and served as the DNA probes for Southern hybridization experiments. Southern hybridizations were carried out using the ECL direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham Biosciences) under standard stringency conditions, except that 0.25 M NaCl was used in the hybridization buffer.

Phenotypic Assays

Production of gelatinase was determined on Todd-Hewitt agar containing 30 g of gelatin (Difco, Detroit, Mich) per liter. Single colonies were streaked onto plates, grown overnight at 37°C, and placed at 4°C for 5 hours before examination for zones of turbidity around the colonies, indicating hydrolysis. Presence of other enzymatic activities was tested by using the APIzym system (Biomérieux, Marcy l'Étoile, France) following the instructions provided by the manufacturer. For investigation of hemolysin production, strains were streaked onto layered fresh horse blood agar plates and grown for 24 hours at 37°C. Zones of clearing around colonies indicated hemolysin production. The ability to form mating aggregates through the production of sex pheromones was assessed using the clumping-inducing agent assay.²¹ For this purpose, *E. faecalis* strains FI9582 (pAD1),²² FI9583 (pOB1),²³ FI9584 (pCF10),²⁴ and FI9586 (pPD1)²⁵ were used as the responder strains. These strains were kindly supplied by Professor D. B. Clewell (School of Dentistry, University of Michigan, Ann Arbor).

The potential of the strains to degrade gastric mucin in vitro was evaluated following the plate procedure developed by Zhou et al.²⁶ Partially purified hog gastric mucin (HGM, Sigma, St. Louis, Mo) and agarose type I-A (Sigma) were added to a minimal anaerobic culture medium without glucose²⁷ at concentrations of 0.5% (w/v) and 1.5 (w/v), respectively. Ten microliters of 24-hour viable bacterial cultures was inoculated onto the surface of the agarose medium. The plates were incubated at 37°C anaerobically for 72 hours and subsequently stained with 0.1% Amido black in 3.5 M acetic acid for 30 minutes. Then they were washed with 1.2 M acetic acid until the mucin lysis zone around the colony of positive control culture (fecal flora) appeared.

The ability to form biogenic amine (tyramine, histamine, putrescine, and cadaverine) was assessed using the decarboxylase broth and the method described by Bover-Cid and Holzapel.²⁸ The precursor amino acids (tyrosine, histidine, ornithine, and lysine, respectively) were purchased from Sigma. Enterococcal strains were streaked onto the different decarboxylase medium plates and incubated for 4 days at 37°C under aerobic and anaerobic conditions. A positive result was indicated by a change of the medium color to purple in response to the pH shift caused by the production of the more alkaline biogenic amines from the amino acids initially included in the medium.

Table 3. Summary of Polymerase Chain Reaction, Southern Hybridization, and Phenotypic Screening Results for the *E faecium* Strains

Strain	Genotype	Phenotype*
LC4	<i>efaA_{fm}</i> ⁺	GelE ⁻ Hyl ⁻ Agg ⁻ Tyr ⁺ Muc ⁺ Van ⁻
LC27	<i>efaA_{fm}</i> ⁺	GelE ⁻ Hyl ⁻ Agg ⁻ Tyr ⁺ Muc ⁺ Van ⁻
LJx4	<i>efaA_{fm}</i> ⁺	GelE ⁻ Hyl ⁻ Agg ⁻ Tyr ⁺ Muc ⁺ Van ⁻
LJx27	<i>efaA_{fm}</i> ⁺	GelE ⁻ Hyl ⁻ Agg ⁻ Tyr ⁺ Muc ⁺ Van ⁻
LJx33	<i>efaA_{fm}</i> ⁺	GelE ⁻ Hyl ⁻ Agg ⁻ Tyr ⁺ Muc ⁺ Van ⁻
LM1a	<i>efaA_{fm}</i> ⁺	GelE ⁻ Hyl ⁻ Agg ⁻ Tyr ⁺ Muc ⁺ Van ⁻
LM22	<i>efaA_{fm}</i> ⁺	GelE ⁻ Hyl ⁻ Agg ⁻ Tyr ⁺ Muc ⁺ Van ⁻

*Hyl refers to β hemolysis, GelE to gelatinase activity, Agg to aggregation, Tyr to tyramine production, Muc to gastric mucin degradation, and Van to resistance/susceptibility to vancomycin.

The strains were screened for resistance against some clinically relevant antibiotics, including ampicillin (10 μ g), chloramphenicol (30 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), clindamycin (2 μ g), erythromycin (10 μ g), kanamycin (30 μ g), tetracycline (30 μ g), and vancomycin (30 μ g), using the MRS agar disc diffusion method described by Temmerman et al.¹⁷ All the antibiotic discs were purchased from Oxoid. Results were interpreted according to the cutoff levels proposed by Charteris et al.²⁹

Screening for *vanA* and *vanB* Genes

Since vancomycin resistance is an issue of particular interest regarding the safety of enterococcal strains, PCR for detection of *vanA* and *vanB* genes was performed. Oligonucleotides used as primers for the amplification of the 732-bp fragment of the *vanA* gene were VanA₁ (5'-GGGAAAACGACAATTGC-3') and VanA₂ (5'-GTACAATGCGGCCGTTA-3'),³⁰ while those used for amplification of the 1145-bp fragment of *vanB* were VanB (5'-GTGCTGCGAGATACCACAGA-3') and VanBrev (5'-CGAACACCATGCAACATTTC'-3').³¹ Primers were obtained from Sigma-Genosys. PCR reactions for *vanA* and *vanB* genes were prepared as described by Dutka-Malen et al.³⁰ and Ramos-Trujillo et al.,³¹ respectively. *E faecium* BM4147 (resistant to vancomycin, VanA⁺) and *E faecalis* V583 (resistant to vancomycin, VanB⁺) were used as positive controls. These strains were kindly supplied by Dr F. Claverie-Martín (Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain).

Results

In this study, 7 *E faecium* strains isolated from human milk were screened for the presence of characterized factors (and/or their genetic determinants) that can be

relevant from a safety point of view. The screening results are summarized in Table 3. PCR amplifications and Southern hybridizations revealed that all the strains were clear of potential virulence determinants, except for *efaA_{fm}* that was found in all of them. These results were in good agreement with those obtained with the phenotypic assays since none of the strains showed hemolysin production or gelatinase activity (Table 3). In addition, neither the sex pheromone determinants (*cpd*, *cob*, *ccf*, and *cad*) nor the *agg* gene were present in any strain, and none of the strains displayed an aggregation phenotype.

In relation to the production of biogenic amines, none of the enterococci tested showed any potential to produce the amines histamine, putrescine, cadaverine, or serotonin. However, tyramine was formed by all the strains except *E faecium* LM1a and LM22 (Table 3). On the other hand, although all the strains showed high esterase and lipase activities, they did not display proteolytic activities. All the strains were able to degrade gastric mucin in vitro.

All the strains were resistant to ciprofloxacin, erythromycin, and kanamycin but sensitive to ampicillin, chloramphenicol, clindamycin, tetracycline, and vancomycin. In addition, *vanA* and *vanB* genes could not be detected by PCR.

Discussion

In this study, 7 *E faecium* strains isolated from human milk of healthy women were clear of virulence determinants with a clear or presumptive role in enterococcal pathogenesis (*efaA_{fs}*, *gelE*, *cylMBA*). On the other hand, all of them contained the *efaA_{fm}* gene, but the role of adhesin EfaA_{fm} in virulence has not yet been demonstrated, in contrast to EfaA_{fs} of *E faecalis*.³² Probably, the presence of *efaA_{fm}* in the absence of other virulence determinants has no value as a risk indicator since this gene was also found in 100% of the starter *E faecium* strains screened by Eaton and Gasson,¹⁵ which have a long record of safe use in food. The determinant for another enterococcal adhesin (*esp*) could not be detected in any strain. Recently, Lund and Edlund³³ reported that blood isolates of *E faecium* showed increased adhesion to eukaryotic cells after they were enriched with the *esp* gene. However, it seems that the Esp surface protein is not necessarily required for biofilm formation.^{34,35} Recently, a novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* gene of *E faecium* and associated with epidemicity has been de-

scribed.³⁶ The absence of *cylA*, *cylB*, and *cylM* explains the lack of hemolytic activity among the enterococci tested since expression of such genes is required for the biosynthesis of cytolysin.³⁷ Similarly, absence of *gelE* accounts for the lack of gelatinase activity.

Some enterococci have highly effective gene transfer mechanisms, and both virulence and antibiotic-resistance genes are known to be associated with certain highly transmissible plasmids. However, in this study, neither the sex pheromone determinants (*cpd*, *cob*, *ccf*, and *cad*) nor the *agg* gene were present in any strain, and these results are coincident with the lack of a clumping phenotype. The fact that some virulence-related genes are encoded on pheromone-responsive plasmids that generally occur only among *E faecalis* strains might explain the higher incidence of virulence factors among strains of this species and, as a consequence, why *E faecalis* predominates (80%-90%) among enterococci isolated from human infections.³⁸ *E faecium* strains generally harbor fewer recognized virulence determinants than do *E faecalis* strains, and the incidence of such determinant strains among *E faecium* strains is much lower.^{15,16} Although transfer of vancomycin-resistant genes to a probiotic *E faecium* strain has been described,³⁹ gene transfer into other strains of this species has not been detected.¹⁵

Biogenic amines are produced in different kinds of food, including dairy products, due to the decarboxylase activity of some microorganisms, and they may cause toxicological problems.⁴⁰ Enterococci are among the gram-positive bacteria with highest potential to produce tyramine, and therefore our *E faecium* strains were screened for biogenic amines. None of the strains tested produced histamine, putrescine, or cadaverine. However, tyramine was formed by all the strains, except *E faecium* LM1a and LM22. Tyramine production and inability to produce other amines is a very common finding among enterococci.^{28,41} However, tyramine formation by enterococci seems to require the environmental conditions found in fermented foods,²⁸ and therefore presence of enterococcal strains in human milk or in the infant gut is unlikely to be considered a health risk. In addition, the ability to form biogenic amines is usually linked to proteolytic strains,^{40,42} and our strains did not show any proteolytic activity.

In this study, a disc diffusion method was used to determine the antibiotic resistance pattern of the *E faecium* strains. All the strains were sensitive to ampicillin, chloramphenicol, clindamycin, tetracycline, and van-

comycin. In addition, *vanA* and *vanB* genes could not be detected by PCR. The resistance against antibiotics is an important factor for the evaluation of the safety of enterococci; particularly concerning is that against glycopeptides such as vancomycin because it can be acquired and/or transferred to other enterococcal strains by gene transfer and also because such antibiotics are often used as the last choice for multi-antibiotic-resistant nosocomial infections of the immunocompromised host. However, enterococci not involved in human clinical infection, and especially strains of *E faecium*, are generally sensitive to the clinically relevant antibiotics, including vancomycin.^{16,17,43} Temmerman et al¹⁷ highlighted the limited reliability of the widely employed disc diffusion methods to determine the occurrence of vancomycin resistance among enterococci since they can lead to a significant number of false resistants. Instead, they suggested the use of dilution and/or PCR methods. It is also interesting to note that although the strains tested in this study were sensitive to clindamycin, most enterococci are intrinsically resistant to low levels of this antibiotic.¹¹

In conclusion, no virulence factors could be detected in the *E faecium* strains included in this study. The high concentration of enterococci in milk from healthy mothers¹⁻⁴ strongly suggests that they may play an important biological role during the first months of life. Work is in progress to elucidate their potential to protect the newborn against infectious diseases and their role in the maturation of the infant gut-associated lymphoid tissue.

References

1. Gavin A, Ostovar K. Microbiological characterization of human milk. *J Food Protect.* 1977;40:614-616.
2. Heikkilä MP, Saris PEJ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Bacteriol.* 2003;95:471-478.
3. Martín R, Langa S, Reviriego C, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr.* 2002;143:754-758.
4. West PA, Hewitt JH, Murphy OM. The influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *J Appl Bacteriol.* 1979;46:269-277.
5. Favier CF, Vaughan EE, de Vos WM, Akkermans ADL. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:219-226.
6. Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo ACM, Raangs GC, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;30:61-67.
7. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr.* 1999;69(suppl): 1035S-1045S.

8. Lopez-Alarcon M, Villalpando S, Fajardo A. Breast-feeding lowers the frequency and duration of acute respiratory infection and diarrhea in infants under six months of age. *J Nutr.* 1997;127:436-443.
9. Wright AL, Bauer M, Naylor A, Sutcliffe E, Clark L. Increasing breast-feeding rates to reduce infant illness at the community level. *Pediatrics.* 1998;101:837-844.
10. Klein G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int J Food Microbiol.* 2003; 88:123-131.
11. Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3:46-65.
12. Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol.* 1999;47:1-24.
13. Moellering RC. *Enterococcus* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone; 2000:2147-2156.
14. Franz CMAP, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. Enterococci in foods: a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol.* 2003;88: 105-122.
15. Eaton T, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:1628-1635.
16. Franz CMAP, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NMK, et al. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:4385-4389.
17. Temmerman R, Pot B, Huys G, Swings J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int J Food Microbiol.* 2003;81:1-10.
18. Vancanneyt M, Lombardi A, Andrighetto C, et al. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:1381-1391.
19. Pillai SK, Sakoulas G, Gold HS, et al. Prevalence of the *fsr* locus in *Enterococcus faecalis* infections. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2651-2652.
20. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
21. Dunny GM, Craig RA, Carron RL, Clewell DB. Plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*: production of multiple sex pheromones by recipients. *Plasmid.* 1979;2:454-465.
22. Clewell DB, Tomich PK, Gawron-Burke MC, et al. Mapping of *Streptococcus faecalis* plasmids pAD1 and pAD2 and studies relating to transposition of Tn917. *J Bacteriol.* 1982;152:1220-1230.
23. Dunny G, Funk C, Adsit J. Direct stimulation of the transfer of antibiotic resistance by sex pheromones in *Streptococcus faecalis*. *Plasmid.* 1981;6:270-278.
24. Oliver DR, Brown BL, Clewell DB. Characterization of plasmids determining hemolysin and bacteriocin production in *Streptococcus faecalis* 5952. *J Bacteriol.* 1977;130:948-950.
25. Yagi Y, Kessler R, Shaw J, Lopatin D, An F, Clewell DB. Plasmid content of *Streptococcus faecalis* strain 39-5 and identification of a pheromone (cPD1)-induced surface antigen. *J Gen Microbiol.* 1983; 129:1207-1215.
26. Zhou JS, Gopal PK, Hill HS. Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin in vitro. *Int J Food Microbiol.* 2001;63:81-90.
27. Ruseler-van Embeden JGH, Lieshcut-van LMC, Gosselink MJ, Marteau P. Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scand J Gastroenterol.* 1995;30:675-680.
28. Bover-Cid S, Holzapfel WH. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 1999;53:33-41.
29. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Prot.* 1998; 61:1636-1643.
30. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995;33:24-27.
31. Ramos-Trujillo E, Pérez-Roth E, Méndez-Álvarez S, Claverie-Martín F. Multiplex PCR for simultaneous detection of enterococcal genes *vanA* and *vanB* and staphylococcal genes *mecA*, *ileS-2* and *femB*. *Int Microbiol.* 2003;6:113-115.
32. Singh KV, Coque TM, Weinstock GM, Murray BE. In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998;21:323-331.
33. Lund B, Edlund C. Bloodstream isolates of *Enterococcus faecium* enriched with the enterococcal surface protein gene, *esp*, show increased adhesion to eukaryotic cells. *J Clin Microbiol.* 2003;41:5183-5185.
34. Kristich CJ, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol.* 2004;186: 154-163.
35. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:4538-4545.
36. Leavis H, Shankar N, Borgen K, et al. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol.* 2004;186:672-682.
37. Gilmore MS, Segarra SA, Booth MC, et al. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J Bacteriol.* 1994; 176:7335-7344.
38. Kayser FH. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int J Food Microbiol.* 2003;88:255-262.
39. Lund B, Edlund C. Probiotic *Enterococcus faecium* strain is a possible recipient of the *vanA* gene cluster. *Clin Infect Dis.* 2001;32:1384-1385.
40. Ten Brink B, Damink C, Joosten HJ, Huis in't Veld J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int J Food Microbiol.* 1990;11:73-84.
41. Bover-Cid S, Hugas M, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int J Food Microbiol.* 2001;66:185-189.
42. Gardini F, Martuscelli M, Caruso C, et al. Effects of pH, temperature, and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *Int J Food Microbiol.* 2001;64:105-117.
43. Klein G, Pack A, Reuter G. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64:1825-1830.

Resumen

Determinantes de virulencia en cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de leche materna

En un estudio previo, los autores aislaron bacterias lácticas a partir de leche materna de mujeres sanas. Dado que algunos de los aislados identificados pertenecían a la especie *Enterococcus faecium*, el objetivo de este trabajo consistió en la evaluación de su seguridad. La posible presencia de determinantes genéticos de virulencia se evaluó mediante la reacción

en cadena de la polimerasa (PCR) y la técnica de hibridación de Southern. Se investigó la presencia de genes involucrados en procesos de conjugación para determinar el potencial de las cepas para adquirir plásmidos conjugativos. Paralelamente, se realizaron ensayos fenotípicos. La presencia de genes de resistencia a la vancomicina se evaluó mediante PCR. Los ensayos de PCR e hibridación de Southern

revelaron que todas las cepas estaban libres de prácticamente todos los determinantes de virulencia analizados. Ninguna de las cepas mostró actividad gelatinasa, producción de hemolisina, capacidad de agregación o presencia de los genes *vanA* o *vanB*. Estos resultados sugieren que la leche de mujeres sanas puede ser una fuente de *E faecium* avirulentos para los lactantes.

**VIII. ACTIVIDAD ANTI-*Listeria* Y PROPIEDADES
BIOQUÍMICAS DE INTERÉS PARA LA INDUSTRIA LÁCTEA
EN CEPAS DE *Enterococcus faecium* AISLADAS DE LECHE
MATERNA**

Manuscrito en preparación

Actividad anti-*Listeria* y propiedades bioquímicas de interés para la industria láctea en cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de leche materna

Anti-*Listeria* activity and biochemical properties of interest to dairy industries in *Enterococcus faecium* strains isolated from human milk

C. Reviriego, R. Arroyo, J.M. Rodríguez, L. Fernández*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

**Autora para correspondencia.*

Fax 34-91-3943743; Correo electrónico: leonides@vet.ucm.es

Resumen

En este trabajo se ha evaluado la actividad anti-*Listeria* y diversas propiedades bioquímicas de interés tecnológico en siete cepas de *E. faecium* aisladas de leche materna poseían *In vitro*, todas las cepas inhibieron el crecimiento de diversas cepas de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*, siendo *E. faecium* LJx4 la que manifestó la actividad anti-*Listeria* más potente. En cuanto a las propiedades tecnológicas, su actividad acidificante fue baja y no mostraron actividad proteolítica detectable, a excepción de dos cepas (LJx4 y Lc4) en las que la actividad fue pequeña. En contraste, todas las cepas mostraron actividad peptidásica y esterásica. Finalmente, se evaluó la eficacia de *E. faecium* LJx4 para inhibir el crecimiento de *Listeria innocua* SA1 durante la elaboración de quesos. Los quesos se manufacturaron a partir de leche inoculada con la cepa LJx4, con o sin la presencia de *L. innocua* SA1 (~4 log ufc/ml). Al final del período de maduración, los recuentos de *L. innocua* fueron de, aproximadamente, 5×10^2 ufc/g en presencia de *E. faecium* LJx4 y de 2×10^6 ufc/g en su ausencia. Los enterococos analizados podrían resultar útiles como cultivos adjuntos y/o bioprotectores en la elaboración de quesos.

Abstract

In this work, the anti-*Listeria* activity and a variety of biochemical properties of seven *E. faecium* strains isolated from breast milk were analyzed. *In vitro*, all the enterococcal strains inhibited the growth of all the *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains tested, being *E. faecium* LJx4 the one that showed the highest anti-*Listeria* activity. In relation to the technological properties, their acidifying capacity was low and they did not show detectable proteolytic activity, with the exception of two strains (LJx4 y Lc4) which displayed a low activity. In contrast, all the strains showed peptidase and esterase activities. Finally, the effect of *E. faecium* LJx4 on the survival of *Listeria innocua* SA1 during cheese ripening was also investigated. Cheeses were manufactured from milk inoculated with the enterococcal strain and with or without the *Listeria* strain (4 log CFU/ml). At the end of the ripening period, counts of *L. innocua* were approximately 5×10^2 CFU/g in cheeses made with *E. faecium* LJx4, and 2×10^6 CFU/g in those in which the enterococcal strain was not present. The enterococcal strains could be useful as adjunct and/or bioprotective in cheese making.

1. INTRODUCCIÓN

Los enterococos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, asociados a los alimentos, en el ambiente y como constituyentes de la microbiota intestinal humana. Su elevada tolerancia al calor, su capacidad para adaptarse a distintos sustratos y su resistencia a condiciones ambientales adversas les permiten colonizar una gran variedad de nichos ecológicos (Giraffa, 2002). En estos momentos el género *Enterococcus* es el más controvertido dentro de las bacterias lácticas. Por una parte, los enterococos juegan un papel fundamental en la obtención de muchos productos fermentados, como quesos, embutidos o aceitunas, y algunas cepas se emplean como probióticos. Por otra, algunas cepas de enterococos están dotadas de factores de virulencia propios de patógenos oportunistas y son responsables de infecciones nosocomiales en individuos inmunodeprimidos (Franz et al., 2003; Foulquié Moreno et al., 2006; Giraffa, 2002; Ogier y Serror, 2007). Los enterococos son intrínsecamente resistentes a muchos de los agentes antimicrobianos empleados para tratar infecciones humanas aunque es más preocupante su capacidad para adquirir y transferir resistencias (Mundy et al., 2000). Las resistencias a niveles elevados de glucopéptidos (vancomicina, teicoplanina y avoparcina) resultan de particular interés ya que la vancomicina es uno de los últimos recursos para el tratamiento de infecciones originadas por bacterias multirresistentes (Franz et al., 2003).

Los enterococos son fundamentales para la maduración y el desarrollo del flavor en la mayoría de los quesos del sur de Europa, independientemente de que hayan sido elaborados con leche cruda o pasteurizada o con leche de cualquiera de las especies empleadas habitualmente (Foulquié Moreno et al., 2006). Las especies que se aíslan con mayor frecuencia de productos lácteos son *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* y *E. durans*. El número de enterococos presentes en el queso es, además, relativamente elevado desde las primeras etapas de elaboración (10^4 - 10^6 UFC/g en la cuajada) hasta el final de la maduración (10^5 - 10^7 UFC/g) (Franz et al., 1999; Ogier y Serror, 2007). Los enterococos pueden contribuir a la proteólisis, a la generación de ácidos grasos y a la producción de diacetilo y acetoína (Centeno et al., 1999; Sarantinopoulos et al., 2001). Un beneficio adicional que pueden aportar los

enterococos durante la elaboración del queso es la producción de bacteriocinas activas frente a patógenos de origen alimentario (Franz et al., 2007).

Otro aspecto interesante de los enterococos es su potencial como probióticos, en cepas cuya seguridad haya sido confirmada. Después de los lactobacilos, los enterococos son las bacterias que se emplean con mayor frecuencia como probióticos en el hombre, e incluso en los animales (Holzapfel et al., 1998). Existen en el mercado preparados comerciales que contienen diversas cepas de *E. faecium* cuya efectividad como probióticos se ha demostrado en ensayos clínicos (Foulquié Moreno et al., 2006).

La caracterización de la microbiota presente en la leche de mujeres sanas ha revelado que está compuesta de un espectro relativamente pequeño de bacterias, entre las que se encuentran diversas especies de enterococos (Martín et al., 2003). En un trabajo anterior, se investigó la presencia de diversos rasgos genéticos y fenotípicos de importancia clínica en siete cepas aisladas de *E. faecium* procedentes de varias mujeres sanas. En ninguna de las cepas se detectó ningún factor de virulencia, indicando su seguridad para los lactantes (Reviriego et al., 2005). Dada la competitividad de los enterococos, el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad anti-*Listeria* y algunas propiedades bioquímicas de relevancia tecnológica en estas cepas de *E. faecium* para evaluar su posible inclusión como cultivos iniciadores, bioprotectores o adjuntos en la elaboración de productos lácteos fermentados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Bacterias y condiciones de cultivo

En este trabajo se ha empleado una colección de siete cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de tres muestras de leche materna (Reviriego et al., 2005). Como referencia se han empleado diversas cepas de origen lácteo. *E. faecalis* TAB 28, *E. faecalis* TAB 52, *Lactococcus lactis* ESI 153 y *L. lactis* ESI 515 fueron aisladas originalmente de quesos artesanos elaborados con leche cruda (Cogan et al., 1997) y se han empleado en repetidas ocasiones como cultivos iniciadores y/o adjuntos para la elaboración de queso (Rodríguez et al., 1998). *E. durans* AZ6 es una cepa aislada

de queso elaborado con leche cruda de cabra por su notable actividad esterásica y, junto con *L. lactis* 18-16, *L. lactis* E8 y *Lactobacillus helveticus* CNRZ32, procede de la colección que mantenemos en nuestro laboratorio. Los enterococos y el lactobacilo se mantuvieron en caldo MRS (Oxoid) y los lactococos en caldo GM17 (M17 complementado con 0,5% de glucosa), a los que se añadió glicerol (15% v/v), a -80°C. Estos cultivos se revitalizaron (1% v/v) en el medio correspondiente antes de ser utilizados. Todos ellos se incubaron a 32°C, excepto *L. helveticus* CNRZ32 que se incubó a 42°C.

2.2. Actividad anti-*Listeria*

La capacidad anti-*Listeria* de las cepas de *E. faecium* aisladas de leche materna se evaluó mediante la técnica de Magnusson y Schnürer (2001) empleando las siguientes bacterias indicadoras de nuestra colección: *Listeria monocytogenes* ScottA, Ohio, CA y SLR1, y *Listeria innocua* RdC y TFD1. Para ello, se emplearon placas de agar MRS en las que se habían sembrado las cepas de *E. faecium* en forma de estrías de aproximadamente 2 cm de largo; tras una incubación a 37°C durante 24 h, se añadió una capa (10 ml) de agar BHI (0,7%) con 10⁵ UFC del correspondiente indicador. A continuación, las placas se incubaron a 32°C durante 48 h. Finalmente, se examinaron las placas para detectar zonas de inhibición (>2 mm) alrededor de las estrías de las cepas de *E. faecium*. Todos los ensayos de inhibición se realizaron por triplicado.

Paralelamente, se investigó si la posible actividad inhibidora era debida a la producción de bacteriocinas. Inicialmente, las cepas de *E. faecium* se crecieron en caldo MRS a 37°C hasta el inicio de la fase estacionaria ($A_{620} \sim 1$). Los cultivos se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min a 4°C, y los sobrenadantes se neutralizaron a 6,2 con NaOH 1 M, se hirvieron durante 5 min y se filtraron a través de filtros de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore, Bedford, USA). La actividad bacteriocinogénica de los sobrenadantes libres de células se determinó mediante un ensayo de difusión en agar. Alícuotas (50 µl) de los sobrenadantes se depositaron en pocillos (7 mm diámetro) realizados en placas de agar BHI previamente inoculadas (10⁵ UFC/ml) con las cepas indicadoras citadas previamente. Las placas se mantuvieron a 4°C durante 2 h y, posteriormente, se incubaron a 32°C durante 24 h.

2.3. Actividad acidificante

La actividad acidificante de las distintas bacterias se evaluó midiendo el cambio del pH y la acidez titulable (expresada como g 100 mL⁻¹) en leche desnatada. Las bacterias se cultivaron en caldo MRS o GM17 a 32°C y este cultivo se empleó para inocular al 1% (v/v) leche desnatada en polvo reconstituida (al 10%, p/v) (Oxoid) y sometida a un tratamiento térmico suave (121°C, 5 min). El pH se midió con un pH-metro a las 6, 12 y 24 h de incubación a 32°C. La acidez se determinó por titulación con 0,11 M NaOH en presencia de fenofaleína y se expresó como la cantidad de ácido láctico producido (g 100 mL⁻¹). Ambos parámetros, pH y acidez titulable, se estimaron empleando dos duplicados por cada cepa.

2.4. Actividad proteolítica

La actividad proteolítica se determinó con el ensayo espectrofotométrico basado en el empleo de OPA (*o*-phthaldialdehído) descrito por Church y col. (1983). Este ensayo detecta los grupos amino α liberados por la hidrólisis de la caseína, tras reaccionar con OPA y mercaptoetanol β para formar un complejo que absorbe fuertemente a una densidad óptica de 340 nm (DO₃₄₀). Las bacterias se cultivaron en caldo MRS o GM17 a 32°C y, a continuación, para reducir al mínimo la cantidad de grupos amino libres en el inóculo, se lavaron y resuspendieron en un volumen igual al original de tampón fosfato sódico 0,32 mM, pH 7,2. Las células lavadas se inocularon (1%) en leche desnatada en polvo (Nestlé) reconstituida e incubada a 32°C durante 24 h. Como control, se incubó una muestra sin inocular. Los valores de la actividad proteolítica se expresaron con la diferencia en DO₃₄₀ entre los cultivos de las bacterias y la leche sin inocular.

2.5. Preparación de extractos intracelulares

Las bacterias se incubaron en caldo MRS hasta el final de la fase exponencial de crecimiento. Las células se recuperaron por centrifugación (10000 \times g) durante 10 min a 4°C y se lavaron dos veces con solución salina fría (0,85% NaCl, p/v). Finalmente, se resuspendieron en tampón fosfato 50 mM, pH 7, de tal forma que se concentraron 100 veces con respecto al volumen original del cultivo. La suspensión de bacterias se mezcló con 0,5 ml de perlas de vidrio, enfriándose la mezcla en hielo. A continuación se sometieron a cuatro ciclos de agitación a 5 m s⁻¹ y de 15 s de

duración en un FastPrep FP120 (Qbiogen), enfriándose en hielo entre los ciclos. Las perlas de vidrio y los restos celulares se eliminaron por centrifugación (13.000 rpm, 15 min, 4°C). Los sobrenadantes recuperados se emplearon como extractos intracelulares. El contenido de proteína en los extractos intracelulares se determinó con el método de Bradford (BioRad), empleando seroalbúmina bovina (Sigma) como estándar.

2.6. Actividad peptidásica

La actividad aminopeptidásica de las bacterias se ensayó utilizando los sustratos L-alanina *p*-nitroanilida (Ala-*p*NA), L-leucina *p*-nitroanilida (Leu-*p*NA), L-lisina *p*-nitroanilida (Lys-*p*NA), L-prolina *p*-nitroanilida (Pro-*p*NA) y ácido L-glutámico *p*-nitroanilida (Glu-*p*NA) y la actividad dipeptidásica con glicil- L-prolina *p*-nitroanilida (Gly-Pro-*p*NA) (Sigma). El ensayo se hizo en placas multipocillos, estando la mezcla de reacción formada por 200 μ l de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7, 25 μ l de extracto intracelular (diluido en caso necesario) y 25 μ l de la solución de sustrato 20 mM recién preparada en metanol. Para determinar la cantidad de *p*-nitroanilina liberada se midió el incremento en la absorbancia a 410 nm al cabo de una h de incubación a 37°C. La actividad peptidásica específica se expresó como los nmoles de *p*NA liberados por miligramo de proteína en el extracto intracelular y por h de incubación.

2.7. Actividad esterásica y lipásica

Para la determinación de las actividades esteárica y lipásica se emplearon seis derivados α -naftil (α -NA) de los ácidos acético (C2), propiónico (C3), butírico (C4), caproico (C6), palmítico (C16) y esteárico (C18) (Sigma). El método empleado se desarrolló a partir del descrito por Abeijón y col. (2006), adaptándolo para realizarlo en placas multipocillos. La mezcla de reacción contenía 28 μ l de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7, 10 μ l de extracto intracelular (diluido, como mínimo, diez veces en el mismo tampón) y 2 μ l de la solución de sustrato 10 mM recién preparada en metanol. Después de incubar la mezcla a 37°C durante una h, se añadieron 60 μ l de Fast Garnet GBC (Sigma) con una concentración de 0,5 mg mL⁻¹ en SDS al 10% (p/v) y 100 μ l de SDS al 10%. A continuación se procedió a la lectura de la

absorbancia a 560 nm. Los resultados se expresaron como los μ moles de naftol α liberados por miligramo de proteína en el extracto intracelular y por h de incubación.

2.8. Perfil de actividad esterásica

Los extractos intracelulares (aproximadamente 150 mg de proteína) se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida-agarosa utilizando condiciones no desnaturalizantes y tampón HEPES 50 mM pH 7,2 con 5 mM $MgCl_2$, según describen Benoist y Schwencke (1990) en una unidad de electroforesis Mini Protean 2 (BioRad). La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante (60 V) durante 2 h. Al finalizar, los geles se equilibraron durante 20 min con tampón HEPES 100 mM pH 7,5 con NaCl 100 mM y $MgCl_2$ 5 mM. A continuación se añadieron a cada gel 50 ml del mismo tampón conteniendo como sustrato el derivado α -NA del ácido acético, propiónico o butírico (20 mM en dimetilsulfóxido, concentración final) correspondiente y 1% de Fast Garnet GBC. Las bandas con actividad esterásica se visualizaron en el gel como zonas de color negro.

2.9. Elaboración de quesos experimentales y análisis microbiológicos

Los quesos se elaboraron a partir de leche pasteurizada de la forma descrita por Rodríguez et al. (2005) y Reviriego et al. (2007) en dos ensayos independientes. En cada ensayo, la leche (32°C; $CaCl_2$: 0,01%) se distribuyó en 5 cubas (1,5 l por cuba). Dos de las cubas se inocularon con un 1% de un cultivo en leche (~ 9 log UFC/ml) de *E. faecium* LJx4. Otras dos cubas se coinocularon con la cepa enterocócica (de la forma descrita anteriormente) y con *L. innocua* SA1 (concentración final: 4 log UFC/ml). La cuba restante se inoculó únicamente con *L. innocua* SA1. La renina (Naturen Powder, Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca) se añadió a la leche 20 min después de que se inoculara con los cultivos bacterianos. Las cuajadas se cortaron 40 min después de la adición de renina y, seguidamente, se calentaron a 38°C durante 20 min. Tras drenar el suero, las cuajadas se distribuyeron en moldes cilíndricos de plástico. A partir de cada cuba se obtuvo un único queso (~ 190 g). Los quesos se prensaron durante 4 h a temperatura ambiente, se salaron en una salmuera (15%) durante 45 min y se mantuvieron a 20°C durante 16 h. Entonces, cada queso se cortó en 5 piezas, que se envasaron al vacío individualmente en bolsas de plástico Cryovac, y se dejaron madurar a 12°C durante 4 semanas.

Antes del prensado, se tomaron dos muestras (2 g) de cuajada de cada cuba. Posteriormente, se tomaron muestras de los quesos en los días 1 (antes del envasado al vacío), 7, 14, 21 y 28. Los recuentos de *L. innocua* se determinaron por duplicado en placas de agar PALCAM agar plates (Biomérieux, Marcy L'Etoile, Francia), que se incubaron a 32°C durante 48 h.

2.10. Análisis estadístico

En este trabajo se ha utilizado el análisis de la varianza (ANOVA) con el test de Duncan de comparaciones múltiples post hoc. Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces.

3. RESULTADOS

3.1. Actividad anti-*Listeria*

Las 7 cepas de *E. faecium* mostraron actividad antimicrobiana (zona de inhibición >2 mm alrededor de la estría) frente a todas las listerias empleadas como bacterias indicadoras. Sin embargo, no se pudo detectar actividad bacteriocinogénica en las condiciones en las que se realizaron los ensayos.

3.2. Actividad acidificante: acidez titulable y evolución del pH

La actividad acidificante de las siete cepas de *E. faecium* aisladas de leche humana se evaluó durante su crecimiento en leche desnatada, registrando la evolución del pH y determinando el ácido láctico producido (Tabla 1). El pH inicial de la leche fue 6,57. Al cabo de 6 h de crecimiento a 32°C, todas estas cepas de *E. faecium* habían disminuido el pH de los cultivos en leche a valores que oscilaban entre 6,06 (Lc27 and LJx27) y 6,11 (Lc4). Otras especies de enterococos (*E. faecalis* y *E. durans*) de origen alimentario, aisladas de quesos artesanos, que se incluyeron en este estudio tuvieron el mismo comportamiento ($P < 0.01$) que los *E. faecium* de origen humano en relación con la disminución del pH durante este periodo de tiempo. El valor más bajo de pH (pH 5,43) que se obtuvo al cabo de 6 h se correspondió con *L. lactis* ESI 153, la bacteria con mayor capacidad acidificante. Al cabo de 24 h a 32°C, el pH de ninguno de los cultivos en leche de *E. faecium*, ni el de *E. faecalis* TAB52, había descendido

por debajo de 5,0. En cambio, *E. faecalis* TAB28 y *L. lactis* ESI 153 habían alcanzado este valor en menos de 12 h.

Los valores correspondientes a la producción de ácido cuando esas bacterias crecieron en leche desnatada también se muestran en la Tabla 1. La cantidad de ácido láctico producido por las cepas de *E. faecium* aisladas de leche materna después de 6 h osciló entre 0,06 y 0,08 g 100 mL⁻¹. Tampoco se observó ninguna diferencia ($P < 0.01$) en la cantidad de ácido láctico producido por estos aislados ni siquiera al cabo de 12 (0,09-0,14 g 100 mL⁻¹) ó 24 h (0,18-0,21 g 100 mL⁻¹) a 32°C. Por lo tanto, deben considerarse con escasa capacidad acidificante, ya que la cantidad de ácido producida fue muy inferior a la necesaria para la coagulación de la leche. Por otra parte, todos los enterococos de origen alimentario, a excepción de *E. faecalis* TAB52, y todos los lactococos mostraron una buena capacidad acidificante (>0,3 g de ácido láctico 100 mL⁻¹) transcurridas 24 h, provocando la coagulación de la leche. *E. faecalis* TAB28 y *L. lactis* ESI 153 coagularon la leche desnatada reconstituida en menos de 12 h.

3.3. Actividad proteolítica

La actividad proteolítica de las bacterias se determinó en leche desnatada reconstituida (Tabla 2). En el ensayo del OPA se detectan los grupos amino α , que aparecen como consecuencia de la proteólisis de las proteínas de la leche, por lo que da una medida directa de la actividad proteolítica. Ninguna de las cepas de *E. faecium* tuvo una actividad proteolítica detectable, excepto las cepas Lc4 y LJx4, que liberaron una pequeña cantidad de grupos amino (DO₃₄₀ 0,018 \pm 0,002 y 0,009 \pm 0,001, respectivamente). La actividad proteolítica más intensa fue la mostrada por las cepas *E. faecalis* TAB28 y *L. lactis* ESI153 (DO₃₄₀ 0,287 \pm 0,011 y 0,141 \pm 0,008, respectivamente). En el resto de las bacterias ensayadas, no se detectó actividad proteolítica (Tabla 2); de hecho, la cantidad de grupos amino α presentes en las muestras de leche en las que habían crecido esas bacterias era inferior que en el control, indicando que seguramente las bacterias habían empleado para su crecimiento una buena parte del nitrógeno soluble presente en la leche.

3.4. Actividad peptidásica

La actividad peptidásica de las distintas bacterias sobre varios sustratos se muestra en la Tabla 3. Las cepas de *E. faecium* procedentes de leche materna mostraron actividad aminopeptidásica frente a Glu-, Ala-, Leu- y Lys-*p*NA, pero no frente a Pro-*p*NA. El nivel de actividad observada con los sustratos Ala-, Leu- y Lys-*p*NA fue similar (entre 4 y 16 nmol mg⁻¹ proteína h⁻¹) y aproximadamente unas diez veces inferior al obtenido al emplear Glu-*p*NA (entre 50 y 113 nmol mg⁻¹ proteína h⁻¹). Ninguna de las siete cepas de enterococos de leche materna mostró actividad dipeptidásica con Gly-Pro-*p*NA como sustrato y lo mismo sucedió con las tres cepas de enterococos de origen alimentario, *E. faecalis* TAB52 y TAB28 y *E. durans* AZ6. De las cepas de enterococos de leche materna, *E. faecium* Lc4 fue la que tuvo una mayor actividad aminopeptidásica con todos los sustratos ensayados.

La actividad aminopeptidásica de *E. faecalis* TAB52 y TAB28 fue muy parecida a la de los enterococos de leche materna, excepto que fueron incapaces de hidrolizar Glu-*p*NA. En cambio, *E. durans* AZ6 hidrolizó todos los sustratos ensayados, incluso Pro-*p*NA, y su actividad aminopeptidásica fue bastante más elevada que la del resto de los enterococos.

A diferencia de los enterococos, *L. lactis* ESI153, ESI515, 18-16 y E8 y *Lb. helveticus* CNRZ32 mostraron una intensa actividad dipeptidásica frente a Glu-Pro-*p*NA. Además, la actividad aminopeptidásica de estas bacterias, aunque variable de unas cepas a otras, fue muy superior a la de las cepas de *E. faecium* y *E. faecalis*, excepto con el sustrato Glu-*p*NA.

3.5. Actividad esterásica y lipásica

La actividad esteárica de las bacterias se determinó en los extractos intracelulares empleando los derivados α -NA de los ácidos grasos C2, C3, C4 y C6 como sustratos (Fig. 1). Se detectó actividad esterásica en los extractos intracelulares de todas las bacterias ensayadas, obteniéndose los valores más altos en los enterococos.

Como ya se había observado con la actividad aminopeptidásica, el comportamiento de los *E. faecium* aislados de leche materna fue bastante similar. En todos ellos el valor más alto de actividad esterásica siempre se obtuvo con los derivados del ácido propiónico (entre 85,24 y 114,22 μ moles de α -NA mg⁻¹ proteína

h^{-1}) y el ácido butírico (entre 65,61 y 99,64 mg^{-1} proteína h^{-1}). La actividad esterásica con los derivados del ácido acético (entre 17,91 y 28,73 μmoles de $\alpha\text{-NA}$ mg^{-1} proteína h^{-1}) y caprílico (entre 16,70 y 23,28 μmoles de $\alpha\text{-NA}$ mg^{-1} proteína h^{-1}) fue bastante menor.

La actividad esterásica de *E. faecalis* TAB52 y TAB28 fue superior a la de los enterococos de leche materna, especialmente con el $\alpha\text{-NA}$ -propionato (entre 132,97 y 193,00 μmoles de $\alpha\text{-NA}$ mg^{-1} proteína h^{-1}). La diferencia de actividad entre el derivado del ácido propiónico y el del butírico fue, también, mucho más marcada en estas dos cepas.

A diferencia de lo observado con la actividad peptidásica, *Lb. helveticus* CNRZ32 apenas tuvo capacidad para hidrolizar ninguno de los cuatro sustratos ensayados. Los lactococos, por su parte, tuvieron un comportamiento variable, pero en general se caracterizaron por su escasa actividad esterásica. Quizá deba resaltarse que en *L. lactis* 18-16 y E8 la actividad más intensa se correspondía con el derivado del ácido caprílico, siendo ésta, por otra parte, muy similar a la observada en los enterococos.

Finalmente, en ningún caso se observó actividad lipolítica apreciable empleando como sustratos los derivados $\alpha\text{-NA}$ de los ácidos grasos palmítico ni esteárico.

3.6. Perfiles de esterases

La detección de actividad esterásica después de la separación electroforética de los extractos intracelulares reveló que el sistema esterásico de las bacterias lácticas es bastante complejo, con una gran diversidad entre los distintos géneros e incluso dentro de la misma especie (Fig. 2). Todos los enterococos aislados de leche materna mostraron una única banda (R_f de 0,34) con actividad frente a los tres sustratos ensayados, los derivados de los ácidos acético, propiónico y butírico. En *E. faecalis* TAB28 y TAB52, así como en *E. durans* AZ6 el perfil fue más complejo, detectándose entre dos y tres bandas adicionales con los sustratos $\alpha\text{-NA}$ -propionato y -butirato con R_f de 0,27 y 0,22. El perfil de los lactococos y de *Lb. helveticus* CNRZ32 fue completamente distinto y característico de cada cepa, mostrando cada una entre una y tres bandas con actividad. Es de destacar que a igual concentración de proteína, la

intensidad de las bandas (actividad esterásica en los geles) casi siempre fue notablemente superior en los enterococos aislados de leche materna.

3.7. Efecto de *E. faecium* LJx4 frente a *L. innocua* en quesos experimentales

La actividad anti-*Listeria* de *E. faecium* LJx4 se evaluó en quesos inoculados con *L. innocua* SA1. En los quesos que contenían el enterococo, los valores de pH oscilaron entre 4,94 y 4,99 en el día 1 y entre 4,66 y 4,67 al final del periodo de maduración (Tabla 4). Por otra parte, el pH de los quesos que únicamente se inocularon con *L. innocua* SA1 varió de aproximadamente 6,18 (día 1) a 4,95 (día 28) (Tabla 4). En los quesos control, los recuentos de *L. innocua* SA1 fueron de 7,40 log UFC/g en el día 1 y disminuyeron durante la maduración hasta alcanzar 6,35 log UFC/g en el día 28 (Tabla 5). La presencia de *E. faecium* LJx4 provocó una reducción significativamente mayor ($P < 0.01$) en los recuentos finales de *L. innocua*, que fueron 3,64 unidades logarítmicas menores que los observados en los quesos control tras 28 días de maduración (Tabla 5).

4. DISCUSIÓN

Los productos fermentados gozan de gran popularidad porque se perciben como naturales, sanos, nutritivos y sensorialmente atractivos. Estas características tan deseables son consecuencia del crecimiento y metabolismo de los microorganismos que intervienen en la fermentación (Cogan et al., 2007; Law, 2001). La práctica habitual en la industria alimentaria, que persigue obtener productos con características consistentes y un control adecuado de la fermentación, ha reducido notablemente el número de cepas que se emplean. En consecuencia, las propiedades organolépticas de los productos procedentes de fermentaciones industriales a menudo se consideran demasiado uniformes y poco atractivas. Existe, por tanto, una necesidad de buscar nuevas cepas de bacterias que se puedan utilizar para aumentar la biodiversidad, diversificar el flavor y recuperar las características propias de los productos tradicionales (Cogan et al., 2007; Peláez y Requena, 2005). Por otro lado, también hay un gran interés en desarrollar productos que aporten un beneficio adicional a la salud de los consumidores (Saxelin et al., 2005).

La leche de mujeres sanas se podría considerar, teniendo en cuenta lo anterior, una fuente potencial de nuevas bacterias, dado que por su origen estas bacterias serían seguras. La caracterización microbiológica de la leche de mujeres sanas ha puesto de manifiesto que *E. faecium* es una de las especies predominantes, aislándose en 9 de 10 muestras analizadas (Martín et al., 2003). En un estudio posterior, se ha demostrado que siete *E. faecium* aislados en dicho trabajo carecían de rasgos genéticos y fenotípicos de relevancia clínica (Reviriego et al., 2005). Por otra parte, un gran número de enterococos, pertenecientes a diferentes especies del género *Enterococcus*, poseen características tecnológicas interesantes, entre las que caben citar la producción de bacteriocinas y propiedades probióticas (Foulquié Moreno et al., 2006; Franz et al., 1999). En este trabajo, se han estudiado distintas propiedades tecnológicas en los siete *E. faecium* procedentes de leche materna para determinar su posible aptitud tecnológica para la elaboración de productos lácteos fermentados. Curiosamente, los resultados obtenidos muestran que todos los *E. faecium* aislados de leche materna tuvieron un comportamiento muy similar en relación con casi todas las propiedades tecnológicas ensayadas y, en algunos casos como por ejemplo la actividad esterásica, claramente distinto de las otras bacterias lácticas empleadas en la industria alimentaria.

La propiedad tecnológica más relevante de los cultivos iniciadores en la industria láctea es la capacidad de producir ácido rápidamente, para favorecer una sinéresis correcta e impedir el crecimiento de microorganismos indeseables. Un cultivo con una adecuada velocidad de acidificación para la industria es capaz de bajar el pH de la leche a 5,3 al cabo de 6 horas a 30°C (Cogan et al., 1997). Ni los enterococos aislados de leche materna ni el resto de las bacterias lácticas analizadas tuvieron buena capacidad acidificante (Tabla 1). Este comportamiento es muy habitual en las bacterias lácticas que no están asociadas a los cultivos iniciadores clásicos de la industria láctea, como ocurre con muchos lactococos y enterococos aislados de quesos artesanos (Alonso-Calleja et al., 2002; Ayad et al., 2000; Cogan et al., 1997; de la Plaza et al., 2006).

La actividad proteolítica es muy deseable para que las bacterias tengan un crecimiento rápido en leche y juega un papel clave en el desarrollo de la textura de los quesos. Además, algunos péptidos contribuyen al típico flavor del producto, mientras que otros pueden aportar un carácter amargo (Sousa et al., 2001). De los *E. faecium* aislados de leche materna sólo dos cepas (Lc4 y LJx4) mostraron una débil actividad

proteolítica. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en muchos otros estudios en los que se ha puesto de manifiesto que, en general, la actividad proteolítica de los enterococos en leche es escasa, aunque varía mucho de una cepa a otra (Cogan et al., 1997; Foulquié Moreno et al., 2006; Psoni et al., 2006). Los aislados de *E. faecium* siempre tienen menor actividad proteolítica cuando se compara con *E. faecalis* (Andrighetto et al., 2001; Sarantinopoulos et al., 2001).

La lentitud acidificación y la escasa actividad proteolítica de los aislados de *E. faecium* de leche materna indican que sólo serían útiles como cultivos auxiliares a un cultivo iniciador industrial. Por otra parte, en los últimos años el interés se ha centrado en la búsqueda y selección de cultivos que contribuyan a incrementar el sabor y aroma de los quesos. Precisamente los enterococos son los principales implicados en la maduración y en el desarrollo del flavor en muchos quesos, sobre todos los del Mediterráneo (Bouton et al., 1998; Centento et al., 1996; Coppola et al., 1998; Litopoulou-Tzanetaki, 1990; Macedo et al., 1995; Nikolaou et al., 2002; Ordóñez et al., 1978; Prodromou et al., 2001; Psoni et al., 2003; Suzzi et al., 2000; Tzanetakis y Litopoulou-Tzanetaki, 1992).

Todos los enterococos aislados de leche materna mostraron actividad peptidásica frente a Ala-, Leu-, Lys- y Glu-pNA, poniendo en evidencia la presencia de, al menos, una aminopeptidasa general. Esta actividad fue poco intensa en comparación con otras bacterias, como por ejemplo *E. durans* AZ6, varios lactococos y, especialmente, *L. helveticus* CNRZ32. Este lactobacilo se emplea comercialmente como cultivo adyuvante para reducir el amargor en queso y su sistema proteolítico está muy bien caracterizado. Destacó por su intensa actividad aminopeptidásica frente a todos los sustratos, excepto Glu-pNA (Christensen et al., 1999). Precisamente con este sustrato los enterococos de leche materna mostraron una actividad destacable. Existen varias rutas por las que se puede metabolizar el ácido glutámico en las bacterias lácticas, habiéndose demostrado que potencia la producción de ácidos carboxílicos. Estos ácidos carboxílicos como, por ejemplo, el ácido isovalérico son compuestos aromáticos muy potentes que contribuyen en gran medida al flavor del queso (Kieronczyk et al., 2003; Urbach, 1997).

Cabe destacar que ningún enterococo, a excepción de *E. durans* AZ6, hidrolizó el sustrato Pro-pNA ni el dipéptido Glu-Pro-pNA. Las aminopeptidasas generales no hidrolizan los enlaces peptídicos en los que está implicado el aminoácido prolina,

requiriéndose para ello peptidasas específicas. Los péptidos que contienen prolina se caracterizan por ser amargos y tras su hidrólisis mejora sustancialmente el sabor del queso (Park et al., 1995). Los pocos trabajos disponibles sobre la actividad peptidásica de otros enterococos aislados de productos lácteos confirman esta escasa actividad peptidásica (Arizcun et al., 1997; Psoni et al., 2006; Tsakalidou et al., 1994).

La hidrólisis de la grasa es otro de los fenómenos bioquímicos importantes durante la maduración del queso, aunque ha sido bastante menos estudiado que la proteólisis o la utilización de la lactosa. Los ácidos grasos liberados durante la lipólisis afectan directamente al flavor del queso y, además, pueden ser transformados en compuestos aromáticos mucho más potentes como metil cetonas, lactonas, ésteres, alcoholes secundarios y aldehidos. La importancia de las esterasas de bacterias lácticas no se debe sólo a que contribuyen a la liberación de ácidos grasos de cadena corta, sino que también pueden en medios acuosos catalizar la síntesis de ésteres, aunque se desconoce si tienen la misma actividad en el queso (Fenster et al., 2003; Holland et al., 2005).

Todos los enterococos tuvieron una notable actividad esterásica con los sustratos ensayados, derivados de los ácidos grasos C2 a C6, en general muy superior a la de los lactococos y *L. helveticus* CNRZ32. Esta superior actividad esterásica de los enterococos sobre otras bacterias lácticas concuerda con observaciones anteriores (Katz et al., 2007; Oliszewski et al., 2007; Tsakalidou et al., 1994). Los sustratos preferidos, con bastante diferencia sobre el resto, fueron los derivados de los ácidos propiónico y butírico, como han mostrado con anterioridad otros autores (Abeijón et al., 2006; Oliszewski et al., 2007).

La actividad esterásica se puede atribuir en los enterococos aislados de leche materna a una única proteína. En el resto de los enterococos y en los lactococos hay más de una banda proteica con actividad esterásica, que se diferencian no sólo en la movilidad electroforética, sino también en la preferencia de sustratos. El polimorfismo electroforético de las esterasas es habitual en las bacterias lácticas (Abeijón et al., 2006; Ouzari et al., 2006; Sarantinopoulos et al., 2001). También es frecuente en otras especies bacterianas, siendo el análisis de los perfiles de esterasas útil incluso como herramienta taxonómica y como marcador para estudios epidemiológicos (Goulet y Picard, 1995; Ouzari et al., 2006).

En resumen, las cepas de enterococos aisladas de leche materna evaluadas en este estudio tienen poca capacidad acidificante y escasa actividad proteolítica. Sin embargo, presentan intensa actividad esterásica y una notable actividad aminopeptidasa que les permite liberar ácido glutámico. Por todo ello, podrían ser útiles como cultivos auxiliares durante la elaboración de queso. Sería deseable en el futuro analizar con detalle los compuestos aromáticos formados a partir de los sustratos liberados por la acción de las peptidasas y estererasas de estos enterococos y su influencia en las propiedades organolépticas del queso. También sería interesante analizar el metabolismo del citrato, otra fuente muy importante de aromas como diacetilo, acetaldehído, acetoína y 2,3-butanodiol (Hugenholtz, 1993).

La aplicación de *E. faecium* LJx4 para inhibir el crecimiento de *L. innocua* en quesos experimentales condujo a una notable reducción de la concentración de *L. innocua* al final de la maduración. Probablemente el inóculo de *L. innocua* fuera demasiado elevado para el enterococo pudiera eliminarla completamente. En cualquier caso, los resultados obtenidos muestran la necesidad de la aplicación de un cultivo iniciador junto con *E. faecium* LJx4. Serán necesarios más estudios para evaluar el potencial de la cepa como cultivo adjunto o bioprotector.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. M. Medina (INIA, Madrid) la cesión de las cepas de *L. lactis* ESI 153 y ESI 515 y *E. faecalis* TAB 28 y TAB 52.

REFERENCIAS

- Abeijón, M.C., Medina, R.B., Katz, M.B., González, S.N. 2006. Technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from ewe's milk and cheese with importance for flavour development. *Can. J. Microbiol.* 52:237-245.
- Alonso-Calleja, C., Carballo, J., Capita, R., Bernardo, A., García-López, M.L. 2002. Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from goat's milk and Valdeteja cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 34:134-138.

- Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., Dellaglio, F. 2001. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J. Dairy Res.* 68:303-316.
- Arizcun, C., Barcina, Y., Torre, P. 1997. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 38:17-24.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Wouters, J.T.M., Smit, G. 2000. Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *Int. Dairy J.* 10:169-179.
- Benoist, P., Schwencke, J., 1990. Native agarose-polyacrylamide gel electrophoresis allowing the detection of aminopeptidase, dehydrogenase, and esterase activities at the nanogram level: Enzymatic patterns in some *Frankia* strains. *Anal. Biochem.* 187:337-344.
- Bouton, Y., Guyot, P., Grappin, P. 1998. Preliminary characterization of microflora of Comte cheese. *J. Appl. Microbiol.* 85:123-131.
- Centeno, A., Menéndez S., Rodríguez-Otero, J.L. 1996. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's milk cheese (Northwest Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 33:307-313.
- Centeno, J.A., Menéndez, S., Hermida, M., Rodríguez-Otero, J.L. 1999. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 48:97-111.
- Coppola, T.M., Parente, J.E., Dumontet, S., La Peccerella, A. 1998. The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water buffalo milk. *Lait* 68:295-310.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L. 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:217-246.
- Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignain, G.L. 1983. Spectrophometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66:1219-1227.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuviel, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M.,

- Rea, M.C., Rodríguez, E. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64:409-421.
- Cogan, T.M., Beresford, T.P., Steele, J., Broadbent, J., Shah, N.P., Ustunol, Z. 2007. Invited Review: Advances in starter cultures and cultured foods. *J. Dairy Sci.* 90:4005-4021.
- de la Plaza, M., Rodríguez, A., Fernández de Palencia, P., Martínez-Cuesta, M.C., Peláez, C., Requena, T. 2006. Discrepancies between the phenotypic and genotypic characterization of *Lactococcus lactis* cheese isolates. *Lett. Appl. Microbiol.* 43:637-44.
- Fenster, K.M., Rankin, S.A., Steele, J.L. 2003. Accumulation of short *n*-chain ethyl esters by esterases of lactic acid bacteria under conditions simulating ripening parmesan cheese. *J. Dairy Sci.* 86:2818-2825.
- Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106:1-24.
- Franz, C.M.A.P., Holzappel, W.H., Stiles, M.E. 1999. Enterococci at the crossroads on food safety? *Int. J. Food Microbiol.* 47:1-24.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H. y Holzappel, W.H. 2003. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88:105-122.
- Franz, C.M., van Belkum, M.J., Holzappel, W.H., Abriouel, H., Gálvez, A. 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev.* 31:293-310.
- Giraffa, G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Rev.* 26:163-171.
- Goulet, P., Picard, B. 1995. The electrophoretic polymorphism of bacterial esterases. *FEMS Microbiol. Rev.* 16:7-31.
- Holland, R., Liu, S.-Q., Crow, V.L., Delabre, M.-L., Lubbers, M., Bennett, M., Norris, G. 2005. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavor: milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *Int. Dairy J.* 15:711-718.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J.H.J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. Dairy J.* 41:85-101.
- Hughenoltz, J. 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Rev.* 12:165-178.

- Katz, M., Medina, R., González, S., Oliver, G. 2002. Esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk and cheese. *J. Food Prot.* 65:1997-2001.
- Kieronczyck, A., Skeie, S., Langsrud, T., Yvon, M. 2003. Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:734-739.
- Law, B.A. 2001. Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. *Int. Dairy J.* 11:383-398.
- Litopoulou-Tzanetaki, E. 1990. Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria during ripening of Kefalotyri cheese. *J. Food Sci.* 55:111-113.
- Macedo, C.A., Malcata F.X., Hogg, T.A. 1995. Microbiological profile in Serra ewe's cheese during ripening. *J. Appl. Bacteriol.* 79:1-11.
- Magnusson, J., Schnürer, J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1-5.
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* 143:754-758.
- Mundy, L.M., Sahn, D.F., Gilmore, M. 2000. "Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance". *Clin. Microbiol. Rev.* 13:513-522.
- Nikolaou, E., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Robinson, R.K. 2002. Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal, low-fat cheese made from raw ovine milk during ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 55:12-17.
- Ogier, J.-C., Serror, P. 2008. Part VI: The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017.
- Ordóñez, J.A., Barneto, R., Ramos, M. 1978. Studies on Manchego cheese ripened in oil olive. *Milchwissenschaft* 33:609-612.
- Oliszewski, R., Medina, R.B., González, S.N., Pérez Chaia, A.B. 2007. Esterase activities of indigenous lactic acid bacteria from Argentinean goats' milk and cheeses. *Food Chem.* 101:1446-1450.
- Ouzari, H., Hassen, A., Najjari, A., Ettoumi, B., Daffonchio, D., Zagorec, M., Boudabous, A., Mora, D. 2006. A novel phenotype based on esterase

- electrophoretic polymorphism for the differentiation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *cremoris*. *Lett. Appl. Microbiol.* 43:351-359.
- Park, S.K., Gibbs, B.F., Lee, B.H. 1995. Effects of crude enzyme of *Lactobacillus casei* LLG on water-soluble peptides of enzyme-modified cheese. *Food Res. Intern.* 28:43-49.
- Peláez, C., Requena, T. 2005. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *Int. Dairy J.* 15:831-844.
- Prodromou, K., Thasitou, P., Haritonidou, E., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki, E. 2001. Microbiology of Orinotyri, a ewe's milk cheese from the Greek mountains. *Food Microbiol.* 18:319–328.
- Psoni, L., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. 2003. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk, *Food Microbiol.* 20:575–582.
- Psoni, L., Kotzamanides, C., Andrighetto, C., Lombardi, A., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki, E. 2006. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 109:109-120.
- Reviriego, C., Eaton, T., Martín, R., Jiménez, E., Fernández, L., Gasson, M.J., Rodríguez, J.M. 2005. Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *J. Hum. Lact.* 21:131-137.
- Reviriego, C., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2007. A food-grade system for production of pediocin PA-1 in nisin- and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains. Application to inhibit *Listeria* growth in a cheese model system. *J. Food Prot.* 70:2512-2517.
- Rodríguez, E., Calzada, J., Arqués, J.L., Rodríguez, J.M., Nuñez, M., Medina, M. 2005. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *E. coli* O157:H7 in cheese. *Int. Dairy J.* 15:51-57.
- Rodríguez, E., Gaya, P., Nuñez, M., 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.

- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int. Dairy J.* 11:621-647.
- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., de Vos, W.M. 2005. Probiotics and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr. Opinion Biotechnol.* 16:204-211.
- Sousa, M.J., Ardo, Y., McSweeney, P.L.H. 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening *Int. Dairy J.* 11:327-345.
- Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., Andrighetto C., Lanorte, M.T. 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *J. Applied Microbiol.* 89:267–274.
- Tsakalidou, E., Manolopoulou, E., Kabaraki, E., Zoidou, E., Pot, B., Kersters, K., Kalantzopoulos, G. 1994. The combined use of whole-cell protein extracts for the identification (SDS-PAGE) and enzyme activity screening of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products. *Syst. Appl. Microbiol.* 17:444-458.
- Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. 1992. Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria in Feta and Teleme, two Greek cheeses from ewe's milk. *J. Dairy Sci.* 75:1389–1393.
- Urbach, G. 1997. The flavor of milk and dairy products. 2. Cheese: contribution of volatile compounds. *Int. J. Dairy Technol.* 50:79-89.

Tabla 1. Actividad acidificante de las cepas de *E. faecium* procedentes de leche materna, y de otras bacterias lácticas relevantes en la industria láctea, en leche descremada (10% p/v) a las 6, 12 y 24h a 30°C.

Cepa	6 h		12 h		24 h	
	pH	Acidez titulable (ácido láctico, g/100 mL)	pH	Acidez titulable (ácido láctico, g/100 mL)	pH	Acidez titulable (ácido láctico, g/100 mL)
<i>Enterococcus faecium</i> :						
Lc4	6,11	0,06 ± 0,01 ^a	5,84	0,09 ± 0,01 ^a	5,57	0,19±0,01 ^a
Lc27	6,06	0,07 ± 0,00 ^a	5,77	0,11 ± 0,00 ^a	5,54	0,18±0,00 ^a
Ljx4	6,08	0,08 ± 0,00 ^{ac}	5,60	0,14 ± 0,01 ^a	5,63	0,18±0,01 ^a
Ljx27	6,06	0,07 ± 0,01 ^{ac}	5,87	0,10 ± 0,01 ^a	5,49	0,20±0,00 ^a
Ljx33	5,99	0,08 ± 0,00 ^{ac}	5,86	0,12 ± 0,02 ^a	5,50	0,19±0,01 ^a
LM1a	6,10	0,07 ± 0,00 ^a	5,86	0,10 ± 0,00 ^a	5,65	0,18±0,01 ^a
LM22	6,06	0,07 ± 0,01 ^a	5,86	0,11 ± 0,01 ^a	5,57	0,21±0,03 ^a
<i>Enterococcus faecalis</i> :						
TAB 52	6,19	0,05 ± 0,00 ^a	5,92	0,12 ± 0,00 ^a	5,67	0,17±0,00 ^a
TAB 28	5,74	0,08 ± 0,01 ^{ac}	4,92*	0,44 ± 0,03 ^b	4,51*	0,69±0,02 ^b
<i>Enterococcus durans</i> :						
AZ6	6,03	0,07 ± 0,01 ^a	5,48	0,22 ± 0,03 ^c	5,07*	0,31±0,01 ^c
<i>Lactococcus lactis</i> :						
ESI 153	5,43	0,18 ± 0,03 ^b	4,31*	0,68 ± 0,07 ^d	4,10*	0,71±0,01 ^b
ESI 515	6,19	0,05 ± 0,01 ^a	5,65	0,14 ± 0,03 ^a	4,35*	0,54±0,03 ^d
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>Diacetylactis</i> :						
18-16	5,96	0,10 ± 0,01 ^c	5,36	0,30 ± 0,01 ^e	4,93*	0,39±0,01 ^e

Nota: Los valores presentados son las medias ± DS de cultivos duplicados para cada bacteria.

Los valores en la misma columna y con distinta letra difieren significativamente (Duncan, $P < 0,01$)

*, la muestra estaba coagulada.

Tabla 2. Actividad proteolítica de las cepas de *E. faecium* procedentes de leche materna, y de otras bacterias lácticas relevantes en la industria láctea, en leche descremada (10% p/v) a las 24 h a 30°C.

Cepa	OPA (DO ₃₄₀)
<i>Enterococcus faecium</i> :	
Lc4	0,018 ± 0,002 ^a
N	
Lc27	ND
LJx4	0,009 ± 0,001 ^a
LJx27	ND
LJx33	ND
LM1a	ND
LM22	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> :	
TAB 52	ND
TAB 28	0,287 ± 0,011 ^b
<i>Enterococcus durans</i> :	
AZ6	ND
<i>Lactococcus lactis</i> :	
ESI 153	0,141 ± 0,008 ^c
ESI 515	ND
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> :	
18-16	ND

Nota: Los valores presentados son las medias ± DS de cultivos duplicados para cada bacteria. Los valores con distinta letra difieren significativamente (Duncan, $P < 0,01$). ND: no detectado.

Tabla 3. Actividad peptidásica específica de las cepas de *E. faecium* procedentes de leche materna y de otras bacterias lácticas relevantes en la industria láctea.

Cepa	Actividad aminopeptidásica (nmol pNA mg ⁻¹ proteína h ⁻¹)					
	Ala-pNA	Leu-pNA	Lys-pNA	Pro-pNA	Glu-pNA	Gly-Pro-pNA
<i>Enterococcus faecium</i>						
Lc4	16,16 ± 3,32 ^a	15,36 ± 2,16 ^a	15,61 ± 0,84 ^a	ND	113,29 ± 10,23 ^a	ND
Lc27	8,45 ± 1,84 ^a	8,96 ± 2,08 ^a	4,07 ± 1,87 ^a	ND	62,32 ± 7,08 ^{bc}	ND
Ljx4	5,39 ± 0,25 ^a	10,56 ± 1,50 ^a	5,50 ± 1,14 ^a	ND	70,67 ± 11,74 ^{bc}	ND
Ljx27	9,53 ± 3,99 ^a	13,99 ± 0,98 ^a	8,58 ± 1,40 ^a	ND	76,42 ± 12,53 ^b	ND
Ljx33	7,01 ± 1,36 ^a	8,29 ± 2,19 ^a	4,73 ± 2,19 ^a	ND	51,38 ± 6,06 ^c	ND
LM1a	9,37 ± 1,68 ^a	8,94 ± 0,99 ^a	6,50 ± 0,98 ^a	ND	68,97 ± 8,99 ^{bc}	ND
LM22	7,06 ± 2,76 ^a	7,37 ± 1,21 ^a	7,65 ± 1,71 ^a	ND	59,01 ± 2,69 ^{bc}	ND
<i>Enterococcus faecalis</i>						
TAB 52	15,19 ± 0,76 ^a	9,68 ± 0,42 ^a	2,67 ± 0,11 ^a	ND	ND	ND
TAB 28	9,03 ± 7,83 ^a	8,32 ± 0,29 ^a	1,55 ± 1,19 ^a	ND	ND	ND
<i>Enterococcus durans</i>						
AZ6	447,27 ± 28,50 ^b	98,46 ± 16,16 ^b	417,44 ± 37,43 ^b	12,45 ± 4,64 ^{ac}	194,48 ± 30,05 ^d	ND
<i>Lactococcus lactis</i>						
ESI 153	41,02 ± 6,95 ^c	80,06 ± 6,51 ^b	563,04 ± 37,61 ^c	8,97 ± 1,38 ^b	1,06 ± 0,20 ^e	2244,10 ± 21,07 ^a
ESI 515	225,64 ± 35,62 ^d	232,87 ± 55,10 ^c	1401,39 ± 44,18 ^d	9,34 ± 0,84 ^{ab}	249,28 ± 5,60 ^f	3829,86 ± 117,46 ^b
<i>L. lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>						
18-16	128,67 ± 16,87 ^e	429,93 ± 65,67 ^d	1880,47 ± 207,45 ^e	14,43 ± 4,25 ^c	1,72 ± 0,65 ^e	4316,86 ± 27,64 ^c
E8	166,78 ± 4,49 ^f	380,30 ± 19,55 ^e	2470,48 ± 221,11 ^f	21,15 ± 2,86 ^d	24,54 ± 2,06 ^g	3872,66 ± 21,89 ^b
<i>Lactobacillus helveticus</i>						
CNRZ32	12895,80 ± 880,674	9431,53 ± 1024,74	14416,40 ± 1038,14	227,88 ± 11,55	13,11 ± 0,11	12263,60 ± 1173,65

Nota: Los valores presentados son las medias ± DS de los triplicados para cada bacteria.

Los valores en la misma columna y con distinta letra difieren significativamente (Duncan, $P < 0,05$). En el análisis estadístico no se incluyeron los datos de *Lactobacillus helveticus* CNRZ32.

Tabla 4. Valores de pH en los quesos experimentales.

Cultivo	Cuajada	Periodo de maduración (días)				
		1	7	14	21	28
<i>L. innocua</i> SA1	6,91± 0,07	6,18± 0,04	5,35± 0,04	5,12± 0,10	4,87± 0,03	4,95± 0,04
<i>E. faecium</i> LJx4	6,52± 0,03	4,99± 0,04	4,76± 0,02	4,64± 0,03	4,65± 0,04	4,66± 0,02
<i>E. faecium</i> LJx4/ <i>L. innocua</i> SA1	6,39± 0,02	4,94± 0,06	4,75± 0,03	4,62± 0,05	4,61± 0,06	4,67± 0,07

Tabla 5. Recuentos (\log_{10} UFC/g) de *L. innocua* en los quesos experimentales inoculados con *Listeria innocua* SA1.

Cultivo	Cuajada	Periodo de maduración (días)				
		1	7	14	21	28
<i>L. innocua</i> SA1	4,02±0,09	7,40±0,15	7,21± 0,11	7,11± 0,17	7,02± 0,04	6,35±0,07
<i>E. faecium</i> LJx4+ <i>L. innocua</i>	4,05±0,07	4,15± 0,12	3,74± 0,07	3,67± 0,12	3,43± 0,17	2,71± 0,10

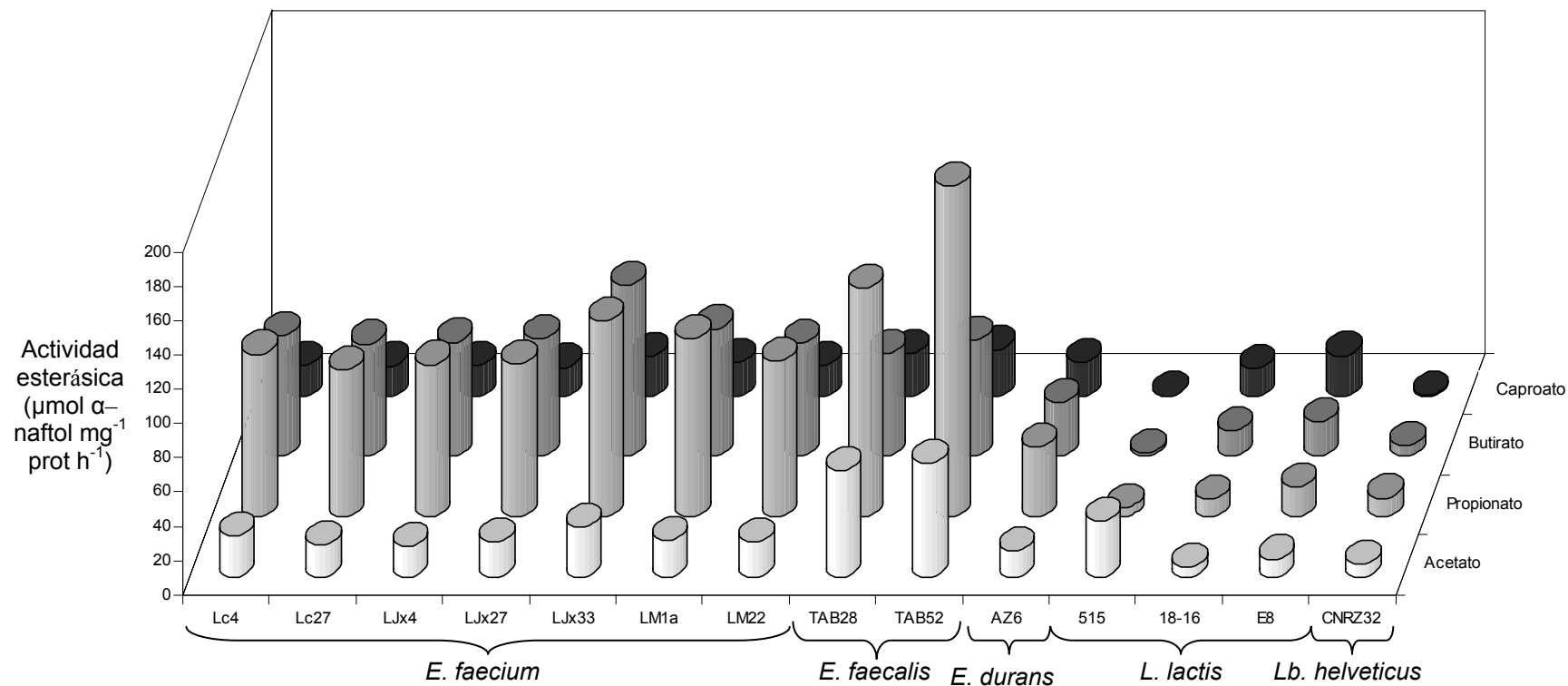


Figura 1. Actividad esterásica específica de las cepas de *E. faecium* procedentes de leche materna, y de otras bacterias lácticas relevantes en la industria láctea, empleando como sustratos los derivados α -NA de los ácidos grasos C2, C3, C4 y C6.

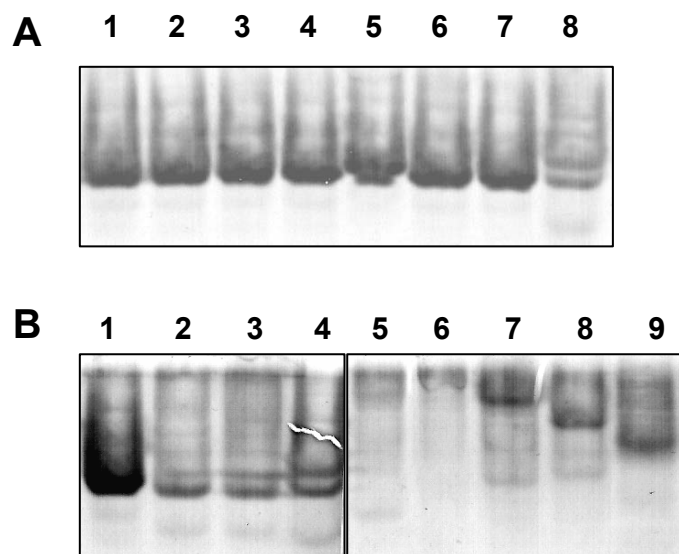


Figura 2. Perfiles esterásicos de las cepas de *E. faecium* procedentes de leche materna y de otras bacterias lácticas relevantes en la industria láctea. Las proteínas de los extractos intracelulares de las bacterias se separaron en geles de poliacrilamida-agarosa en condiciones no desnaturalizantes. La actividad esterásica se reveló incubando los geles con α -naftil acetato y Fast Garnet GBC. Panel A: Línea 1, *Enterococcus faecium* Lc4; línea 2, *E. faecium* Lc27; línea 3, *E. faecium* Ljx4; línea 4, *E. faecium* Ljx27; línea 5, *E. faecium* Ljx33; línea 6, *E. faecium* LM1a; línea 7, *E. faecium* LM22; y línea 8, *E. durans* AZ6. Panel B: Línea 1, *Enterococcus faecium* Lc4; línea 2, *E. faecalis* TAB28; línea 3, *E. faecalis* TAB52; línea 4, *E. durans* AZ6; línea 5, *Lactococcus lactis* ESI153; línea 6, *L. lactis* ESI515; línea 7, *L. lactis* 18-16; línea 8, *L. lactis* E8; y línea 9, *Lactobacillus helveticus* CNRZ32.

IX. DISCUSIÓN GENERAL

IX.1. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE PEDIOCINA PA-1 EN *L. lactis* DE INTERÉS INDUSTRIAL

Las bacterias lácticas tienen un papel clave en la fermentación de diversas materias primas alimentarias porque desarrollan en los productos fermentados características sensoriales que son muy apreciadas por el consumidor y, al mismo tiempo, contribuyen a su seguridad desde el punto de vista microbiológico. El empleo empírico de las bacterias lácticas para la conservación de los alimentos (bioconservación) es una práctica muy antigua en la historia de la humanidad (Stiles, 1996). De los diversos compuestos antimicrobianos que producen las bacterias lácticas, sin ninguna duda, las bacteriocinas poseen un gran número de propiedades idóneas para que se empleen como bioconservantes. La aplicación de las bacteriocinas aporta muchos beneficios como, por ejemplo, alargar la vida útil, disminuir el riesgo de transmisión de patógenos a través de los alimentos, proporcionar una protección adicional si se rompe la cadena de frío y permitir el empleo de una menor cantidad de conservantes químicos o reducir la severidad de otros tratamientos de conservación (Gálvez et al., 2007). De esta forma, contribuyen, en definitiva, a conservar las propiedades nutritivas y organolépticas de los alimentos.

Uno de los patógenos que más preocupan en la industria láctea, por su carácter psicrotrofo y su resistencia al ácido, es *L. monocytogenes*. Este patógeno puede estar presente en productos elaborados con leche cruda e incluso en los elaborados con leche pasteurizada, si se produce una contaminación posterior al tratamiento térmico. Los brotes de listeriosis no tienen una incidencia muy elevada (entre 2 y 10 casos por millón de habitantes en la Unión Europea), pero tienen la tasa de mortalidad más alta de todos los patógenos de transmisión alimentaria. Muchos brotes de listeriosis han estado relacionados con el consumo de leche o queso contaminados (Jemmi y Stephan, 2006). Una de las estrategias más prometedoras para el control de *L. monocytogenes* en la industria láctea es el empleo de bacteriocinas y, en concreto, la pediocina PA-1, ya que consigue reducir la población del patógeno entre 1 y 4 ciclos logarítmicos (Muriana, 1996). Aunque estos niveles de inhibición son inaceptables como método de conservación único, si resultan muy útiles como uno de los factores en un sistema de barreras múltiples. Por otra parte, en productos fermentados la pediocina PA-1 tiene

muy poca interferencia con los cultivos iniciadores a diferencia de otra bacteriocinas como, por ejemplo, la nisina (Eijsink et al., 1998; Guyonnet et al., 2000).

Los microorganismos productores de pediocina PA-1 pertenecen al género *Pediococcus*, a excepción de *Lb. plantarum* WHE92 (Ennahar et al., 1996). Esos pediococos proceden de productos vegetales y cárnicos y no son útiles en la industria láctea porque no fermentan bien la lactosa ni poseen buena actividad proteolítica (Caldwell et al., 1996). Por ello, experimentalmente se ha buscado en numerosas ocasiones el modo de dotar a diversas cepas de lactococos con la capacidad de producir pediocina PA-1 (Buyong et al., 1998; Chikindas et al., 1995; Horn et al., 1998, 1999; Rodríguez et al., 2003; van Belkum et al., 1997). Una de las estrategias con la que se obtuvo más éxito permitió que una cepa de *L. lactis* produjera una cantidad de pediocina PA1 similar a la de *P. acidilactici* 347, el productor natural (Horn et al., 1999). Esta estrategia se basaba en utilizar el líder, el promotor y el aparato secretor de la lactococina A para producir y secretar la pediocina PA-1. Las cepas de *L. lactis* empleadas por estos investigadores eran de uso habitual en investigación, bien caracterizadas y desprovistas de plásmidos, pero con una dudosa aptitud tecnológica. Es de destacar, por otra parte, que en ese mismo trabajo se obtuvieron dos cepas de *L. lactis* capaces de expresar y secretar simultáneamente nisina y pediocina PA1. Es decir, se ampliaba la utilidad de *L. lactis* como bioconservante al coproducir esas dos bacteriocinas: además de su actividad frente a *Listeria*, esas cepas también serían efectivas frente a los clostridios y sus esporas, gracias a la producción de nisina (Horn et al., 1999).

A pesar de los avances logrados en la producción heteróloga de pediocina PA-1 en *L. lactis*, la utilización de cepas llamadas “de laboratorio” para su consecución hace que los resultados no tengan aplicación industrial inmediata. En este contexto, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue producir niveles adecuados de pediocina PA-1 en cepas de *L. lactis* de interés para la industria láctea.

IX.1.1. Empleo de cepas de interés industrial como hospedador heterólogo

En la industria láctea, y especialmente durante la elaboración de queso, es necesario que el cultivo iniciador produzca ácido rápidamente, contribuya a la proteólisis, tenga resistencia a los bacteriófagos y desarrolle el flavor adecuado en el producto (Law, 2001). Sin embargo, en los laboratorios de investigación suelen emplearse cepas “de laboratorio” para las que se dispone de una gran variedad de herramientas de trabajo y están perfectamente caracterizadas. Éste es el caso de las dos cepas de *L. lactis* más habituales en investigación, IL1403 y MG1363 descritas inicialmente por Chopin *et al.* (1984) y Gasson (1983), de las que incluso se ha hecho público su genoma completo (Bolotin *et al.*, 2001; Makarova *et al.*, 2006). Es probable que las industrias de cultivos iniciadores hayan secuenciado algunas de sus cepas, pero difícilmente harán públicas dichas secuencias (Johansen, 2003).

Estas cepas “de laboratorio” proceden originalmente de cepas comerciales, pero las manipulaciones realizadas para facilitar el trabajo de investigación hacen que sus propiedades tecnológicas disten mucho de ser adecuadas para la industria. En primer lugar, carecen de plásmidos, donde precisamente se suelen encontrar muchos genes importantes para la industria. Éste es el caso de los relacionados con el metabolismo de la lactosa y la producción de proteinasa, necesarios para la acidificación y la coagulación de la leche, y de muchos genes de resistencia a bacteriófagos. Además, en la cepa MG1363 se ha eliminado un profago. La presencia de un profago confiere cierta inmunidad frente a la infección por otros fagos y facilita la autólisis, una característica muy favorable para el desarrollo del flavor del queso (Johansen, 2003).

Por otra parte, las estrategias de manipulación genética están optimizadas para las cepas utilizadas en los laboratorios, por lo que cuando se trabaja con cepas salvajes es necesario adaptar las técnicas y los protocolos, como ha sucedido en la realización del trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral. En este tipo de cepas, la eficiencia de la transformación suele ser muy reducida, bien por dificultad para obtener células electrocompetentes o por la presencia de otros plásmidos en el interior de la cepa, lo cual dificulta la aceptación de un nuevo vector (Gravesen *et al.*, 1997; Sørensen *et al.*, 2000). Además, existen mecanismos de resistencia en *Lactococcus* que reconocen y

degradan el DNA extraño, independientemente de que sea un plásmido o un fago, por lo que las posibilidades de introducir y mantener un plásmido en el interior de la célula son escasas (Forde y Fitzgerald, 1999). Finalmente, un escollo adicional para trabajar con cepas de interés industrial es el gran desconocimiento de sus necesidades nutritivas individuales.

Las cepas elegidas para desarrollar este trabajo han sido *L. lactis* subsp. *lactis* ESI 153 y ESI 515, siendo esta última productora de nisina de forma natural (Nis⁺). Ambas cepas fueron aisladas de quesos artesanos y se caracterizan por tener buena capacidad tecnológica para la elaboración de quesos (Cogan et al., 1997). Además, se han utilizado como cultivos adjuntos en la elaboración de quesos en varios trabajos (Rodríguez et al., 1998; Gómez et al., 1999).

IX.1.2 Expresión heteróloga de pediocina PA-1 empleando el sistema secretor de la lactococina A

La estrategia inicial empleada para producir heterológamente pediocina PA-1 en *L. lactis* ESI 153 y ESI 515 (Nis⁺) fue la misma que utilizaron Horn et al. (1999) con cepas de laboratorio: aprovechar la homología de líderes y del sistema de secreción de la lactococina A, una bacteriocina lactocócica de la clase IIa. De hecho, se empleó el mismo plásmido para comprobar su utilidad en cepas salvajes. La cantidad de pediocina PA-1 producida por los respectivos transformantes, *L. lactis* CL1 (Ped⁺) y *L. lactis* CL2 (Nis⁺, Ped⁺), fue aproximadamente el 30 y 20% de la cantidad que produce normalmente *P. acidilactici* 347. Es decir, se obtuvieron mejores resultados que en el trabajo realizado por Horn et al. (1999), ya que la cantidad de pediocina PA-1 producida en *L. lactis* FI5876 (Nis⁺, Ped⁺) fue sólo el 11% de lo observado en *P. acidilactici* 347. También se confirmó en *L. lactis* ESI 515 (Nis⁺) que la producción de pediocina PA-1 no afectaba en absoluto su capacidad de sintetizar y segregar nisina. Además, la capacidad de producir pediocina PA-1 en *L. lactis* CL1 (Ped⁺) y *L. lactis* CL2 (Nis⁺, Ped⁺) fue muy estable, incluso en ausencia de presión selectiva, indicando que esa nueva propiedad aparentemente no altera el metabolismo normal de la bacteria. Otros autores, en cambio, habían constatado la inestabilidad de la producción de pediocina PA-1 en ausencia del agente selectivo (antibiótico) en transformantes de *L.*

lactis, a pesar de que curiosamente sí se mantenía la resistencia al antibiótico del plásmido en el que se encontraba el operón de la pediocina (Coderre y Somkuti, 1999).

Las peculiares propiedades de la nisina y la pediocina PA-1 y la posibilidad de coproducirlas en cepas de interés industrial abren nuevas posibilidades en la industria láctea. Por un lado, estas bacteriocinas tienen un efecto sinérgico, ya que su mecanismo de acción es distinto, ampliándose mucho el espectro de acción antimicrobiano (Hanlin et al., 1993; Mulet-Powell et al., 1998). Por otra parte, la aparición de resistencias cruzadas en las bacterias sensibles es más difícil (Rekhif et al., 1994). De hecho, la efectividad como cultivos auxiliares de los transformantes *L. lactis* CL1 (Ped⁺) y *L. lactis* CL2 (Nis⁺, Ped⁺) para controlar *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli* O157:H7 se ha comprobado durante la elaboración de quesos experimentales. Empleando un nivel de contaminación inicial muy superior al que se podría esperar de forma natural en la leche, se consiguieron reducciones de 2,97, 0,98 y 1,69 unidades logarítmicas, respectivamente, para cada uno de los patógenos (Rodríguez et al., 2005).

IX.1.3 Mejora de la producción heteróloga de pediocina PA-1 empleando promotores fuertes

Uno de los aspectos claves que determinan la eficiencia y el control de la expresión génica es la fuerza y la inducibilidad del promotor del gen durante la iniciación de la transcripción. El promotor que dirigía la expresión de la pediocina PA-1 en *L. lactis* CL1 (Ped⁺) y *L. lactis* CL2 (Nis⁺, Ped⁺) era el promotor de la lactococina, de carácter constitutivo y débil. Se planteó, por tanto, la posibilidad de emplear un promotor constitutivo más fuerte, como P32, muy utilizado en la manipulación genética de los lactococos (Van de Guchte et al., 1989). Este promotor se combinó con diversos plásmidos (pMC117, pRK119, pCNC16) utilizados anteriormente para la producción heteróloga de pediocina PA-1 en estudios con cepas de laboratorio, para evaluar la estrategia más adecuada en las cepas *L. lactis* ESI 153 y ESI 515 (Nis⁺) (Chikindas *et al.*, 1995; Kemperman, comunicación personal).

Los plásmidos pMC117, pRK119 y pCNC16 contienen el operón *ped* completo bajo el control del promotor lactocócico P32, diferenciándose en el marcador de selección (resistencia a eritromicina en pMC117 y a cloranfenicol en pRK119 y

pCNC16) y en el número de copias del plásmido por célula (entre 5 y 6 veces más copias por célula en pCNC16 que en pMC117 y pRK119) (Chikindas et al., 1995; Kemperman et al., comunicación personal). La producción de pediocina PA-1 en todos los transformantes de *L. lactis* ESI 153 y ESI 515 obtenidos con estos plásmidos, en los que el operón estaba bajo el control del promotor P32, fue superior a la observada anteriormente con el promotor de la lactococina A en *L. lactis* CL1 (Ped⁺) y *L. lactis* CL2 (Nis⁺, Ped⁺). Estos resultados pueden ser la respuesta a una mayor capacidad biosintética de las cepas, al contener el operon *ped* completo. Otra razón puede ser la mayor fuerza del promotor P32 empleado, un factor clave en el control de la expresión génica.

Por otra parte, en los transformantes de *L. lactis* ESI 153 y ESI 515 (Nis⁺) conteniendo el plásmido pMC117, *L. lactis* MC1 (Ped⁺) y MC2 (Nis⁺, Ped⁺), respectivamente, la producción de pediocina PA-1 fue un 15 y un 50% de la producción de *P. acidilactici* 347. Es decir, en estas cepas fue superior a la obtenida anteriormente en cepas de laboratorio (Chikindas et al. (1995). Ese mismo vector se había utilizado en un lactococo que formaba parte de un cultivo iniciador para la industria quesera. La producción de pediocina PA-1 en el queso por el transformante *L. lactis* MM217 era muy inferior a la observada anteriormente en las cepas de laboratorio. Sin embargo, la inhibición de *L. monocytogenes* fue evidente (Buyong et al., 1998; Chikindas et al., 1995).

Curiosamente, el cambio del marcador de selección del plásmido, resistencia a cloranfenicol en vez de resistencia a eritromicina, permitió un notable aumento de la producción de pediocina PA-1. En cambio, el número de copias por célula del operon *ped* no tuvo influencia. En los derivados de *L. lactis* ESI 153 que contenían los plásmidos pRK119 y pCNC16 (resistencia al cloranfenicol), denominados *L. lactis* RK1 (Ped⁺) y CNC1 (Ped⁺), respectivamente, la producción de pediocina PA-1 supero notablemente (163 y 165%) el nivel producido por *P. acidilactici* 347. Los derivados del productor natural de nisina *L. lactis* ESI 515 (Nis⁺) que contenían esos mismos plásmidos, denominados *L. lactis* RK2 (Nis⁺, Ped⁺) y CNC2 (Nis⁺, Ped⁺), produjeron el mismo nivel de pediocina que *P. acidilactici* 347, al tiempo que mantenían su nivel natural de producción de nisina. Por lo tanto, estos nuevos transformantes se

consideran muy atractivos para controlar no sólo a *L. monocytogenes*, sino también a otros muchos patógenos en la industria alimentaria, puesto que tienen la peculiaridad de coproducir pediocina PA-1 y nisina a niveles comparables a los de las cepas parentales.

En ocasiones los promotores constitutivos tienen algunos problemas, bien por tratarse de promotores débiles, como *PlcnA*, o bien por ser fuertes, ya que la elevada producción de proteína puede conducir a su agregación, acumulación y/o degradación intracelular (Makrides, 1996). Para evitar estos problemas, se han desarrollado nuevos sistemas de expresión basados en promotores inducibles, que permiten controlar la expresión génica mediante un inductor, un represor o factores ambientales, como el pH, la temperatura o la concentración de ciertos iones (Nouaille et al., 2003). De los diversos sistemas de expresión génica desarrollados para las bacterias lácticas, el de mayor interés está basado en el promotor inducible de la nisina (*PnisA*) (de Vos y Gasson, 1989; Kuipers et al., 1995, 1997). El interés de este sistema se debe al peculiar sistema de autorregulación de la biosíntesis de la nisina y al hecho de que es un bioconservante de grado alimentario autorizado con fines alimentarios en numerosos países. El nivel basal de expresión de los genes bajo el control de *PnisA* en cepas que contienen las proteínas NisR y NisK pero que no producen nisina, es despreciable. 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 *nisA*, siendo el nivel de expresión proporcional a la cantidad de nisina añadida. Este sistema se ha aplicado con éxito para la producción de pediocina PA-1 y de otras bacteriocinas (Horn et al., 2004).

IX.1.4. Integración cromosómica del gen que codifica la pediocina PA-1 en *L. lactis*

A pesar de los niveles de pediocina PA-1 tan satisfactorios obtenidos en las cepas *L. lactis* RK1 (Ped⁺), RK2 (Nis⁺, Ped⁺), CNC1 (Ped⁺) y CNC2 (Nis⁺, Ped⁺), la presencia de marcadores de selección no deseados en los plásmidos que portan hace inviable su utilización en la industria alimentaria. A este respecto, otro de los objetivos planteados durante el transcurso de esta Tesis Doctoral fue la obtención de cepas de *L.*

lactis capaces de producir pediocina PA-1 o coproducir pediocina y nisina A en las que no hubiese genes de resistencia a antibióticos como marcadores de selección con el objetivo de que se puedan considerar de grado alimentario.

Una de las posibles alternativas es reconstruir las cepas de manera adecuada, mediante la integración cromosómica del operón *ped*. Esto permitiría prescindir del empleo de antibióticos como marcadores de selección y estabilizar las características codificadas en los genes integrados. Los sistemas de integración cromosómica se basan en plásmidos no replicativos o de replicación condicionada (de Vos y Simons, 1994). Una posibilidad es emplear un vector que no disponga del gen que codifica la proteína RepA, necesaria para su replicación, y que contenga una región de homología con el cromosoma de la célula hospedadora. Al introducir el vector en un hospedador adecuado, los genes se integran mediante recombinación por homología con entrecruzamiento sencillo o integración Campbell (de Vos, 1999). Si el plásmido integrativo contiene dos regiones de homología con el cromosoma de la célula hospedadora, que estén cercanas entre sí como, por ejemplo, el fragmento inicial y final de la secuencia de un determinado gen, la recombinación conlleva la sustitución total del gen. Esta recombinación puede ocurrir simultáneamente produciéndose un entrecruzamiento doble o consecutivamente, ocurriendo en primer lugar un entrecruzamiento sencillo y, a continuación, la delección de la secuencia correspondiente al vector. Esta modificación genética se considera segura y las cepas resultantes, por lo tanto, aptas para llegar al consumidor.

A la dificultad que presenta habitualmente este tipo de recombinación en las cepas de laboratorio, se suman las propias de trabajar con cepas industriales. El gen en el que se llevará a cabo la recombinación no debe modificar la capacidad tecnológica de la cepa industrial. Además, la construcción del vector integrativo debe ser individual para cada cepa, puesto que la secuencia del gen seleccionado puede diferir de una cepa a otra. Por este motivo, se abordó el problema empezando la integración cromosómica para la producción heteróloga de pediocina PA-1 en una cepa de laboratorio, *L. lactis* MG1614. El plásmido para la integración se preparó clonando los genes necesarios para la biosíntesis de la pediocina PA-1 (utilizando el sistema de intercambio de líderes, genes *lcnA/pedA*, *lcnC* y *lcnD*) entre dos fragmentos del gen

gala. Con este plásmido se construyó la cepa *L. lactis* CR, en la que se confirmó la presencia de los genes de interés, pero no se pudo detectar producción de pediocina. Sin embargo, sí se detectó producción de pediocina PA-1 en otra cepa de *L. lactis* en la que se introdujo el plásmido y que porta varias copias del gen *repA* en su cromosoma que permiten su replicación. La integración de una única copia de los genes de interés en el cromosoma de *L. lactis* MG1614 puede explicar la ausencia de producción de pediocina en *L. lactis* CR. Por lo tanto, esta alternativa no se considera adecuada para la construcción de cultivos bioprotectores para la industria alimentaria y se descartó la posibilidad de construir nuevos vectores adecuados a *L. lactis* ESI 153 y ESI 515 (Nis⁺).

IX.1.5. Construcción de un vector de grado alimentario

Aunque no existe una definición precisa de qué se considera como un organismo modificado genéticamente de grado alimentario, se ha indicado que únicamente puede contener DNA de su misma especie o, teniendo en cuenta una definición un poco más amplia, de otros microorganismos que cumplan con el estatus GRAS (Johansen, 1999). Gracias a esta definición, se ha admitido como GRAS una cepa de *Lactococcus* modificada genéticamente, que se está utilizando en el mercado norteamericano (Kondo y Johansen, 2002).

Para la construcción de un vector de grado alimentario se partió del plásmido pCNC16, puesto que ya se había comprobado que permitía obtener lactococos coproductores de pediocina PA-1 y nisina, y en cantidades muy adecuadas. En este plásmido era necesario eliminar todo DNA no perteneciente a cepas con carácter GRAS. Para ello, en primer lugar, se localizaron con exactitud los genes estrictamente necesarios para la replicación (el *ori* y para la producción de la bacteriocina (el promotor y el operón *ped*). Estas dos regiones se amplificaron y unieron para dar lugar al nuevo vector pGA1. Este plásmido sólo contiene los genes necesarios para la producción de pediocina PA-1, que proceden de *Pediococcus*, y el resto de la secuencia (*Ori*⁺, gen *repA* y promotor P32) pertenece a *Lactococcus*, por lo que puede considerarse de grado alimentario de acuerdo con la definición de Sørensen et al. (2000).

Los transformantes obtenidos a partir de *L. lactis* ESI 153 y ESI 515, mediante la transformación con el plásmido pGA1, denominados *L. lactis* GA1 (Ped⁺) y GA2 (Nis⁺, Ped⁺), respectivamente, produjeron entre 10 y 3 veces menos pediocina PA-1 que los derivados que tenían el plásmido original pCNC16 (*L. lactis* RK1 y RK2). Este resultado era de esperar, dada la eliminación de ciertas secuencias presentes en el plásmido. Como se había observado anteriormente con otros plásmidos, la presencia de este vector de grado alimentario no modificó la producción de nisina en la cepa *L. lactis* GA2. En consecuencia, este sistema de coproducción de ambas bacteriocinas representa un logro muy atractivo para la industria alimentaria.

Finalmente, era obligado comprobar la utilidad en la práctica de estas cepas de grado alimentario. Para ello se elaboraron quesos experimentales con los derivados construidos y leche contaminada con 10⁴ ufc/mL de *Listeria innocua*. Aunque el agente causal de la listeriosis y, por tanto, el microorganismo a controlar en la industria láctea es *L. monocytogenes*, su elevada patogenicidad y el elevado volumen de residuos que se generan durante la elaboración de queso, imposibilitaban su empleo para las fabricaciones en las instalaciones disponibles. Por otra parte, el efecto inhibitorio de la pediocina PA-1 frente a *L. innocua* es similar al ejercido por esta bacteriocina frente a distintas cepas de *L. monocytogenes* como Ohio y Scott A.

Al final de la maduración, y a pesar de la menor producción de pediocina PA-1 observada *in vitro*, los recuentos del patógeno en los quesos se encontraron por debajo de 50 ufc/g en el caso de *L. lactis* GA1 (Ped⁺) y de 25 ufc/g en *L. lactis* GA2 (Ped⁺, Nis⁺). Estos niveles corresponden, respectivamente, a reducciones de 2,35 y 2,65 ciclos logarítmicos de la población inicial de *Listeria*. Esta reducción resulta muy interesante para controlar la presencia de microorganismos del género *Listeria*, teniendo en cuenta que, como se comentó anteriormente, estos niveles del patógeno son superiores a los que se suelen encontrar en la práctica. Por lo tanto, cabe esperar una mejora en la inhibición cuando la población de dicho microorganismo sea más reducida. A pesar de que se recomienda la ausencia de *Listeria* en 25 g de queso, se considera aceptable aquel producto que contiene menos de 100 ufc/g (Recomendación 2005/175/CE). Tras la maduración de los quesos elaborados en este estudio, los recuentos de *Listeria* se encontraron entre 25 y 50 ufc/g, por lo que se considerarían

aptos para el consumo. Por otra parte, se confirma la actividad sinérgica de las bacteriocinas producidas por *L. lactis* GA2, nisina y pediocina PA-1, observada en ocasiones anteriores y por otros autores (Hanlin et al., 1993; Mulet-Powell et al., 1998; Horn et al., 2004).

En consecuencia, la capacidad inhibidora frente a *Listeria* que exhiben *in situ* las cepas *L. lactis* GA1 y GA2 y la presencia exclusiva de DNA procedente de bacterias seguras podrían abrir camino a su utilización como cultivos iniciadores o adyuvantes en la industria láctea. La conversión de resultados de investigación en innovaciones útiles para la industria es bastante más compleja de lo que se puede apreciar a primera vista (Pedersen *et al.*, 2005). Sin embargo, aunque la modificación genética provoca bastante rechazo por parte de los consumidores, cabría esperar que esta situación cambie en el futuro. Sobre todo en casos como el aquí referido, dado que las cepas construidas mejoran las condiciones higiénicas y la seguridad del producto final, al tiempo que reducen la necesidad de aditivos químicos o la intensidad de tratamientos tecnológicos complementarios.

IX.2. LA MICROBIOTA DE LA LECHE HUMANA

En general, la leche materna constituye el mejor alimento para los bebés durante los primeros meses de su vida ya que satisface todos sus requerimientos nutritivos durante esta etapa de rápido crecimiento. Por ello, se recomienda que el destete no se inicie hasta los 6 meses y que, llegada esta edad, se haga de forma gradual, de tal manera que se mantenga un aporte de leche humana durante un tiempo no inferior a los dos años (WHO, 2001). Desafortunadamente, durante algunas décadas la lactancia estuvo considerada por diversos sectores como una práctica anticuada e incompatible con un estilo de vida “moderno”, creando una inercia que todavía no se ha superado completamente. En este sentido, los condicionantes socio-laborales representan, con diferencia, la primera causa de destete precoz o forzado. No obstante, en los últimos años se ha producido una cierta inflexión al constatar que, a pesar de los grandes avances en el campo de la nutrición infantil, todavía existen diferencias cuantitativa y cualitativamente importantes entre la leche humana y las fórmulas

infantiles. En este sentido, la lactancia materna constituye un derecho fundamental para el niño (WHO/UNICEF, 1989).

Entre las ventajas “no nutricionales” que confiere la leche materna al recién nacido destaca su elevada capacidad de protección frente a enfermedades infecciosas (López-Alarcón et al., 1997; Morrow y Rangel, 2004; Wright et al., 1998). Resulta ilustrativo el hecho de que en neonatos prematuros, particularmente sensibles a este tipo de enfermedades, la alimentación exclusiva con leche materna conlleva una menor incidencia de enterocolitis necrotizante (Lucas y Cole, 1990) y septicemia (El-Mohandes et al., 1997; Ronnestad et al., 2005), una tolerancia más rápida a la nutrición enteral y una menor dependencia de la nutrición parenteral (Schanler, 2000).

Este efecto protector puede ser debido a la acción combinada de algunos componentes de la leche, como inmunoglobulinas, células inmunocompetentes, ácidos grasos antimicrobianos, oligosacáridos fucosilados, lisozima, lactoferrina y péptidos antimicrobianos (Newburg, 2005; Saavedra, 2002). Recientemente, se ha demostrado que estos componentes pueden inactivar patógenos de forma individual, aditiva y/o sinérgica (Isaacs, 2005). Además, la leche materna también contiene sustancias prebióticas que estimulan de forma selectiva el crecimiento de bacterias deseables en el intestino infantil (Dai y Walker, 1999; Drasar y Roberts, 1990).

Desde un punto de vista microbiológico, los estudios sobre leche materna son muy escasos y, en cualquier caso, se han restringido casi exclusivamente a la detección e identificación de bacterias potencialmente patógenas en leche almacenada en bancos o en casos de mastitis (Bingen et al., 1992; El-Mohandes et al., 1993; Wright y Fenny, 1998; Le Thomas et al., 2001; Ng et al., 2004); en contraste, apenas existen estudios sobre la microbiología de la leche humana obtenida de mujeres sanas, lo cual no es de extrañar si se tiene en cuenta que este fluido se había considerado estéril hasta hace pocos años a pesar de la inexistencia de trabajos científicos que avalaran tal esterilidad. Por este motivo, el conocimiento sobre los microorganismos comensales presentes en la leche humana es todavía muy limitado. No obstante, los escasos estudios existentes hasta la fecha señalan que, entre las bacterias que se aíslan con mayor frecuencia, destacan diversas especies de los géneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*,

Streptococcus, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (Gavin y Ostovar, 1977; Heikkilä y Saris, 2003; Ng et al., 2004; West et al., 1979). En esta Tesis, el empleo de medios de cultivo adecuados para el aislamiento de bacterias lácticas confirmó que la leche materna es una excelente fuente de estas bacterias y, particularmente, de lactobacilos y enterococos. El hecho de que bacterias pertenecientes a los citados géneros se puedan aislar fácilmente de leche obtenida a partir de mujeres residentes en países muy distantes entre sí sugiere que su presencia no es un fenómeno aislado sino que, al contrario, se trata de una característica propia de la leche. Por lo tanto, sería más justo considerar que tales bacterias no son el resultado de una mera contaminación sino que realmente constituyen la microbiota natural de este fluido biológico.

La leche humana es uno de los factores clave en la iniciación y el desarrollo de la microbiota intestinal del neonato ya que este fluido garantiza un aporte continuo de bacterias durante todo el periodo de lactancia. De hecho, posiblemente se trate de la principal fuente de bacterias para el recién nacido ya que se estima que un lactante que ingiera aproximadamente 800 ml de leche al día recibe entre 1×10^5 y 1×10^7 bacterias comensales y/o potencialmente beneficiosas (Heikkilä y Saris, 2003), dato que también se ha confirmado durante la realización de esta Tesis. Por lo tanto, y como se ha comentado anteriormente, no es de extrañar que la microbiota intestinal del lactante refleje la existente en la leche materna (Heikkilä y Saris, 2003). Por ejemplo, la concentración de lactobacilos y enterococos es significativamente más elevada en la microbiota intestinal de lactantes que en la de niños alimentados con fórmulas (Ahrné et al., 2005; Rinne et al., 2005).

Recientemente, la construcción de librerías génicas a partir de muestras de leche de mujeres sanas permitió la detección de secuencias correspondientes a un máximo de 12 especies bacterianas (Martín, 2005). El predominio de un pequeño número de especies en este fluido podría explicar porqué la microbiota intestinal de lactantes sanos está compuesta por un reducido espectro de especies y cepas (Ahrné et al., 2005). La presencia de un espectro bacteriano muy reducido también podría explicar porqué el desarrollo de una microbiota mucho más diversa coincide precisamente con el inicio del destete (Favier et al., 2002; Hall et al., 1990). La

microbiota intestinal infantil está profundamente influenciada por la dieta y, en este sentido, la introducción de alimentos sólidos, junto con la retirada progresiva de la leche, provoca cambios drásticos en su composición (Favier et al., 2002; Mackie et al., 1999). Es probable que este hecho sea el principal responsable de las diferencias observadas entre la microbiota intestinal de los niños que reciben lactancia materna y la de aquellos alimentados con fórmulas infantiles (Benno et al., 1984; Favier et al., 2002; Harmsen et al., 2000; Mackie et al., 1999; Yoshioka et al., 1983). Precisamente, la composición microbiológica constituye actualmente una de las mayores diferencias entre la leche humana y las fórmulas infantiles.

IX.II.1. Origen y función de las bacterias lácticas aisladas de leche materna

Como se ha comentado en la sección anterior, en los últimos años se han aislado diversas especies de bacterias a partir de la leche humana, incluyendo *E. faecium* y *E. faecalis* (Heikkilä y Saris, 2003). Sin embargo, el origen de las bacterias presentes en este fluido biológico es objeto de controversia.

La idea de que la colonización del intestino del neonato empieza durante el parto debido a la contaminación de la cavidad oral del recién nacido con bacterias procedentes de las mucosas vaginal e intestinal de la madre ha sido ampliamente aceptada a pesar de no existir evidencias científicas (Favier et al., 2002; Isolauri et al., 2001; Tannock, 1995). Posteriormente, las bacterias pasarían de la boca del niño al pecho de la madre y de ahí a la leche. Tal hipótesis es contraria a los hallazgos de esta Tesis. De hecho, resultados obtenidos por otros miembros de nuestro grupo de investigación mediante la utilización de métodos de microbiología molecular (PCR-DGGE y/o librerías de clones), indican que no existen diferencias destacables entre la composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota intestinal de niños nacidos por cesárea y la de los nacidos por parto (Martín, 2005). Por otra parte, Heikkilä y Saris (2003) aislaron cepas de *Lb. rhamnosus* con un perfil genético indistinguible de la cepa comercial GG y también cepas de *L. lactis* productoras de nisina a partir de leche de mujeres finlandesas. *Lb. rhamnosus* GG es una cepa consumida frecuentemente en Finlandia a través de productos lácteos que son muy populares en aquel país nórdico mientras que las cepas de *L. lactis* productoras de nisina se aíslan habitualmente a

partir de alimentos fermentados. En consecuencia, es poco probable que estos aislados estuvieran presentes en la leche materna como resultado de una mera contaminación vaginal.

En cualquier caso, el papel prácticamente irrelevante de la microbiota vaginal en la colonización intestinal del neonato ha sido puesto de manifiesto durante los últimos años gracias al empleo de técnicas moleculares (Ahrné et al., 2005; Fanaro et al., 2003; Matsumiya et al., 2002; Tannock et al., 1990). Por otra parte, diversos estudios han demostrado que las bacterias que colonizan inicialmente el intestino neonatal se transmiten de forma vertical entre la madre y el niño, incluso en aquellos nacidos por cesárea, y todos los indicios sugieren que la leche puede resultar un elemento clave en esta transmisión (Ahrné et al., 2005; Favier et al., 2002; Matsumiya et al., 2002; Qutaishat et al., 2003; Schultz et al., 2004; Tannock et al., 1990). Por lo que respecto al posible papel de la piel como fuente de bacterias lácticas para el intestino del recién nacido, en esta Tesis Doctoral se ha comprobado la gran dificultad o, en muchos casos, imposibilidad de aislar bacterias lácticas a partir de la piel que rodea al pecho materno.

En esta Tesis se ha observado que los enterococos forman parte de la microbiota asociadas a la leche humana fresca, lo que coincide con los resultados de otros estudios (Eidelman y Szilagyi, 1979; Heikkilä y Saris, 2003; Ng et al., 2004; West et al., 1979). De hecho, en los últimos años se han podido detectar estas y otras bacterias propias de las mucosas del aparato digestivo de la madre (estreptococos, estafilococos, enterococos, lactobacilos, propionibacterias...) en muestras de corioamnion, líquido amniótico y/o sangre de cordón umbilical de niños sanos en los que las membranas placentarias estaban intactas (Bearfield et al., 2002; Dasanayake et al., 2005; Hitti et al., 1997; Jiménez et al., 2005). Curiosamente, las bacterias predominantes en las muestras perinatales citadas coinciden con las que se han encuentran en la leche humana, lo que sugiere que podrían acceder desde el aparato digestivo a la circulación sistémica y, posteriormente, aparecer en fluidos como el líquido amniótico o la leche materna. En otras palabras, al menos una parte sustancial de las bacterias comensales existentes en leche materna podrían proceder de la microbiota intestinal de la madre y accederían al epitelio de la glándula mamaria a

través de la ruta enteromamaria, una conexión bien documentada que se establece durante los últimos meses de gestación y la lactancia.

Aunque el mecanismo por el que los enterococos y otras bacterias Gram-positivas podrían atravesar el epitelio intestinal no se ha dilucidado todavía, algunos trabajos recientes ofrecen posibilidades muy interesantes, que implican interacciones no destructivas entre las bacterias, las células del epitelio intestinal y ciertas células del sistema inmunitario, como las células dendríticas o los macrófagos (Langa, 2006; Qutaishat et al., 2003; Rescigno et al., 2001; Vazquez-Torres et al., 1999). En cualquier caso, las bacterias del intestino materno deberían reunir al menos tres propiedades para alcanzar primero el epitelio de la glándula mamaria y, después, el intestino del niño: (1) capacidad de translocación a través del epitelio intestinal, (2) capacidad para interactuar con los componentes del sistema inmunitario en la lámina propia del intestino y en la circulación sistémica sin ser destruidas, y (3) capacidad para sobrevivir durante el tránsito por el aparato digestivo del lactante.

La capacidad de translocación de ciertos lactobacilos y enterococos sin causar efectos perjudiciales para el hospedador ha sido puesta de manifiesto tanto *in vitro* como *in vivo* (Berg, 1995; Berg y Garlington, 1979; Jiménez et al., 2005; Rodríguez et al., 2001; Langa, 2006). Es más, la translocación de las bacterias lácticas en la cavidad oral de mujeres embarazadas con una placenta completamente normal deriva en la presencia de estas bacterias en el líquido amniótico, un proceso que tiene una clara influencia beneficiosa en el proceso de gestación ya que se ha asociado a una menor tasa de prematuridad (Dasanayake et al., 2005). Recientemente, Hufnagel et al. (2005) observaron que el suero de humanos sanos contiene de forma natural anticuerpos específicos frente a las cápsulas de los enterococos, lo que demuestra la presencia regular de estas bacterias en la sangre sin que ello conlleve ninguna situación patológica para el anfitrión.

Por otra parte, se sabe que en el intestino se establecen interacciones específicas entre células del sistema inmunitario y ciertas bacterias lácticas, las cuales pueden propiciar la translocación de cepas que se encuentran en la leche humana (Christensen et al., 2002). En este mismo sentido, Langa (2006) detectó la activación

de células dendríticas pertenecientes a dos líneas celulares (D1 de origen murino y KG1 de origen humano) en presencia de algunas cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Enterococcus* mediante el análisis de marcadores de activación. Por ejemplo, las células D1 mostraron una notable activación en presencia de *E. faecium* M1a y *Lb. salivarius* CECT 5713 ya que se observó un aumento significativo en la expresión de los marcadores MHC-II y B7.2 (CD86) en aproximadamente el 60% de las células D1 expuestas a las citadas cepas. Estos resultados concuerdan con los de otros trabajos previos en los que también se había demostrado que las bacterias lácticas tienen un papel claramente estimulador en células dendríticas inmaduras de ratón (Drakes et al., 2004).

Tradicionalmente se pensaba que las bacterias sólo podían atravesar el epitelio intestinal intacto a través de las células M, unas células epiteliales especializadas que se localizan en las placas de Peyer, pero Rescigno et al. (2001) demostraron que las células dendríticas (CD18+) existentes en la lámina propia pueden penetrar el epitelio intestinal intacto y captar bacterias directamente de la luz intestinal. Más concretamente, las células dendríticas son capaces de abrir las zonas de oclusión entre enterocitos adyacentes, proyectar dendritas al exterior del epitelio y captar células viables, preservando la integridad de la barrera intestinal mediante la expresión de las proteínas que integran las zonas de oclusión. Una vez en el interior de las células del sistema inmunitario, las bacterias pueden migrar desde la mucosa intestinal y colonizar mucosas distantes, como la de los tractos respiratorio y genitourinario, la de las glándulas salivares y lacrimales, y, lo que es más relevante para este trabajo, la de la glándula mamaria de las mujeres embarazadas y/o lactantes (Roitt, 1994). Precisamente, durante el período de lactancia, se produce un acúmulo selectivo de células del sistema inmunitario en la glándula mamaria mediante un proceso regulado por las hormonas lactogénicas (Bertotto et al., 1991).

Con respecto a la supervivencia de las bacterias lácticas en la corriente sanguínea/linfática, es interesante señalar que 57 de las 166 cepas de enterococos y 125 de las 485 cepas de lactobacilos depositadas en la prestigiosa colección PROSAFE (derivada del proyecto de la UE titulado “*Biosafety evaluation of lactic acid bacteria used for human consumption*”) fueron aisladas originalmente de muestras de sangre

humana obtenida, en la mayoría de los casos, de individuos sanos (Vankerckhoven et al., 2004). Entre esas 182 cepas se encuentran dos especies de enterococos y 16 de lactobacilos, incluyendo todas las especies a las que pertenecen las cepas identificadas en las muestras de leche analizadas en el transcurso de esta Tesis. Resulta particularmente ilustrativo que de las 57 cepas de enterococos aisladas de sangre, 53 (93%) pertenezcan a la especie *E. faecium*, precisamente la especie que se ha encontrado de forma mayoritaria en la leche de las mujeres que participaron en nuestro estudio.

Finalmente, un estudio reciente de nuestro grupo de investigación ha demostrado la elevada supervivencia de diversas cepas de lactobacilos de leche humana cuando se exponen a las condiciones existentes durante el tránsito por el tracto gastrointestinal (Martín et al., 2005). De hecho, un reciente estudio ha corroborado que la administración oral de *Lb. gasseri* CECT 5714 a personas adultas va seguida de su presencia en el intestino (Olivares et al., 2006). Lo mismo se ha observado con una de las cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de leche materna en esta Tesis cuando se administró a ratonas gestantes (Fernández et al., 2004). Este hecho no es de extrañar ya que precisamente la resistencia a la exposición a condiciones ácidas y/o a la presencia de sales biliares son características comunes entre los enterococos.

Este hecho implicaría que la capacidad de algunas bacterias lácticas intestinales para extenderse a otros tejidos u órganos de hospedadores humanos sanos habría sido tradicionalmente infravalorada. Aunque los problemas clínicos relacionados con lactobacilos son muy escasos, se han descrito algunos casos de endocarditis, septicemia o abscesos hepáticos causados por estas bacterias, habitualmente en pacientes con graves enfermedades previas (Alvarez-Olmos y Oberhelman, 2001; Rautio et al., 1999). Obviamente tales casos no son representativos de lo que puede suceder en un hospedador sano pero ilustran el hecho de que ciertos lactobacilos tienen mecanismos para extenderse desde el intestino a localizaciones extraintestinales. En un hospedador sano, estas bacterias no provocan sintomatología, por lo que no se investiga su presencia extraintestinal y pasan desapercibidas. Conviene recalcar que el consumo de lactobacilos (y otras bacterias lácticas) es extraordinariamente seguro ya que cada año se consumen en el mundo billones de dosis de productos que los

contienen (Hamilton-Miller et al., 1999; Reid, 2002) y el escasísimo número de casos clínicos en los que están implicados se puede considerar prácticamente irrelevante desde un punto de vista epidemiológico.

IX.2.2. El caso particular de los enterococos

Por lo que respecta a los enterococos, algunas cepas pueden actuar como patógenos oportunistas y causar infecciones nosocomiales en niños que sufren enfermedades graves que requieren, habitualmente, convalecencias prolongadas (Moellering, 2000). Hasta hace poco tiempo, se pensaba que las infecciones enterocócicas se adquirían endógenamente, es decir, a partir de la propia flora del paciente; sin embargo, en los últimos años los análisis de casos clínicos han demostrado que prácticamente todas las cepas involucradas tenían un origen exógeno (Kayser, 2003). En este sentido, actualmente se sabe que las infecciones por enterococos suelen seguir un proceso que consta de dos etapas (Kayser, 2003); inicialmente, se produce una colonización asintomática de los pacientes con cepas que poseen factores de virulencia y resistencia a antibióticos y que son endémicas en un hospital o unidad hospitalaria; seguidamente, esta población exógena crece, a menudo favorecida por la eliminación de competidores debida a la antibioterapia, y puede conducir a una enfermedad adicional en pacientes de riesgo (normalmente con enfermedades graves y/o crónicas que requieren una larga hospitalización). Conviene destacar que, incluso en pacientes inmunodeprimidos, los enterococos por sí solos son a menudo incapaces de causar una enfermedad y requieren para ello la presencia de una microbiota patógena compleja (Kayser, 2003). En cualquier caso, no se debe generalizar esta consideración a todos los enterococos ya que la incidencia de factores de virulencia y de resistencia a antibióticos depende de cada cepa (Eaton y Gasson, 2001; Franz et al., 2001; Temmerman et al., 2003). Vancanneyt et al. (2002) compararon los genotipos de numerosas cepas de *E. faecium* aisladas de muestras humanas, animales y alimentarias, y encontraron que todos los aislados humanos involucrados en infecciones clínicas podrían englobarse en un mismo subgrupo, distinto de todos los demás; los resultados de ese trabajo sugieren que seguramente existe una base genética común a todas las cepas potencialmente peligrosas. Pillai et al. (2002) también han sugerido la existencia de subpoblaciones virulentas entre las

cepas de *E. faecalis*. En consecuencia, la seguridad de cualquier cepa de *Enterococcus* spp. de interés clínico o industrial debe ser evaluada de forma individual y meticulosa.

Por este motivo, se analizó la presencia de los genes que codifican factores de virulencia conocidos o presuntivos (*efaA_{fs}*⁺, *efaA_{fm}*⁺, *esp_{fs}*⁺, *esp_{fm}*⁺, *cpd*⁺, *cob*⁺, *ccf*⁺, *cad*⁺, *gelE*⁺, *agg*⁺, *vanA*, *vanB* y *cylMBA*⁺) y de diversos fenotipos relacionados con la seguridad (gelatinasa, hemólisis, agregación, capacidad de conjugación, actividad proteolítica, antibiograma, degradación de mucinas, producción de aminas biógenas) en las cepas de *E. faecium* aisladas de leche materna en esta Tesis. Los resultados obtenidos por PCR e hibridación de Southern revelaron que ninguna de las cepas analizadas contenía determinantes genéticos de factores de virulencia, a excepción del gen *efaA_{fm}* que estaba presente en todas. Estos resultados coinciden plenamente con los de las pruebas fenotípicas ya que ninguna de las cepas mostró actividad gelatinasa, producción de hemolisina o capacidad de agregación celular. Tampoco se pudo conseguir la transferencia conjugativa de pAD1 desde *E. faecalis* FI9582 a *E. faecium* LC27, a pesar de los repetidos intentos.

La presencia en todas las cepas del gen *efaA_{fm}*, que codifica la supuesta adhesina, no es un hecho preocupante ya que hasta la fecha no se le ha podido atribuir ningún papel en la virulencia de *E. faecium*, en contraste con *efaA_{fs}* de *E. faecalis* (Singh et al., 1998). La presencia de *efaA_{fm}* no tiene valor como indicador de riesgo en ausencia de otros factores de virulencia. De hecho, se halla presente en el 100% de los *E. faecium* que forman parte de cultivos iniciadores analizados por Eaton y Gasson (2001) y, al menos varias de esas cepas, tienen un largo historial de uso seguro en alimentos humanos. Además, el gen *esp_{fm}*, que codifica otra adhesina enterocócica, tampoco se pudo detectar en ninguna cepa. La ausencia de los genes *cylA*, *cylB* y *cylM* explica la ausencia de actividad hemolítica en las cepas analizadas ya que su expresión es imprescindible para la biosíntesis de la citolisina (Gilmore et al., 1994). De forma similar, la ausencia del gen *gelE* está directamente relacionada con la ausencia de actividad gelatinasa.

Algunos enterococos poseen mecanismos de transferencia génica muy eficaces y se sabe que los genes que codifican ciertos factores de virulencia y la resistencia a

algunos antibióticos están asociados con plásmidos altamente transferibles. Sin embargo, en este estudio no fue posible detectar los genes relacionados con feromonas sexuales (*cpd*, *cob*, *ccf* y *cad*) ni el gen de agregación *agg* en las cepas analizadas; estos resultados justifican la falta de agregación celular y la repetida incapacidad de *E. faecium* LC27 para adquirir el plásmido pAD1 mediante conjugación. En consecuencia, el potencial de nuestras cepas para adquirir y/o transferir genes es extremadamente bajo, en caso de que exista. El hecho de que algunos genes indeseables estén codificados en plásmidos que responden a feromonas y que generalmente sólo se encuentran en *E. faecalis* podría explicar la mayor incidencia de factores de virulencia en cepas de esta especie y su marcado predominio (80-90%) entre los enterococos involucrados en infecciones humanas (Kayser, 2003). Aunque se ha descrito la transferencia de genes de resistencia a vancomicina a una cepa probiótica de *E. faecium* (Lund y Edlund, 2001), otras cepas se han mostrado totalmente incapaces para participar en procesos de conjugación (Eaton y Gasson, 2001). En este sentido, Franz et al. (2003) consideran que, en muchos estudios, las tasas de transferencia de genes a cepas de *E. faecium* son muy exageradas ya que las condiciones en las que se realizan los experimentos no son representativas de las que pueden existir en ambientes naturales.

Ninguna de las cepas analizadas produjo histamina, putrescina o cadaverina. Por el contrario, todas las cepas produjeron niveles detectables de tiramina, a excepción de *E. faecium* LM1a y LM22. Las aminas biógenas se producen en ciertos alimentos, como consecuencia de la actividad descarboxilasa de algunos microorganismos, y cuando se encuentran en concentraciones elevadas pueden ocasionar problemas toxicológicos en los consumidores (ten Brink et al., 1990). La histamina y la tiramina tienen propiedades vasoactivas y psicoactivas, mientras que las diaminas putrescina y cadaverina, además de potenciar la toxicidad de las anteriores, son potenciales precursores de nitrosaminas carcinogénicas si simultáneamente existen agentes nitrosables en los alimentos (Bover-Cid y Holzapfel, 1999). En este estudio, se investigó el potencial de las cepas para producir estos compuestos orgánicos en previsión de que algún día se utilicen en alimentos comerciales. No se pudo detectar histamina, putrescina o cadaverina a partir de ninguna de las cepas, mientras que la mayoría formaron tiramina. Las únicas excepciones fueron *E. faecium* LM1a y LM22,

dos aislados procedentes de la misma muestra de leche y que muy posiblemente conformen una misma cepa ya que comparten perfiles genéticos. A diferencia de lo que sucede con otras aminas biógenas, la capacidad para producir tiramina está ampliamente distribuida entre los enterococos (Le Jeune et al., 1995; Bover-Cid y Holzapfel, 1999; Bover-Cid et al., 2001; Gardini et al., 2001). No obstante, la formación de tiramina parece requerir unas condiciones ambientales que sólo se encuentran en alimentos fermentados o alterados (Bover-Cid y Holzapfel, 1999) y, en consecuencia, la presencia de estas cepas en la leche humana o en el intestino del lactante no debe ser considerada como un riesgo para la salud infantil.

Todas las cepas analizadas fueron sensibles a la ampicilina, a la clindamicina, al cloranfenicol, a la tetraciclina y, lo que es más significativo, a la vancomicina. Por el contrario, se mostraron resistentes a la eritromicina, a la ciprofloxacina y a la kanamicina. No se detectaron los genes *vanA* o *vanB* en ninguna de las cepas analizadas. La resistencia a los antibióticos es una propiedad muy importante cuando se evalúa la seguridad de cepas de enterococos. En este contexto, resultan particularmente preocupantes la resistencia frente a gluco péptidos como la vancomicina ya que, en primer lugar, pueden ser transferidas a otras cepas, incluso de otras especies y géneros, y, en segundo lugar, porque estos antibióticos constituyen frecuentemente la única opción para tratar infecciones nosocomiales en hospedadores inmunodeprimidos. Diversos estudios sobre la incidencia de resistencia a antibióticos entre enterococos que no están implicados en infecciones humanas han revelado que la mayoría de las cepas analizadas, especialmente las de *E. faecium*, suelen ser sensibles a los antibióticos clínicamente importantes, incluyendo la vancomicina (Klein et al., 1998; Franz et al., 2001; Temmerman et al., 2003). Recientemente, Temmerman et al. (2003) han demostrado la escasa validez de los métodos basados en difusión a partir de discos para determinar la resistencia real a la vancomicina. A pesar de ello, estos métodos se siguen empleando ampliamente y originan un gran número de falsos resistentes. Por ello, los citados autores sugirieron el empleo de métodos de dilución, como los habitualmente utilizados para establecer concentraciones mínimas en combinación con la detección de los genes *vanAB* por PCR.

La sensibilidad de las cepas a antibióticos tan importantes como la ampicilina, la clindamicina, el cloranfenicol, la tetraciclina y la vancomicina, junto con la ausencia de los genes *vanAB* y la incapacidad manifiesta para adquirir información genética mediante procesos de conjugación, hace que, desde este aspecto, las cepas analizadas se puedan considerar seguras. La resistencia de todas las cepas frente a la kanamicina era un resultado esperado ya que el género *Enterococcus* es intrínsecamente resistente a dicho antibiótico (Franz et al., 1999). Quizás, la prueba más convincente de la seguridad de las cepas de *E. faecium* sea el hecho de que los niños de cuyas madres se obtuvieron las muestras de leche se alimentaron con leche materna que contenía elevadas concentraciones de enterococos ($>10^3$ ufc/ml) durante al menos sus primeros 5 meses de vida y su estado de salud ha sido óptimo hasta la fecha.

Finalmente, conviene reflexionar sobre el hecho de que entre los principales agentes bacterianos causantes de infecciones neonatales nosocomiales se encuentren enterococos, estafilococos, estreptococos, propionibacterias o *E. coli*, que son precisamente las bacterias predominantes de forma natural en sangre del cordón umbilical, líquido amniótico y meconio de niños sanos (Jiménez et al., 2005) y que son también muy abundantes en la leche humana (Heikkilä y Saris, 2003; Ng et al., 2004). El hecho de que estos microorganismos causen una enfermedad infecciosa únicamente a niños con otras patologías predisponentes sugiere que el estado del hospedador es un factor clave para que una bacteria comensal pueda convertirse en un patógeno oportunista.

IX.2.3. Los enterococos de la leche humana como agentes bioterapéuticos y/o bioconservantes

En los últimos años, los problemas asociados a la difusión de bacterias resistentes a antibióticos de relevancia clínica ha conducido a un renovado interés por la bacterioterapia, una práctica que hace uso de bacterias comensales o probióticas para prevenir o tratar la colonización del hospedador por parte de patógenas (Huovinen, 2001; Reid et al., 2001; Strauss, 2000). Esta estrategia se basa en el principio de exclusión competitiva, por el que ciertas bacterias no patógenas se imponen sobre las patógenas cuando compiten por el mismo nicho ecológico (Mackie et al., 1999). En

este sentido, es lógico suponer que algunas de las bacterias comensales presentes en la leche materna contribuyen a la prevención de infecciones infantiles; de hecho, su presencia podría ser una de las razones que explicarían porqué la actividad antimicrobiana exhibida por la leche humana recién recolectada se pierde, parcial o totalmente, tras su pasteurización (Ford et al., 1977).

La leche materna es el único alimento ingerido por muchos neonatos, un segmento de la población muy sensible a las enfermedades infecciosas (Morris y Potter, 1997), especialmente cuando deben permanecer ingresados en unidades de neonatología durante un tiempo prolongado. En consecuencia, el aislamiento de bacterias con propiedad beneficiosas para la salud de los niños a partir de leche humana resulta particularmente atractivo para los sectores biomédico y alimentario ya que, por su propia naturaleza, cumplen algunos de los requisitos generalmente recomendados para bacterias empleadas como probióticos humanos, tales como origen humano, ingestión infantil prolongada sin efectos adversos y adaptación tanto a mucosas como a substratos lácteos (Klaenhammer y Kullen, 1999). Además, tal hallazgo abre nuevas perspectivas sobre el papel biológico de la lactancia materna. De hecho, Martín et al. (2005) observaron recientemente que al menos algunos de los lactobacilos aislados de leche materna poseen un potencial probiótico similar o superior al de ciertas cepas de gran difusión comercial como *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. casei* imunitass o *Lb. johnsonii* La-1. Conviene tener en cuenta que entre las bacterias aisladas normalmente de la leche materna existen algunas especies, como *Lb. gasseri*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. salivarius*, *Lb. fermentum* o *E. faecium*, que se incluyen habitualmente entre las potencialmente probióticas (Holzapfel et al., 1998). En este sentido, 21 de las 166 cepas de enterococos y 163 de las 485 cepas de lactobacilos depositadas en la colección PROSAFE citada anteriormente se emplean en productos prebióticos y fueron donadas por las empresas que las comercializan (Vankerckhoven et al., 2004). Nuevamente llama la atención que, entre las 21 cepas de enterococos utilizadas como probióticos, 17 (81%) pertenecen a la especie *E. faecium*. En consecuencia, la leche de mujeres sanas puede constituir una fuente de bacterias lácticas probióticas o bioterapéuticas con un papel importante en la protección de los niños y las madres frente a enfermedades infecciosas (Gavin y Ostovar, 1977). Como se ha comentado repetidamente, la leche materna es posiblemente la principal fuente de bacterias

comensales para el intestino del lactante y se considera que las bacterias intestinales son uno de los estímulos más importantes para el desarrollo del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal, pudiendo promover procesos antiinfecciosos y antialérgicos (Kalliomäki et al., 2001).

El potencial probiótico de las bacterias presentes en la leche materna debería ser un motivo de reflexión para los Bancos de Leche. El desconocimiento de la existencia de una microbiota específica en la leche materna ha propiciado que estas entidades desechen aquellas leches que contienen un recuento total de entre 10^3 y 10^5 ufc/ml, a pesar de que dichas concentraciones se encuentran de forma natural en la leche de prácticamente cualquier mujer sana (Heikkilä y Saris, 2003). Además, la mera presencia, a cualquier nivel, de enterococos o estafilococos también se considera un elemento de inaceptabilidad. En esta Tesis, se ha observado que tales bacterias son habitantes naturales de la leche materna por lo que, siguiendo ese criterio, prácticamente ninguna mujer sana debería amamantar a su bebé; afortunadamente, a las mujeres que amamantan directamente a sus hijos no se les practica cultivos de leche materna. En este sentido, no es de extrañar que hasta un 86% de las muestras de leche extraídas de mujeres chinas sanas habría sido rechazada según los criterios de muchos Bancos de Leche (Ng et al., 2004) a pesar de que, en ese mismo estudio, el empleo de esa leche “presuntamente contaminada” derivó en efectos beneficiosos para la salud de los niños que la consumieron, especialmente en comparación con la de aquellos que recibieron fórmulas infantiles. En conclusión, la leche de madres sanas puede considerarse como una fuente de enterococos seguros para sus recién nacidos. La elevada concentración de enterococos tanto en la leche materna como en el intestino infantil sugiere que estos microorganismos deben desempeñar un papel biológico importante en los primeros meses de vida del niño, tema que será objeto de estudio por parte de nuestro grupo de investigación en un futuro próximo.

Por lo que respecta al posible papel de los enterococos de la leche materna como candidatos a formar parte de cultivos bioprotectores para la industria alimentaria, hay que recordar que las bacterias lácticas, en general, y los enterococos, en particular, desempeñan papeles muy importantes en los procesos fermentativos, entre los que se incluyen un aumento de la vida útil, la seguridad microbiológica y la calidad

organoléptica de los productos finales en comparación con las de las materias primas de partida (Wood, 1997). 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, incluyendo a enterococos, y los productos de su metabolismo han sido consumidos desde tiempos inmemoriales a través de alimentos fermentados. 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).

Los enterococos constituyen una parte importante de la microbiota autóctona de las mucosas humanas (Favier et al., 2002; Manero y Blanch, 1999). Dentro de las especies de enterococos, *E. faecium* es la más numerosa en el tracto gastrointestinal humano, seguida de *E. faecalis* (Klein, 2003). Tradicionalmente, estas dos especies se han empleado como indicadores de contaminación fecal debido, por una parte, a su amplia distribución en el intestino de animales y personas, y, por otra, a su resistencia a los ambientes extraentéricos. Sin embargo, esta interpretación tan parcial ha evolucionado y actualmente se considera que los enterococos forman parte de la microbiota normal de las mucosas y los alimentos, sin que su presencia sea necesariamente atribuible a una falta de higiene (Franz et al., 1999; Klein, 2003). De hecho, existen diversas cepas de enterococos que integran cultivos iniciadores o adjuntos, o que forman parte de productos probióticos (Franz et al., 2003). En esta Tesis, se ha observado que las cepas de enterococos aisladas de leche materna son seguras, poseen actividad anti-*Listeria* y podrían tener aplicaciones como cultivos adjuntos o bioprotectores en las industrias queseras.

X. CONCLUSIONES

PRIMERA. En esta Tesis se han desarrollado diversos sistemas para la producción heteróloga de pediocina PA-1 en cepas salvajes de *Lactococcus lactis* con buenas propiedades tecnológicas para la elaboración de quesos. La introducción del plásmido pFI2160, que contiene el gen híbrido *L-peda* (que codifica la fusión entre el líder de la lactococina A y la propediocin PA-1) y los genes *lcnC* y *lcnD* (que codifican el sistema de secreción de la lactococina A) en *L. lactis* ESI 153 y *L. lactis* ESI 515 (Nis⁺) condujo a una producción estable de pediocina equivalente a un 30 y un 20%, respectivamente, de la cantidad producida por *Pediococcus acidilactici* 347, una cepa que produce dicha bacteriocina de forma natural.

FIRST. In this PhD Thesis, heterologous production of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis* strains, which had been previously selected because of their technological properties for cheese making, was investigated. The introduction of plasmid pFI2160, which contains the hybrid gene *L-peda* (encoding the fusion between the lactococcin A leader and propediocin PA-1) and also the genes *lcnC* and *lcnD* (encoding the lactococcin A secretion apparatus), into *L. lactis* ESI 153 and *L. lactis* ESI 515 (Nis⁺) led to a stable pediocin production. The production level was equivalent to 30 and 20%, respectively, of the quantity produced by the natural pediocin PA-1 producer *Pediococcus acidilactici* 347.

SEGUNDA. La producción de pediocina PA-1 aumentó considerablemente tras la introducción de los plásmidos pRK119 y pCNC16, que contienen el operón completo de la pediocina bajo control del promotor P32, en los mismos hospedadores. Con relación con las cepas derivadas de *L. lactis* ESI 153, la concentración de pediocina en los sobrenadantes de *L. lactis* RK1 y CNC1 fue mayor (165 %) que la obtenida en los de *P. acidilactici* 347. En el caso de las derivadas de *L. lactis* ESI 515, la producción de pediocina mostrada por *L. lactis* RK2 y CNC2 fue similar a la de *P. acidilactici* 347. La transformación de *L. lactis* ESI 515 con cualquiera de estos plásmidos no afectó a su capacidad para producir nisina. En consecuencia, se obtuvieron cepas de *L. lactis* con la capacidad de coproducir pediocina PA-1 y nisina a niveles comparables a los de las respectivas cepas parentales.

SECOND. Pediocin production increased after the introduction of plasmids pRK119 and pCNC16, which contain the complete pediocin operon under the control of the strong P32 promoter, into the same hosts. In relation to *L. lactis* ESI 153 derivatives, pediocin production by strains RK1 (pRK119) and CNC1 (pCNC16) was notably higher (163-165 %) than that produced by *P. acidilactici* 347. In the case of the *L. lactis* ESI 515-derived strains, the level of pediocin production by *L. lactis* RK2 and CNC2 was similar to that of *P. acidilactici* 347. Transformation of *L. lactis* ESI 515 with any of the plasmids cited above did not affect its ability to produce nisin. Therefore, we obtained *L. lactis* strains technologically suited for cheese making with the ability to coproduce pediocin PA-1 and nisin A at levels comparable to the respective wild parental strains.

TERCERA. En esta Tesis se construyó un vector de grado alimentario (pGA1), que porta el operón completo de la pediocina bajo control del promotor P32 y carece de genes que confieran resistencia a antibióticos. Una vez obtenidos los transformantes de *L. lactis* ESI 153 y *L. lactis* ESI 515 (*L. lactis* GA1 y GA2, respectivamente), se evaluó su eficacia para inhibir el crecimiento de *Listeria innocua* SA1 durante la elaboración de quesos. Al final del período de maduración, los recuentos de *L. innocua* fueron inferiores a 50 ufc/g en los quesos que contenían *L. lactis* GA1 e inferiores a 25 ufc/g en aquellos con *L. lactis* GA2. En consecuencia, las cepas desarrolladas podrían resultar útiles como cultivos bioprotectores para controlar el crecimiento de *Listeria* en quesos.

THIRD. Plasmid pGA1 was constructed in order to achieve food-grade heterologous production of pediocin PA-1 in the lactococcal hosts. This plasmid contains the complete pediocin operon under the control of the strong P32 promoter and is devoid of any antibiotic gene marker. Once *L. lactis* ESI 153 and *L. lactis* ESI 515 transformants were obtained (*L. lactis* GA1 and GA2, respectively), their ability to inhibit *Listeria innocua* SA1 growth during cheese ripening was also investigated. At the end of the ripening period, counts of *L. innocua* in cheeses made with the bacteriocin-producing lactococcal strains were below 50 CFU/g in the *L. lactis* GA1 cheeses and below 25 CFU/g in the *L. lactis* GA2 ones. As a consequence, the food-grade recombinant strains can be useful as bioprotective cultures to control the growth of *Listeria* in cheeses.

CUARTA. La leche materna es una excelente fuente de bacterias lácticas para el intestino infantil. En esta Tesis, las especies que se aislaron con mayor frecuencia fueron *Lactobacillus gasseri* y *Enterococcus faecium*. Los resultados obtenidos revelaron que las siete cepas de *E. faecium* analizadas estaban libres de determinantes de virulencia. Ninguna de las cepas mostró actividad gelatinasa, producción de hemolisinas o capacidad de agregación. Ninguna portaba genes *van*. Por lo tanto, la leche de mujeres sanas parece ser una fuente de cepas apatógenas de *E. faecium* para el intestino del lactante.

FOURTH. Breast milk is an excellent source of lactic acid bacteria to the neonatal gut. In this PhD Thesis, the species more frequently isolated were *Lactobacillus gasseri* and *Enterococcus faecium*. PCR amplifications and Southern hybridizations revealed that all the *E. faecium* strains tested were clear of potential virulence determinants. None of the strains showed gelatinase activity, hemolysin production or aggregation phenotype and none of them carried *van* genes. These findings suggest that milk of healthy mothers may be a source of avirulent *E. faecium* isolates to the newborns.

QUINTA. El análisis de la actividad anti-*Listeria* y de diversas propiedades bioquímicas de interés tecnológico para la industria láctea reveló que las cepas de *E. faecium* aisladas de leche materna pueden resultar útiles como cultivos adjuntos y/o bioprotectores para la elaboración de quesos.

FIFTH. Analyses of anti-*Listeria* activity and biochemical properties of technological interest to dairy industries revealed that the *E. faecium* strains isolated from breast milk may be useful as adjunct and/or bioprotective cultures in cheese making.

- Abeijón, M.C., Medina, R.B., Katz, M.B., González, S.N.** 2006. Technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from ewe's milk and cheese with importance for flavour development. *Can. J. Microbiol.* 52: 237-254.
- Ahrné, S., Lönnemark, E., Wold, A.E., Åberg, N., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegård, I.L., Molin, G., Adlerberth, I.** 2005. Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microb. Infect.* 7: 1256-1262.
- Allen, W.D., Linggood, M.A., Porter, P.** 1996. *Enterococcus* organisms and their use as probiotics in alleviating irritable bowel syndrome symptoms. *European Patent* 0508701 B1.
- Allison, G.E., Fremaux, C., Ahn C., 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.
- Alvarez-Olmos, M.I., Oberhelman, R.A.** 2001. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin. Infect. Dis.* 32: 1567-1576.
- Andrewes, F.W., Horder, T.J.** 1906. A study of the streptococci pathogenic for man. *Lancet* II, 708-713.
- Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., Dellaglio, F.** 2001. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J. Dairy Res.* 68: 303-316.
- Arizeun, C., Barcina, Y., Torre, P.** 1997. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 38: 17-24.
- Arqués, J.L., Rodríguez, E., Gaya, P., Medina, M., Nuñez, M.** 2005. Effect of combinations of high pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *Int. Dairy J.* 15: 893-900.
- Arqués, J.L., Rodríguez, E., Gaya, P., Medina, M., Guamis, B., Nuñez, M.** 2005. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 98: 254-260.
- Ávila, M., Garde, S., Gaya, P., Medina, M., Nuñez, M.** 2005. Influence of a bacteriocin-producing lactic culture on proteolysis and texture of Hispánico cheese. *Int. Dairy J.* 15: 145-153.
- Avila, M., Garde, S., Gaya, P., Medina, M., Nunez, M.** 2006. Effect of high-pressure treatment and a bacteriocin-producing lactic culture on the proteolysis, texture, and taste of Hispánico cheese. *J. Dairy Sci.* 89: 2882-2893
- Axelsson, L.** 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology, En: *Lactic Acid bacteria*, S. Salminen, A. von Wright, A. Ouwehand (Eds.), Nueva York: Marcel Dekker, pp. 1-66.
- Axelsson, L., Katla, T., Bjornslett, M., Eijsink, V.G.H., Holck, A.** 1998. A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*. *FEMS Microbiol. Lett.* 168: 137-143.

- Ayad, E.H.E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H., El-Soda, M.** 2004. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiol.* 21: 715-725.
- Aymerich, M.T., 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., 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.
- Aymerich, T., Picouet, P.A., Monfort, J.M.** 2008. Decontamination technologies for meat products. *Meat Sci.* 78: 114-129.
- Baccus-Taylor, G., Glass, K.A., Luchansky, J.B., Maurer, A.J.** 1993. Fate of *Listeria monocytogenes* and pediococcal starter cultures during the manufacture of chicken summer sausage. *Poultry Sci.* 72: 1772-1778.
- Bandell, M., Lhotte, M. E., Marty-Teyssset, C., Veyrat, A., Prévost, H., Dartois, V., Diviès, C., Konings, W.N., Lolkema, J.S.** 1998. Mechanism of the citrate transporters in carbohydrate and citrate cometabolism in *Lactococcus* and *Leuconostoc* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1594-1600.
- Barakat, R.K., Harris, L.J.** 1999. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* on cooked modified-atmosphere-packaged poultry in the presence and absence of a naturally occurring microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 342-345.
- Bari, M.L., Kawasaki, T., Inatsu, Y., Ukuku, D.O., Isshiki, K., Kawamoto, S.** 2005. Combined action of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid and potassium sorbate and EDTA in reducing *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. *J. Food Prot.* 68: 1381-1387.
- Barnes, E.M.** 1956. Methods for the isolation of faecal streptococci Lancefield Group D from bacon factories. *J. Appl. Bacteriol.* 19: 193-203.
- Bearfield, C., Davenport, E.S., Sivapathasundaram, V., Allaker, R.P.** 2002. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 109: 527-533.
- Beasley, S.S., Saris, P.E.J.** 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5051-5053.
- Bellomo, G., Mangiagle, A., Nicastro, L., Frigerio, G.** 1980. A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics. *Curr. Therap. Res.* 28: 927-936.
- Bennik, M.H.J., Verheul, A., Abee, T., Naaktgeboren-Stoffels, G., Gorris, L.G.M., 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.
- Benno, Y., Sawada, K., Mitsuoka, T.** 1984. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and

- bottle-fed infants. *Microbiol. Immunol.* 28: 975-986.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M.** 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11: 259-274.
- Berg, R.D.** 1995. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol.* 3: 149-154.
- Berg, R.D., Garlington, A.W.** 1979. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect. Immun.* 23: 403-411.
- Bernbom, N., Licht, T.R., Brogren, C.H., Jelle, B., Johansen, A.H., Badiola, I., Vogensen, F.K., Nørrung, B.** 2006. Effects of *Lactococcus lactis* on composition of intestinal microbiota: role of nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 239-244.
- Berry, E.D., Liewen, M.B., Mandigo, R.W., Hutkins, R.W.** 1990. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semidry sausage. *J. Food Prot.* 53: 194-199.
- Berry, E.D., Hutkins, R.W., Mandigo, R.W.** 1991. The use of bacteriocin producing *Pediococcus acidilactici* to control postprocessing *Listeria monocytogenes* contamination in frankfurters. *J. Food Prot.* 54: 681-686.
- Bertotto, A., Gerli, R., Castellucci, G., Scalise, F., Vaccaro, R.** 1991. Human milk lymphocytes bearing the gamma/delta T-cell receptor are mostly delta TCS1-positive cells. *Immunology* 74: 360-361.
- Beuvers, E., Buchin, S.** 2004. Raw milk cheeses. En: *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan y T.P. Guinee (Eds.), Elsevier Academic Press, Londres, pp. 320-345.
- Bhunja, A.K., Johnson M.G., Ray B.** 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 261-268.
- Bhunja, A.K., Johnson, M.C., Ray, B., Kalchayanand, N.** 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 25-33.
- Biet, F., Berjeaud, J.M., Worobo, R.W., Cenatempo, 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. Opin. Biotechnol.* 7: 499-504.
- Bingen, E., Denamur, E., Lambert-Zechovsky, N., Aujard, Y., Brahimi, N., Geslin, P., Elion, J.** 1992. Analysis of DNA restriction fragment length polymorphism extends the evidence for breast milk transmission in *Streptococcus agalactiae* late-onset neonatal infection. *J. Infect. Dis.* 165: 569-573.
- Booth, M.C., Bogie, C.P., Sahl, H.-G., Siezen, R.L., Hatter, K.L., Gilmore, M.S.** 1996. Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Mol. Microbiol.* 21: 1175-1184.

- Bover-Cid, S., Holzapfel, W.H.** 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 53: 33-41.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C.** 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 66: 185-189.
- Boziaris, I.S., Humpheson, L., Adams, M.R.** 1998. Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 7-13.
- Broadbent, J.R., Houck, K., Johnson, M.E., Oberg, C.J.** 2003. Influence of adjunct use and cheese microenvironment on nonstarter bacteria in reduced-fat cheddar-type cheese. *J. Dairy Sci.* 86: 2773-2782.
- Brock, T.D., Davies, J.M.** 1963. Probable identity of a group D hemolysin with a bacteriocin. *J. Bacteriol.* 134: 229-236.
- Bukhtiyarova, M., Yang, R., Ray, B.** 1994. Analysis of the pediocin AcH gene cluster from plasmid pSMB74 and its expression in a pediocin-negative *Pediococcus acidilactici* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3405-3408.
- Buydens, P., Debeuckelaere, S.** 1996. Efficacy of SF 68 in the treatment of acute diarrhea. A placebo-controlled trial. *Scand. J. Gastroenterol.* 31: 887-891.
- Buyong, N., Kok, J., 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.
- Cantoni, C., Bersani, C., Soucini, G., Marchisio, E.** 2000. Alterations of Quattrolo cheese. *Industrie Alimentari* 39: 26-28.
- Caplice, E., Fitzgerald, G.F.** 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 131-149.
- Carrasco de Mendoza, M.S., Scarinci, M.S., Huerto-Garat, H.E., Simonetta, A.C.** 1992. Technological properties of enterococci in lactic starters: acidifying and lipolytic activities. *Microbiologie, Aliments, Nutrition* 10: 289-293.
- Casaus, P., Nielsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E., Holo, H.** 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143: 2287-2294.
- Castro, A., Omar, N.B., Lucas, R., Abriouel, H., García, M.T., Martínez-Cañamero, M., Pérez-Pulido, R., Grande, M.J., Gálvez, A.** 2004. *El Género Enterococcus en Microbiología de los Alimentos*. Universidad de Jaén.
- Centeno, J.A., Cepeda, A., Rodríguez-Otero, J. L., Docampo, F.** 1995. Estudio higiénico-sanitario del queso de Arzúa. *Alimentaria* 33: 91-96.
- Centeno, J.A., Menéndez, S., Rodríguez-Otero, J.L.** 1996. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese Northwest Spain. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 307-313.
- Centeno, J.A., Menéndez, S., Hermida, M.A., Rodríguez-Otero, J.L.** 1999. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 48: 97-111.

- Chamba, J.F., Jamet, E.** 2007. Contribution to the safety assessment of technological microflora found in fermented dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.001
- Chen, 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., Shapira, R., Eisenstein, M., Montville, T.J.** 1997a. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 524-531.
- Chen, Y., Ludescher, R.D., Montville, T.J.** 1997b. 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,
- Chen, C.-M., Sebranek, J.G., Dickson, J.S., Mendonca, A.F.** 2004a. Combining Pediocin (ALTA 2341) with postpackaging pasteurization for control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters. *J. Food Prot.* 67: 1855-1865.
- Chen, C.M., Sebranek, J.G., Dickson, J.S., Mendonca, A.F.** 2004b. Combining pediocin with postpackaging irradiation for control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters. *J. Food Prot.* 67: 1866-75.
- 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., 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., Kok, J.** 1995. Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 183-189.
- Choi, S.Y., Beuchat, L.R.** 1994. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocin of *Pediococcus acidilactici* M during fermentation of kimchi. *Food Microbiol.* 11: 301-307.
- Choisy, C., Desmazeaud, M., Gripon, J.C., Lamberet, G., Lenoir, J., Tourneur, C.** 1990. Los fenómenos microbiológicos y enzimáticos y la bioquímica del afinado. En: *El Queso*. Eck, A. (coordinador). Omega, Barcelona, pp. 57-91.
- Chow, J.W.** 2000. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin. Infect. Dis.* 31: 586-589.
- Chow, J.W., Thal, L.A., Perri, M.B., Vazquez, J.A., Donabedian, S.M., Clewell, D.B., Zervos, M.J.** 1993. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2474-2477.
- Christensen, D.P., Hutkins, R.B.** 1992. Collapse of the proton motive force in *Listeria monocytogenes* caused by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3312-3315.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L.** 1999. Peptidases and

- amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 217-246.
- Christensen, H.R., Frokiaer, H., Pestka, J.J.** 2002. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface makers in murine dendritic cells. *J. Immunol.* 168: 171-178.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E., 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.
- Cintas, L., Casaus, P., Herranz, C., Havarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F.** 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182: 6806-6814.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L.** 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1-20.
- Clewell D.B.** 1993. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* 73: 9-12.
- Coburn, P.S., Hancock, L.E., Booth, M.C., Gilmore, M.S.** 1999. A novel means of self-protection, unrelated to toxin activation, confers immunity to the bactericidal effects of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Infect. Immun.* 67: 3339-3347.
- Coderre, P.E., Somkuti, G.A.** 1999. Cloning and expression of the pediocin operon in *Streptococcus thermophilus* and other lactic fermentation bacteria. *Curr. Microbiol.* 39: 295-301.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, M.J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C., Rodríguez, E.** 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64: 409-421.
- Cogan, T.M., Beresford, T.P., Steele, J., Broadbent, J., Shah, N.P., Ustunol, Z.** 2007. Invited review: Advances in starter cultures and cultured foods. *J. Dairy Sci.* 90: 4005-4021.
- Cole, A.M., Weis, P., Diamond, G.** 1997. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J. Biol. Chem.* 272: 12008-12013.
- Collins, M.D., Jones, D., Farrow, J.A.E., Kilpper-Bälz, R., Schleifer K.H.** 1984. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov., *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov., *E. durans* nom. rev., comb. nov., *E. gallinarum* comb. nov., and *E. malodoratus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 220-223.
- Comisión Europea.** 2004. List of the authorized additives in feedingstuffs published in application of Article 9t b of Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs. *Official Journal of the European Union*, 25.2.2004, C50.
- Consentino, S., Pisano, M.B., Corda, A., Fadda, M.E., Piras, C.** 2004. Genotypic and technological characterization of enterococci isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *J. Dairy Res.* 71: 444-450.

- Coppola, T.M., Parente, J.E., Dumontet, S., La Peccerella, A.** 1988. The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water buffalo milk. *Lait* 68: 295–310.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P.** 2003. A food-grade approach for functional analysis and modification of native plasmids in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 702–6.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P.** 2006. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Rev. Microbiol.* 4: 2.
- Coventry, M.J., Hillier, A.J., Jago, G.R.** 1978. The metabolism of pyruvate, and citrate in the thermophilic cheese starter *Streptococcus faecium* *Streptococcus durans*. *Austr. J. Dairy Technol.* 33: 148–154.
- Crow, V.L., Coolbear, T., Gopal, P.K., Martley, F.G., McKay L.L., Riepe, H.** 1995. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int. Dairy J.* 5: 855–875.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., Penades J.R.** 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 183: 2888–2896.
- Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., Simard, R.E., Lemieux, L.** 1994. Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 682–688.
- Dahlberg, A.C., Kosikowski, F.V.** 1948. The development of flavor in American Cheddar cheese made from pasteurised milk with *Streptococcus faecalis* starter. *J. Dairy Sci.* 31: 275–284.
- Dai, D., Walker, W.A.** 1999. Protective nutrients and bacterial colonization in the immature human gut. *Adv. Pediatr.* 46: 353–382.
- Dalet, K., Briand, C., Cenatiempo, Y., Héchard, Y.** 2000. The *rpon* gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.* 41: 441–443.
- Dalet, K., Cenatiempo, Y., Cossart, P., the European Listeria Genome Consortium, Héchard, Y.** 2001. A σ^{54} -dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology* 147: 3263–3269.
- Dasayanake, A.P., Li, Y., Wiener, H., Ruby, J.D., Lee, M.J.** 2005. Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. *J. Periodontol.* 76: 171–177.
- De Graef, E.M., Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M., Collins, M.D., Lefebvre, K., Swings, J., Haesebrouck, F.** 2003. Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinius* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al. 2001. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1069–1074.
- De Kwaadsteniet, M., Fraser, T., Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.** 2006. Bacteriocin T8, a novel class IIa sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4761–6.
- 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 Vuyst, L.** 2000. Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technol. Biotechnol.*, 38: 105-112.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P.** 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058-1071.
- Degnan, A.J., Yousef, A.E., Luchansky, J.B.** 1992. Use of *Pediococcus acidilactici* to control *Listeria monocytogenes* in temperature-abused vacuum-packaged wieners. *J. Food Prot.* 55: 98-103.
- Degnan, A.J., Buyong, N., Luchansky, J.B.** 1993. Antilisterial activity of pediocin AcH in model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes. *Int. J. Food Microbiol.* 18: 127-138.
- Degnan, A.J., Kaspar, C.W., Otwell, W.S., Tamplin, M.L., Luchansky, J.B.** 1994. Evaluation of lactic acid bacterium fermentation products and food-grade chemicals to control *Listeria monocytogenes* in blue crab (*Callinectes sapidus*) meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3198-203.
- Delcour, J., De Vuyst, L., Shortt, C.** 1999. Recombinant dairy starters, probiotics, and prebiotics: scientific, technological, and regulatory challenges. *Int. Dairy J.* 9: 1-82.
- Delgado, S., Mayo, B.** 2002. Technological performance of several *Lactococcus* and *Enterococcus* strains of dairy origin in milk. *J. Food Prot.* 65: 1590-1596.
- Delves-Broughton, J.** 2005. Nisin as a food preservative. *Food Australia* 57: 525-527.
- Descheemaeker, P., Lammens, C., Pot, B., Vandamme, P., Goossens, H.** 1997. Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 555-561.
- Devriese, L.A., Pot, B.** 1995. The genus *Enterococcus*. En: *The Lactic Acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria*, vol. 2, B.J.B. Wood y W.H. Holzapfel (Eds.), Blackie, Londres, pp. 327-367.
- Devriese, L.A., Pot, B., Collins, M.D.** 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 399-408.
- Devriese, L.A., Pot, B., Kersters, K., Lauwers, S., Haesebrouck, F.** 1996. Acidification of methyl- α -glucopyranoside: a useful test to differentiate *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum* from *Enterococcus faecium* species group and from *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2607-2608.
- Diep, D.B., Nes, I.F.** 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets.* 3: 107-22.
- Diep, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., Nes, I.F.** 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for

- class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 2384-2389
- Domig, K.J., Mayer, H.K., Kneifel, W.** 2003a. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.: 1. Media for isolation and enumeration. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 147-164.
- Domig, K.J., Mayer, H.K., Kneifel, W.** 2003b. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.: 2. Pheno- and genotypic criteria. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 165-188.
- Dovat, A.M., Reinbold, G.W., Hammond, E.G., Vedamuthu, E.R.** 1970. Lipolytic and proteolytic activity of enterococci and lactic group streptococci isolated from young Cheddar cheese. *J. Milk Food Technol.* 33: 365-372.
- Drakes, M., Blanchard, T., Czinn, S.** 2004. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infect. Immun.* 72: 3299-3309.
- Drasar, B.S., Roberts, A.K.** 1990. Control of the large bowel microflora. En: *Human Microbial Ecology*. M.J. Hilland, P.D. Marsh (Eds.), CRC Press, Boca Ratón, pp. 87-111.
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L.M., Prevost, H.** 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 564-582
- Duh, R.W., Singh, K.V., Malathum, K., Murray, B.E.** 2001. *In vitro* activity of 19 antimicrobial agents against enterococci from health subjects and hospitalised patients and use of an ace gene probe from *Enterococcus faecalis* for species identification. *Microb. Drug Resist.* 7: 39-46.
- Dupont, H., Montravers, P., Mohler, J., Carbon, C.** 1998. Disparate findings on the role of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in mouse and rat models of peritonitis. *Infect. Immun.* 66: 2570-2575.
- Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., Litopoulou-Tzanetaki, E.** 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 861-870.
- Dutka-Malen, S., Evers, S., Courvalin, P.** 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 24-27.
- Dykes, G.A., Hastings, J.W.** 1998. Fitness costs associated with class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* B73. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 5-8.
- Eaton, T.J., Gasson, M.J.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1628-1635.
- Eaton, T.J., Gasson, M.J.** 2002. A variant enterococcal surface protein Esp_{fm} in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical and environmental isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 216: 269-275.
- Eck, A.** (Coordinador). 1990. *El Queso*. Omega, S.A., Barcelona.
- EFSA.** 2006. The use of nisin (E 234) as a food additive. *The EFSA Journal* 314: 1-16

- EFSA.** 2007a. Assessment of Gram positive non-sporulating bacteria with respect to a qualified presumption of safety. http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/sc_committee/sc_consultations/qps.Par.0004.File.dat/Annex3.pdf
- EFSA.** 2007b. Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178680093176.htm
- Eidelman, A.I., Szilagyi, G.** 1979. Patterns of bacterial colonization of human milk. *Obstet. Gynecol.* 53: 550-552.
- Eijsink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B., Nes, I.F.** 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3275-3281.
- Eijsink, V., Axelsson, L., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Holo, H., Nes, I.F.** 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 639-654.
- El-Mohandes, A.E., Schatz, V., Keiser, J.F., Jackson, B.J.** 1993. Bacterial contaminants of collected and frozen human milk used in an intensive care nursery. *Am. J. Infect. Control* 21: 231-234.
- El-Mohandes, A.E., Picard, M.B., Simmens, S.J., Keiser, J.F.** 1997. Use of human milk in the intensive care nursery decreases the incidence of nosocomial sepsis. *J. Perinatol.* 17: 130-134.
- Eliopoulos, G.M., Farber, B.F., Murray, B.E., Wennersten, C., Moellering, R.C., Jr.** 1984. Ribosomal resistance of clinical enterococcal isolates to streptomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25: 398-399.
- Endtz, H.P., van den Braak, N., Verbrugh, H.A., van Belkum, A.** 1999. Vancomycin resistance: status quo and quo vadis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18: 683-690.
- Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Sorokine, O., van Dorsselaer, A., Bringel, F., Hubert, J.C., Hasselmann, C.** 1996. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4381-4387.
- Ennahar, S., Assobhei, O., Hasselman, C.** 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92. *J. Food Prot.* 61: 186-191
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A.** 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Reviews* 24: 85-106.
- Ennahar, S., Asou, Y., Zendo, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A.** 2001. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 291-301.
- Facklam, R.R., Collins, M.D.** 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 27: 731-734.

- Facklam, R., Elliott, J.A.** 1995. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, Gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 479-495.
- Facklam, R.R., Sahn, D.F.** 1995. *Enterococcus*. En: *Manual of Clinical Microbiology*, P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Tenover y R.H. Tenover (Eds.), American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 308-323.
- Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P., Vigi, V.** 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr.* 91: 48-55.
- FAO/WHO.** 2002. Joint FAO/WHO working group report on guidelines for the evaluation of probiotics in food. www.fao.org/es/esn/Probio/wgreport2.pdf.
- Farias, M.E., Farias, R.N., Holgado, A.P.D., Sesma, F.** 1996. Purification and N-terminal amino acid sequence of Enterocin CRL 35, a pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CRL 35. *Lett. Appl. Microbiol.* 22: 417-419.
- Farias, M.E., Núñez de Kairuz, M., Sesma, F., Palacios, J., de Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G.** 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by the bacteriocin enterocin CRL35 during goat cheese making. *Milchwissenschaft* 54: 30-32.
- Fath, M.J., Kolter, R.** 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* 57: 995-1017.
- Favier, C.F., Vaughan, E.E., de Vos, W.M., Akkermans, A.D.L.** 2002. Molecular monitoring of sucesión of bacterial communities in human neonatos. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 219-226.
- Fernández, A.** 2004. Producción inducible de lactococina A, pediocina PA-1, colicina V e interleuquina-2 en cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Fernández, L., Marín, M.L., Langa, S., Martín, R., Reviriego, C., Fernández, A., Olivares, M., Xaus, J., Rodríguez, J.M.** 2004. A novel genetic label for detection of specific probiotic lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int.* 10: 101-108.
- Fernández del Pozo, B., Gaya, P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M.A., Núñez, M.** 1988. Changes in microflora of La Serena ewes' milk cheese during ripening. *J. Dairy Res.* 55: 440-455.
- Fimland, G., Blingsmo, O.R., Sletten, K., Jung, G., Nes, I.F., 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., 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.
- Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B., Nissen-Meyer, J.** 2005. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J. Pep. Sci.* 11: 688-96.
- Foegeding, P.M., Thomas, A.B., Pilkington, D.H., Klaenhammer, T.R.** 1992. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in

- situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 884-890.
- Fontecha, J., Peláez, C., Juárez, M., Requena, T., Gómez, C.** 1990. Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. *J. Dairy Sci.* 73: 1150-1157.
- Ford, J.E., Law, B.A., Marshall, V.M.E., Reiter, B.** 1977. Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents. *J. Pediatrics* 91: 29-35.
- Foulquié Moreno, M.R., Callewaert, R., Devreese, B., Van Beeumen, J., De Vuyst, L.** 2003a. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.* 94: 214-229.
- Foulquié Moreno, M.R., Rea, M., Cogan, T., De Vuyst, L.** 2003b. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 73-84.
- Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L.** 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 1-24.
- Fox, P.F.** 1987. Cheese: an overview. En *Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology. Vol. 1. General Aspects.* Fox, P.F. (Ed.). Elsevier Applied Science, Londres, pp.1-32.
- Fox, P.F., Lucey, J.A., Cogan, T.M.** 1990. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29: 237-253.
- Fox, P.F., Wallace, J.M.** 1997. Formation of flavour compounds in cheese. *Adv. Appl. Microbiol.* 45:17-85.
- 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., 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., Holzappel, W.H., Stiles, M.E.** 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* 47: 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzappel W.H.** 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4385-4389.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzappel, W.H.** 2003. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 105-122.
- Freitas, A.C., Pintado, A.E., Pintado, M.E., Malcata, F.X.** 1999. Organic acids produced by lactobacilli, enterococci, and yeast isolated from Picante cheese. *Eur. Food Res. Technol.* 209: 434-438.
- Fuller, R.** 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- Gálvez, A., Giménez-Gallego, G., Maqueda, M., Valdivia, E.** 1989. Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*

- S-48. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 437-441.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Ben Omar, N.** 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 51-70.
- Gandhi, M., Chikindas, M.L.** 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 1-15.
- García, M.C., Rodríguez, M.J., Bernardo, A., Tornadizo, M.E., Carballo, J.** 2002. Study of enterococci and micrococci isolated throughout manufacture and ripening of San Simón cheese. *Food Microbiol.* 19: 23-33.
- García de Fernando, G.D., Hernandez, P.E., Burgos, J., Sanz, B., Ordóñez, J.A.** 1991. Extracellular proteinase from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*: II. Partial purification and some technologically important properties. *Folia Microbiol.* 36: 429-436.
- Garde, S., Gaya, P., Medina, M., Núñez, M.** 1997. Acceleration of flavour formation in cheese by a bacteriocin-producing adjunct lactic culture. *Biotechnol. Lett.* 19: 1011-1014.
- Gardiner, G.E., Ross, R.P., Wallace, J.M., Scanlan, F.P., Jägers, P.P.J.M., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Stanton, C.** 1999. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of Cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4907-4916.
- Gardini, F., Martuscelli, M., Caruso, C., Galgano, F., Crudele, M.A., Favati, F., Guerzoni, M.E., Suzzi, G.** 2001. Effects of pH, temperature, and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 105-117.
- Garg, S.K., Mital, B.K.** 1991. Enterococci in milk and milk products. *Crit. Rev. Microbiol.* 18: 15-45.
- Garneau, S., Ference, C.A., van Belkum, M.J., Stiles, M.E., Vederas, J.C.** 2003. Purification and characterization of brochocin A and brochocin B(10-43), a functional fragment generated by heterologous expression in *Carnobacterium piscicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1352-1358.
- Garriga, M., Aymerich, T., Costa, S., Monfort, J.M., Hugas, M.** 2002. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiol.* 19: 509-518.
- Garrity, G.M., Holt, J.G.** 2001. The road map to the manual. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, D.R. Boone, R.W. Castenholz y G.M. Garrity (Eds.), Springer-Verlag, Nueva York, pp. 119-166.
- Gavin, A., Ostovar, K.** 1977. Microbiological characterization of human milk. *J. Food Prot.* 40: 614-616.
- Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Condon, S., Swings, J., Cogan, T.M.** 2001. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 177-188.
- Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T.M., Condon, S., Swings, J.** 2002. Source of enterococci in a farmhouse raw-milk

- cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3560-3565.
- Ghrairi, T., Manai, M., Berjeaud, J.M., Frère, J.** 2004. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from rigouta, a traditional Tunisian cheese. *J. Appl. Microbiol.* 97: 621-628.
- Gibbs, G.M., Davidson, B.E., Hillier, A.J.** 2004. Novel expression system for large-scale production and purification of recombinant Class IIa bacteriocins and its application to piscicolin 126. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3292-3297
- Gilmore, M.S., Segarra, R.A., Booth, M.C.** 1990. An HlyB-type function is required for expression of the *Enterococcus faecalis* hemolysin/bacteriocin. *Infect. Immun.* 58: 3914-3923.
- Gilmore, M.S., Segarra, R.A., Booth, M.C., Bogie, C.P., Hall, L.R., Clewell, D.B.** 1994. Genetic structure of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* 176: 7335-7344.
- Gilson, L., Mahanty, H.K., Kolter, R.** 1990. Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *EMBO J.* 9: 3875-3884.
- Giraffa, G.** 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 215-222.
- Giraffa, G.** 1995. Enterococcal bacteriocins: their potential use as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiol.* 12: 551-556.
- Giraffa, G., Carminati, D.** 1997. Control of *Listeria monocytogenes* in the rind of Taleggio, a surface smear cheese, by a bacteriocin from *Enterococcus faecium* 7C5. *Science des Aliments* 17: 383-391.
- Giraffa, G., Carminati, D., Torri-Tarelli, G.** 1995a. Inhibition of *Listeria innocua* in milk by bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* 7C5. *J. Food Prot.* 58: 621-623.
- Giraffa, G., Picchioni, N., Neviani, E., Carminati, D.** 1995b. Production and stability of an *Enterococcus faecium* bacteriocin during Taleggio cheesemaking and ripening. *Food Microbiol.* 12: 301-307.
- Giraffa, G., Carminati, D., Neviani, E.** 1997. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Prot.* 60: 732-738.
- Glass, K.A., Bhanu Prasad, B., Schlyter, J.H., Uljas, H.E., Farkye, N.Y., Luchansky, J.B.** 1995. Effects of acid type and ALTATM 2431 on *Listeria monocytogenes* in a Queso Blanco type of cheese. *J. Food Prot.* 58: 737-741.
- Goff, J.H., Bhunia, A.K., Johnson, M.G.** 1996. Complete inhibition of low levels of *Listeria monocytogenes* on refrigerated chicken meat with pediocin AcH bound to heat-killed *Pediococcus acidilactici* cells. *J. Food Prot.* 59: 1187-1192.
- Gonzalez, C.F., Kunka, B.S.** 1987. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2534-2538.
- Granato, P.A., Jackson, R.W.** 1969. Bicomponent nature of lysin from *Streptococcus zymogenes*. *J. Bacteriol.* 100: 856-868.
- Gratia, A.** 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de

- colibacille. *C. R. Soc. Biol. Fill.* 93: 1040-1041.
- Gravesen, A., Ramnath, M., Rechinger, K.B., Andersen, N., Jansch, L., Hechard, Y., Hastings, J.W., Knochel, S.** 2002. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 148: 2361-2369.
- Gravesen, A., Kallipolitis, B., Holmstrøm, K., Høiby, P.E., Ramnath, M., Knøchel, S.** 2004. *pbp2229*-mediated nisin resistance mechanism in *Listeria monocytogenes* confers cross-protection to class IIa bacteriocins and affects virulence gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1669-1679.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S., Minshull, J.** 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.* 22: 346-353
- Guyonnet, D., Fremaux, C., Cenatiempo, Y., Berjeaud, J.M.** 2000. Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1744-1748.
- Haas, W., Gilmore, M.S.** 1999. Molecular nature of a novel bacterial toxin: the cytolysin of *Enterococcus faecalis*. *Med. Microbiol. Immunol.* 187: 183-190.
- Haas, W., Shepard, B.D., Gilmore, M.S.** 2002. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature* 415: 84-87.
- Halami, P.M., Ramesh, A., Chandrashekar, A.** 2005. Enhanced production of pediocin C20 by a native strain of *Pediococcus acidilactici* C20 in an optimized food-grade medium. *Process Biochemistry* 40: 1835-1840
- Hall, M.A., Cole, C.B., Smith, S.L., Fuller, R., Rolles, C.J.** 1990. Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Arch. Dis. Child.* 64: 185-188.
- Hamilton-Miller, J.M.T., Shah, S., Winkler, J.T.** 1999. Public Health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public Health Nutr.* 2: 2-8.
- Hancock, L.E., Gilmore, M.S.** 2002. The capsular polysaccharide of *Enterococcus faecalis* and its relationship to other polysaccharides in the cell wall. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1574-1579.
- Hancock, L.E., Perego, M.** 2004. The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J. Bacteriol.* 186: 5629-5639.
- Hanlin, M.B., Kalchayanand, N., Ray, P., Ray, B.** 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *J. Food Prot.* 56: 252-255.
- Hardie, J.M., Whiley, R.A.** 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series*, 26, 1S-11S.
- Harmsen, H.J.M., Wildeboer-Veloo, A.C.M., Raangs, G.C., Wagendorp, A.A., Klijn, N., Bindels, J.G., Welling, G.W.** 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30: 61-67.

- Harris, L.J.** 1998. The microbiology of vegetable fermentations. En: *Microbiology of Fermented Foods*, Vol. 1, Wood, B.J.B. (Ed.). Blackie, Londres, pp. 45-72.
- Hartman, P.A., Reinbold, G.W., Saraswat, D.S.** 1966. Media and methods for isolation and enumeration of the enterococci. *Adv. Appl. Microbiol.* 8: 253-289.
- Hasper, H.E., de Kruijff, B., Breukink, E.** 2004. Assembly and Stability of Nisin-Lipid II Pores. *Biochemistry* 43: 11567-11575.
- Hauge, H.H., Mantzilas, D., Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J.M., Eijsink, V.G.H., Nissen-Meyer, J.** 1998. Plantaricin A is an amphiphilic α -helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms. *Biochemistry* 37: 16026-16032.
- Håvarstein, L.S., Holo, H., 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., 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.
- Hayes, J.R., English, L.L., Carter, P.J., Proescholdt, T., Lee, K.Y., Wagner, D.D., White, D.G.** 2003. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7153-7160.
- Héchar, Y., Sahl, H.G.** 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 84: 545-557.
- Héchar, Y., Pelletier, C., Cenatiempo, Y., Fréré, J.** 2001. Analysis of σ^{54} -dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII^{Man}) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology* 147: 1575-1580.
- Heikkilä, M.P., Saris, P.E.J.** 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J. Appl. Microbiol.* 95: 471-478.
- 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.
- Hitti, J., Riley, D.E., Krohn, M.A., Hillier, S.L., Agnew, K.J., Krieger, J.N., Eschenbach, D.A.** 1997. Broad-spectrum bacterial ribosomal RNA polymerase chain reaction for detecting amniotic fluid infection among women in preterm labor. *Clin. Infect. Dis.* 24: 1228-1232.
- Holland, R., Liu, S.-Q., Crow, V.L., Delabre, M.-L., Lubbers, M., Bennett, M., Norris, G.** 2005. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *Int. Dairy J.* 15: 711-718.
- Holo, H., Nissen, O., 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.
- Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S., Nes, I.F.** 2001. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to

- a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology* 147: 643-651
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J.H.J.** 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 85-101.
- Hoover, D.G., Walsh, P.M., Kolaetis, K.M., Daly, M.M.** 1988. A bacteriocin produced by *Pediococcus* species associated with a 5,5 megadalton plasmid. *J. Food Prot.* 59: 29-31.
- Horn, N., Martínez, M.I., Martínez, J.M., Hernández, P.E., Gasson, M.J., Rodríguez, J.M., 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., Fernandez, A., Dodd, H.M., Gasson, M.J., Rodriguez, J.M.** 2004. Nisin-controlled production of pediocin PA-1 and colicin V in nisin- and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5030-5032.
- Huebner, J., Wang, Y., Krueger, W.A., Madoff, L.C., Martirosian, G., Boisot, S., Goldmann, D.A., Kasper, D.L., Tzianabos, A.O., Pier G.B.** 1999. Isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect. Immun.* 67: 1213-1219.
- Huebner, J., Quaas, A., Krueger, W.A., Goldmann, D.A., Pier, G.B.** 2000. Prophylactic and therapeutic efficacy of antibodies to a capsular polysaccharide shared among vancomycin-sensitive and -resistant enterococci. *Infect. Immun.* 68: 4631-4636.
- Hufnagel, M., Hancock, L.E., Koch, S., Theilacker, C., Gilmore, M.S., Huebner, J.** 2004. Serological and genetic diversity of capsular polysaccharides in *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2548-57.
- Hufnagel, M., Kropec, A., Theilacker, C., Huebner, J.** 2005. Naturally acquired antibodies against four *Enterococcus faecalis* capsular polysaccharides in healthy human sera. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 12: 930-934.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T., Monfort, J.M.** 1995. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 322-330.
- Huggins, A.R., Sandine, W.E.** 1984. Differentiation of fast and slow acid-producing strains of lactic streptococci. *J. Dairy Sci.* 67: 1674-1679.
- Hughenholtz, J.** 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 165-178.
- Huovinen, P.** 2001. Bacteriotherapy: the time has come. *Br. Med. J.* 323: 353-354.
- Huycke, M.M., Moore, D.R.** 2002. *In vivo* production of hydroxyl radical by *Enterococcus faecalis* colonizing the intestinal tract using aromatic

- hydroxylation. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 818-826.
- Huycke, M.M., Moore, D., Joyce, W., Wise, P., Shepard, L., Kotake, Y.** 2001. Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases. *Mol. Microbiol.* 42: 729-740.
- Huycke, M.M., Abrams, V., Moore, D.R.** 2002. *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis* 23: 529-536.
- Ike, Y., Hashimoto, H., Clewell, D.B.** 1987. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus Streptococcus faecalis* strains associated with human parenteral infections. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1524-1528.
- Ike, Y., Clewell, D.B., Segarra, R.A., Gilmore, M.S.** 1990. Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in *Enterococcus faecalis*: Tn917 insertional mutagenesis and cloning. *J. Bacteriol.* 172: 155-163.
- Ingham, A.B., Sproat, K.W., Tizard, M.L.V., Moore, R.J.** 2005. A versatile system for the expression of nonmodified bacteriocins in *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 98: 676-683
- Isaacs, C.E.** 2005. Human milk inactivates pathogens individually, additively and synergistically. *J. Nutr.* 135: 1286-1288.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., Salminen, S.** 2001. Probiotics: effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 444S-450S.
- Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B.** 1995. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 171-200.
- Jack, R.W., Wan, J., Gordon, J., Harmark, K., Davidson, B.E., Hillier, A.J., Wettenhall, R.E., Hickey, M.W., Coventry, M.J.** 1996. Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(8): 2897-903.
- Jager, K., 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.
- Jensen, L.B., Hammerum, A.M., Poulsen, R. L., Westh, H.** 1999. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains with highly similar pulsed-field gel electrophoresis patterns containing similar Tn1546-like elements isolated from a hospitalized patient and pigs in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 724-725.
- Jemmi, T., Stephan R.** 2006. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Rev. Sci. Tech.* 25: 571-580.
- Jensen, J.P., Reinbold, G.W., Washam, C.J., Vedamuthu, E.R.** 1975. Role of enterococci in Cheddar cheese: organoleptic considerations. *J. Milk Food Technol.* 38: 142-145.
- Jett, B.D., Jensen, H.G., Nordquist, R.E., Gilmore, M.S.** 1992. Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect. Immun.* 60: 2445-2452.

- Jett, B.D., Huycke, M.M., Gilmore, M.S.** 1994. Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 462-478.
- Jiménez, E., Fernández, L., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Nueno-Palop, C., Nabad, A., Olivares, M., Xaus, J., Rodríguez, J.M.** 2005. Isolation of commensal bacteria from umbilical chord blood of healthy neonates born by caesarean section. *Curr. Microbiol.* 51: 270-274.
- Jiménez-Díaz, R., Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Holo, H., Nes, I.F., Sletten, K.H., Warner, P.J.** 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4459-4463.
- Joerger, M.C., 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.
- Johansen, E.** 2003. Challenges when transferring technology from *Lactococcus lactis* laboratory strains to industrial strains. *Gen. Mol. Res.*, 2: 112-116.
- Johnsen, L., Fimland, G., Eijsink, V.G.H., Nissen-Meyer, J.** 2000. Engineering increased stability in the antimicrobial peptide pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4798-4802
- Johnsen, L., Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J.** 2004. Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2647-2652.
- Johnsen, L., Fimland, G., Nissen-Meyer, J.** 2005. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (Class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J. Biol. Chem.* 280: 9243-50.
- Joosten, H.M.L.J., Gaya, P., Núñez, M.** 1995. Isolation of tyrosine decarboxylaseless mutants of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* strain and their application in cheese. *J. Food Prot.* 58: 1222-1226.
- Joosten, H.M.L.J., Rodríguez, E., Nuñez, M.** 1997. PCR detection of sequences similar to the AS-48 structural gene in bacteriocin-producing enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 40-42.
- Jordan, K.N., Cogan, T.M.** 1993. Identification and growth of non-starter lactic acid bacteria in Irish Cheddar cheese. *Irish J. Agric. Food Res.* 32: 47-55.
- Jydegaard, A.-M., Gravesen, A., Knøchel, S.** 2000. Growth condition-related response of *Listeria monocytogenes* 412 to bacteriocin inactivation. *Lett. Appl. Microbiol.* 31: 68-72
- Kalchayanand, N.** 1990. *Extension of Shelf-Life of Vacuum-Packaged Refrigerated Fresh Beef by Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria.* PhD Thesis, Universidad de Wyoming, USA.
- Kalchayanand, N., Hanilin, M.B., 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, T., Dunne, C.P., Ray, B.** 1994. Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4174-4177.
- Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C.P., 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.
- Kalchayanand N., Szabo, E.A., Cahill, M.E.** 1999. Nisin and ALTA™ 2341 inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon packaged under vacuum or 100% CO₂. *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 373-377.
- Kalliomäki, M., Kirjavainen, P., Eerola, E., Kero, P., Salminen, S., Isolauri, E.** 2001. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J. Allergy Clin. Immun.* 107: 129-134.
- Kaur, K., Andrew, L.C., Wishart, D.S., Vederas, J.C.** 2004. Dynamic relationships among type IIa bacteriocins: temperature effects on antimicrobial activity and on structure of the C-terminal amphipathic α helix as a receptor-binding region. *Biochemistry* 43: 9009-9020.
- Kawai, Y., Kemperman, R., Kok, J., Saito, T.** 2004. The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. *Curr. Prot. Pep. Sci.* 5: 393-398.
- Keyser, F.H.** 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 255-262.
- Kjems, E.** 1955. Studies on streptococcal bacteriophages. I. Technique of isolating phage-producing strains. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 36: 433-440.
- Kim, I.K, Min-Kyu, K., Ji-Hye, K., Hyung-Soon, Y., Sun-Shin, C., Sa-Ouk, K.** 2007. High resolution crystal structure of PedB: a structural basis for the classification of pediocin-like immunity proteins. *BMC Struct. Biol.* 7: 35.
- Kimoto, H., Nomura, M., Suzuki, I.** 1999. Growth energetics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis in cometabolism of citrate and glucose. *Int. Dairy J.* 9: 857-863.
- Klaenhammer, T.R.** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337-349.
- Klaenhammer, T.R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-86.
- Klaenhammer, T.R., Kullen, M.J.** 1999. Selection and design of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 45: 45-57.
- Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Buck, B.L., Azcarate-Peril, M.A., Altermann, E.** 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 393-409.
- Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Werner, G., Witte, W.** 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 269-290.
- Kleerebezem, M., Hugenholtz, J.** 2003. Metabolic pathway engineering in lactic

- acid bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 232–237.
- Klein, G.** 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 123-131.
- Klein, G., Pack, A., Reuter, G.** 1998. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1825-1830.
- Koninsky, J.** 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu. Rev. Microbiol.* 36: 125-144.
- Kreft, B., Marre, R., Schramm, U., Wirth, R.** 1992. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect. Immun.* 60: 25-30.
- Krogstad, D.J., Pargwette, A.R.** 1980. Defective killing of enterococci: a common property of antimicrobial agents acting on the cell wall. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 965-968.
- Kuipers, O.P., de Ruyter, P.G.G.A., Kleerebezem, M., 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., de Vos, W.M.** 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotech.* 64: 15-21.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M.** 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5: 150-163.
- Kunji, E.R.S., Chan, K.W., Slotboom, D.J., Floyd, S., O'Connor, R., Monné, M.** 2005. Eukaryotic membrane protein overproduction in *Lactococcus lactis*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 546-551.
- Langa, S.** 2006. Interacciones entre bacterias lácticas, células del epitelio intestinal y células del sistema inmunitario. Desarrollo de modelos *in Vitro*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Lauková, A., Vlaemynick, G., Czikková, S.** 2001. Effect of enterocin CCM 4231 on *Listeria monocytogenes* in Saint-Paulin cheese. *Folia Microbiologica* 46: 157-160.
- Law, B.A.** 1987. Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. En *Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology. Vol. 1. General Aspects*. Fox, P.F. (Ed.). Elsevier Applied Science, Londres, pp. 365-392.
- Law, B.A.** 2001. Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. *Int. Dairy J.* 11: 383-398.
- Le Jeune, C., Lonvaud-Funel, A., ten Brink, B., Hofstra, H., van der Vossen, J.M.B.M.** 1995. Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 316-326.
- Le Loir, Y., Azevedo, V., Oliveira, S., Freitas, D., Miyoshi, A., Bermudez-Humaran, L., Nouaille, S., Ribeiro, L., Leclercq, S., Gabriel, J., Guimaraes, V., Oliveira, M., Charlier, C., Gautier, M., Langella, P.** 2005. Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microb. Cell Factories* 4: 2.

- Le Marrec, C., Hyronimus, B., Bressollier, P., Verneuil, B., Urdaci, M.C.** 2000. Biochemical and genetic characterization of coagulatin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I(4). *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5213-20.
- Le Thomas, I., Mariani-Kurkgjian, P., Collignon, A., Gravet, A., Clermont, O., Brahimi, N., Gaudelus, J., Aujard, Y., Navarro, J., Beaufils, F., Bingen, E.** 2001. Breast milk transmission of a panton-valentine-leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* strain causing infantile pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 39: 728-729.
- Leclercq, R., Courvalin, P.** 1997. Resistance to glycopeptides in enterococci. *Clin. Infect. Dis.* 24: 545-554.
- Leistner, L.** 1992. Food preservation by combined methods. *Food Res. Int.* 25: 151-158.
- Lemieux, L., Simard, R.E.** 1992. Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition, *Lait* 72: 335-382.
- Leroy, F., De Vuyst, L.** 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 67-78.
- Leuschner, R.G.K., Kurihara, R., Hammes, W.P.** 1998. Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by lactobacilli during Gouda cheese ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 44: 15-20.
- Lewus, C.B., Sun, S., Montville, T.J.** 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by *Leuconostoc paramesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 143-149.
- Liggozi, M., Pittaluga, F., Fontana, R.** 1996. Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 355-357.
- Lilly, D.H., Stillwell, R.H.** 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147: 747-748.
- Litopoulou-Tzanetaki, E.** 1990. Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria during ripening of Kefalotyri cheese. *J. Food Sci.* 55: 113-119.
- Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A.** 1993. Effect of type of lactic starter on microbiological, chemical and sensory characteristics of Feta cheese. *Food Microbiol.* 10: 31-41.
- López-Alarcón, M., Villalpando, S., Fajardo, A.** 1997. Breast-feeding lowers the frequency and duration of acute respiratory infection and diarrhea in infants under six months of age. *J. Nutr.* 127: 436-443.
- López-Díaz, T.M., Santos, J.A., González, C.J., Moreno, B., García, M.L.** 1995. Bacteriological quality of traditional Spanish blue cheese. *Milchwissenschaft* 50: 503-505.
- Lucas, A., Cole, T.J.** 1990. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet* 336: 1519-1523.
- 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., Cassen, R.G.** 1992.

- Genomic analysis of *Pediococcus acidilactici* in turkey summer sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3053–3059.
- Lund, B., Edlund, C.** 2001. Probiotic *Enterococcus faecium* strain is a possible recipient of the *vanA* gene cluster. *Clin. Infect. Dis.* 32: 1384-1385.
- Lund, B., Edlund, C., Barkholt, L., Nord, C.E., Tvede, M., Poulsen, R.L.** 2000. Impact on human intestinal microflora of an *Enterococcus faecium* probiotic and vancomycin. *Scand. J. Infect. Dis.* 32: 627-632.
- Lund, B., Adamsson, I., Edlund, C.** 2002. Gastrointestinal transit survival of an *Enterococcus faecium* probiotic strain administered with or without vancomycin. *Int. J. Food Microbiol.* 77: 109-115.
- Macedo, A.C., Malcata, F.X.** 1997. Role of adventitious microflora in proteolysis and lipolysis of Serra cheese: preliminary screening. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 205: 25-30.
- Mackie, R.I., Sghir, A., Gaskins, H.R.** 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 1035S-1045S.
- Mainardi, J.-L., Legrand, R., Arthur, M., Schoot, B., van Heijenoort, J., Gutmann, L.** 2000. Novel mechanism of β -lactam resistance due to bypass of transpeptidation in *Enterococcus faecium*. *J. Biol. Chem.* 275: 16490-16496.
- Makarova, K.S., Koonin, E.V.** 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 189: 1199-208.
- Makrides, S.C.** 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60: 512-538.
- Manero, A., Blanch, A.R.** 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4425-4430.
- Maqueda, M., Quitantes, R., Martín, I., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E.** 1997. Chemical signals in gram-positive bacteria: the sex-pheromone system *Enterococcus faecalis*. *Microbiología SEM* 13: 23-36.
- Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez Bueno, M., Sanchez-Barrena, M.J., González, C., Albert, A., Rico, M., Valdivia, E.** 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Prot. Pep. Sci.* 5: 399-416.
- Martín, R.** 2005. *Origen y potencial probiótico de la microbiota de la leche humana*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M.** 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* 143: 754-758.
- Martin, R., Olivares, M., Marin, M.L., Fernandez, L., Xaus, J., Rodriguez, J.M.** 2005. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *J. Hum. Lact.* 21: 8–17.
- Martinez, B., Suarez, J.E., Rodriguez, A.** 1996. Lactococcin 972: a homodimeric lactococcal bacteriocin whose primary target is not the plasma membrane. *Microbiology* 142: 2392-2398.
- 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 coexpresión heteróloga en *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- Martínez, J.M., Kok, J., Sanders, J.W., 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-Cuesta, M.C., Requena, T., Peláez, C.** 2001. Use of a bacteriocin-producing transconjugant as starter in acceleration of cheese ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 79-88.
- Martínez-Murcia, A.J., Collins, M.D.** 1991. *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 64: 69-74.
- 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., 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.
- Mathys, S., von Ah, U., Lacroix, C., Staub, E., Raffaella Mini, R., Cereghetti, T., Meile, L.** 2007. Detection of the pediocin gene pedA in strains from human faeces by real-time PCR and characterization of *Pediococcus acidilactici* UVA1. *BMC Biotechnol.* 12: 55.
- Matsumiya, Y., Kato, N., Watanabe, K., Kato, H.** 2002. Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J. Infect. Chemother.* 8: 43-49.
- McKessar, S.J., Berry, A.M., Bell, J.M., Turnidge, J.D., Paton, J.C.** 2000. Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3224-3228.
- Menéndez, S., Centeno, J.A., Godínez, M.R., Rodríguez-Otero, J.L.** 1998. Algunas propiedades tecnológicas y actividades enzimáticas de cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas del queso del Cebreiro. *Alimentaria* 296: 71-76.
- Menéndez, S., Godínez, R., Centeno, J.A., Rodríguez-Otero, J.L.** 2001. Microbiological, chemical and biochemical characteristics of Tetilla raw cows-milk cheese. *Food Microbiol.* 18: 151-158.
- Mierau, I., Kleerebezem, M.** 2005. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 705-717.
- Mierau, I., Leij, P., van Swam, I., Blommestein, B., Floris, E., Mond, J., Smid, E.J.** 2005. Industrial-scale production and purification of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisin-controlled gene expression system NICE: The case of lysostaphin. *Microb. Cell Fact.* 4: 15.
- Miller, K.W., Schamber, R., Chen, 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.
- Miller, K.W., Ray, P., Steinmetz, T. Hanekamp, T., Ray, B.** 2005. Gene organization and sequences of pediocin AcH/PA-1 production operons in *Pediococcus* and *Lactobacillus* plasmids. *Lett. Appl. Microbiol.* 40: 56-62
- Millette, M., Cornut, G., Dupont, C., Shareck, F., Archambault, D., Lacroix, M.** 2008a. Capacity of human nisin and pediocin-producing LAB to reduce vancomycin-resistant Enterococci (VRE) intestinal colonization. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.02150-07
- Millette, M., Dupont, C., Shareck, F., Ruiz, M.T., Archambault, D., Lacroix, M.** 2008b. Purification and identification of the pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain. *J. Appl. Microbiol.* 104: 269-275
- Ming, X., Weber, G.H., Ayres, J.W., Sandine, W.E.** 1997. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *J. Food Sci.* 62: 413-415.
- Moellering, R.C.** 2000. *Enterococcus* species. En: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (Eds.), Churchill Livingstone, Filadelfia, pp. 2147-2156.
- Mogensen, G.** 1993. Starter cultures. En: *Technology of Reduced-Additive Foods*, Smith, J. (Ed.). Blackie, Londres, pp. 1-25.
- Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J.M.** 1999. Bacteriocins: Mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 185-198.
- Moon, G.S., Pyun Y.R., Kim, W.J.** 2006. Expression and purification of a fusion-typed pediocin PA-1 in *Escherichia coli* and recovery of biologically active pediocin PA-1. *Int. J. Food Microbiol.* 108: 136-140
- Montville, T.J., Winkowski, K.** 1997. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. En: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville (Eds.), ASM Press, Washington D.C., pp. 557-576.
- Morisset, D., Frère, J.** 2002. Heterologous expression of bacteriocins using the mesentericin Y105 dedicated transport system by *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochimie* 84: 569-576.
- Morris, J.G., Potter, M.** 1997. Emergence of new pathogens as a function of changes in host susceptibility. *Emerg. Infect. Dis.* 3: 435-441.
- Morrow, A.L., Rangel, J.M.** 2004. Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 15: 221-228.
- Mossel, D.A.A., Bijker, P.G.H., Elderink, I.** 1978. Streptokokken der Lancefield-gruppe D in lebensmitteln und trinkwasser-ihre bedeutung, erfassung und bekämpfung. *Arch. Lebensm. Hyg.* 29: 121-127.
- Mota-Meira, M., Lapointe, G., Lacroix, C., Lavoie, M.C.** 2000. MICs of Mutacin B-Ny266, Nisin A, Vancomycin, and Oxacillin against Bacterial Pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 24-29.
- Motlagh, A.M., Bhunia, A.K., Szosteck, F., Hansen, T.R., Johnson, M.C., Ray, B.** 1992a. Nucleotide and amino acid sequence of *pap*-gene (pediocin AcH production) in

- Pediococcus acidilactici* H. *Lett. Appl. Microbiol.* 15: 45-48.
- Motlagh, A.M., Holla, S., Johnson, M.C., Ray, B., Field, R.A.** 1992b. Inhibition of *Listeria* spp. in sterile food systems by pediocin AcH, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* H. *J. Food Prot.* 55: 337-343.
- Motlagh, A.M., Bukhtiyarova, M., 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.
- Mulet-Powell, N., Lacoste-Armynot, A.M., Viñas, M., De Buochberg, M.S.** 1998. Interactions between pairs of bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 61: 1210-1212.
- Mundy, L.M., Sahm, D.F., Gilmore, M.** 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 513-522.
- Muriana, P.M.** 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *J. Food Prot.* suppl. 1996: 54-63.
- Murray, B.E.** 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 46-65.
- Murray, B.** 1992. Betalactamase-producing enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 2355-2359.
- Murray, M., Richard, J.A.** 1997. Comparative study of the antilisterial activity of nisin A and pediocin AcH in fresh ground pork stored aerobically at 5°C. *J. Food Prot.* 60: 1534-1540.
- Mylonakis, E., Engelbert, M., Qin, X., Sifri, C.D., Murray, B.E., Ausubel, F.M.** 2002. The *Enterococcus faecalis* *fsrB* gene, a key component of the *fsr* quorum-sensing system, is associated with virulence in the rabbit endophthalmitis model. *Infect. Immun.* 70: 4678-4681.
- Naghmouchi, K., Kheadr, E., Lacroix, C., Fliss, I.** 2007. Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 24: 718-27.
- Nakayama, J., Cao, Y., Horii, T., Sakuda, S., Nagasawa, H.** 2001. Chemical synthesis and biological activity of the gelatinase biosynthesis-activating pheromone of *Enterococcus faecalis* and its analogs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2322-2325.
- Nallapareddy, S.R., Qin, X., Weinstock, G.M., Höök, M., Murray, B.E.** 2000. *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect. Immun.* 68: 5218-5224.
- Nallaparreddy, S.R., Singh, K.V., Duh, R.W., Weinstock, G.M., Murray, B.E.** 2000. Diversity of *ace*, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of *ace* during human infections. *Infect. Immun.* 68: 5210-5217.
- Nallapareddy, S.R., Weinstock, G.M., Murray, B.E.** 2003. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acn, a new member of the MSCRAMM family. *Mol. Microbiol.* 47: 1733-1747.

- Nes, I.F., Holo, H. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Pep. Sci.* 55: 50-61.
- Newburg, D.S. 2005. Innate immunity and human milk. *J. Nutr.* 135: 1308-1312.
- Ng, D.K., Lee, S.Y.R., Leung, L.C.K., Wong, S.F., Ho, J.C.S. 2004. Bacteriological screening of expressed breast milk revealed a high rate of bacterial contamination in Chinese women. *J. Hospital Infect.* 58: 146-150.
- Nielsen, J.W., Dickson, J.S., Crouse, J.D. 1990. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2142-2145.
- Nieto-Lozano, J.C., Nissen-Meyer, J., Sletten, K., Peláez, C., Nes, I.F. 1992. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1-6.
- Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Peàez-Martínez, M.C., De la Torre, A.H. 2006. Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat. *Meat Sci.* 72: 57-61.
- Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P., Chackraborty, T. 1998. Studies on risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 61: 244-248.
- Núñez, M., Martínez Moreno, J.L. 1976. Flora microbiana del queso Manchego. I. Evolución de la flora microbiana de quesos Manchegos artesanales. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias* 4: 11-31.
- Núñez, M., Rodríguez, J.L., García, E., Gaya, P., Medina, M. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *J. Appl. Microbiol.* 83: 671-677.
- Olivares, M., Díaz-Ropero, M.P., Gómez, N., Lara-Villaoslada, F., Sierra, S., Maldonado, J.A., Martín, R., López-Huertas, E., Rodríguez, J.M., Xaus, J. 2006. Oral administration of two probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT5711, enhances the intestinal function of healthy adults. *Int. J. Food Microbiol.* 107: 104-111.
- Ordóñez, J.A., Barneto, R., Ramos, M. 1978. Studies on Manchego cheese ripened in olive oil. *Milchwissenschaft* 33: 609-612.
- Orla-Jensen, S. 1919. *The Lactic Acid Bacteria*. Host and Son, Copenhagen.
- Oumer, B.A., Gaya, P., Fernandez-Garcia, E., Marciaca, R., Garde, S., Medina, M., Núñez, M. 2001. Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. *J. Dairy Res.* 68: 117-129.
- Palles, T., Beresford, T., Condon, S., Cogan, T.M. 1998. Citrate metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 85: 147-154.
- Parente, E., Cogan, T.M. 2004. Starter cultures: General aspects. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan y T.P. Guinee (Eds.), Elsevier Academic Press, Londres, pp. 123-147.
- Parente, E., Hill, C. 1992. Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 55: 497-502.

- Parente, E., Villani, F., Coppola, R., Coppola, S.** 1989. A multiple strain starter for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Lait* 69: 271-279.
- Parsek, M.R., Singh, P.K.** 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 57: 677-701.
- Patton, G.C., van der Donk, W.A.** 2005. New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 1-9.
- Pedersen, M.B., Iversen, S.L., Sørensen, K.I., Johansen, E.** 2005. The long and winding road from the research laboratory to industrial applications of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:611-624.
- Peláez, C., Requena, T.** 2005. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *Int. Dairy J.* 15: 831-844
- Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M., Barcina, Y.** 1999. Physicochemical properties and secondary microflora variability in the manufacture and ripening of Idiazabal cheese. *Lait* 79: 281-290.
- Peterson, S.D., Marshall, R.T.** 1990. Nonstarter lactobacilli in Cheddar cheese: A review. *J. Dairy Sci.* 73: 1395-1410.
- Pfeiler, E.A., Klaenhammer, T.R.** 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends Microbiol.* 15: 546-553.
- Pillai, S.K., Sakoulas, G., Gold, H.S., Wennersten, C., Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C., Inouye, R.T.** 2002. Prevalence of the *fsr* locus in *Enterococcus faecalis* infections. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2651-2652.
- Pouillet, B., Huertas, M., Sánchez, A., Cáceres, P., Larriba, G.** 1993. Main lactic acid bacteria isolated during ripening of Casar de Cáceres cheese. *J. Dairy Res.* 60: 123-127.
- Pritchard, G.G., Coolbear, T.** 1993. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 179-206.
- Pucci, M.J., Vedamuthu, R.E.R., Kunka, B.S., Vandenberg, P.A.** 1988. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2349-2353.
- Qin, X., Singh, K.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E.** 2000. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect. Immun.* 68: 2579-2586.
- Qin, X., Singh, K.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E.** 2001. Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J. Bacteriol.* 183: 3372-3382.
- Quadri, L.E.N., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P., de Vos, W.M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E.** 1997. Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* 179: 6163-6171
- Qutaishat, S.S., Stemper, M.E., Spencer, S.K., Borchardt, M.A., Opitz, J.C., Monson, T.A., Anderson, J.L., Ellingson, L.E.** 2003. Transmission of *Salmonella*

- enterica* serotype *typhimurium* DT104 to infants through mother's breast milk. *Pediatrics* 111: 1442-1446.
- Raccach, M., Geshell, D.J.** 1993. The inhibition of *Listeria monocytogenes* in milk by pediococci. *Food Microbiol.* 10: 181-186.
- Ramnath, M., Beukes, M. Tamura, K. Hastings, J.W.** 2000. Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3098-3101.
- Ramnath, M., Arous, S., Gravesen, A., Hastings, J.W., Hechard, Y.** 2004. Expression of mptC of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 150: 2663-2668
- Ramos, R., Barneto, R., Ordoñez, J.A.** 1981. Evaluation of a specific starter for Manchego cheese production. *Milchwissenschaft* 36: 528-531.
- Rasch, M., Knochel, S.** 1998. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 275-278.
- Rautio, M., Jousimies-Somer, H., Kauma, H., Pietarinen, I., Saxelin, M., Tynkkynen, S., Koskela, M.** 1999. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* indistinguishable from *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Clin. Infect. Dis.* 28: 1159-1160.
- Ray, B., Hoover, D.G.** 1993. Pediocins. En: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, Hoover, D.G. y Steenson, L.R. (Eds). Academic Press, San Diego, pp. 181-210.
- Ray, S.K., Kim, W.J., Johnson, M.C., Ray, B.** 1989. Conjugal transfer of a plasmid encoding bacteriocin production and immunity in *Pediococcus acidilactici* H. J. *Appl. Bacteriol.* 66: 393-399.
- Ray, B., Schamber, R., Miller, K.W.** 1999. The pediocin AcH precursor is biologically active. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2281-2286.
- Rea, M.C., Cogan, T.M.** 2003a. Catabolite repression in *Enterococcus faecalis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 159-164.
- Rea, M.C., Cogan, T.M.** 2003b. Glucose prevents citrate metabolism by enterococci. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 201-206.
- Reed, R.P., Sinickas, V.G., Lewis, C., Byron, K.** 1999. A comparison of polymerase chain reaction and phenotyping for rapid speciation of enterococci and detection of vancomycin resistance. *Pathology* 31: 127-132.
- Reid, G., Howard, J., Gan, B.C.** 2001. Can bacterial interference prevent infection? *Trends Microbiol.* 9: 424-428.
- Reid, G.** 2002. Safety of *Lactobacillus* strains as probiotic agents. *Clin. Infect. Dis.* 35: 349-350.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valsazina, B., Francoloni, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., Ricciardi-Castagnoli, P.** 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunol.* 2: 361-367.

- Reuter, G.** 1992. Culture media for enterococci and group D-streptococci. *Int. J. Food Microbiol.* 17: 101-111.
- Rice, L.B.** 2000. Bacterial monopolists: the bundling and dissemination of antimicrobial resistance genes in gram-positive bacteria. *Clin. Infect. Dis.* 31: 762-769.
- Rich, R.L., Kreikemeyer, B., Owens, R.T., LaBrenz, S., Narayana, S.V.L., Weinstock, G.M., Murray, B.E., Höök, M.** 1999. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* 274: 26939-26945.
- Richard, C., Drider, D., Elmorjani, K., Marion, D., Prévost, H.** 2004. Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186: 4276-84.
- Richard, C., Cañon, R., Naghmouchi, K., Bertrand, D., Prévost, H., Drider, D.** 2006. Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol.* 23: 175-83.
- Rinne, M.M., Gueimonde, M., Kalliomäki, M., Hoppu, U., Salminen, S.J., Isolauri, E.** 2005. Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. *J. Pediatr.* 147: 186-191.
- Roberts, J.C., Singh, K.V., Okhuysen, P.C., Murray, B.E.** 2004. Molecular epidemiology of the *fsr* locus and of gelatinase production among different subsets of *Enterococcus faecalis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2317-2320.
- Rodríguez, A.V., Baigori, M.D., Alvarez, S., Castro, G.R., Oliver, G.** 2001. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Lactobacillus rhamnosus* with capacity to translocate. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 33-38.
- Rodríguez, E., Gaya, P., Nuñez, M., 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, E., González, B., Gaya, P., Nuñez, M., Medina, M.** 2000. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from milk. *Int. Dairy J.* 10: 7-15.
- Rodríguez, E., Arques, J.L., Gaya, P., Nuñez, M., Medina, M.** 2001. Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocins and monitoring of bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization in semi-hard raw milk cheese. *J. Dairy Res.* 68: 131-137.
- Rodríguez, E., Arques, J.L., Nuñez, M., Gaya, P., Medina, M.** 2005. Combined effect of high pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3399-3404.
- Rodríguez, J.L., Gaya, P., Medina, M., Nuñez, M.** 1997. Bactericidal effect of enterocin 4 on *Listeria monocytogenes* in a model dairy system. *J. Food Prot.* 60: 28-32.
- Rodríguez, J.M.** 1996. Espectro antimicrobiano, estructura, propiedades y modo de acción de la nisina, una

- bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*. *Food Sci. Tech. Int.* 2: 61-68.
- Rodríguez, J.M., Cintas, L.M. Casaus, P., Martínez, M.I., Suárez, A., Hernández, P.E.** 1997. Detection of pediocin PA-1 producing pediococci by rapid molecular biology techniques. *Food Microbiol.* 14: 363-37.
- Rodríguez, J.M., Martínez, M.I., Kok, J.** 2002a. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Tech.* 42: 91-121.
- Rodríguez, J.M., Martínez, M.I., Horn, N., Dodd, H.M.** 2002b. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 101-116.
- Roitt, I.** 1994. *Essential Immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Ronnestad, A., Abrahamsen, T.G., Melbø, S., Reigstad, H., Lossius, K., Kaaresen, P.I., Engelund, I.E., Polit, C., Irgens, L.M., Markestad, T.** 2005. Septicemia in the first week of life in a Norwegian national cohort of extremely premature infants. *Pediatrics* 115: 262e-268e.
- Ross, R.P., Galvin, M., Mc Auliffe, O., Morgan, S.M., Ryan, M.P., Twomey, D.P., Meaney, W.J., Hill, C.** 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76: 337-346.
- Ross, R.P., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Coffey, A.** 2000. Novel cultures for cheese improvement. *Trends Food Sci. Technol.* 11: 96-104.
- Rossi, E.A., Vendramini, R.C., Carlos, I.Z., Pei, Y.C., de Valdez, G.F.** 1999. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. *Eur. Food Res. Technol.* 209: 305-307.
- Rozum, J.J., Maurer, A.J.** 1997. Microbiological quality of cooked chicken breasts containing commercially available shelf-life extenders. *Poultry Sci.* 76: 908-913.
- Ryan, M.P., Rea, M.C., Hill, C., 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.
- Saavedra, J.M.** 2002. Probiotic agents: clinical applications in infants and children. En: *Infant Formula: Closer to the Reference*. N.C.R. Rähäand, F.F. Rutelli (Eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, pp. 15-27.
- Sablón E, Contreras, B., Vandamme, E.** 2000. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-86.
- Sahl, H.-G., Bierbaum, G.** 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 52: 41-79.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E.** 2001a. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int. Dairy J.* 11: 621-647.
- Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E.** 2001b. Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR E229. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5482-5487.

- Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E.** 2002a. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 76: 93-105.
- Sarantinopoulos, P., Leroy, F., Leontopoulou, E., Georgalaki, M.D., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., De Vuyst, L.** 2002b. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR E198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 125-136.
- Sarantinopoulos, P., Makras, L., Vaningelgem, F., Kalantzopoulos, G., De Vuyst, L., Tsakalidou, E.** 2003. Growth and energy generation by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 during citrate metabolism. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 197-206.
- Sartingen, S., Rozdzinski, E., Muscholl-Silberhorn, A., Marre, R.** 2000. Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells *in vitro*. *Infect. Immun.* 68: 6044-6047.
- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., de Vos, W.M.** 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 204-211.
- Schanler, R.J.** 2000. Overview: The clinical perspective. *J. Nutr.* 130: 417S-419S.
- Schillinger, U., Geisen, R., Holzapfel, W.H.** 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 158-164.
- Schleifer, K.H., Kilpper-Bälz, R.** 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 31-34.
- Schleifer, K.H., Kilpper-Bälz, R.** 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.* 10: 1-19.
- Schlyter, J.H., Glass, K.A., Loeffelholz, J., Degnan, A.J., Luchansky, J.B.** 1993. The effects of diacetate with nitrite, lactate, or pediocin on the viability of *Listeria monocytogenes* in turkey slurries. *Int. J. Food Microbiol.* 19: 271-281.
- Schülein, R., Gentschev, I., Mollenkopf, H.J., Goebel, W.** (1992). A topological model for the haemolysin translocator protein HlyD. *Mol. Gen. Genet.* 234: 155-163.
- Schultz, M., Göttl, C., Young, R.J., Iwen, P., Vanderhoof, J.A.** 2004. Administration of oral probiotic bacteria to pregnant women causes temporary infantile colonization. *J. Ped. Gastroenterol. Nutr.* 38: 293-297.
- Schedv, F., Lalazar, A., Henis, 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.
- Segarra, R.A., Booth, M.C., Morales, D.A., Huycke, M.M., Gilmore, M.S.** 1991. Molecular characterization of the *Enterococcus faecalis* cytolysin activator. *Infect. Immun.* 59: 1239-1246.

- Shankar, V., Baghdayan, A.S., Huycke, M.M., Lindahl, G., Gilmore, M.S.** 1999. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect. Immun.* 67: 193-200.
- Shankar, N., Lockett, C.V., Baghdayan, A.S., Drachenberg, C., Gilmore, M.S., Johnson, D.E.** 2001. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.* 69: 4366-4372.
- Shankar, N., Baghdayan, A.S., Gilmore, M.S.** 2002. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 417: 746-750.
- Shankar, N., Coburn, P., Pillar, C., Haas, W., Gilmore, M.** 2004. Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 609-18.
- Sherman, J.M.** 1937. The streptococci. *Bacteriol. Rev.* 1: 3-97.
- Shepard, B.D., Gilmore, M.S.** 2002. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infect.* 4: 215-224.
- Sherwood, N.P., Russell, B.E., Jay, A.R., Bowman, K.** 1949. Studies on streptococci: III. New antibiotic substances produced by beta hemolytic streptococci. *J. Infect. Dis.* 84: 88-91.
- Siezen, R.J., van Enkevort, F.H., Kleerebezem, M., Teusink, B.** 2004. Genome data mining of lactic acid bacteria: the impact of bioinformatics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 105-115.
- Sifri, C.D., Mylonakis, E., Singh, K.V., Qin, X., Garsin, D.A., Murray, B.E.** 2002. Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. *Infect. Immun.* 70: 5647-5650.
- Singh, K.V., Qin, X., Weinstock, G.M., Murray, B.E.** 1998. Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J. Infect. Dis.* 178: 1416-1420.
- Slanetz, L.W., Bartley, C.H.** 1957. Numbers of enterococci in water, sewage and faeces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *J. Bacteriol.* 74: 591-595.
- Smith, J. (ed.)** 1993. *Technology of Reduced-Additive Foods*, Blackie, Londres.
- Smith, M.C., Murray, B.E.** 1992. Comparison of enterococcal and staphylococcal beta-lactamase-encoding fragments. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 273-276.
- Soleiman, D.K.Y., Somkuti, G.A.** 1993. Shuttle vectors developed from *Streptococcus thermophilus* native plasmid. *Plasmid* 30: 67-78.
- Stackebrandt, E., Teuber, M.** 1988. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 317-324.
- Stark, P.L., Lee, A.** 1982. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed infants during the first year of life. *J. Med. Microbiol.* 15: 189-203.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., 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., 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.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.
- Stoddard, G.W., Petzel, J.P., Van Belkum, M.J., Kok, J., McKay, L.L.** 1992. Molecular analyses of the lactococin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* WM4. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1952-1961.
- Stratton, J.E., Hutkins R.V., Taylor, S.L.** 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods. A review. *J. Food Prot.* 54: 460-470.
- Strauss, E.** 2000. Fighting bacterial fire with bacterial fight. *Science* 290: 2231-2233.
- Süßmuth, S.D., Muscholl-Silberhorn, A., Wirth, R., Susa, M., Marre, R., Rozdzinski, E.** 2002. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect. Immun.* 68: 4900-4906.
- Sulzer, G., Busse, M.** 1991. Growth inhibition of *Listeria* spp. on Camembert cheese by bacteria producing inhibitory substances. *Int. J. Food Microbiol.* 14: 287-296.
- Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., Andrighetto, C., Lanorte, M.T.** 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese Semicotto Caprino. *J. Appl. Microbiol.* 89: 267-274.
- Svec, P., Devriese, L.A., Sedlacek, I., Baele, M., Vancanneyt, M., Haesebrouck, F., Swings, J., Doskar, J.** 2001. *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1567-1574.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W.** 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40: 722-756.
- Tannock, G.W.** 1995. More than smell: the complexity of the normal microflora. En: *Normal Microflora. An Introduction to Microbes Inhabiting the Human Body*, Chapman & Hall, Londres, pp. 1-35.
- Tannock, G.W., Fuller, R., Smith, S.L., Hall, M.A.** 1990. Plasmid profiling of members of the Family *Enterocacteriaceae*, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1225-1228.
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J.** 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 1-10.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J., Huis in't Veld, J.H.J.** 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 11: 73-84.
- Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S., Shankar, N.** 2003. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 2622-2636.
- Thiercelin, M.E.** 1899. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de

- devenir pathogène. *C.R. Séances Soc. Biol.* 5: 269-271.
- Tham, W.** 1988. Histamine formation by enterococci isolated from home-made goat cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 7: 103-108
- Tham, W., Karp, G, Danielsson-Tham, M.L.** 1990. Histamine formation by enterococci in goat cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 11: 225-229.
- Thiercelin, M.E., Jouhaud, L.** 1903. Reproduction de l'entérocoque, taches centrales, granulations périphériques et microblastes. *Séances Soc. Biol.* 55 : 686-688.
- Thomas, L.V., Clarkson, M.R., Delves-Broughton, J.** 2000. Nisin. En: *Natural Food Antimicrobial Systems*, Naidu A.S. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, pp. 463-524.
- Thomas, T.D., Batt, R.D.** 1969. Degradation of cell constituents by starved streptococcus lactis in relation to survival. *J. Gen. Microbiol.* 58: 347-362.
- Thompson, T.L., Marth, E.H.** 1986. Changes in Parmesan cheese during ripening: Microflora coliforms, enterococci, anaerobes, propionibacteria and staphylococci. *Milchwissenschaft* 41 : 201-205.
- Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.L., Cacarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penadés, J.R., Lasa, I.** 2001. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 : 4538-4545.
- Tomayko, J.F., Murray, B.E.** 1995. Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinental sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2903-2907.
- Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., Ike, Y.** 1996. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *J. Bacteriol.* 178: 3585-3593
- Tornadijo, M.E., Fresno, J.M., Bernardo, A., Martín Sarmiento, R., Carballo, J.** 1995. Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of Spanish goat's raw milk cheese Armada variety. *Lait* 75: 551-570.
- Toth, C., Van Horn, K.** 1999. Evaluation of motility media for detection of motility in enterococci. En: *Abstracts of the 99th General Meeting of the American Society for Microbiology* 99: 196.
- Tsakalidou, E., Dalezios, I., Kalantzopoulos, G.** 1994. Isolation and partial characterization of an intracellular esterase from *Enterococcus faecium* ACA-DC 237. *J. Biotechnol.* 37: 201-208.
- Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E.** 1992. Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria in Feta and Teleme, two Greek cheeses from ewe's milk. *J. Dairy Sci.* 75: 1389-1393.
- Uhart, M., Ravishankar, S., Maks, N.D.** 2004. Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials on beef franks stored at 4°C. *J. Food Prot.* 67: 2296-2301.
- Upreti, G.C., Hinsdill, R.D.** 1975. Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7: 139-145.

- Uteng, M., Hauge, H.H., Markwick, P.R.L., Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J., Muhle-Goll, C. 2003. Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. *Biochemistry* 42: 11417-11426.
- Vadyvaloo, V., Hastings, J.W., van der Merwe, M.J., Rautenbach, M. 2002. Membranes of class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5223-5230.
- van Belkum, M.J., Worobo, R.W., 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., Kok, J., 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.
- Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrighetto, C., Knijff, E., Torriani, S., Bjorkroth, K.J., Franz, C.M., Foulquie Moreno, M.R., Revets, H., De Vuyst, L., Swings, J., Kersters, K., Dellaglio, F., Holzappel, W.H. 2002. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1381-1391.
- Vankerckhoven, V.V., van Autgaerden, T., Huys, G., Vancanneyt, M., Swings, J., Goossens, H. 2004. Establishment of the PROSAFE collection of probiotic and human lactic acid bacteria. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 16: 131-136.
- Vaughan, E.E., de Vries, M.C., Zoetendal, E.G., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M. 2002. The intestinal LABs. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 341-352.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Baumler, A.J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W.T., Fang, F.C. 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* 401: 804-808.
- Venema, K., Kok, J., Marugg, J.D., Toonen, M.Y., Ledeboer, A.M., Venema, G., 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.
- Vergio, F. 1954. Anti- und probiotika. *Hipocrates* 25: 116-119.
- Vignolo, G., Palacios, J., Farias, M.E., Sesma, F., Schillinger, U., Holzappel, W., Oliver, G. 2000. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr. Microbiol.* 41: 410-416.
- Villani, F., Coppola, S. 1994. Selection of enterococcal strains for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia* 44: 97-105.
- Vlaemynck, G., Herman, L., Coudijzer, K. 1994. Isolation and characterization of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria*

- monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 211-225.
- Waar, K., Muscholl-Silberhorn, A.B., Willems, R.J., Slooff, M.J., Harmsen, H.J., Degener, J.E.** 2002. Genogrouping and incidence of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients differ from blood culture and fecal isolates. *J. Infect. Dis.* 185: 1121-1127.
- Walsh, C.** 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406: 775-781.
- Wastfelt, M., Stalhammar-Carlemalm, M., Delisse, A.M., Cabezon, T., Lindahl, G.** 1997. Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely repetitive structure. *J. Biol. Chem.* 271: 18892-18897.
- Waters, C.M., Antiporta, M.H., Murray, B.E., Dunny G.M.** 2003. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J. Bacteriol.* 185: 3613-3623.
- Watson, R.M., Woody, R.W., Lewis, R.V., Bohle, D.S., Andreotti, A.H., Ray, B., Miller, K.W.** 2001. Conformation changes in pediocin AcH upon vesicle binding and approximation of the membrane-bound structure in detergent micelles. *Biochemistry* 40: 14037-14046.
- Wegener, H.C., Madsen, M., Nielsen, N., Aarestrup, F.M.** 1997. Isolation of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from food. *Int. J. Food Microbiol.* 35: 57-66.
- Weigel, L.M., Clewell, D.B., Gill, S.R., Clark, N.C., McDougal, L.K., Flannagan, S.A., Kolonay, J.F., Shetty, J., Killgore, G.E., Tenover, F.C.** 2003. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 302: 1569-1571.
- Wells, C.L., Moore, E.A., Hoag, J.A., Hirt, H., Dunny, G.M., Erlandsen, S.L.** 2000. Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. *Infect. Immun.* 68: 7190-7194.
- West, P.A., Hewitt, J.H., Murphy, O.M.** 1979. The influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *J. Appl. Bacteriol.* 46: 269-277.
- WHO.** 2001. The optimal duration of exclusive breastfeeding. Note for the Press n° 7. Ginebra.
- WHO/UNICEF.** 1989. Protección, promoción y apoyo de la lactancia natural. La función especial de los servicios de maternidad. Ginebra.
- Wiedemann, I., Benz, R., Sahl, H.-G.** 2004. Lipid II-mediated pore formation by the peptide antibiotic nisin: a black lipid membrane study. *J. Bacteriol.* 10: 3259-3261.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., Sahl, H.-G.** 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.* 276: 1772-1779.
- Williams, A.G., Noble, J., Banks, J.M.** 2001. Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *Int.*

- Dairy J.* 11: 203-215.
- Wood, B.J.B.** 1997. *Microbiology of Fermented Foods*. Blackie, Londres.
- Wood, B.J.B. Holzapfel, W.H.** 1995. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Blackie, Londres.
- Worobo, R.W., Henkel, T., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J., Stiles, M.E.** 1994. Characteristics and genetics determinants of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology* 140: 517-526.
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G.** 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 12: 91-109.
- Wright, K.C., Fenny, A.M.** 1998. The bacteriological screening of donated human milk: Laboratory experience of British Paediatric Association's published guidelines. *J. Infection* 36: 23-27.
- Wright, K.C., Bauer, M., Naylor, A., Sutcliffe, E., Clark, L.** 1998. Increasing breastfeeding rates to reduce infant illness at the community level. *Pediatrics* 101: 837-844.
- Wunderlich, P.F., Braun, L., Fumagalli, I., D'Apuzzo, V., Heim, F., Karly, M., Lodi, R., Politta, G., Vonbank, F., Ja Zeltner, L.** 1989. Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus* SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. *J. Int. Med. Res.* 17: 333-338.
- Xu, Y., Singh, K.V., Qin, X., Murray, B.E., Weinstock, G.M.** 2000. Analysis of a gene cluster of *Enterococcus faecalis* involved in polysaccharide biosynthesis. *Infect. Immun.* 68: 815-823.
- Yoshioka, H., Iseki, K., Fugita, K.** 1983. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics* 72: 317-321.
- Yousef, A.E., Luchansky, J.B., Degnan, A.J., Doyle, M.D.** 1991. Behavior of *Listeria monocytogenes* in wiener exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* H or pediocin AcH during storage at 4 or 25°C. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1461-1467.
- Yuksel, S., Hansen, J.** 2007. Transfer of nisin gene cluster from *Lactococcus lactis* ATCC 11454 into the chromosome of *Bacillus subtilis* 168. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 640-649.
- Zárate, V., Belda, F., Pérez, C., Cardell, E.** 1997. Changes in the microbial flora of Tenerife goat's milk cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 7: 635-641.
- Zeng, J., Teng, F., Murray, B.E.** 2005. Gelatinase Is Important for Translocation of *Enterococcus faecalis* across Polarized Human Enterocyte-Like T84 Cells. *Infect. Immun.* 73: 1606-1612.