

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos



**CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA DE LA
ENTEROCINA P Y EVALUACIÓN DE SU CLONACIÓN,
PRODUCCIÓN Y EXPRESIÓN FUNCIONAL EN
Escherichia coli, Methylobacterium extorquens, Lactococcus
lactis y Pichia pastoris**

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

Jorge Gutiérrez Merino

Bajo la dirección de los Doctores:

Pablo E. Hernández Cruza
Luis M. Cintas Izarra

Madrid, 2005

ISBN: 84-669-2851-0

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA DE
LA ENTEROCINA P Y EVALUACIÓN DE SU
CLONACIÓN, PRODUCCIÓN Y EXPRESIÓN
FUNCIONAL EN *Escherichia coli*,
Methylobacterium extorquens,
Lactococcus lactis y *Pichia pastoris***

TESIS DOCTORAL

JORGE GUTIÉRREZ MERINO

Madrid, 2005

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA
DE LOS ALIMENTOS**



TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA DE
LA ENTEROCINA P Y EVALUACIÓN DE SU
CLONACIÓN, PRODUCCIÓN Y EXPRESIÓN
FUNCIONAL EN *Escherichia coli*,
Methylobacterium extorquens,
Lactococcus lactis y *Pichia pastoris***

Memoria que, para optar al título de Doctor, con mención honorífica de “Doctorado Europeo”, presenta el Licenciado Jorge Gutiérrez Merino

Madrid, marzo de 2005



Departamento de Nutrición,
Bromatología
y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91-394 3749. Fax: 91-394 3743

PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA Y LUIS M. CINTAS IZARRA, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD Y PROFESOR CONTRATADO DOCTOR, RESPECTIVAMENTE, DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada: "Caracterización inmunoquímica de la enterocina P y evaluación de su clonación, producción y expresión funcional en *Escherichia coli*, *Methylobacterium extorquens*, *Lactococcus lactis* y *Pichia pastoris*" de la que es autor el Licenciado en Veterinaria D. Jorge Gutiérrez Merino, 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 título de Doctor con mención honorífica de "Doctorado Europeo".

Madrid, 8 de marzo de 2005.

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Pablo E. Hernández Cruza

Luis M. Cintas Izarra

A mis padres
A mi hermana María
A mi abuela Catalina
A Carlota

La verdadera amistad llega cuando el silencio entre dos parece ameno
Erasmus de Rotterdam

La gente buena, si se piensa un poco en ello, ha sido siempre gente alegre
Ernest Hemíngway

El sabio no se sienta para lamentarse, sino que se pone alegremente a su
tarea de reparar el daño hecho
William Shakespeare

Quisiera dar las gracias a todas aquellas personas que, de algún modo, han participado en la realización de esta Tesis Doctoral.

A Juan A. Ordóñez y Lorenzo de la Hoz, directores del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos durante el período de realización de este trabajo de investigación, por acogerme en el Departamento y por la amabilidad mostrada a lo largo de estos años.

A mis directores de tesis, por abrirme las puertas al maravilloso mundo de la investigación. A Luís Cintas, por su entusiasmo, por la ayuda que me ha ofrecido en todo momento y, sobre todo, por esas pequeñas charlas, al final de cada una de las interminables y duras jornadas de trabajo, y de las que guardo un grato recuerdo. A Pablo Hernández, por confiar en mí desde el inicio, por su preocupación diaria y por brindarme la oportunidad de vivir una experiencia de la que he disfrutado y que siempre recordaré. Sin tu trabajo y dedicación, la realización de esta tesis no hubiera sido posible. Muchas gracias por todo.

A todas las personas que han pasado por el laboratorio "punto LAB" y que han formado parte de mi grupo de investigación. A José María, por su inestimable ayuda durante mis primeros pasos como investigador. A Alicia, por su simpatía y alegría. A Raquel, por su confianza y por la amistad que hemos consolidado durante estos años. A Rosanna, por el cariño mostrado y por preocuparse de que siempre tuviera lo mejor, tanto en lo personal como en lo profesional. A Afonso, mi "hermano" brasileño, por su sonrisa contagiosa y por los inolvidables momentos que hemos vivido juntos. A María, por su compañerismo. A las nuevas incorporaciones, Bea, Antonio y Jorge, por su frescura.

A todos los compañeros y profesores del Departamento que he conocido estos 5 años y que han hecho posible que la convivencia fuera mucho más sencilla durante las largas horas de trabajo. En este apartado, me gustaría destacar a mi querido amigo Luís Asensio, persona entrañable y única, a pesar de sus gustos musicales. Siempre pensé que merecía la pena tenerte como amigo y creo que no me equivoqué. Tampoco podría olvidarme de Juan, por esas largas travesías por el Pirineo aragonés, por su obsesión por el Monte Perdido, ni de mis antiguas vecinas de laboratorio, Ana, Belén y Ju, ni de las nuevas, Esther y Rocío, por su ayuda desinteresada.

A todas las personas que conocí durante mis estancias en Canadá y en Holanda. A los doctores Carlos B. Míguez y Jan Kok, por aceptarme en sus respectivos centros de investigación y por preocuparse de que mi estancia fuera lo más agradable posible. A mis inolvidables amigos "montrealenses", David, Denis, Erin, Fabio, Poh, y en especial, a la "petit mademoiselle" Lucie, por participar en uno de los momentos más bonitos de mi vida. Merci beaucoup!! A Paolo y a Carmen (compañera de "punto LAB"), a los que tuve la suerte de conocer en Groningen. Y como no, a Naomi, Rute, Rasmus y Chris, por esos irrepetibles "Friday meetings" en tierras holandesas.

Igualmente, quisiera agradecer al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT) la concesión de la beca predoctoral y las ayudas para las estancias cortas en Canadá y en Holanda, las cuales han contribuido significativamente en mi formación científica y humana. Asimismo, el trabajo realizado ha sido posible gracias a los fondos concedidos por la Comunidad de Madrid (CAM), proyecto 07G/0026/2000, por el Ministerio de Educación y Cultura (MEC), proyecto AGL2000-0707, y por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, proyecto AGL2003-01508. A Inglof F. Nes, por su ayuda en todo momento.

A mis amigos de "Moral", Cheto y Pablo, y de la Facultad, Álvaro, Luis, Pablo, Rafa y "Suker", por compartir conmigo una de las etapas más felices de mi vida. A mis colegas de "Fuenla" y "Lega", Andrés, "Chulo", David, Edu, "Jara", Javi, Nacho, "Pepino", Rafa y "Rupí", por hacerme recordar de dónde vengo. Es obvio que nuestras ciudades nunca llegarán a ser patrimonio de la Humanidad, sin embargo me siento orgulloso de mis raíces y vosotros participáis en ello. Mantener una amistad durante más de 10 años no debe ser casualidad. Y, por supuesto, a José, el de la "Caixa" (no sabía en que grupo incluirte), al que le quería recordar que siempre hay que intentar sacar algo positivo de cualquier situación desagradable. Muchas gracias amigos, sin vuestro apoyo y ayuda, sobre todo en los momentos difíciles, todo esto no tendría sentido.

A mi familia, por estar a mi lado siempre que los he necesitado. A mi hermana María, que aunque creas que me comporto como un segundo padre, piensa que es porque quiero todo lo mejor para ti. A mi abuela Catalina, de la que aprendí a dar sin pedir nada a cambio. Y a mis padres, Loli y Félix, por cuidarme, por su sacrificio y por hacer posible que todos mis pequeños sueños e ilusiones se hicieran realidad. Todo lo que soy se lo debo a ellos y nunca debería olvidarlo. Gracias, muchas gracias, muchísimas gracias.

Por último, no podía acabar sin dar las gracias a una de las personas que más ha contribuido en la realización de esta tesis y a la que quiero con locura. Muchas gracias Carlota, por tu apoyo incondicional, por tu infinita paciencia, por creer en mí y por hacerme sentir mucho más seguro de mí mismo. Sin tu alegría y comprensión, no hubiera sido capaz de seguir hacia delante. Sencillamente, gracias por estar ahí.

ÍNDICE

	Página
CAPÍTULO I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR Y DE LOS OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	1
CAPÍTULO II. INTRODUCCIÓN GENERAL	7
<u>II.1. LAS BACTERIOCINAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y SU PAPEL COMO BIOCONSERVANTES DE LOS ALIMENTOS</u>	9
II.1.1. LAS BACTERIAS LÁCTICAS	9
II.1.2. EL GÉNERO <i>Enterococcus</i>	9
II.1.3. CONCEPTO DE BIOCONSERVANTE DE LOS ALIMENTOS	10
II.1.4. LAS BACTERIOCINAS DE LAS BACTERIA LÁCTICAS	11
II.1.4.1. Definición y clasificación	11
II.1.4.2. Propiedades físico-químicas	12
II.1.4.3. Purificación de las bacteriocinas	13
II.1.4.4. Espectro de actividad	13
II.1.4.5. Modo de acción	14
II.1.4.6. Organización genética y biosíntesis	14
<u>II.2. PROCESADO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS EN BACTERIAS Y LEVADURAS</u>	17
II.2.1. MECANISMOS DE PROCESADO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS	18
II.2.1.1. Sistema transportador-ABC ó sistema de transporte dedicado	18
II.2.1.2. Ruta general de secreción o sistema <i>sec</i>	19
II.2.1.2.1. Componentes del sistema <i>sec</i>	20
II.2.1.2.2. Mecanismo de translocación proteica	22
II.2.1.2.3. Sistema <i>sec</i> en bacterias Gram-positivas	22
II.2.1.2.4. Sistema <i>sec</i> en levaduras	24
II.2.2. PROCESADO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS EN BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS	24
II.2.3. PROCESADO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS	28
II.2.3.1. Procesado, transporte y secreción de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas mediante transportadores-ABC o el sistema dedicado de transporte (DTS)	29

II.2.3.2. Procesado, transporte y secreción de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas mediante la ruta general de secreción (GSP) o sistema <i>sec</i>	30
II.2.4. PROCESADO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS EN LEVADURAS	31
<u>II.3. LA ENTEROCINA P, UNA BACTERIOCINA SEC-DEPENDIENTE DE LA SUBCLASE IIa</u>	32
II.3.1. BACTERIOCINAS DE LA CLASE II	32
II.3.2. BACTERIOCINAS DE LA SUBCLASE IIa	33
II.3.2.1. Características estructurales	33
II.3.2.2. Organización genética y biosíntesis	33
II.3.2.3. Actividad antimicrobiana: modo y espectro de acción	35
II.3.3. ENTEROCINAS PRODUCIDAS POR ENTEROCOCOS	36
II.3.4. LA ENTEROCINA P	37
II.3.4.1. Estructura molecular	37
II.3.4.2. Organización genética y biosíntesis	39
II.3.4.3. Espectro y modo de acción	39
II.3.4.4. Utilización de la enterocina P como bioconservante de los alimentos	40
<u>II.4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS</u>	40
II.4.1. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS	40
II.4.1.1. Pruebas biológicas	40
II.4.1.2. Pruebas genéticas	40
II.4.1.3. Pruebas inmunológicas	41
II.4.2. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A BACTERIOCINAS	42
II.4.2.1. Protocolo de inmunización: elección del inmunógeno	42
II.4.2.1.1. <i>Utilización de bacteriocinas (semi)purificadas</i>	43
II.4.2.1.2. <i>Utilización de péptidos sintéticos de especificidad predeterminada</i>	44
II.4.2.2. Producción de anticuerpos	46
II.4.2.2.1. <i>Producción de anticuerpos policlonales</i>	46
II.4.2.2.2. <i>Producción de anticuerpos monoclonales</i>	46
II.4.2.2.3. <i>Producción de anticuerpos recombinantes</i>	46
II.4.2.3. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos generados: elección del inmunoensayo y del inmunoformato	46

II.4.2.3.1. <i>Tipos de inmunoensayos</i>	47
II.4.2.3.2. <i>Tipos de inmunoformatos</i>	47
II.4.2.4. Aplicaciones de los anticuerpos	47
II.4.2.4.1. <i>Inmunolocalización antigénica</i>	48
II.4.2.4.2. <i>Inmunopurificación</i>	48
II.5. <u>PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS</u>	49
II.5.1. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA EN <i>Escherichia coli</i>	50
II.5.1.1. Producción heteróloga basada en el empleo de sistemas de procesado, transporte y secreción propios de las bacteriocinas	51
II.5.1.2. Producción heteróloga basada en el empleo de sistemas de procesado, transporte y secreción de proteínas de <i>E. coli</i>	52
II.5.1.3. Otros sistemas de producción heteróloga de bacteriocinas en <i>E. coli</i>	53
II.5.2. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA EN BACTERIAS LÁCTICAS	53
II.5.1.1. Producción heteróloga basada en la expresión de los genes nativos	54
II.5.1.1.1. <i>Bacteriocinas de la clase I</i>	55
II.5.1.1.2. <i>Bacteriocinas de la clase II</i>	55
II.5.1.1.3. <i>Bacteriocinas de la clase III</i>	57
II.5.1.1.4. <i>Bacteriocinas de otras clases</i>	57
II.5.1.2. Producción heteróloga basada en el intercambio sistemas de procesado, transporte y secreción	57
II.5.1.2.1. <i>Intercambio de secuencias líder y/o de genes del sistema transportador-ABC ó sistema de transporte dedicado (DTS)</i>	57
II.5.1.2.2. <i>Intercambio de secuencias líder por péptidos señal reconocidos por la ruta general de secreción (GSP) ó sistema sec</i>	60
II.5.1.3. Aplicaciones y perspectivas futuras de la producción heteróloga de bacteriocinas en bacterias lácticas	62
II.5.3. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA EN LEVADURAS	63
CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA Y PURIFICACIÓN DE LA ENTEROCINA P	65

<i>CAPÍTULO IV. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA P EN Escherichia coli</i>	77
<i>CAPÍTULO V. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA P EN Methylobacterium extorquens</i>	91
<i>CAPÍTULO VI. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA P EN Lactococcus lactis</i>	115
<i>CAPÍTULO VII. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA P EN Pichia pastoris</i>	151
<i>CAPÍTULO VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL</i>	181
<u>VIII.1. CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA Y PURIFICACIÓN DE LA ENTEROCINA P</u>	183
VIII.1.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES DE ESPECIFICIDAD PREDETERMINADA FRENTE A LA ENTEROCINA P	183
VIII.1.2. INMUNOPURIFICACIÓN DE LA ENTEROCINA P	184
VIII.1.3. MONITORIZACIÓN DE LA PURIFICACIÓN A HOMOGENEIDAD DE LA ENTEROCINA P	185
<u>VIII.2. CLONACIÓN, PRODUCCIÓN Y EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LA ENTEROCINA P EN HOSPEDADORES HETERÓLOGOS</u>	186
VIII.2.1. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA P EN <i>Escherichia coli</i>	186
VIII.2.1.1. Clonación y producción de la enterocina P en <i>E. coli</i>	187
VIII.2.1.2. Purificación de la enterocina P producida por cultivos recombinantes de <i>E. coli</i>	189
VIII.2.2. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA P EN <i>Methylobacterium extorquens</i>	190
VIII.2.2.1. Clonación y producción de la enterocina P en <i>M. extorquens</i>	190
VIII.2.2.2. Purificación de la enterocina P producida por <i>M. extorquens</i>	191
VIII.2.2.3. Producción heteróloga de la enterocina P en bacterias <i>Gram-negativas</i>	192

VIII.2.3. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA P EN <i>Lactococcus lactis</i>	192
VIII.2.3.1. Producción y expresión funcional de la enterocina P en <i>L. lactis</i>	193
VIII.2.3.1.1. Producción heteróloga de la enterocina P en diferentes subespecies de <i>L. lactis</i>	194
VIII.2.3.1.2. Producción heteróloga de la enterocina P utilizando diferentes sistemas de expresión	195
VIII.2.3.1.3. Producción heteróloga de la enterocina P utilizando diferentes fragmentos de clonación	197
VIII.2.3.1.4. Coproducción de la enterocina P y de la nisina A en <i>L. lactis</i> DPC5598	197
VIII.2.3.2. Purificación de la enterocina P producida por <i>L. lactis</i>	198
VIII.2.4. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA P EN <i>Pichia pastoris</i>	199
VIII.2.4.1. Producción y expresión funcional de la enterocina P en <i>P. pastoris</i>	199
VIII.2.4.2. Purificación de la enterocina P producida por <i>P. pastoris</i>	202
VIII.2.4. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA P EN <i>Escherichia coli</i> , <i>Methylobacterium extorquens</i> , <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Pichia pastoris</i>	203
CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES	205
CAPÍTULO X. TRABAJO FUTURO	209
CAPÍTULO XI. BIBLIOGRAFÍA	213

1. EXPOSICIÓN GENERAL DEL
PROBLEMA A INVESTIGAR Y DE
LOS OBJETIVOS DEL TRABAJO
DE INVESTIGACIÓN

Las bacterias ácido-lácticas ó bacterias lácticas (BAL) constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos Gram-positivos que intervienen en la obtención y producción de numerosos alimentos fermentados y en el desarrollo de sus características organolépticas. Dichas bacterias poseen también mecanismos de antagonismo microbiano, lo que contribuye a que los alimentos fermentados posean una adecuada calidad higiénica. Los mecanismos de antagonismo microbiano de las BAL incluyen la competencia por los nutrientes del sustrato y la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana, entre los que se encuentran las bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos de origen ribosomal, con o sin modificaciones postraduccionales, que se secretan al medio extracelular y que, en algunos casos, poseen un amplio espectro de acción y actividad antimicrobiana frente a bacterias alterantes y patógenas de los alimentos, tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum*.

Debido a su capacidad de controlar, reducir o eliminar el desarrollo de microorganismos alterantes y de aquellos productores de toxoinfecciones alimentarias (TIA), las bacteriocinas producidas por las BAL podrían utilizarse como "bioconservadores" ó "bioconservantes" de los alimentos, sustituyendo a sustancias químicas menos recomendables por sus posibles efectos tóxicos en la salud de los consumidores. Las bacteriocinas podrían utilizarse en los alimentos: (a) empleando la cepa productora (BAL) bacteriocinogénica; (b) como ingrediente alimentario, empleando un sustrato fermentado por una cepa bacteriocinogénica; y (c) como aditivo alimentario, adicionando la bacteriocina purificada. Hasta ahora, la única bacteriocina autorizada para su empleo como aditivo alimentario es la nisina. No obstante, el interés de la industria alimentaria por satisfacer la demanda de los consumidores, que solicitan productos más naturales y menos procesados, sugiere que muchas otras bacteriocinas ó bacterias lácticas (BAL) bacteriocinogénicas, podrían emplearse en un futuro próximo como aditivos antimicrobianos naturales ó como cultivos iniciadores, protectores o probióticos de los alimentos.

En este contexto, conocemos que la enterocina P (EntP) es una bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* P13, una bacteria láctica aislada de un embutido crudo curado español elaborado artesanalmente. La EntP es una bacteriocina de la subclase IIa, similar a las pediocinas y con una potente actividad antilisteriana. Sin embargo, al estar producida por un microorganismo del género *Enterococcus* su empleo como "bioconservante" podría ser cuestionado por la industria alimentaria, ya que, tradicionalmente, los enterococos se han considerado como microorganismos responsables de la formación de aminas biógenas e indicadores de posible contaminación fecal. Asimismo, la utilización de enterococos como productores de bacteriocinas debería evaluarse con cautela porque numerosos aislados del género *Enterococcus* codifican factores potenciales de virulencia y poseen genes de resistencia a antibióticos. Ello hace que, por razones de seguridad e higiene alimentaria, se considere conveniente la clonación, producción y expresión funcional de la EntP en otros hospedadores más seguros. La elección de la EntP como agente antimicrobiano natural de los alimentos pasa también por el desarrollo de técnicas que faciliten su purificación de los sobrenadantes de los cultivos productores.

La mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL se sintetizan como precursores inactivos o pre-péptidos con una extensión N-terminal del tipo secuencia líder, que es reconocida y procesada por transportadores ABC-dedicados para la secreción de la bacteriocina madura a través de la membrana citoplásmica, ó del tipo péptido señal, la cual es hidrolizada para la externalización de la bacteriocina madura a través de la ruta general de secreción (GSP) o ruta *sec*-dependiente. Los péptidos activos (forma madura) son moléculas catiónicas de unos 20 a 60 aminoácidos, clasificables bioquímicamente en cinco categorías: clase I, clase II (subclase IIa, subclase IIb y subclase IIc), clase III, clase IV y clase V. No obstante, también se conoce que

algunas bacteriocinas se sintetizan sin una extensión N-terminal, aunque en este caso, su mecanismo de procesado y secreción no se ha dilucidado todavía. También se sabe que *E. faecium* P13 codifica la EntP como un pre-péptido de 71 aminoácidos, con un péptido señal de 27 aminoácidos y la bacteriocina madura (EntP) de 44 aminoácidos. En el caso de la EntP, su péptido señal es clave para su reconocimiento como parte de la ruta general de secreción o sistema sec-dependiente ya que su hidrólisis y procesado conducirá a la externalización de la EntP madura al sobrenadante de los cultivos productores. Por ello, el desarrollo de estrategias de clonación, producción y expresión funcional de la EntP en hospedadores heterólogos solamente requerirá la utilización de vectores de expresión que permitan la clonación y posterior expresión del gen que codifica la pre-enterocina P (*entP*) con o sin su putativa proteína de inmunidad (*entIP*).

Por otro lado, la disponibilidad de métodos analíticos fiables de detección y cuantificación de bacteriocinas potenciaría su empleo en los alimentos. En este contexto, las técnicas que utilizan reactivos y técnicas inmunológicas se consideran una buena elección para la identificación y cuantificación de las bacteriocinas en diversos sustratos. Las técnicas inmunológicas manifiestan una elevada especificidad y sensibilidad, además de ser fácilmente automatizables, lo que permitiría evaluar un gran número de muestras y reducir la subjetividad en la interpretación de los resultados obtenibles por otras técnicas biológicas. No obstante, para ello, sería conveniente generar anticuerpos que reconociesen la(s) bacteriocina(s) objeto de estudio. El número de trabajos relacionados con la obtención de anticuerpos frente a bacteriocinas es muy reducido lo que, probablemente, se debe a la dificultad de generar anticuerpos frente a las bacteriocinas, moléculas pequeñas, seguramente no inmunógenas y de limitada disponibilidad. Una forma de generar anticuerpos frente a las bacteriocinas consistiría en la obtención de anticuerpos de especificidad predeterminada frente a péptidos sintéticos, deducidos de la secuencia aminoacídica conocida de las bacteriocinas de interés y conjugados a una molécula inmunógena.

Por tanto, los objetivos de este trabajo de investigación fueron los siguientes:

- (1). Caracterización inmunoquímica y purificación de la enterocina P en un sólo paso por inmunocromatografía de afinidad
- (2). Clonación, producción y expresión funcional de la enterocina P en hospedadores heterólogos

Para la consecución del primer objetivo, fue necesaria la realización de los siguientes objetivos parciales:

- (1). Obtención de anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada frente a la EntP.
- (2). Detección y cuantificación de la EntP mediante el empleo y desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) adecuadas.
- (3). Purificación de la EntP mediante el empleo y desarrollo de columnas cromatográficas de inmuoafinidad.
- (4). Purificación a homogeneidad de la EntP mediante el empleo y desarrollo de diversos procesos multi-cromatográficos y monitorización de la eficacia de su recuperación .

- (5). Determinación de características bioquímicas asociadas al comportamiento de la EntP en geles de poliacrilamida (Tricina-SDS-PAGE), tras su transferencia a membranas de nitrocelulosa (*Western blotting*).

Asimismo, la clonación, producción y expresión funcional de la EntP incluyó la utilización de los siguientes hospedadores:

- (1). *Escherichia coli*. Bacteria Gram-negativa reconocida por su potencial como "factoría celular" de síntesis y producción de numerosas moléculas biológicas, y microorganismo en el que se han realizado la mayoría de los estudios sobre el mecanismo molecular de procesado y secreción de péptidos por la ruta general de secreción (GSP) ó sistema sec-dependiente. Además, la disponibilidad de metodologías para su manipulación o modificación genética es casi ilimitada, por lo que constituye un hospedador básico en el que realizar numerosas modificaciones genéticas, transferibles posteriormente, a otros hospedadores de interés.
- (2). *Methylobacterium extorquens*. Bacteria Gram-negativa que utiliza el metanol como única fuente de carbono y energía y que produce péptidos y proteínas de elevado valor biotecnológico tras su desarrollo en un sustrato simple y relativamente económico.
- (3). *Lactococcus lactis*. Bacteria Gram-positiva del grupo de las bacterias lácticas (BAL), ampliamente utilizada como cultivo iniciador en la industria alimentaria y con el reconocimiento de "segura" (GRAS) para su empleo en los alimentos.
- (4). *Pichia pastoris*. Microorganismo eucariota y levadura metilotrófica, de gran potencial como hospedador heterólogo para la sobreproducción de un elevado número y variedad de péptidos y proteínas recombinantes.

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

II.1. LAS BACTERIOCINAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y SU PAPEL COMO BIOCONSERVANTES DE LOS ALIMENTOS

II.1.1. LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias ácido-lácticas ó bacterias lácticas (BAL) son microorganismos Gram-positivos, muy heterogéneos desde el punto de vista morfológico y fisiológico, y cuya característica principal es la producción de ácido láctico como producto mayoritario de un metabolismo fermentativo de los carbohidratos. En general, las BAL son microorganismos de morfología bacilar o cocoide, no esporulados, microaerófilicos o anaerobios facultativos, carecen de citocromos y catalasa *sensu stricto*, y poseen un contenido de guanina y citosina (G+C) inferior a 50 mol%. Actualmente, el grupo de las BAL comprende microorganismos de los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Axelsson, 1998; Cintas y col., 2000a, Herranz, 2001; Cintas y col., 2001a). Las bacterias lácticas se localizan frecuentemente en hábitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas, y con bajas tensiones de oxígeno (Aguirre y Collins, 1993), como por ejemplo, la leche y productos lácteos, productos cárnicos y vegetales fermentados, frutas y hortalizas frescas, ensilados, pescado y derivados de la pesca (Lindgren y Dobrogosz, 1990; Stiles, 1996; Cintas y col., 2000a). Además, algunas bacterias lácticas son habitantes comunes del tracto gastrointestinal y mucosas del hombre y animales, del estiércol y de aguas residuales urbanas e industriales (Aguirre y Collins, 1993; Axelsson, 1998; Cintas y col., 2000a).

II.1.2. EL GÉNERO *Enterococcus*

Dado que la bacteriocina utilizada en este trabajo está producida por una BAL del género *Enterococcus*, a continuación, se describen las características más relevantes de este género. El género *Enterococcus* fue descrito por Schleifer y Kilpper-Bälz (1984), para acomodar taxonómicamente a especies previamente reconocidas como *Streptococcus faecalis* y *S. faecium*, y agrupa a microorganismos desarrollados entre 10 y 45°C, en presencia de cloruro sódico al 6,5%, en un rango de pH entre 4,6 y 9,6-10 y en medios con un 0,04% (p/v) de azida de sodio (Franz y col., 1999a; Herranz, 2000; Martínez, 2003). Filogenéticamente, los enterococos pertenecen a la subdivisión "Clostridio" de las bacterias Gram-positivas, junto con BAL de otros géneros, como *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. De los citados, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* y *Carnobacterium* son los filogenéticamente más cercanos a los enterococos (Franz y col., 1999a). Asimismo, en base a estudios comparativos de la fracción 16S del RNAr, el género *Enterococcus* se divide en cuatro grupos: (i) "faecium", (ii) "avium", (iii) "gallinarum" y (iv) "cecorum" (Franz y col., 1999a; Herranz, 2000). La mayoría de las especies de este género forman parte de alguno de los 4 grupos descritos aunque, algunas especies, como *E. faecalis*, forman líneas independientes y no se incluyen en ninguno de ellos.

Los enterococos son microorganismos muy ubicuos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, pudiéndose localizar en el suelo, agua, plantas, insectos, tracto gastrointestinal del hombre y animales y en todo tipo de alimentos (Franz y col., 1999a; Giraffa, 2003; Martínez, 2003). *E. faecium* y *E. faecalis* son los enterococos aislados con mayor frecuencia de alimentos como la leche y productos lácteos, embutidos crudos curados, vegetales

y ensilados, aceitunas y pescados (Herranz, 2000). Parece ser que los enterococos colonizan los alimentos desde el tracto gastrointestinal o contaminaciones ambientales y que debido a su habilidad para sobrevivir a condiciones adversas de pH, temperatura y salinidad, se desarrollan y multiplican en estos sustratos con facilidad (Giraffa, 2003).

Aunque un elevado número de enterococos se han aislado de alimentos, dónde juegan un papel importante en su obtención por fermentación y conservación (Franz y col., 1999a; Giraffa, 2003; Martínez, 2003), su posible potencial patógeno está siendo objeto de gran debate. La identificación y aislamiento de enterococos de infecciones nosocomiales y con resistencias a antibióticos (Jett y col., 1994; Morrison y col., 1997; Haas y col., 2002; Shankar y col., 2002), y que, además, codifican otros factores de virulencia (Franz y col., 2001; Eaton y Gasson, 2002), hace que su presencia en los alimentos sea cuestionable. No obstante, los enterococos aislados de alimentos suelen ser más “seguros” que los procedentes de fuentes ambientales o clínicas y, algunos estudios sugieren que los enterococos de origen clínico y los de origen alimentario no se encuentran genéticamente relacionados (Lemcke y Bülte, 1997). Además, muchos enterococos se han utilizado intencionadamente como cultivos iniciadores y probióticos (Franz y col., 1999a; Giraffa, 2003; Martínez, 2003) y se han ingerido sin peligro conocido para la salud del hombre y de los animales.

II.1.3. CONCEPTO DE BIOCONSERVANTE DE LOS ALIMENTOS

Debido a su metabolismo, las BAL desempeñan un papel importante en la obtención de alimentos fermentados de origen cárnico, lácteo y vegetal. Las actividades metabólicas de las BAL modifican la textura, aroma, sabor, color, digestibilidad y palatabilidad de las materias primas, originando productos finales de características organolépticas diferentes y deseables (Cintas y col., 2000b). Asimismo, además de un papel tecnológico, las BAL también desempeñan una función higiénica en los alimentos, debido a la competencia por los nutrientes del sustrato y a la producción de metabolitos que inhiben el desarrollo de bacterias alterantes y patógenas (Herranz, 2000; Cintas y col., 2001a). De los metabolitos con actividad antimicrobiana producidos por las BAL se encuentran el ácido láctico, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, el diacetilo, la reuterina y diversas bacteriocinas (Herranz, 2000; Martínez, 2000; Cintas y col., 2001a).

La mayoría de las técnicas de conservación de los alimentos de las que dispone actualmente la industria alimentaria se basan en complejos procesos tecnológicos y en el empleo de aditivos químicos. Sin embargo, cada vez es mayor el número de consumidores que solicitan productos más “naturales” y “menos procesados”, por lo que se ha sugerido que la industria alimentaria debería promover el empleo de “bioconservantes” o “bioconservadores” (Cleveland y col., 2001; O'Sullivan y col., 2002; Devlieghere y col., 2004), términos que engloban la utilización de compuestos antimicrobianos naturales de origen animal, vegetal o microbiano, que no parecen poseer un efecto perjudicial en la salud de los consumidores y que permiten incrementar la calidad higiénica, seguridad y vida útil de los alimentos. De los compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas, las bacteriocinas son las más interesantes tecnológicamente.

En general, las bacteriocinas de las bacterias lácticas poseen una serie de características que favorecen su empleo como “bioconservantes” en la industria alimentaria. Estas características incluyen (Herranz, 2000; Martínez, 2000):

- (1). Ser producidas por bacterias reconocidas generalmente como seguras (GRAS, del inglés, "*Generally Recognized As Safe*"), como es el caso de las bacteriocinas de los géneros *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* o *Streptococcus*.
- (2). Ser degradadas por enzimas proteolíticos del tracto digestivo, por lo que no originan disbiosis intestinales ni fenómenos alérgicos.
- (3). No ser activas biológicamente frente a células eucariotas.
- (4). Muchas de ellas poseen un amplio espectro y elevada actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos y actúan sinérgicamente con otros sistemas de conservación de los alimentos.
- (5). La mayoría son resistentes a tratamientos tecnológicos de conservación de los alimentos, como la pasteurización, la liofilización o la acidificación.

Es de todos conocido que la utilización de BAL bacteriocinogénicas en los alimentos es una práctica que se lleva realizando, intencionada o inadvertidamente, durante siglos (Stiles, 1996). Las bacteriocinas podrían utilizarse en los alimentos de tres maneras distintas: (i) inoculando el alimento con la BAL bacteriocinogénica para que ésta produzca la bacteriocina *in situ*, (ii) empleando un medio fermentado por una cepa bacteriocinogénica como ingrediente alimentario; y (iii) adicionando la bacteriocina purificada o parcialmente purificada como conservante alimentario (Abee y col., 1995; Holzapfel y col., 1995; Schillinger y col., 1996; Aymerich y Hugas, 1998; Ross y col., 1999). Actualmente, el ALTA 2341™, un medio fermentado que contiene la pediocina PA-1 y otros componentes no bien descritos, se utiliza como ingrediente alimentario (Aymerich y Hugas, 1998), mientras que la nisina es la única bacteriocina autorizada como aditivo alimentario (aditivo alimetario E-234, en la Unión Europea), empleándose para tal fin en más de 50 países, incluido España (Cintas y col., 2000b). Sin duda, la utilización de bacteriocinas conjuntamente con otros sistemas de conservación de los alimentos permitiría compatibilizar la obtención de alimentos más seguros con una reducción considerable de las cantidades de aditivos químicos empleados habitualmente y/o con la intensidad de los tratamientos tecnológicos aplicados (Leistner y Gorris 1995).

II.1.4. LAS BACTERIOCINAS DE LAS BACTERIA LÁCTICAS

II.1.4.1. Definición y clasificación

Las bacteriocinas se reconocen como péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal producidos por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Klaenhammer, 1993; Jack y col., 1995; Nes y col., 1996) y que se engloban dentro de un grupo más amplio y heterogéneo de péptidos antimicrobianos producidos por plantas, hongos y células y tejidos animales (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Herranz, 2000; Diep y Nes, 2002). Todos estos péptidos contribuyen a mecanismos de defensa innatos y tienen en común su pequeño tamaño molecular, su naturaleza catiónica y anfipática y su capacidad de desestabilizar las membranas citoplasmáticas de las células sensibles (Riley y Wertz, 2002). Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas, como las colicinas de *Escherichia coli*, poseen, generalmente, un tamaño molecular superior a 20 kDa y un espectro de acción reducido, mientras que las bacteriocinas de las bacterias Gram-positivas son, en su mayoría, péptidos de un tamaño molecular inferior a 6 kDa pero con profundas variaciones en su espectro de acción (Nissen-Meyer y Nes, 1997).

A pesar de la heterogeneidad de su tamaño molecular, propiedades bioquímicas, espectro de acción y organización genética, las bacteriocinas de las bacterias lácticas poseen características comunes que permiten agruparlas en cinco clases (Klaenhammer, 1993; Sablon y col., 2000; Cintas y col., 2001a; Diep y Nes, 2002; Kemperman y col., 2003a,b):

- (1) Clase I: lantibióticos. Son bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (<5 kDa), termoestables y con aminoácidos modificados postraduccionalmente, de los que los más comunes son la deshidroalanina (DHA) y la deshidrobutirina (DHB), originados por deshidratación de la serina y la treonina, respectivamente. La condensación de los residuos DHA y DHB con el grupo sulfhidrilo de las cisteínas de la molécula origina, respectivamente, los aminoácidos lantionina y la β -metillantionina (Guder y col., 2000; McAuliffe y col., 2001). El ejemplo más característico de esta clase de bacteriocinas es la nisina, la bacteriocina más estudiada hasta ahora.

A su vez, en función de su estructura y modo de acción, los lantibióticos se subdividen en 2 grupos:

- (a) Grupo IA: péptidos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana y que engloban a los lantibióticos de un sólo péptido y a aquellos que requieren la presencia de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana total.
 - (b) Grupo IB: péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos.
- (2) Clase II: bacteriocinas lineales y no modificadas postraduccionalmente. Son péptidos pequeños (< 10 kDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática. El representante más característico de este grupo es la pediocina PA-1, la bacteriocina más estudiada después de la nisina. Las características de las bacteriocinas de esta clase se detallan mejor en la sección II.3 de esta memoria.
 - (3) Clase III: bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles. La bacteriocina más conocida de esta clase es la helveticina J.
 - (4) Clase IV: bacteriocinas complejas. Son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica. Por tanto, esta clase incluye bacteriocinas que se consideran como glicoproteínas (lactocina S) o como lipoproteínas (mesenterocina 52).
 - (5) Clase V: bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente. A esta clase pertenecen la enterocina AS-48 y la gasicina A.

De aquí en adelante se hará una mayor referencia a las bacteriocinas de la clase I y II, las cuales han sido evaluadas con mayor profundidad y de las que se han descrito más de 20 representantes de los lantibióticos y, más de 100, en el caso de las bacteriocinas de la clase II (Kemperman y col., 2003b).

II.1.4.2. Propiedades físico-químicas

La mayoría de las bacteriocinas de las clases I y II son de pequeño tamaño y bajo peso molecular, poseen un elevado pI, son catiónicas a pH 7 y contienen regiones hidrofóbicas y/o hidrofílicas en sus moléculas (Herranz, 2000). Estas dos últimas características se relacionan

con su actividad sobre la membrana citoplasmática, ya que las bacteriocinas cargadas positivamente se unen a los fosfolípidos de carga neta negativa que forman parte de la membrana de las células sensibles y, posteriormente, su naturaleza anfipática permite su distribución a lo largo de la membrana (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Diep y Nes, 2002). Además, todas las bacteriocinas de las clases I y II poseen propiedades muy interesantes desde el punto de vista tecnológico y de seguridad de los alimentos. Generalmente, dichas bacteriocinas son activas a pH ácido y neutro, se inactivan por enzimas proteolíticas, incluyendo los de origen pancreático (tripsina y quimotripsina) y gástrico (pepsina), y resisten condiciones extremas de pH, temperatura y salinidad (Herranz, 2000).

II.1.4.3. Purificación de las bacteriocinas

Dado que las bacteriocinas podrían utilizarse como aditivos antimicrobianos naturales de los alimentos, se han desarrollado diversos protocolos de purificación con el fin de obtener los mejores rendimientos posibles. Los protocolos tradicionalmente empleados incluyen la concentración de la bacteriocina del sobrenadante libre de células del cultivo del microorganismo productor, seguida de diversas etapas cromatográficas cuyo objetivo es la separación de la bacteriocina del resto de proteínas de la fracción previamente concentrada (Martínez, 2000; Cintas y col., 2001a).

Por otro lado, la disponibilidad de anticuerpos específicos frente a bacteriocinas (sección II.4) puede permitir la construcción de matrices de inmunoafinidad para su purificación de los sobrenadantes de las cepas productoras, tal y como se ha demostrado con la purificación de las bacteriocinas nisina A (Suárez y col., 1997), pediocina PA-1 (Martínez, 2000), enterocina B (Rose y col., 2001) y divercina V41 (Richard y col., 2003). Las matrices de inmunoafinidad permiten la purificación de las bacteriocinas en un solo paso y con un rendimiento superior al de los métodos multi-cromatográficos tradicionales.

II.1.4.4. Espectro de actividad

Generalmente, la mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL son activas únicamente frente a bacterias Gram-positivas (Jack y col., 1995). La estructura y composición de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, mohos y levaduras impide el acceso de las bacteriocinas a su lugar de acción, las membranas plasmáticas. Sin embargo, dichos microorganismos pueden ser sensibles a la acción antimicrobiana de las bacteriocinas si se someten a tratamientos que alteren la permeabilidad de su pared, como por ejemplo la congelación, el calentamiento suave, la exposición a ácidos orgánicos, a EDTA y otros quelantes, o a presiones hidrostáticas elevadas (Kalchayanand y col., 1992 y 1998; Arqués y col., 2003).

La heterogeneidad del espectro de acción antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, permite su clasificación en tres grupos de actividad (Cintas y col., 2001a):

- (a). Espectro de acción reducido: bacteriocinas únicamente activas frente a cepas de la misma especie o frente a especies del mismo género.
- (b). Espectro de acción intermedio: bacteriocinas que inhiben a otras BAL distintas al microorganismo productor y a otras bacterias Gram-positivas, incluyendo *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *C. botulinum*.
- (c). Espectro de acción amplio: bacteriocinas que, además de las especies mencionadas anteriormente, inhiben a otras, como *Propionibacterium* spp. y *Bacillus* spp.

II.1.4.5. Modo de acción

El efecto bactericida o bacteriostático de las bacteriocinas producidas por BAL depende de diversos factores, como: (i) la dosis y grado de purificación de la bacteriocina; (ii) el estado fisiológico de las células sensibles; y (iii) las condiciones experimentales del ensayo, entre las que destacan la temperatura, el pH o la presencia de agentes u otros compuestos antimicrobianos que desestabilicen la pared o membrana celular de las células sensibles.

En general, la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas se debe a la desestabilización funcional de la membrana citoplasmática de las células sensibles y se desarrolla en tres fases: unión a la membrana, inserción en la misma y formación de poros (Abee, 1995; Moll y col., 1999). La unión de las bacteriocinas a la membrana se establece a través de interacciones electrostáticas entre los residuos de la bacteriocina cargados positivamente y los grupos negativos de los fosfolípidos de la membrana, mientras que la formación de los poros se debe a la naturaleza hidrófoba-hidrófila de las bacteriocinas, lo que facilita su distribución a lo largo de la membrana. La formación de poros origina un flujo pasivo de pequeñas moléculas (iones, aminoácidos, ATP), lo que origina la disipación de la fuerza protón motriz (PMF, del inglés "*Proton Motive Force*") o de algunos de sus componentes (potencial de membrana y gradiente de pH). La alteración en la PMF, gradiente electroquímico necesario para el desarrollo de procesos metabólicos dependientes de energía, reduce el transporte de nutrientes y la síntesis de macromoléculas, como proteínas y ácidos nucleicos, originando la consiguiente muerte celular.

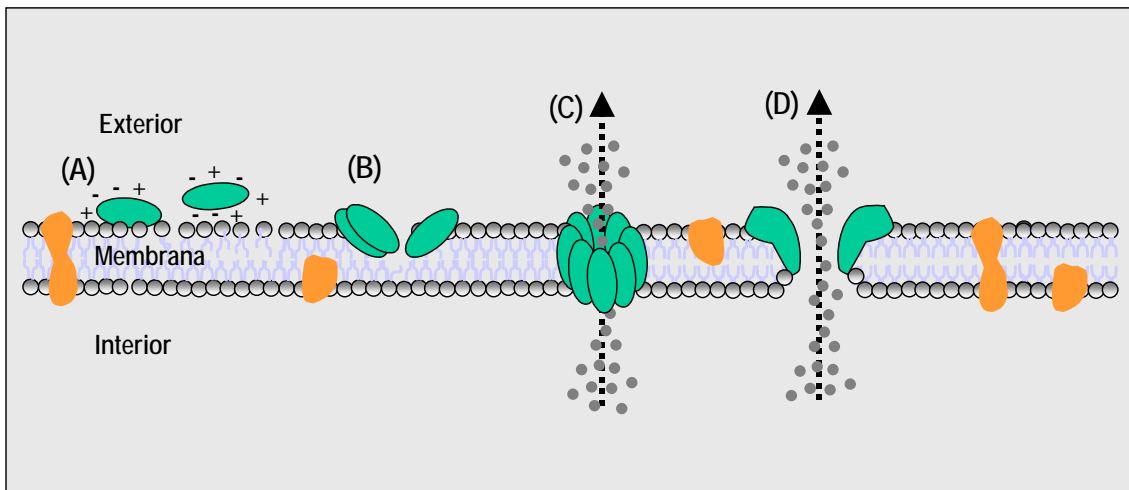
La inserción de las bacteriocinas en la membrana plasmática se debe a su capacidad de adoptar conformaciones anfipáticas en hélice α o en lámina β y puede entenderse según los dos modelos descritos por Moll y col. (1999): (i) el modelo "cuña", aplicable a la nisina y otros lantibióticos; (ii) y el modelo "duela de barril", aplicable a bacteriocinas de la clase II (Figura II.1). Según el modelo "cuña", la molécula se sitúa paralelamente a la membrana, empuja a las cabezas polares de los fosfolípidos hacia los lados, la membrana se adelgaza y el péptido adopta una orientación transmembrana y agrega con otros péptidos, formando un poro por el que pueden fluir iones. Por otro lado, el modelo "duela de barril" explica la inserción de los péptidos a la membrana, su agregación y el posterior "reclutamiento" de péptidos adicionales para formar poros. En estos poros, las caras hidrofílicas se dirigen hacia la luz del poro, mientras que las superficies hidrofóbicas interaccionan con el núcleo hidrofóbico de la membrana.

Aunque la nisina requiere la presencia de un receptor de membrana (lípidos II) para ejercer su actividad antimicrobiana máxima (Brötz y col., 1998), la existencia de un receptor proteico específico que intervenga en el posible reconocimiento de la célula sensible por la bacteriocina es una cuestión controvertida (Herranz, 2000). No obstante, puesto que no todas las células son sensibles a todas las bacteriocinas, debe existir alguna característica que determine su especificidad, aunque la existencia de bacteriocinas capaces de actuar en sistemas liposomales ponen en duda la necesidad de receptores o componentes de membrana para desarrollar su actividad bacteriocinogénica.

II.1.4.6. Organización genética y biosíntesis

En general, las bacteriocinas se sintetizan como precursores (pre-probacteriocinas), constituidos por una extensión N-terminal unida a la bacteriocina madura (probacteriocina o bacteriocina madura) (Jack y col., 1995; Nes y col., 1996). Algunas probacteriocinas sufren modificaciones posttraduccionales, como el establecimiento de anillos tioéter en los lantibióticos.

Figura 11.1. Mecanismo de acción de las bacteriocinas de las bacterias lácticas



El mecanismo de acción de las bacteriocinas consta de tres fases: unión a la membrana (A), inserción en la misma (B) y formación de poros (C ó D). La unión de las bacteriocinas a la membrana se establece a través de interacciones electrostáticas entre los residuos de las bacteriocinas cargados positivamente y los grupos negativos de los fosfolípidos de la membrana. Posteriormente, la naturaleza anfipática de las bacteriocinas facilita su distribución en la membrana, lo que provoca la formación de poros. Finalmente, la formación de poros origina un flujo pasivo de pequeñas moléculas que resulta en la disipación de la fuerza protón motriz. Los poros formados pueden ser de 2 tipos: en forma de duela de barril (C) o en forma de cuña (D). Fuente: Martínez, 2000.

Asimismo, las extensiones N-terminales de las pre-bacteriocinas son de dos tipos: (a) "secuencia líder" del tipo "doble glicina", apelativo referido a la presencia en el extremo C-terminal de la secuencia de dos residuos conservados de glicina, y (b) secuencia del tipo "péptido señal". Dichas extensiones N-terminales intervienen en: (a) el procesado, transporte y secreción de la probacteriocina o bacteriocina madura al medio exocelular; (b) las modificaciones postraduccionales de ciertos lantibióticos, y/o (c) la protección de la célula productora frente a la toxicidad de las bacteriocinas, mientras éstas permanecen en su interior (Herranz, 2000; Martínez, 2000). Actualmente, las únicas bacteriocinas producidas por las BAL y sintetizadas sin una extensión N-terminal son las enterocinas L50 (EntL50A y EntL50B) (Cintas y col., 1998), la enterocina Q (Cintas y col., 2000c) y la enterocina EJ97 (Sánchez-Hidalgo y col., 2003), de las que todavía se desconoce su mecanismo o mecanismos moleculares de procesado, transporte y/o secreción.

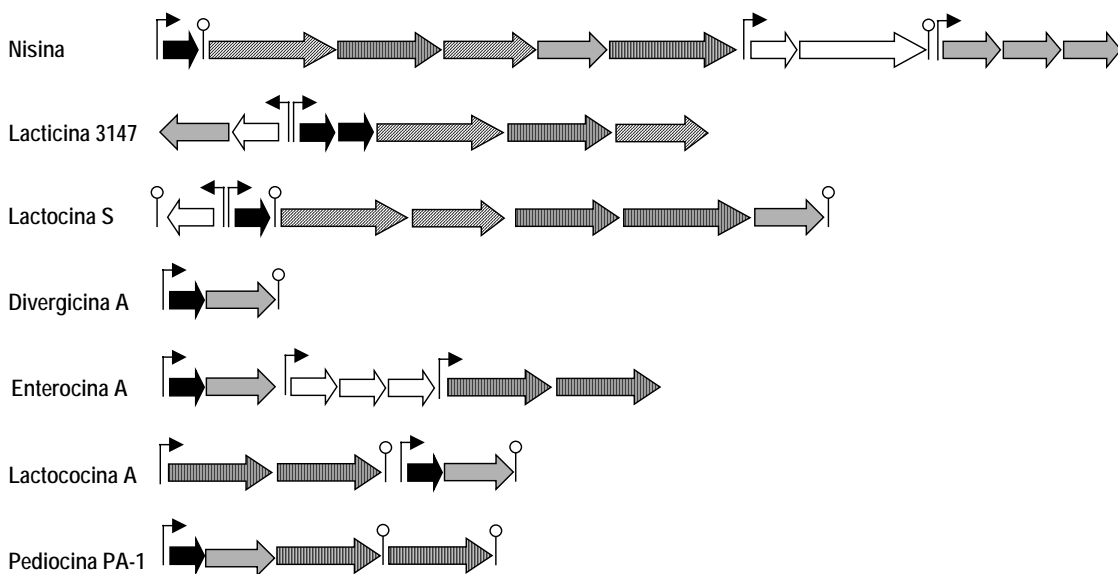
Igualmente, los determinantes genéticos de la biosíntesis de las bacteriocinas, localizados en plásmidos, en el cromosoma o incluso en transposones insertados de forma estable en el cromosoma, constan de los siguientes componentes (Sablon y col., 2000; Cintas y col., 2001a; Diep y Nes, 2002):

- (1). Gen estructural, que codifica la síntesis de la pre-probacteriocina.
- (2). Gen de inmunidad, que codifica la proteína que protege a la célula productora de su propia bacteriocina.
- (3). Genes que codifican proteínas responsables del procesado, transporte y secreción de la pre-probacteriocina.
- (4). Genes que codifican enzimas responsables de las modificaciones postraduccionales de la pre-probacteriocina.

(5). Genes que codifican componentes involucrados en la regulación de la biosíntesis de la pre-bacteriocina.

En el caso de las bacteriocinas de la clase II, la estructura genética de los dos o tres primeros grupos de genes se encuentra organizada en uno o dos operones, mientras que los lantibióticos suelen disponer sus determinantes genéticos en dos operones que incluyen, además de los genes mencionados, los que codifican las enzimas responsables de las modificaciones postraduccionales (Martínez, 2000) (Figura II.2). Excepcionalmente, la producción de muchos lantibióticos y de algunas bacteriocinas de la clase II se encuentra regulada por un sistema regulador de tres componentes (un factor de inducción, un regulador de respuesta y una proteína sensora), de modo que los determinantes genéticos de estas bacteriocinas poseen un tercer operón, que contiene los genes responsables de dicha regulación (Nes y col., 1996; Nissen-Meyer y Nes, 1997) (Figura II.2). Actualmente, el mecanismo de autorregulación mejor conocido es el de la nisina A (Figura II.3).

Figura II. 2. Organización de los determinantes genéticos que intervienen en la biosíntesis de bacteriocinas de las clases I y II



Las bacteriocinas nisina, lacticina 3147 y lactocina S pertenecen a la clase I ó grupo de los lantibióticos, mientras el resto de bacteriocinas se incluyen en la clase II. La lacticina 3147 es un ejemplo de bacteriocina de 2 péptidos. Gen estructural (■); gen de inmunidad (□); genes de transporte y procesado (▨); genes de modificación postraduccionales (▩); genes de regulación (▪); promotor (▶); terminador (⊖). Fuente: Worobo y col., 1995; Skaugen y col., 2003; Fernández, 2004.

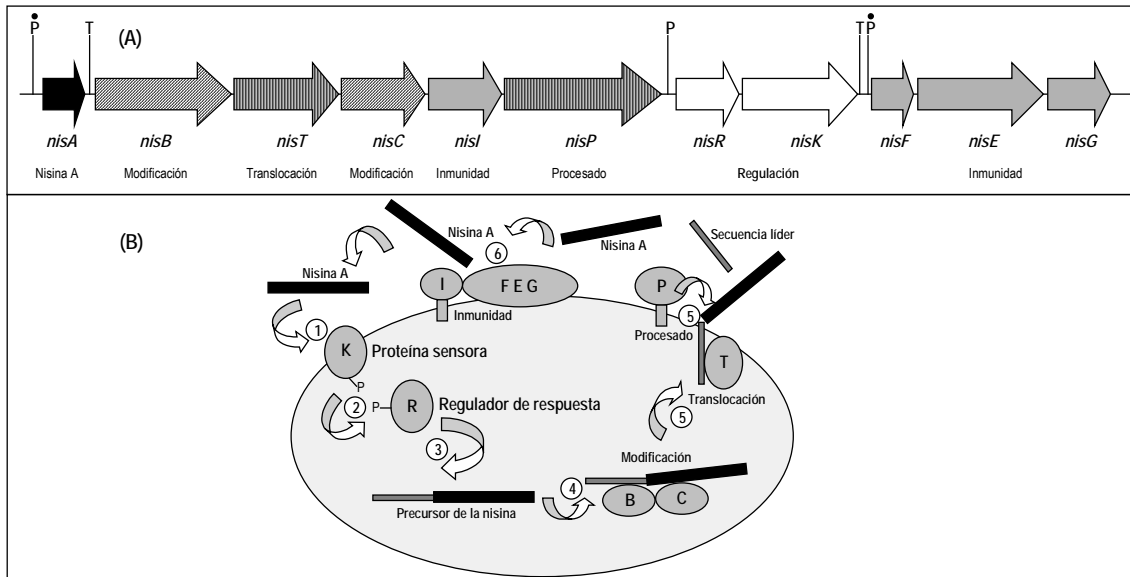


Figura II. 3. (A) Organización de los determinantes genéticos que intervienen en la biosíntesis de la nisina A. Las funciones de las proteínas codificadas por los 3 operones se indican debajo de sus respectivos genes. P es el promotor y T el terminador de transcripción. El punto encima del promotor indica que el promotor es inducible. **(B) Modelo de biosíntesis de la nisina A:** (1) en presencia de nisina extracelular, la proteína sensora histidín-quinasa NisK se fosforila; (2) la proteína NisK fosforilada cede su grupo fosfato a la proteína reguladora de respuesta NisR; (3) la proteína NisR fosforilada activa la transcripción de la síntesis del precursor de la nisina y del resto de enzimas que intervienen en la biosíntesis del antibiótico; (4) el péptido pre-pronisina A precursor es modificado por las enzimas NisB y NisC; (5) el precursor modificado es procesado y transportado por la proteasa NisP y el transportador-ABC NisT, originando la nisina madura; (6) las proteínas NisI, NisF, NisE y NisG protegen a la célula productora de la actividad bactericida de la nisina. Las proteínas NisK y NisR se encuentran siempre en el interior de la célula ya que la transcripción de sus genes se encuentra regulada por un promotor constitutivo. A diferencia de otros sistemas de regulación, la nisina A extracelular actúa como factor de inducción. Fuente: Kuipers y col., 1995; 1998.

II.2. PROCESADO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS EN BACTERIAS Y LEVADURAS

En general, la mayoría de péptidos y proteínas sintetizados por procariontes y eucariontes se localizan en su interior, de modo que sólo unos pocos péptidos y proteínas se liberan al exterior. La liberación extracelular de péptidos y proteínas supone una ventaja en la producción heteróloga de proteínas, puesto que si se consigue secretar la proteína de interés por un hospedador, su purificación se vería facilitada por la ausencia de otras muchas proteínas no liberadas al medio exocelular (Henderson, 2004). Sin embargo, los mecanismos de procesado y secreción de proteínas son muy complejos y, generalmente, los rendimientos en la producción heteróloga de proteínas liberadas al medio extracelular no son elevados, sobre todo, si cuando como hospedador se utiliza la bacteria Gram-negativa *E. coli* (Choi y Lee, 2004). Las proteínas secretadas por esta bacteria deben cruzar dos membranas (membrana interna y externa) y su paso por ambas "barreras" depende de la estructura aminoacídica de la proteína. En el caso de las bacterias Gram-positivas, que poseen una única membrana, los rendimientos en la producción heteróloga de proteínas pueden ser mayores, de modo que estas bacterias constituyen una alternativa frente a las Gram-negativas para la producción de péptidos y proteínas de interés comercial (Van Wely y col., 2001). En este contexto, la búsqueda de nuevas y mejores alternativas de expresión heteróloga de proteínas ha propiciado la utilización de

hospedadores eucariotas, como las levaduras (Cregg y col., 1993). Aunque los sistemas de procesado, transporte y secreción de proteínas en levaduras parecen ser más complejos que los utilizados por las bacterias, la disponibilidad de vectores de expresión que permiten la producción de proteínas heterólogas en el sobrenadante de levaduras metilotróficas, caso de *Pichia pastoris*, es una de las causas de la elección de este microorganismo eucariota como hospedador heterólogo (Cereghino y Cregg, 2000).

A continuación, se describen algunos mecanismos de procesado, transporte y secreción de proteínas en bacterias y levaduras. En la sección sobre procesado, transporte y secreción de proteínas en bacterias Gram-positivas, se considera más detalladamente lo relativo al procesado, transporte y secreción de las bacteriocinas por las bacterias lácticas.

II.2.1. MECANISMOS DE PROCESADO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS

Dado que las células requieren una “señal” que distinga las proteínas citoplasmáticas de las de liberación al exterior, la mayoría de las proteínas secretadas se sintetizan como precursores inactivos o pre-proteínas (van Wely y col., 2001), es decir, como proteínas con una secuencia señal (“péptido señal”) que, generalmente, se localiza en su extremo N-terminal de su secuencia aminoacídica y que constituye la señal de reconocimiento para el procesado, transporte y secreción del péptido o proteína “madura” a través de la ruta general de secreción (GSP, del inglés “*General Secretory Pathway*”) ó sistema sec-dependiente (sistema *sec*). No obstante, las células también disponen de sistemas de transporte y secreción de proteínas mucho más específicos, como por ejemplo el sistema transportador-ABC (del inglés “*Adenosin triphosphate Binding Cassette*”) ó sistema de transporte dedicado (DTS, del inglés “*Dedicated Transport System*”).

II.2.1.1. Sistema transportador-ABC o sistema de transporte dedicado

Los translocadores de membrana de la superfamilia de transportadores-ABC constituyen una de las familias de proteínas más abundantes, tanto en células procariotas como en eucariotas (Higgins, 2001). De hecho, se conoce que el 5% del genoma de *E. coli* posee genes que codifican componentes de estos transportadores. Un transportador-ABC clásico consta de cuatro dominios: dos dominios transmembrana (TMD, del inglés “*Transmembrane Domain*”) y dos dominios de unión al ATP (Higgins, 2001). Los dominios TMD son N-terminales, hidrofóbicos y se integran en la membrana, mientras los dominios de unión al ATP son C-terminales, hidrófilos y se asocian a la cara citoplasmática de la membrana celular. Generalmente, los cuatro dominios funcionan como péptidos independientes aunque, en algunos casos, pueden fusionarse y actuar como un complejo polipeptídico.

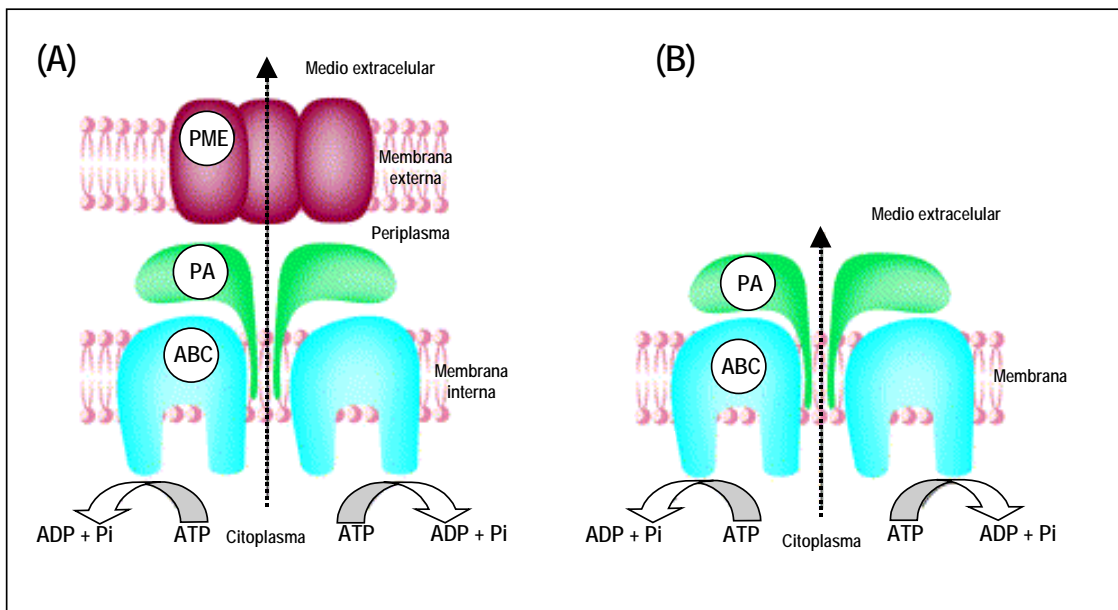
Al sistema transportador-ABC también se le conoce como sistema de transporte dedicado (DTS), puesto que suele ser específico para una proteína o grupo de proteínas de una misma familia (Wandersman, 1992). En función de sus características funcionales, los transportadores-ABC se clasifican en los siguientes grupos (Dassa y Bouige, 2001):

- (a) “Importadores”: transportadores característicos de procariotas que proporcionan nutrientes a las células. En este caso, los 4 dominios actúan por separado y requieren la presencia de una proteína de unión al nutriente para que su transporte sea eficaz.
- (b) “Exportadores”: se encuentran en procariotas y eucariotas y, en general, se ocupan de la excreción de sustancias nocivas, de la secreción de toxinas extracelulares y de la

distribución de diferentes componentes de la membrana. En el caso de las bacterias, estos transportadores-ABC dirigen la secreción de sustancias (Young y Holland, 1999; Herranz, 2000) como: (i) antibióticos y compuestos no proteícos, (ii) precursores peptídicos sintetizados con una extensión N-terminal del tipo secuencia líder, como la bacteriocina colicina V y la mayoría de las bacteriocinas de las bacterias lácticas, (iii) péptidos que carecen de extensión N-terminal, como, por ejemplo, la hemolisina α de *E. coli* o, quizás, las enterocinas L50 (EntL50A y EntL50B), Q y EJ97; y (iv) compuestos anfífilicos implicados en la resistencia a numerosos fármacos (MDR, del inglés “*Multidrug Resistance*”). En general, los 4 dominios de los “exportadores” transportador-ABC de las bacterias suelen estar fusionados y, además, necesitan de una proteína accesoria y, en el caso de las bacterias Gram-negativas, de otra proteína que se localiza en la membrana externa (Figura II.4).

- (c) “Reguladores”: como su nombre indica se encargan de la regulación de diversos procesos celulares como, por ejemplo, la reparación del ADN, la traducción de proteínas o la expresión de genes. Estos transportadores carecen del dominio TMD.

Figura II.4. Secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas (A) y Gram-positivas (B) mediante el sistema de transporte dedicado (DTS) y el empleo de transportadores-ABC



ABC es el transportador, PA la proteína accesoria y PME la proteína de la membrana externa. Fuente: Michiels y col., 2001.

II.2.1.2. Ruta general de secreción o sistema *sec*

Los péptidos y proteínas sintetizados con una extensión N-terminal del tipo “péptido señal” (SP, del inglés “*Signal Peptide*”), se procesan y secretan mediante la ruta general de secreción (GSP) ó sistema *sec* (Pugsley, 1993; Driessen, 1994; Economou, 1999; Fekkes y Driessen, 1999; Herranz, 2000).

A continuación, se describen los componentes de este sistema de procesado, transporte y secreción, así como el mecanismo por el que las proteínas que contienen un “péptido señal”(SP)

atraviesan la membrana citoplásmica (mecanismo de translocación). La mayoría de sus características y propiedades se han elucidado de *E. coli*. No obstante, también se han descrito sistemas homólogos en arqueobacterias, otras eubacterias como *Bacillus subtilis* y en células eucariotas (Pohlschröder y col., 1997; van Wely y col., 2001).

11.2.1.2.1. Componentes del sistema *sec*

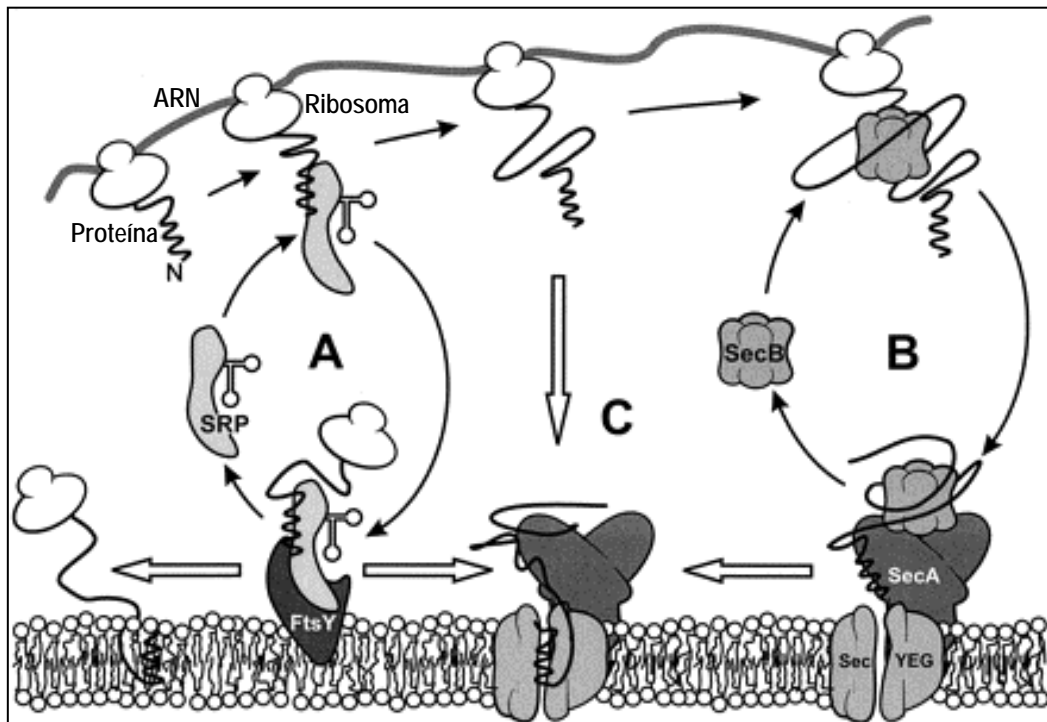
La secreción de péptidos y proteínas mediante la ruta general de secreción (GSP) requiere la participación de los siguientes componentes:

- (a) "Péptido señal" (SP): es una extensión N-terminal de 18 a 30 aminoácidos, que presenta tres dominios característicos con propiedades físico-químicas comunes para todos ellos (Izard y Kendall, 1994; Fekkes y Driessen, 1999; Herranz, 2000):
 - (1) Dominio N: consta de 1-5 aminoácidos y posee una carga neta positiva. Este dominio interacciona con la proteína SecA y con los fosfolípidos de carga negativa de la membrana citoplásmica, de modo que es importante para la entrada de las proteínas en la ruta de translocación.
 - (2) Dominio H: compuesto por 7-15 aminoácidos de naturaleza hidrofóbica. Este dominio es la parte más importante del SP, puesto que puede adoptar una conformación en hélice α e insertarse en la bicapa lipídica.
 - (3) Dominio C: región de carácter polar integrada por 3-7 aminoácidos. Este dominio es reconocido por "peptidasas señal" que van a hidrolizar o cortar el SP cuando éste comienza a dejar la membrana plasmática. Las "peptidasas señal" pueden ser de dos tipos: peptidasas de tipo I, que actúan sobre proteínas, y peptidasas de tipo II, que son específicas de lipoproteínas. Las peptidasas de tipo I poseen especificidad por aminoácidos en las posiciones -3 y -1, en relación al inicio de la parte madura de la proteína; estas posiciones son generalmente ocupadas por aminoácidos de cadenas laterales cortas y neutras, como alanina, glicina, serina o treonina.
- (b) Proteínas de reconocimiento *secB* y SRP: cuando una proteína provista de un "péptido señal" es sintetizada en el ribosoma puede alcanzar el complejo de translocación de dos formas distintas. En el primer caso, la preproteína se asocia directamente a la translocasa o es conducida hasta ella por la proteína SecB mientras que, en el otro caso, la preproteína se asocia con la partícula reconocedora de señal (SRP, del inglés, "Signal Recognition Protein") (Figura 11.5). La proteína SecB es una chaperona que interacciona con la región madura de la preproteína de modo que retarda su plegamiento y mantiene un estado competente de la misma para su translocación. La otra proteína de reconocimiento (SRP) está constituida por 3 dominios funcionales: dominios N, G y M. El dominio M se encarga de la unión con el ARN del ribosoma, mientras que los otros 2 dominios se unen a las regiones hidrofóbicas del SP del precursor. El dominio G también interviene en la actividad GTPasa, una vez que el complejo precursor-SRP se pone en contacto con un receptor específico de membrana (FtsY) que interacciona con la translocasa.
- (c) Complejo de translocación: translocasa. Dos son los componentes que forman parte de la translocasa o complejo encargado de guiar la preproteína a través de la membrana: la

proteína SecA y el complejo proteico de membrana (Manting y Driessen, 2000; van Wely y col., 2001).

- (i) SecA: es una proteína con actividad ATPasa que posee una gran afinidad por SecB y por el SP y la región madura de las preproteínas. Esta proteína se halla próxima al complejo de membrana y, cuando se une a la preproteína, estimula el cambio de ADP por ATP, causando su inserción y la del precursor en la membrana.
- (ii) Complejo de membrana: este complejo está compuesto por los polipéptidos SecY, SecE, SecG, SecD, SecF y YajC. Las proteínas SecY, SecE y SecG forman un complejo estable en la membrana y parece que podrían funcionar como un canal conductor de las preproteínas a través de la membrana citoplásmica. Las otras proteínas (SecD, SecF y YajC) se asocian con el complejo SecYEG y aunque no se conoce con exactitud la función de dichas proteínas, se sabe que aumentan la eficacia del proceso de translocación.

Figura II.5. Secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas mediante la ruta general de secreción (GSP) ó sistema sec

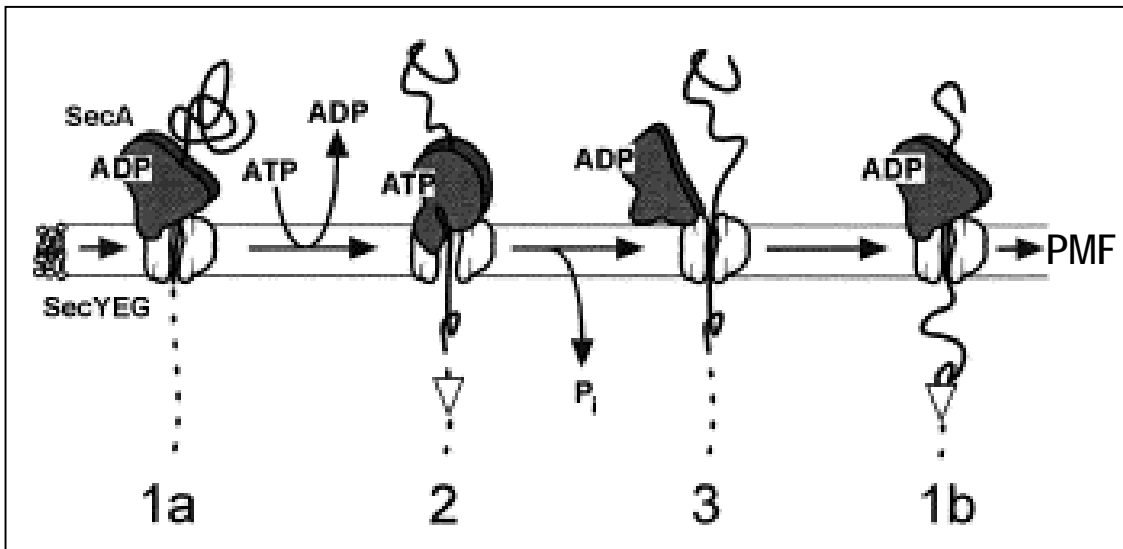


Se han descrito tres rutas que dirigen la secreción de proteínas *sec*-dependientes desde el citoplasma hasta el espacio periplásmico de *Escherichia coli*. (A) cuando el péptido señal (SP) de la preproteína es muy hidrófobo, la proteína reconocedora de señal (SRP) transporta el precursor hasta la proteína de membrana FtsY. Posteriormente, la preproteína es transferida al complejo de translocación para su secreción, o bien, se incorpora a una ruta alternativa, insertándose en la membrana; (B) por otro lado, la preproteína puede ser transportada hasta la translocasa con la ayuda de SecB. Para ello, la chaperona se une a la parte madura del precursor y una vez llegan a la membrana, SecB presenta la preproteína a SecA; (C) cuando la preproteína no es reconocida ni por la SRP ni por SecB, ésta puede alcanzar la membrana por sí sola. Fuente: Fekkes y Driessen, 1999.

11.2.1.2.2. Mecanismo de translocación proteica

El modelo propuesto para la translocación de precursores proteicos a través de la membrana citoplasmática se muestra en la Figura 11.6. Como se observa en dicha figura, la hidrólisis del ATP y la fuerza protón motriz (PMF) actúan en diferentes etapas del proceso de translocación, siendo la primera imprescindible para los ciclos de inserción-desinserción de SecA en la membrana y, la segunda, para proporcionar energía en etapas más tardías.

Figura 11.6. Mecanismo de translocación de proteínas sec-dependientes



Inicialmente, la proteína SecA y la preproteína se asocian con el complejo SecYEG de la membrana (1a), originando un intercambio de ADP por ATP. Posteriormente, se produce un cambio conformacional en SecA que propicia su inserción en la membrana y el paso del precursor a través del canal formado por el complejo SecYEG (2). Más tarde, la hidrólisis del ATP provoca la desinserción de SecA (3). Finalmente, el proceso de translocación prosigue conforme a lo descrito en las etapas 1a, 2 y 3 (1b) ó utilizando energía procedente de la fuerza protón motriz (PMF). Fuente: Driessen, 1994; van Wely y col., 2001.

11.2.1.2.3. Sistema sec en bacterias Gram-positivas

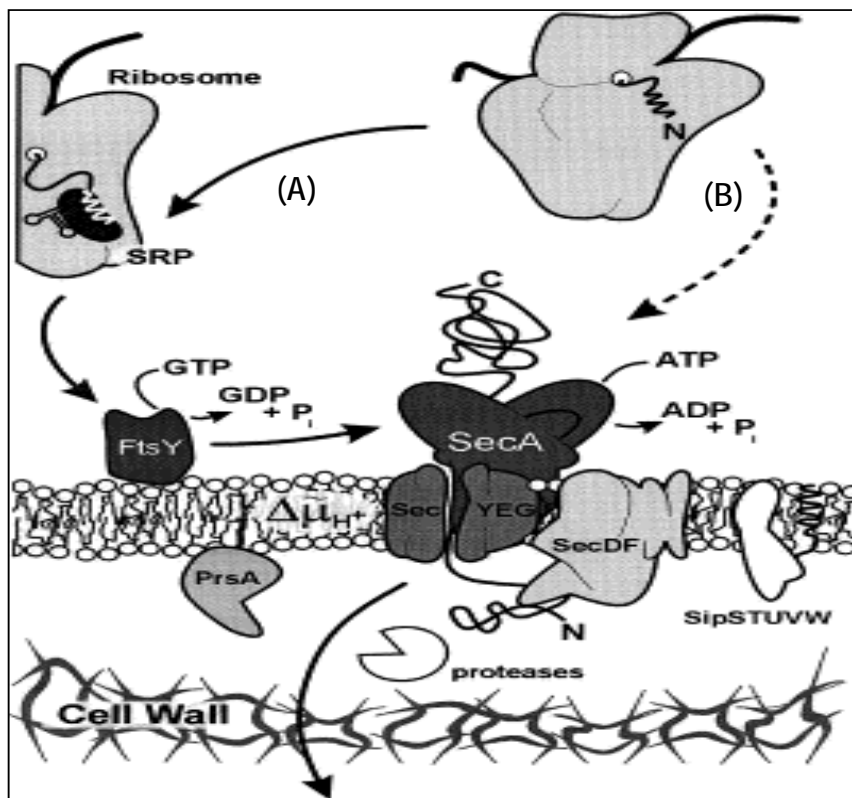
Los componentes que intervienen en el proceso de translocación de proteínas en las bacterias Gram-negativas (G-) y Gram-positivas (G+) muestran un elevado grado de conservación, sugiriendo funciones similares en ambos grupos de bacterias (van Wely y col., 2001). Sin embargo, pueden establecerse algunas diferencias como, por ejemplo:

- (1). El dominio N del SP de G+ es de mayor tamaño.
- (2). La peptidasa señal de tipo I de G+ contiene de 5 a 7 aminoácidos más que la de G-.
- (3). Las peptidasas de G+ actúan en las posiciones 7 y 9, desde el final de la región C-terminal del dominio H, mientras que, en G- las peptidasas reconocen la zona comprendida entre las posiciones 3 y 7.
- (4). Ausencia de SecB en G+.
- (5). La SecA de G- muestra una elevada afinidad por el complejo SecYEG de G- y G+, mientras que la afinidad de SecA de G+ por alguno de los componentes que forman parte de dicho complejo es baja.

- (6). Los niveles de SecA en G- son controlados por un mecanismo de autorregulación, en el que interviene el ARNm. Las G+ carecen de sistema de autorregulación.
- (7). Algunas proteínas del complejo de membrana suelen ser más pequeñas en G+ y, además, no son intercambiables funcionalmente con las de G-.
- (8). Los genes que codifican las proteínas SecD, SecF y YajC se encuentran organizados en el mismo operón en G-, mientras que en las G+ el gen *yajC* se localiza en un operón distinto al de los genes *secD* y *secF*.

Con respecto a la ausencia de SecB en G+, es importante destacar que esta chaperona no es imprescindible para la secreción de la mayoría de las proteínas de *E. coli*. La proteína SecB sólo es necesaria para la secreción de algunas proteínas que tienen que atravesar las dos membranas y que tienden a plegarse o agregarse con facilidad. Las proteínas de G+ sólo tienen que atravesar una membrana y, en general, su plegamiento es mucho más lento, por lo que la presencia de SecB no es imprescindible (Figura II.7).

Figura II.7. Secreción de proteínas en bacterias Gram-positivas mediante la ruta general de secreción (GSP) ó sistema sec



La preproteína alcanza la translocasa con ayuda de la SRP (A) o por sí misma (B). Las proteasas que reconocen el péptido señal (SP) de las proteínas de secreción se localizan cerca de la membrana o en la pared celular. Fuente: van Wely y col., 2001.

II.2.1.2.4. Sistema *sec* en levaduras

Al igual que sucede con las bacterias, las proteínas que sintetizan las levaduras como precursores son reconocidas durante su traducción o postraduccionalmente (Ward, 1999). Como ya se ha descrito en la sección II.2.1.2.1 de esta memoria, las SRP se encargan del reconocimiento de la preproteína en el momento de su traducción, mientras que la chaperona SecB interviene después de la traducción del precursor. Las proteínas de reconocimiento también forman parte del sistema *sec* de las levaduras, aunque en este caso, la chaperona eucariótica (Sec63) manifiesta diferencias estructurales significativas respecto a la chaperona procariótica (SecB).

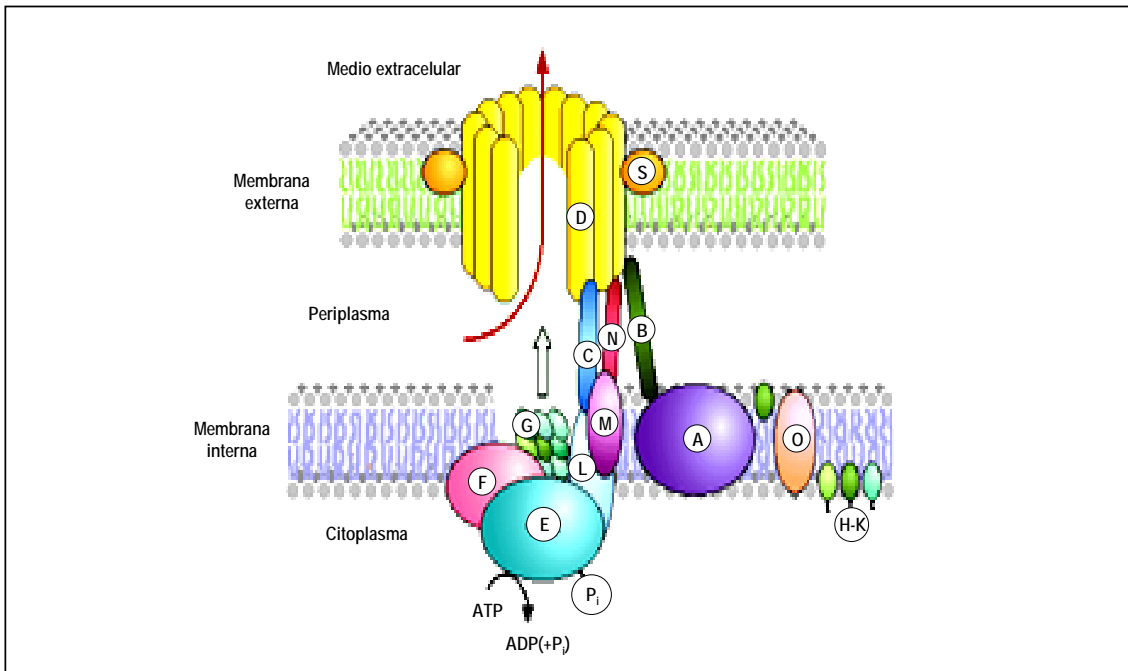
Por otro lado, el complejo de translocación de las levaduras (complejo Sec61) es diferente del que poseen las bacterias (complejo SecYEG). No obstante, se ha observado que la proteína Sec61 α que forma parte del complejo Sec61 de las levaduras es similar a la proteína SecY del complejo de translocación procariótico (Cao y col., 2003).

II.2.2. PROCESADO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS EN BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

La mayoría de las proteínas de las bacterias Gram-negativas secretadas al espacio periplásmico (EP) a través de la membrana interna (MI) utilizan el sistema *Sec* (Pugsley, 1993). Una vez en el espacio periplásmico pueden permanecer en este compartimento, insertarse en la membrana externa (ME) o ser secretadas al medio extracelular (Fernández y de Lorenzo, 2001). Hasta ahora el análisis molecular de los componentes que intervienen en el proceso de secreción de péptidos y proteínas al EP y al medio extracelular ha revelado la existencia de, al menos, cinco modelos de secreción (Pallen y col., 2003; Tabla II.1):

- (1) Tipo I (Figura II.4): este sistema de secreción incluye a proteínas que carecen de una "secuencia señal" en su región N-terminal, de modo que son reconocidas a través de su región C-terminal (Fernández y de Lorenzo, 2001). La única excepción es la colicina V (Håvarstein y col., 1994; van Belkum y col., 1997), que posee una secuencia N-terminal del tipo "doble glicina" ("secuencia líder") que es reconocida como señal de transporte, procesado y secreción. La secuencia más conservada en este tipo de proteínas es una secuencia repetida de glicinas y asparraginas en la parte media de su dominio C-terminal. La secreción de estas proteínas al espacio periplásmico y al medio extracelular no necesita de intermediarios periplásmicos, aunque requiere la presencia de 3 polipéptidos de la membrana interna (MI) y externa (ME) que forman parte de un sistema transportador-ABC o sistema de transporte dedicado. El polipéptido localizado en la ME es el encargado de la formación de un poro hidrófilo que permite el paso de la proteína desde el EP hasta el exterior, mientras los otros 2 polipéptidos son un transportador-ABC y una "proteína accesoria", localizada en la MI para facilitar el transporte de la proteína desde el citoplasma hasta el EP. Las proteínas secretadas de esta manera son generalmente toxinas y enzimas de elevado tamaño molecular.
- (2) Tipo II (Figura II.8): las proteínas secretadas se sintetizan con una secuencia N-terminal que facilita su paso desde la MI hasta el EP a través del sistema *sec*. Una vez que la proteína se establece en el EP, se procede a su secreción mediante la utilización de un complejo proteico o "secretón" que consta de, al menos, 12 proteínas de actividad específica (Sandkvist, 2001a y b). Las proteínas secretadas por la ruta tipo II incluyen proteasas, celulasas, pectinasas, fosfolipasas, lipasas y diversas toxinas.

Figura II.8. Modelo de secreción Tipo II

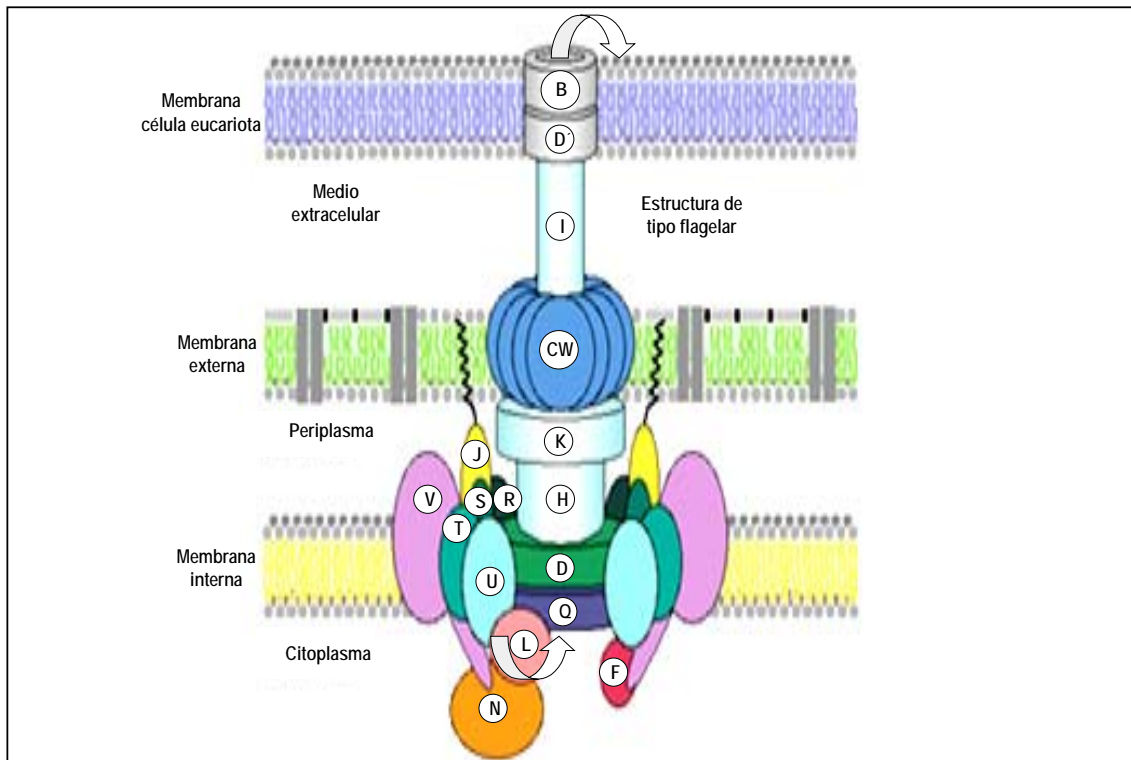


Las proteínas *sec*-dependientes del espacio periplásmico son liberadas al medio extracelular a través de un complejo proteico denominado “secretón”. Las 16 proteínas de dicho complejo se nombran siguiendo un orden alfabético (desde A hasta O), aunque la proteína S también forma parte de este complejo proteico. En este modelo, la proteína D forma el “poro de secreción”, mientras que las proteínas E, L, M y C regulan el mecanismo de secreción a través de la hidrólisis del ATP; la proteína S interviene en la inserción de la proteína D en la membrana externa. Por otro lado, las proteínas G, H, I, J y K, con la ayuda de la proteína O, dan lugar a una estructura muy similar a un *pilus* que puede actuar como un pistón, empujando a la proteína de secreción hasta el “poro de secreción”. La proteína A se localiza en la membrana interna formando un “complejo de unión” con la proteína B, la cual interacciona con D. El resto de proteínas mostradas (F y N) no se encuentran presentes en todos los microorganismos que poseen este tipo de transporte, de modo que no se consideran esenciales de este mecanismo de secreción. Fuente: Sandkvist, 2001a; www.genome.ad.jp/kegg/pathway.

- (3) Tipo III (Figura II.9): un gran número de bacterias patógenas utilizan este modelo de secreción para introducir sus proteínas desde el citoplasma hasta el interior de las células eucariotas, por lo que este tipo de secreción se conoce también como de “secreción dependiente de contacto” (Cheng y Schneewind, 2000; Plano y col., 2001). Este modelo de secreción es muy complejo ya que se encuentra mediado por unas veinte proteínas de estructuras diferentes, incluyendo diez, que forman parte de un sistema de transporte del tipo “flagelar” y que son las responsables del contacto entre la bacteria y la célula eucariota. El lugar de reconocimiento de las proteínas que van a ser “inyectadas” se localiza en el extremo N-terminal de su secuencia aminoacídica o a través de señales del ARNm, mientras que su movilización hasta su lugar de procesado parece estar regulado por una chaperona.
- (4) Tipo IV (Figura II.10): este modelo de secreción es utilizado por numerosas bacterias patógenas para transferir su ADN hasta el interior de las células eucariotas y posee similitudes con el sistema de conjugación bacteriano (Christie y Vogel, 2000; Christie, 2001). La transferencia conjugativa de las moléculas de ADN tiene lugar a partir de una estructura conocida como complejo Mpf (del inglés “*Mating pair formation complex*”), constituido por un *pilus* conjugativo y un canal de “contacto”, a través del cual se realiza la transferencia. A su

vez, dicha transferencia se encuentra mediada por tres proteínas: una proteína de unión o relaxasa, una chaperona y una proteína de acoplamiento. La relaxasa se encarga de cortar el ADN que va a ser transferido desde su lugar de origen y de transportarlo como una nucleoproteína, mientras las otras dos proteínas parecen ser necesarias en la presentación del ADN al complejo Mpf.

Figura II.9. Modelo de secreción Tipo III

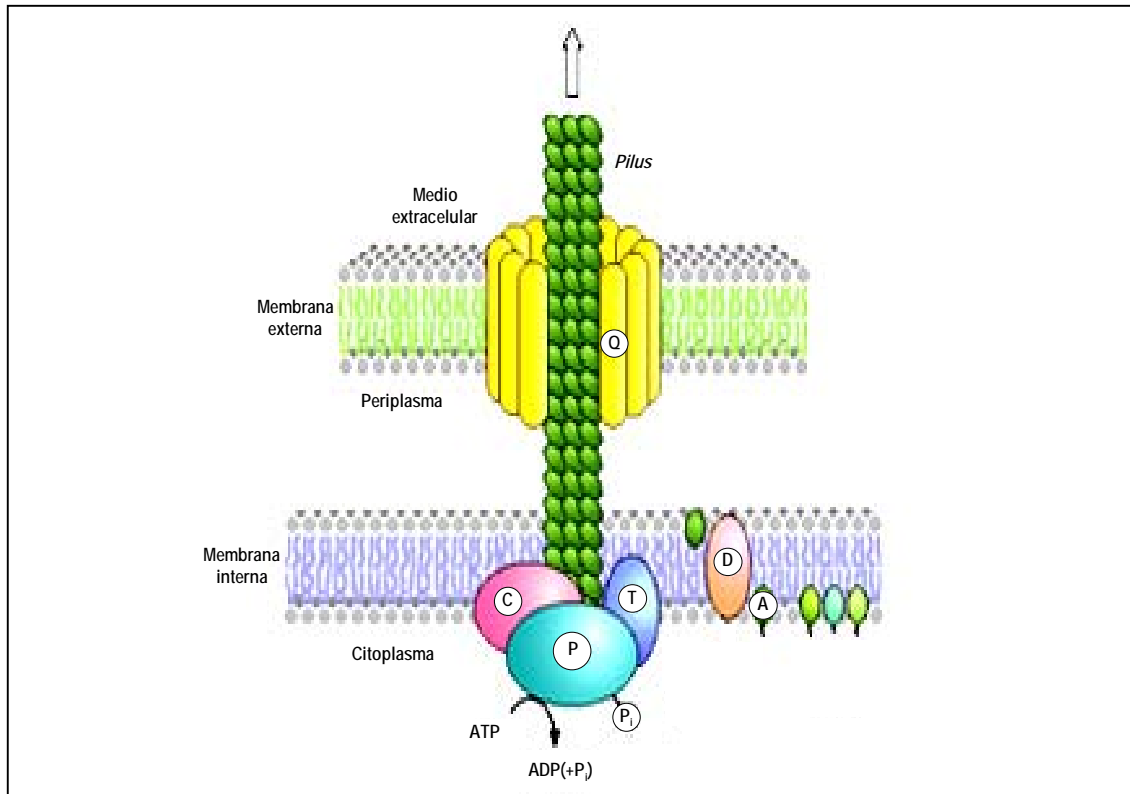


En este modelo, las proteínas son "inyectadas" desde el citoplasma bacteriano al interior de las células eucariotas. Para ello se requiere la presencia de al menos 18 proteínas de transporte. De las proteínas localizadas en el citoplasma y en la membrana interna (F, L, N, R, S, T, U y V), destaca la función ATPasa de la proteína N. Las 10 proteínas restantes (B, D, D', H, I, J, K, Q y W) sintetizan una estructura de tipo flagelar; la construcción de esta estructura puede atender a diferentes tipos de modelos (tipo flagelo, tipo "pilus" ó tipo "aguja"). La estructura de la figura es del tipo "aguja" y está constituida por 3 partes: (i) una "base" situada en la membrana interna (MI) y en el espacio periplásmico (EP) (proteínas D, H, K, J y Q); (ii) un "anillo" que se integra en la membrana externa (ME) (proteínas C y W); y (iii) una "aguja de inyección" que establece el contacto entre la bacteria y la célula eucariota (proteínas B, D' e I). De todas las proteínas de esta estructura, las proteínas C, D, J y Q son las más frecuentes en las bacterias que poseen este tipo de transporte. Las proteínas de la figura se nombran en función de su reconocimiento y presencia en las bacterias *Pseudomonas syringae*, *Salmonella typhimurium* y *Yersinia* sp. Fuentes: Plano y col., 2001; www.genome.ad.jp/kegg/pathway.

Aunque el modelo de secreción tipo IV se utiliza, principalmente, para movilizar ADN, también se ha descrito que interviene en el transporte de proteínas. La transferencia de proteínas puede tener lugar de forma "directa" o en 2 etapas. La forma directa es idéntica a la utilizada para la transferencia de ADN, aunque en este caso no se requiere la presencia de la relaxasa, mientras que el transporte en 2 etapas engloba a aquellas proteínas que contienen un péptido señal en la región N-terminal de su secuencia aminoacídica. Estas últimas proteínas son secretadas desde

la MI hasta el EP a través del sistema *sec* y, una vez que alcanzan el EP se unen a proteínas específicas formando un complejo proteico, que es transportado por el canal de “contacto” al medio extracelular y que interviene en el reconocimiento de la célula hospedadora.

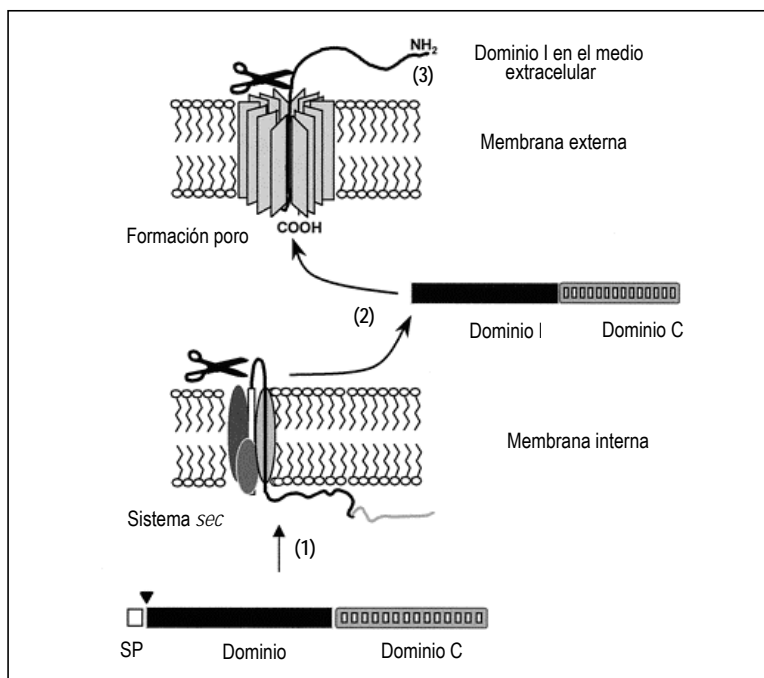
Figura II.10. Modelo de secreción Tipo IV



En esta figura se muestran algunas de las proteínas que intervienen en la transferencia de moléculas mediante el sistema de transporte tipo IV. La transferencia conjugativa tiene lugar a partir del complejo Mpf, una estructura constituida por un *pilus* conjugativo y el “canal de contacto”. La proteína D de la membrana interna se encarga del procesamiento de la proteína A para la formación del *pilus*; por otro lado, el acoplamiento de la proteína Q entre la membrana externa y el periplasma permite la formación de un “canal”. El resto de proteínas de este tipo de transporte (proteínas C, P y T) se sitúan entre la membrana interna y el citoplasma; la proteína P posee actividad ATPasa, mientras que las proteínas C y T intervienen en la presentación de la molécula al complejo de conjugación. Fuente: Christie, 2001; www.genome.ad.jp/kegg/pathway.

- (5) Tipo V (Figura II.11): este tipo de secreción es conocido como de “autotransporte”, ya que es un modelo que no requiere la presencia de proteínas accesorias o de un elevado aporte energético para su procesamiento, transporte y secreción (Desvaux y col., 2004). Las proteínas secretadas poseen 2 dominios especializados localizados en sus extremos N- y C-terminales. El péptido señal de su región N-terminal permite su procesamiento a través de la MI, mientras que el dominio C-terminal se integra en la ME para facilitar el transporte de la proteína desde el EP hasta el medio extracelular.

Figura II.11. Modelo de secreción tipo V



A este modelo de secreción se le conoce como mecanismo de “autotransporte”. Las proteínas secretadas mediante este tipo de transporte se sintetizan como como precursores proteicos con 3 dominios: (i) péptido señal (SP) en el extremo N-terminal; (ii) dominio situado en la zona intermedia de la proteína (dominio I); y (iii) dominio en el extremo C-terminal (dominio C). El paso de la preproteína desde el citoplasma hasta el periplasma tiene lugar mediante el sistema *sec* (1). Una vez que la preproteína alcanza el espacio periplásmico, el dominio C se integra en la membrana externa para la formación de un poro (2). Finalmente, la formación de este poro permite la secreción de la proteína (dominio I) al medio extracelular (3). Fuente: Henderson y Nataro, 2001.

II.2.3. PROCESADO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS

Al contrario de lo que sucede en las bacterias Gram-negativas como *E. coli*, las proteínas sintetizadas por las bacterias Gram-positivas solamente deben cruzar la membrana plasmática para alcanzar el medio extracelular, de modo que su procesado, transporte y secreción debería ser más sencillo que en las bacterias Gram-negativas. A este respecto, lo que ocurre durante el procesado, transporte y secreción de las bacteriocinas producidas por BAL constituye un claro ejemplo de ello.

Como ya se ha descrito previamente en la sección II.1.4.6 de esta memoria, las extensiones N-terminales de las pre-probacteriocinas sintetizadas por las BAL son de dos tipos: (a) secuencia líder del tipo “doble glicina”; o (b) secuencia del tipo “péptido señal” (SP). Por ello, se distinguen dos tipos de procesado, transporte y secreción de las bacteriocinas: uno, mediado por transportadores-ABC o sistema de transporte dedicado (DTS), en el caso de pre-probacteriocinas sintetizadas con una secuencia líder del tipo “doble glicina”; y, otro, mediante la utilización de la ruta general de secreción (GSP) o sistema *sec*, en el caso de las pre-probacteriocinas sintetizadas con un “péptido señal”.

Tabla II.1. Modelos de procesado, transporte y secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas

Modelo de secreción	Características ^a	Ejemplos
Tipo I	Ausencia de péptido señal Proteínas transportadoras-ABC	Adenilato ciclasa (<i>Bordetella pertussis</i>) Hemolisina α (<i>Escherichia coli</i>) Proteasa alcalina (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
Tipo II	Transporte <i>sec</i> a través de la MI De 12 a 16 proteínas para atravesar la ME	Lipasa (<i>Vibrio cholerae</i>) Proteasa (<i>Aeromonas hydrophila</i>) Pululanasa (<i>Klebsiella oxytoca</i>)
Tipo III	Ausencia de péptido señal Secreción directa desde el citoplasma a través de flagelos 20 proteínas de transporte	Proteínas de invasión (<i>Shigella</i> spp.) Proteínas virulentas (<i>Salmonella</i> spp.) Proteínas Yop (<i>Yersinia</i> spp.)
Tipo IV		
“Secreción directa”	Transporte de ADN y proteínas Transferencia directa desde el citoplasma a través de <i>pilus</i>	ADN (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) Citotoxina (<i>Helicobacter pylori</i>)
“Secreción tipo <i>sec</i> ”	Transporte de proteínas Transferencia en dos etapas y sin <i>pilus</i>	Toxina (<i>Bordetella pertussis</i>)
Tipo V		
“Autotransporte”	Transporte <i>sec</i> a través de la MI Reconocimiento dominio C-terminal para atravesar la ME	Proteasa (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)

^a MI, membrana interna; ME, membrana externa.

En el caso de las bacteriocinas sintetizadas sin una extensión N-terminal (sección II.1.4.6), su secreción podría tener lugar mediante el empleo de transportadores-ABC, como los que intervienen en el transporte de proteínas de bacterias Gram-negativas sintetizadas sin una “secuencia señal”, como por ejemplo, la hemolisina α de *E. coli* o las proteínas Yop de *Yersinia*.

II.2.3.1. Procesado, transporte y secreción de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas mediante transportadores-ABC o sistema dedicado de transporte (DTS)

La extensión N-terminal de la mayoría de las bacteriocinas de la Clase II es del tipo secuencia líder, cuya función parece ser la de inactivar la bacteriocina en el interior de la célula productora, así como aportar la señal de reconocimiento para el procesado, transporte y secreción de la bacteriocina madura al exterior celular. Como ya se ha comentado previamente, el procesado, transporte y secreción de bacteriocinas con una secuencia líder y un lugar de procesado del tipo “doble-glicina”, se encuentra mediado por un translocador de membrana de la superfamilia de transportadores-ABC (Håvarstein y col., 1994, 1995; Ennahar y col., 2000). No obstante, estos transportadores difieren de los transportadores ABC “clásicos”, descritos anteriormente, en que poseen tres dominios, uno de integración a la membrana, otro de unión al ATP citoplasmático y, otro, involucrado en la hidrólisis de la pre-probacteriocina con la consiguiente liberación de su secuencia líder (Håvarstein y col., 1994, 1995). El último dominio de, aproximadamente, 150 aminoácidos, y que contiene residuos conservados de cisteína e histidina, reconoce al precursor o pre-probacteriocina e hidroliza la secuencia líder, de modo que el transportador-ABC no sólo interviene en el transporte, sino también en el reconocimiento y procesado de la bacteriocina.

El modelo molecular de procesado, transporte y secreción de bacteriocinas sintetizadas con una secuencia líder y un lugar de procesado doble-glicina, fue propuesto por Håvarstein y col., (1995). El modelo propone una etapa inicial de unión de la pre-bacteriocina y del ATP al transportador-ABC. Posteriormente, la energía liberada por la hidrólisis del ATP induce un cambio conformacional en el transportador, lo que facilita el procesado y translocación de la probacteriocina o bacteriocina madura. Como ya se comentó en la sección II.2.1.1 de esta memoria, durante el procesado y transporte de bacteriocinas mediante este sistema de transporte dedicado también interviene una proteína accesoria. En general, las proteínas accesorias poseen una región N-terminal de unos 20 aminoácidos y anclada en el citoplasma celular, y una región C-terminal orientada hacia el lado extracelular de la membrana citoplasmática y conectada a la N-terminal mediante una secuencia transmembrana (Franke y col., 1996). Aunque la función de estas proteínas no se conoce bien, se sabe que son imprescindibles en la secreción de las bacteriocinas al exterior celular (Skaugen y col., 2000). Generalmente, el transportador-ABC y su proteína accesoria se encuentran codificados en el mismo operon que los genes estructural y de inmunidad, o en otro diferente, pero próximo al anterior (Håvarstein y col., 1995).

El procesado y transporte de la nisina, una bacteriocina de la clase I (grupo de los lantibióticos) también depende de transportadores-ABC, aunque, en este caso, el lugar de procesado de la secuencia líder manifiesta un residuo polar o cargado en posición -1 y un residuo de prolina en posición -2 (Jack y col., 1995). No obstante, otros lantibióticos se sintetizan como pre-péptidos con una secuencia líder y un lugar de procesado doble-glicina (McAuliffe y col., 2001).

II.2.3.2. Procesado, transporte y secreción de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas mediante la ruta general de secreción (GSP) ó sistema *sec*

Hasta ahora, solamente se han descrito unas pocas bacteriocinas de BAL sintetizadas como pre-bacteriocinas con una extensión N-terminal del tipo "péptido señal" y, probablemente, procesadas, transportadas y liberadas al exterior mediante la ruta general de secreción (GTS) o sistema *sec* (Tabla II.2). Dichas bacteriocinas son la acidocina B (Leer y col., 1995), divergicina A (Worobo y col., 1995), bacteriocina 31 (Tomita y col., 1996), enterocina P (Cintas y col., 1997), lactocina 972 (Martínez y col., 1999) y enterolisina A (Nilsen y col., 2003). Algunos investigadores consideran que dichas bacteriocinas deberían constituir un grupo independiente dentro de las bacteriocinas de la clase II (como bacteriocinas *sec*-dependientes; Cintas y col., 2001a; Diep y Nes, 2002). No obstante, algunas bacteriocinas, como la bacteriocina 31 y la enterocina P, manifiestan características típicas de las bacteriocinas de la subclase IIa (similares a las pediocinas y con elevada actividad antilisteria), por lo que la incorporación de un nuevo grupo dentro de la clasificación de las bacteriocinas se encuentra sometida a debate.

La organización genética de las bacteriocinas procesadas y secretadas mediante la ruta general de secreción (GTS) o sistema *sec*, es la más simple de todas ellas ya que dichas bacteriocinas se encuentran generalmente codificadas en un único operon constituido por el gen estructural y el que codifica la proteína putativa de inmunidad (Leer y col., 1995; Worobo y col., 1995; Nilsen y col., 2003).

Tabla II.2. Secuencia del péptido señal (SP) de bacteriocinas sec-dependientes producidas por bacterias lácticas

Bacteriocina	Clase ^a	Secuencia del péptido señal (SP)	*
Acidocina B	IIc	M V T K Y G R N L G L S K V E L F A I W A V L V V A L L L	A T A N I Y W I 1
Bacteriocina 31	IIa	M K K K L V I C G I I G I G F T A L G T N	V E A Y Y G N G 2
Divergicina A	IIc	M K K Q I L K G L V I V V C L S G A T F F S T P Q Q	A S A A A P K I 3
Enterocina P	IIa	M R K K L F S L A P I G I F G L V V T N F G T K	V D A A T R S Y 4
Enterolisina A	III	M K N I L L S I L G V L S I V V S L A F S S Y S	V N A A S N E W 5
Lactococina 972	IIc	M K T K S K V K A K S A V T K F S A G G I V	A Q A E G T W Q 6

^a Clase a la que pertenece la bacteriocina; * Referencias (1) Leer y col., 1995; (2) Tomita y col., 1996; (3) Worobo y col., 1995; (4) Cintas y col., 1997; (5) Nilsen y col., 2003; (6) Martínez y col., 1999. Los aminoácidos del péptido señal (SP) situados en las posiciones -3 y -1 se indican con el sombreado negro; a la derecha y en sombreado gris se muestran los cinco primeros aminoácidos del extremo N-terminal de la bacteriocina madura. Fuente: Herranz, 2000; Nilsen y col., 2003.

II.2.4. PROCESADO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS EN LEVADURAS

En general, las proteínas de secreción sintetizadas por levaduras son procesadas, transportadas y secretadas mediante la ruta general de secreción (GSP) ó sistema *sec*. Inicialmente, las proteínas con un "péptido señal" son dirigidas hasta la membrana del retículo endoplasmático (RE) por las proteínas de reconocimiento de los tipos SRP o sec63 (sección II.2.1.2.4). Una vez que alcanzan la membrana del RE, las proteínas la atraviesan a través del complejo de translocación sec61 y, posteriormente, se procede a su transporte desde el RE hasta el aparato de Golgi (AG). Una vez alcanzado el AG, las proteínas se incorporan a unas "vesículas de secreción" que se fusionan con la membrana citoplasmática, para que las proteínas lleguen al medio extracelular (Ward, 1999) (Figura II.12).

Por otro lado, cabe destacar que no existe una secuencia consenso del "péptido señal" reconocida como "secuencia general" o de "referencia" para la secreción de proteínas en levaduras. No obstante, un importante número de secuencias aminoacídicas consideradas como "péptido señal" y procedentes de proteínas sintetizadas por levaduras ya han sido evaluadas por su posible utilidad como "señales" de procesado y secreción en diversos vectores de expresión (Cereghino y Cregg, 2000). En este contexto, el péptido señal de la feromona factor α de *Saccharomyces cerevisiae* α MF (del inglés, "*Alpha Mating Factor*") se ha convertido en una de las secuencias más utilizadas para la secreción heteróloga de proteínas en levaduras (Cregg y col., 1993). El factor α es una pre-proproteína con 3 lugares de reconocimiento para su procesado, transporte y secreción. Como se observa en la Figura II.12, los lugares de reconocimiento de su extremo N-terminal incluyen: (i) un péptido señal; (ii) una zona reconocida por endopeptidasas; y (iii) una zona reconocida por exopeptidasas.

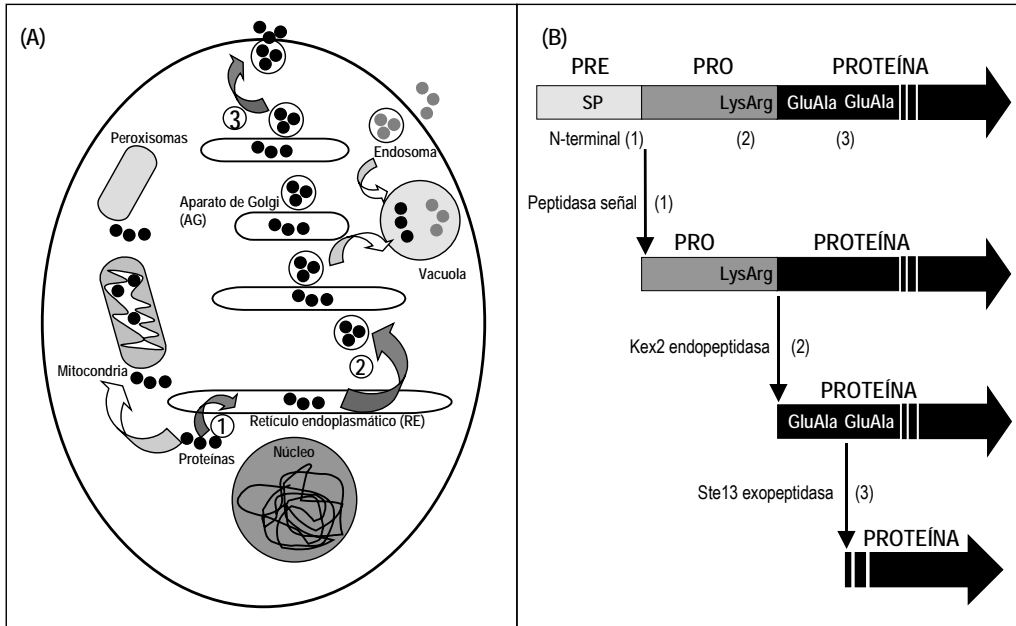


Figura II.12. (A) Mecanismo de procesamiento, transporte y secreción de proteínas en levaduras: las proteínas sintetizadas como precursores preproteína se dirigen hasta la membrana del retículo endoplásmico (RE) con la ayuda de proteínas de reconocimiento (1). Una vez alcanzan la membrana del RE, la cruzan mediante un complejo de translocación. Posteriormente, las proproteínas alcanzan el aparato de Golgi (AG), donde son incorporadas a “vesículas de secreción” (2). Finalmente, las “vesículas de secreción” se fusionan con la membrana citoplasmática para que las proteínas se liberen al medio exocelular (3). No obstante, las proteínas citoplasmáticas pueden utilizar rutas alternativas (indicadas con flechas blancas). (B) Reconocimiento del péptido señal y lugar de procesamiento de la feromona factor α de *Saccharomyces cerevisiae*: inicialmente, el péptido señal (SP) del extremo N-terminal de la preproteína de secreción es reconocida por proteínas de reconocimiento e incorporada al interior del RE (1). Cuando la proproteína llega al aparato de Golgi, se realiza la separación del extremo N-terminal del resto de la proteína. En esta separación intervienen endopeptidasas que reconocen a los residuos contiguos lisina-arginina (2). Finalmente, en el momento de su secreción, la proteína es hidrolizada por exopeptidasas que reconocen el lugar de procesamiento constituido por la repetición de dos aminoácidos contiguos ácido glutámico-alanina (3). Fuente: http://biochemie.web.me.uni-muenchen.de/Yeast_Biology.

II.3. LA ENTEROCINA P, UNA BACTERIOCINA SEC-DEPENDIENTE DE LA SUBCLASE IIa

II.3.1. BACTERIOCINAS DE LA CLASE II

Las bacteriocinas de la clase II son péptidos de pequeño tamaño molecular (<10 KDa) que no contienen aminoácidos modificados, son termoestables, con un pI elevado, entre 8 y 11, y un fuerte carácter catiónico (Martínez, 2000). A su vez, las bacteriocinas de esta clase se ordenan en los siguientes subgrupos (Nes y Holo, 2000; Eijsink y col., 2002):

- (a) Subclase IIa o bacteriocinas de la familia de las pediocinas, en alusión a la bacteriocina más estudiada de este grupo (la pediocina PA-1). Se trata de péptidos con una potente actividad antilisteria y de una elevada homología de sus secuencias aminoacídicas, especialmente en la región N-terminal.
- (b) Subclase IIb o bacteriocinas cuya actividad depende de la acción complementaria de dos péptidos. En algunos casos, como en el de la lactococina G (van Belkum y col., 1991; Nissen-Meyer y col., 1992) es necesaria la presencia de ambos péptidos para que la bacteriocina sea activa; en otros, como en los de la plantaricina S (Jiménez-Díaz y col.,

1995) y la lactacina F (Allison y col., 1994), aunque uno de los péptidos es activo *per se*, su actividad aumenta notablemente en presencia del otro péptido.

- (c) Subclase IIc o bacteriocinas con características peculiares, que aconsejan no incluirlas en las subclases anteriores. A esta subclase pertenecen, por ejemplo, la enterocina B (Casaus y col., 1997), la carnobacteriocina A (Worobo y col., 1994), las enterocinas L50 (EntL50A y EntL50B) (Cintas y col., 1998), la enterocina Q (Cintas y col., 2000c) y la lactococina A (Holo y col., 1991).

A continuación y dado que la enterocina P se ha clasificado como una bacteriocina de la subclase IIa, se describen las características más relevantes de esta subclase.

II.3.2. BACTERIOCINAS DE LA SUBCLASE IIa

Las bacteriocinas de la subclase IIa constituyen el grupo más abundante de bacteriocinas de la clase II (Nes y Holo, 2000). Todas las bacteriocinas de esta subclase muestran una potente actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* y un espectro de acción muy amplio, inhibiendo a numerosos microorganismos alterantes y patógenos de los alimentos, como a otras especies de bacterias lácticas y a microorganismos de los géneros *Brochotrix*, *Clostridium*, *Bacillus* y *Staphylococcus* (Ennahar y col., 2000).

II.3.2.1. Características estructurales

Las bacteriocinas de la subclase IIa contienen entre 37 y 58 aminoácidos y poseen un elevado grado de homología de sus secuencias aminoacídicas (40-70%), sobre todo en el extremo N-terminal (Nes y Holo, 2000). Asimismo, todas las bacteriocinas de esta subclase comparten en su región N-terminal la secuencia consenso **KYYGNGVXCXKXXCXVD/NWXXA XXXI** (Tabla II.3), en la que los aminoácidos resaltados en negrita son los más conservados (prácticamente, en un 100%). Otra característica de las bacteriocinas de este grupo, a excepción de lo que sucede con la acidocina A, es la presencia de dos cisteínas que forman un enlace disulfuro en la parte N-terminal de la molécula. Además, las bacteriocinas divercina V41, enterocina A, pediocina PA-1, plantaricina 423 y sakacina G, contienen otros dos residuos cisteína en sus extremos C-terminal (tabla II.3), lo que les faculta para formar 2 enlaces disulfuro, el primero, en el extremo N-terminal, y el segundo, en la región C-terminal de su molécula.

En general, las bacteriocinas de la subclase IIa no forman estructuras definidas en soluciones acuosas, aunque poseen propensión a formar estructuras secundarias cuando se exponen a solventes hidrófobos. La región N-terminal de estas bacteriocinas parece organizada en forma de lámina β , conformación mantenida por un enlace disulfuro, mientras que la región C-terminal podría adoptar una estructura en hélice α (Ennahar y col., 2000). Sin embargo, este modelo estructural puede ser incompatible con el de las bacteriocinas que poseen 2 enlaces disulfuro (Nes y Holo, 2000).

II.3.2.2. Organización genética y biosíntesis

Como ya se comentó en la sección II.1.4.6 de esta memoria, los genes de la síntesis, procesado y secreción de bacteriocinas producidas por BAL se encuentran agrupados en uno o más operones. En las bacteriocinas de la subclase IIa dichos genes suelen encontrarse agrupados en 1, 2 ó 3 operones, de modo que los determinantes genéticos de las bacteriocinas secretadas por transportadores-ABC se organizan en 2 ó 3 operones, mientras que las que lo hacen por un

sistema *sec* se encuentran localizados en un solo operón (Ennahar y col., 2000). Generalmente, el primer operón contiene los genes estructural y de inmunidad, el segundo los genes de procesado y secreción y el tercero los genes que intervienen en la autorregulación de su síntesis.

Tabla II.3. Secuencia aminoacídica de bacteriocinas de la subclase IIa producidas por bacterias lácticas

Bacteriocina	Secuencia aminoacídica
Acidocina A	K T Y Y G T N G V H C T K R S L W G K V R L K N V I P G T L C R K Q S L P I K Q D L K I L L G W A T G A F G K T F H
Bacteriocina 31	A T Y Y G N G L Y C N K Q K C W V D W N K A S R E I G K I I V N G W V Q H G P W A P R
Bavaricina A	K Y Y G N G V H C G K H S C T V D W G T A I G N I G N N A A A N W A T G G N A G
Bavaricina MN	T K Y Y G N G V Y C N S K K C W V D W G Q A A G G I G Q T V V X G W L G G A I P G K
Carnobacteriocina B2	V N Y G N G V S C S K T K C S V N W G Q A F Q E R Y T A G I N S F V S G V A S G A G S I G R R P
Carnobacteriocina BM1	A I S Y G N G V Y C N K E K C W V N K A E N K Q A I T G I V I G G W A S S L A G M G H
Divercina V41	T K Y Y G N G V Y C N S K K C W V D W G Q A S G C I G O T V V G W L G G A I P G K C
Enterocina A	T T H S G K Y Y G N G V Y C T K N K C T V D W A K A T T C I A G M S I G G F L G G A I P G K C
Enterocina P	A T R S Y G N G V Y C N S K C W V N W G E A K E N I A G I V I S G W A S G L A G M G H
Lactococina MMFII	T S Y G N G V H C N K S K C W I D V S E L E T Y K A G T V S N P K D I L W
Leucocina A	K Y Y G N G V H C T K S G C S V N W G E A F S A G V H R L A N G G N G F W
Mesentericina Y105	K Y Y G N G V H C T K S G C S V N W G E A A S A G I H R L A N G G N G F W
Mundticina	K Y Y G N G V S C N K K G C S V D W G K A I G I I G N N S A A N L A T G G A A G W S K
Pediocina PA-1	K Y Y G N G V T C G K H S C S V D W G K A T T C I I N N G A M A W A T G G H O G N H K C
Piscicolina 126	K Y Y G N G V S C N K N G C T V D W S K A I G I I G N N A A A N L T T G G A A G W N K G
Plantaricina 423	K Y Y G N G V T C G K H S C S V N W G Q A F S C S V S H L A N F G H G K C
Plantaricina C19	K Y Y G N G L S C S K K G C T V N W G Q A F S C G V N R V A T A G H G K
Sakacina A	A R S Y G N G V Y C N N K K C W V N R G E A T Q S I I G G M I S G W A A S G L A G M
Sakacina G	K Y Y G N G V S C N S H G C S V N W G Q A W T C G V N H L A N G G H G V C
Sakacina P	K Y Y G N G V H C G K H S C T V D W G T A I G N I G N N A A A N W A T G G N A G W N K
Sakacina X	K Y Y G N G L S C N K S G C S V D W S K A I S I I G N N A V A N L T T G G A A G W K S

La secuencia consenso se indica con el sombreado gris, mientras que los residuos más conservados de la secuencia aminoacídica están en negrita. Los residuos cisteína del extremo C-terminal se indican con el sombreado negro. Fuente: Ennahar y col., 2000; Ferchichi y col., 2001; Simon y col., 2002; Van Reenen y col., 2003; Vaughan y col., 2003.

Asimismo, la secuencia aminoacídica de la extensión N-terminal de la mayoría de las prebacteriocinas de la subclase IIa son del tipo secuencia líder con un lugar de procesado “doble glicina” (Tabla II.4). Por tanto, el mecanismo de procesado, transporte y secreción de casi todas ellas es mediante transportadores-ABC o sistema dedicado de transporte (DTS). Únicamente la enterocina P y la bacteriocina 31 se sintetizan como prepéptidos con una extensión N-terminal tipo péptido señal, lo que facilita su procesado y secreción mediante la ruta general de secreción (GSP) o sistema *sec*.

El gen de inmunidad de las BAL productoras de bacteriocinas de la subclase IIa codifica proteínas de 88 a 114 aminoácidos, que actúan como sistemas de “autodefensa” frente a la propia bacteriocina (Eijsink y col., 1998). Considerando que el grado de homología de las proteínas de inmunidad de las bacteriocinas de la subclase IIa es pequeño, en comparación con la homología encontrada entre las bacteriocinas, se ha propuesto que estas proteínas no interactúan directamente con sus respectivas bacteriocinas, sino que, podrían hacerlo indirectamente a través de algún tipo de receptor de membrana, como sucede con la proteína de inmunidad de la lactococina A (Kok y col., 1993; Venema y col., 1994). Además, las proteínas de inmunidad son, generalmente, catiónicas e hidrófilas, por lo que también se ha sugerido que se encuentran localizadas entre la membrana y el citoplasma celular (Ennahar y col., 2000). También es posible que las proteínas de inmunidad no interactúen directamente con las bacteriocinas, sino que actúen modificando su posible agregación ó la formación de poros en las membranas ó alterando la interacción entre la bacteriocina y sus receptores localizados en la membrana celular (Venema y col., 1994; Quadri y col., 1995).

Tabla II.4. Secuencias líder del tipo doble glicina de bacteriocinas de la subclase IIa

Bacteriocina	Secuencia líder																							
Acidocina A	M	I	S	M	I	S	S	H	Q	K	T	L	T	D	K	E	L	A	L	I	S	G	G	
Divercina V41	M	K	N	L	K	E	G	S	Y	T	A	V	N	T	D	E	L	K	S	I	N	G	G	
Carnobacteriocina B2				M	N	N	V	K	E	L	S	M	T	E	L	Q	T	I	T			G	G	
Carnobacteriocina BM1				M	K	S	V	K	E	L	N	K	K	E	M	Q	Q	I	I			G	G	
Enterocina A				M	N	S	V	K	E	L	N	V	K	E	M	K	Q	L	H			G	G	
Pediocina PA-1				M	E	K	F	I	E	L	S	L	K	E	V	T	A	I	T			G	G	
Sakacina A				M	K	H	L	K	I	L	S	I	K	E	T	Q	L	I	Y			G	G	
Sakacina P				M	K	K	I	E	K	L	T	E	K	E	M	A	N	I	I			G	G	
Leucocina A	M	M	N	M	K	P	T	E	S	Y	E	Q	L	D	N	S	A	L	E	Q	V	V	G	G
Mesentericina Y105	M	T	N	M	K	S	V	E	A	Y	Q	Q	L	D	N	Q	N	L	K	K	V	V	G	G

Los aminoácidos homólogos de las secuencias líder se muestran con el sombreado gris mientras que los residuos "doble glicina" se indican con el sombreado negro. Fuente: Ennahar y col., 2000.

En la Figura II.13 se muestra la organización de los determinantes genéticos que intervienen en la producción de la enterocina A, una de las bacteriocinas mejor evaluadas de la subclase IIa, así como una representación esquemática de su síntesis, regulación de su síntesis, procesado y secreción.

II.3.2.3. Actividad antimicrobiana: modo y espectro de acción

Un análisis detallado de la secuencia aminoacídica de las bacteriocinas de la subclase IIa indica que su región N-terminal es más hidrofílica y catiónica que la C-terminal (Nes y Holo, 2000), lo que sugiere que su región N-terminal participa en la unión de la bacteriocina a la membrana, mientras que la naturaleza anfipática del dominio C-terminal permite su inserción en la membrana citoplasmática. Además, la mayor variabilidad aminoacídica del extremo C-terminal sugiere que esta región es la responsable del reconocimiento de las células sensibles (Fimland y col., 1998), lo que explicaría las diferencias encontradas en el espectro de acción de las bacteriocinas de la subclase IIa. En este sentido, mientras la región N-terminal, mucho más conservada, podría encargarse de la unión inespecífica de las bacteriocinas a las células diana mediante interacciones electrostáticas, la C-terminal lo haría a través de componentes específicos de la membrana o de receptores proteicos. De hecho, la intervención de un receptor proteico reconocido específicamente por las bacteriocinas ya ha sido propuesto para la pediocina PA-1 y leucocina A (Chikindas y col., 1993; Gallagher y col., 1997).

Como ya se ha comentado previamente, el espectro de acción de las bacteriocinas de la subclase IIa no se reduce únicamente a *L. monocytogenes*, sino que también inhiben el desarrollo de otras bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Brochothrix* y *Clostridium* (Ennahar y col., 2000). En general, las bacteriocinas que contienen 2 enlaces disulfuro muestran una mayor actividad antimicrobiana que las que poseen un único enlace (Nes y Holo, 2000). El enlace disulfuro adicional de su extremo C-terminal no sólo incrementa su espectro de acción sino que, además, estabiliza la estructura tridimensional de las bacteriocinas que lo poseen (Eijsink y col., 1998).

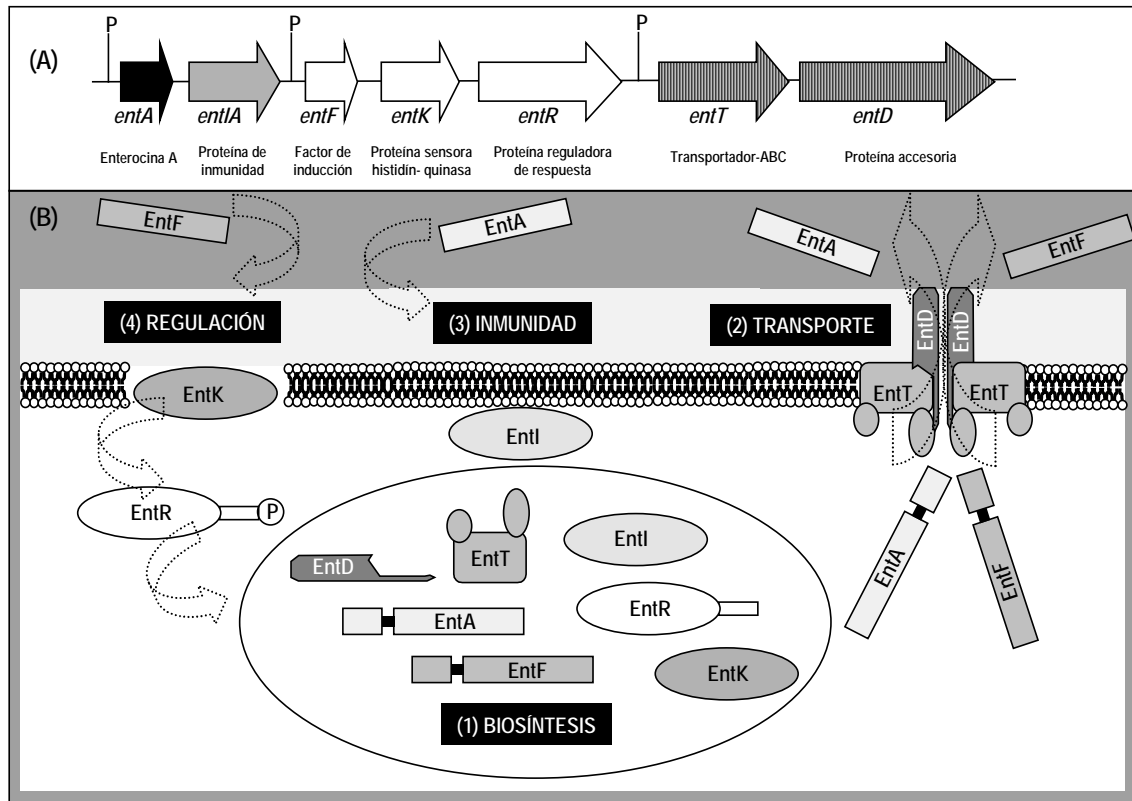


Figura II.13. (A) Organización de los determinantes genéticos de la biosíntesis de la enterocina A. Las proteínas codificadas se nombran debajo de sus respectivos genes; P es el promotor. (B) Representación esquemática de la producción de enterocina A y de su liberación al medio extracelular: (1) Proteínas que intervienen en la síntesis de la enterocina A (EntA); (2) Procesado, transporte y secreción de EntA y del factor de inducción (EntF) mediante un transportador-ABC (EntT) y su proteína accesoria (EntD); (3) la proteína de inmunidad EntI protege a la célula de EntA; (4) Regulación de la síntesis de EntA mediante un sistema regulador de tres componentes: un factor de inducción (EntF), la proteína sensora histidín-quinasa (EntK) y la proteína reguladora de respuesta (EntR); la presencia de EntF en el medio extracelular se traduce en una fosforilación de EntK, la cual cede su grupo fosfato a EntR para que active la transcripción de los operones involucrados en la síntesis de la EntA. Fuente: Ennahar y col., 2000; Martínez, 2000.

II.3.3. ENTEROCINAS PRODUCIDAS POR ENTEROCOCOS

La producción de bacteriocinas parece ser una característica común de enterococos aislados de alimentos. A las bacteriocinas producidas por enterococos se las reconoce como enterocinas y pueden jugar un papel importante en tratamientos combinados de conservación de los alimentos, dado su elevada actividad antimicrobiana frente a microorganismos alterantes y patógenos de los alimentos y, particularmente, frente a *L. monocytogenes*. Su potente actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* podría deberse a que los enterococos y las listerias se encuentran relacionados filogenéticamente (Franz y col., 1999a). No obstante, el espectro de acción de las enterocinas producidas por enterococos también incluye a otras bacterias Gram-positivas, como diversas bacterias lácticas, diversas cepas de *Staphylococcus aureus* y distintas especies de *Clostridium* (Franz y col., 1999a; Giraffa, 2003; Martínez, 2003). En general, las enterocinas se ajustan a la definición de las bacteriocinas producidas por BAL y, generalmente, sólo son activas frente a bacterias Gram-positivas, aunque el espectro de acción antimicrobiana de la enterocina AS-48 incluye también a bacterias Gram-negativas (Jennes y col., 2000). La mayoría de las enterocinas caracterizadas hasta ahora son pequeños péptidos termoestables,

sin modificaciones posttraduccionales, y que pertenecen a la clase II (tabla II.5). Algunas ventajas de las enterocinas frente a otras bacteriocinas son: (i) su estabilidad en condiciones extremas; (ii) su actividad a bajas temperaturas durante largos periodos de tiempo; y (iii) su estabilidad al calor (Martínez, 2003), lo que facilitaría su utilidad en la conservación de alimentos fermentados, refrigerados y/o pasteurizados.

Dado que aislados de *E. faecium* se han aceptado como seguros para su empleo como cultivos iniciadores por la Federación Internacional de Lecherías (FIL) (Martínez, 2003), el uso de enterococos productores de bacteriocinas en diversos productos lácteos podría generalizarse (Franz y col., 1999a; Martínez, 2003). De hecho, los enterococos bacteriocinogénicos podrían resultar útiles como agentes antilisteria en diversos tipos de quesos. Por otra parte, la capacidad de muchos enterococos bacteriocinogénicos de inhibir el desarrollo de *C. tyrobutyricum* permitiría combatir el defecto de la hinchazón tardía de otros tipos de quesos. Asimismo, ya que también se han aislado enterococos productores de bacteriocinas de productos cárnicos fermentados, pescados, vegetales, aceitunas y ensilados, posiblemente dichos enterococos puedan también tener una aplicación tecnológica en aquéllos u otros alimentos o sustratos alimentarios (Franz y col., 1999a; Martínez, 2003).

Tabla II.5. Bacteriocinas de la clase II producidas por enterococos

Bacteriocina	Productor	Referencia
Clase IIa		
Enterocina A	<i>E. faecium</i> CTC492	Aymerich y col., 1996
Enterocina CRL35	<i>E. faecium</i> CRL35	Fariás y col., 1996
Bacteriocina 31	<i>E. faecalis</i> Y117	Tomita y col., 1996
Enterocina P	<i>E. faecium</i> P13	Cintas y col., 1997
Enterocina SE-K4	<i>E. faecalis</i> K-4	Eguchi y col., 2001
Enterocina BC25	<i>E. faecium</i> BC25	Morovsky y col., 2001
Clase IIc		
Enterocina B	<i>E. faecium</i> T136	Casaus y col., 1997
Enterocinas L50 (EntL50A y EntL50B)	<i>E. faecium</i> L50	Cintas y col., 1998
Enterocinas 1071 (Ent1071A y Ent1071B)	<i>E. faecalis</i> BFE1071	Balla y col., 2000
Enterocina Q	<i>E. faecium</i> L50	Cintas y col., 2000
Enterocina RJ-11	<i>E. faecalis</i> RJ-11	Yamamoto y col., 2003
Enterocina EJ97	<i>E. faecalis</i> EJ97	Sánchez-Hidalgo y col., 2003

II.3.4. LA ENTEROCINA P

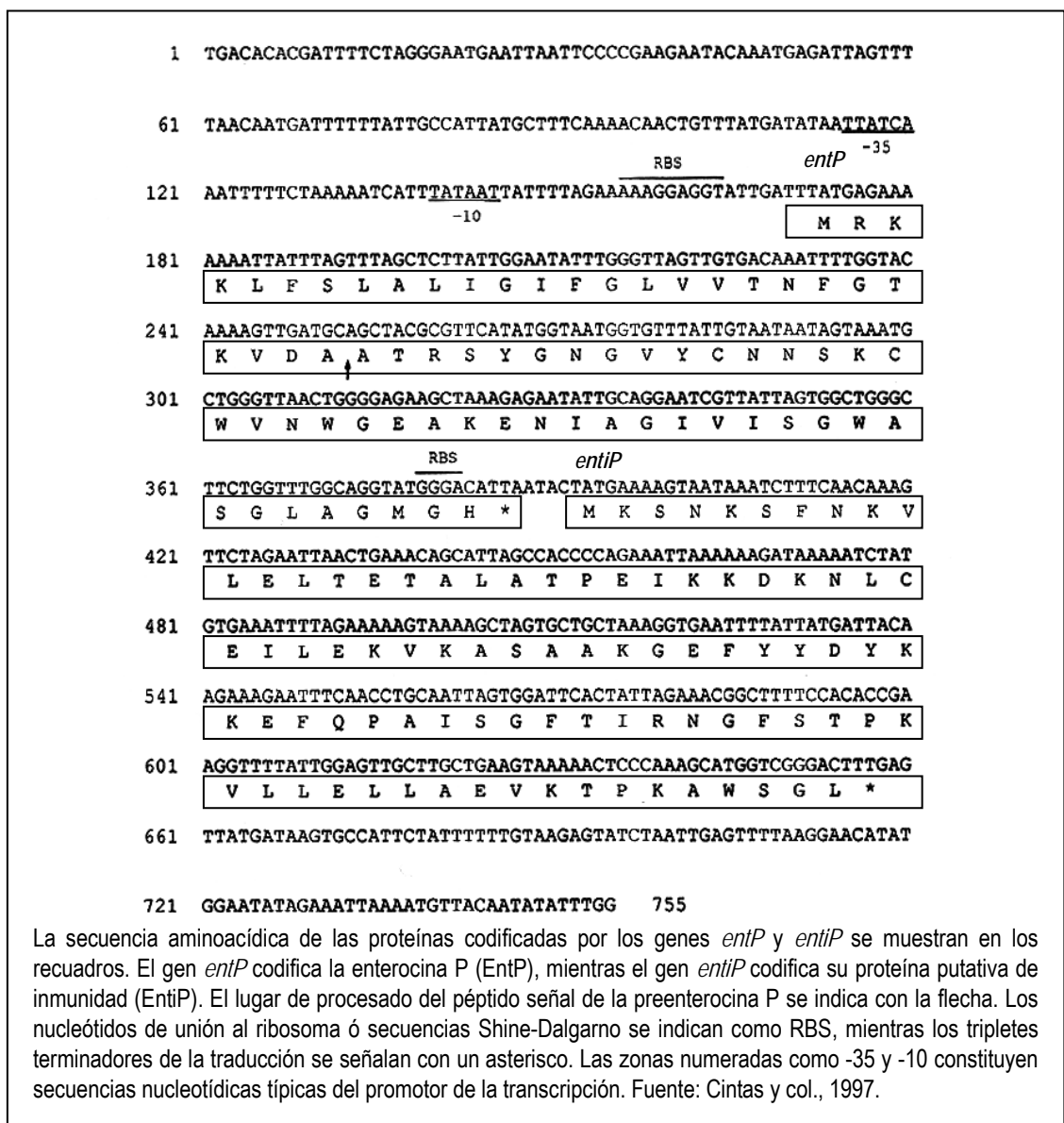
La enterocina P (EntP) es una bacteriocina producida por *E. faecium* P13, una cepa aislada de un embutido crudo curado español elaborado artesanalmente (Cintas y col., 1997). La EntP es un péptido de pequeño tamaño molecular, termoestable, catiónico e hidrófobo, y que pertenece al grupo de las bacteriocinas de la subclase IIa. A continuación, se describen las características más relevantes de dicha bacteriocina.

II.3.4.1 Estructura molecular

La estructura primaria de la EntP se ha elucidado de los resultados de su secuenciación aminoacídica, una vez purificada a homogeneidad, y de la secuencia nucleotídica de los genes

estructural (*entP*) y de su proteína putativa de inmunidad (*entiP*) (Figura 11.14). Los resultados de ambos análisis muestran que se trata de un péptido de 44 aminoácidos que manifiesta las características propias de las bacteriocinas de la subclase IIa: la secuencia consenso YGNGV desde la posición 5 hasta la 9, dos residuos cisteína en las posiciones 9 y 11 y el residuo valina en la posición 18 (Tabla 11.3). El extremo N-terminal de la EntP (desde el residuo 1 hasta el 25) contiene un alto porcentaje de aminoácidos polares, 14 residuos sin carga, 3 residuos de carga positiva y 2 residuos de ácido glutámico cargados negativamente. Por otro lado, su región C-terminal es más hidrófoba, conteniendo 10 residuos no polares y sin carga. La secuencia aminoacídica de la EntP posee una elevada homología (80,5%) con la sakacina A de *Lactobacillus sakei* Lb706 (Holck y col., 1992; Axelsson y Holck, 1995) y con la carnobacteriocina BM1 (74,4%) de *Carnobacterium piscicola* LV17B (Quadri y col., 1994).

Figura 11.14. Secuencia nucleotídica del operón de la enterocina P



II.3.4.2. Organización genética y biosíntesis

Los genes de biosíntesis de la EntP se localizan en el ADN cromosómico de *E. faecium* P13 (Cintas y col., 1997) y se organizan en un único operón (Figura II.14). El gen estructural (*entP*) codifica la EntP como un pre-péptido de 71 aminoácidos, con un péptido señal (PS) de 27 aminoácidos y la bacteriocina madura (EntP) de 44 aminoácidos. El péptido señal posee las características descritas de las proteínas procesadas, transportadas y secretadas por la ruta general de secreción (GTS) o sistema *sec*-dependiente (sección II.2.1.2.1), mostrando un 50% de homología con el SP de la bacteriocina 31 (Tomita y col., 1996); en ambos casos, el péptido señal incluye: (i) 4 residuos idénticos en el extremo N-terminal (MXKKL) y (ii) la secuencia VXA en las posiciones -3 y -1 del lugar de procesado (Tabla II.2). De ello se deduce que la EntP se sintetiza como un prepéptido de 71 aminoácidos, procesado inmediatamente después de los residuos aminoácidos de las posiciones -3 y -1 (VDA) y transportado y translocado al exterior celular como un péptido de 44 aminoácidos.

El segundo gen del operon de la EntP (*entiP*), se localiza inmediatamente después del gen *entP* y codifica una proteína putativa de inmunidad de 88 aminoácidos (EntiP). Dicha proteína muestra una elevada homología con las proteínas de inmunidad de la sakacina A (78%), carnobacteriocina BM1 (73%) y bacteriocina 31 (44%) (Cintas y col., 1997), de modo que es posible que la EntiP no sólo proteja a la propia cepa productora de la acción tóxica de la EntP sino que, además, podría protegerla frente a otras bacteriocinas cuyas proteínas de inmunidad presentan una elevada homología con la EntiP. Fimland y col. (2002) han demostrado experimentalmente que la EntiP protege a células sensibles de la actividad antagonista de la EntP y de la sakacina A.

II.3.4.3. Espectro antimicrobiano y modo de acción

La EntP muestra un espectro de acción intermedio-alto con una elevada actividad antimicrobiana frente a otras bacterias lácticas como *Lb. sakei* y *P. pentosaceus*, y frente a bacterias Gram-positivas alterantes y patógenas de los alimentos, entre las que se incluyen, numerosas cepas de *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Cintas y col., 1997); las bacterias alterantes incluirían a cepas de *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum* y *Propionibacterium spp.*, mientras que otras bacterias patógenas inhibidas estarían representadas por *C. perfringens* y *C. botulinum*.. Cabe destacar la ausencia de actividad antimicrobiana frente a diversas cepas de *Lactococcus*, *Leuconostoc* o *P. acidilactici*, de modo que dichas bacterias lácticas podrían evaluarse como hospedadores para la producción heteróloga de la EntP.

La EntP ejerce una acción bactericida no bacteriolítica en células sensibles. Este modo de acción se ha determinado evaluando su actividad frente al microorganismo indicador *E. faecium* T136 (Herranz y col., 2001a, b). Los resultados obtenidos indican que la EntP origina una reducción significativa del ATP intracelular de las células sensibles, sin un incremento correspondiente del ATP extracelular, así como una reducción, también significativa, del potencial de membrana ($\Delta\Psi$), uno de los componentes de la fuerza protón motriz (PMF), pero sin llegar a afectar al gradiente de pH (ΔpH). La disipación del $\Delta\Psi$ se debe al hecho de que la EntP induce el movimiento transmembrana de cationes K^+ . Por otro lado, se ha visto que dicha bacteriocina altera la permeabilidad de liposomas derivados de *E. faecium* T136, de manera concentración y tiempo-dependientes, y que, además, es inactiva frente a liposomas sintéticos. Por tanto, de ello, se deduce que la EntP induce la formación de canales iónicos selectivos en las células sensibles y de poros menos selectivos en liposomas derivados de éstas.

II.3.4.4. Utilización de la enterocina P como bioconservante de los alimentos

Diversas características de la EntP la convierten en candidata para su utilización como bioconservante de los alimentos. Dichas características incluyen (Cintas y col., 1997): (i) un amplio espectro de acción frente a bacterias alterantes y patógenas de los alimentos; (ii) sensibilidad a enzimas proteolíticas; (iii) elevada estabilidad a altas temperaturas durante largos periodos de tiempo (100°C durante 60 minutos; 121°C durante 15 minutos) y a amplios intervalos de pH (desde 2 hasta 11); y (iv) persistencia de su actividad antimicrobiana tras su almacenamiento a 4 y -20°C durante largos periodos de tiempo, congelación/descongelación y liofilización.

II.4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

II.4.1. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

Las técnicas empleadas en la identificación, detección y cuantificación de las bacteriocinas pueden dividirse en tres grandes grupos (Martínez, 2000): (1) pruebas biológicas, basadas en la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas frente a microorganismos indicadores (microorganismos sensibles a determinadas bacteriocinas); (2) pruebas genéticas, basadas en la detección de secuencias específicas de genes estructurales de bacteriocinas ya caracterizadas; y (3) pruebas inmunológicas, basadas en la detección de bacteriocinas mediante el empleo de anticuerpos específicos.

II.4.1.1. Pruebas biológicas

Las pruebas biológicas constituyen, habitualmente, el punto de partida en la búsqueda de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas. Los bioensayos más empleados son la prueba de difusión en agar (ADT, del inglés "*Agar well Diffusion Test*") y los métodos turbidométricos, basados en la inhibición del desarrollo de un microorganismo indicador inoculado en una placa microtituladora (MPA, del inglés "*Microtiter Plate Assay*") (Cintas y col., 2000c). La cuantificación de la actividad antimicrobiana se realiza empleando "unidades arbitrarias" (UA), en la prueba de difusión en placas de agar, ó "unidades de bacteriocina" (UB), cuando el bioensayo utilizado es la prueba turbidométrica. Ambos parámetros se definen como la recíproca de la dilución más alta de una muestra que produce en el agar inhibición del indicador (UA) o que inhibe en las placas microtituladoras un 50% el crecimiento del indicador (UB). No obstante, a pesar de su innegable utilidad, sensibilidad y sencillez, ambas pruebas presentan 2 inconvenientes que las convierten en poco reproducibles y fiables (Blom y col., 1997): (i) la cuantificación de la actividad antimicrobiana es subjetiva y depende de la sensibilidad de la cepa indicadora; y (ii) son pruebas inespecíficas, pues no permiten discriminar otros posibles compuestos o componentes con actividad antimicrobiana.

II.4.1.2. Pruebas genéticas

Las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o de hibridación DNA-DNA, (*Southern blotting*) son pruebas genéticas de uso rutinario que permiten determinar si una bacteria posee el potencial genético de codificar una determinada bacteriocina (Martínez, 2000). Estas pruebas tienen entre sus ventajas su elevada especificidad y sensibilidad y son de utilidad para determinar la presencia del gen estructural de una bacteriocina conocida en una gran número de cepas. Sin embargo, la detección del gen estructural de una bacteriocina en un organismo hospedador, no implica conocer y cuantificar su producción.

II.4.1.3. Pruebas inmunológicas

Las pruebas inmunológicas constituyen métodos de elección para la detección y cuantificación de bacteriocinas, de las que las técnicas inmunoenzimáticas son las más adecuadas. La mayoría de estas pruebas se basan en la transferencia del antígeno a una superficie inerte, para que, una vez fijado a esa superficie, pueda ser reconocido por un anticuerpo específico; el complejo antígeno-anticuerpo formado se detectará enzimáticamente. En general, los ensayos inmunoenzimáticos permiten la detección y cuantificación de bacteriocinas en diferentes sustratos, ya sean los sobrenadantes de los cultivos de los microorganismos productores o los alimentos en los que se encuentran. Además, dichos ensayos pueden servir de referencia para el desarrollo de otras pruebas inmunológicas más complejas, como por ejemplo, las de inmunolocalización e inmunopurificación (sección II.4.2.3).

En función del tipo de muestra utilizada para detectar el antígeno, en este caso la bacteriocina, las técnicas inmunoenzimáticas pueden dividirse en dos grandes grupos: (a) ensayos basados en la transferencia de células y su posterior reconocimiento inmunológico, como la prueba de "*Colony immunoblotting*"; y (b) ensayos basados en la transferencia de bacteriocinas (semi)purificadas o de sobrenadantes de las cepas bacteriocinogénicas y su posterior detección inmunológica. Dentro del segundo grupo, existen distintas técnicas, según la transferencia y superficie inerte utilizada para la fijación de los antígenos, como por ejemplo: (i) el "*Western blotting*", basada en la transferencia electroforética de las bacteriocinas a una membrana de nitrocelulosa; (ii) el "*Spot immunoblotting*", basada en la transferencia directa de las bacteriocinas a una membrana de nitrocelulosa; y (iii) la técnica ELISA, basada en la transferencia directa de las bacteriocinas a placas de poliestireno.

Hasta ahora, las técnicas inmunológicas más utilizadas han sido las basadas en la detección y cuantificación directa de las bacteriocinas (Tablas II.6 y II.7). Sin embargo, también se han diseñado ensayos para la detección de células productoras de bacteriocinas (Bhunja y Johnson, 1992; Bhunja, 1994; Stringer y col., 1995; Lerversee y Glatz, 2001). Por otro lado, la mayoría de las técnicas inmunológicas se han optimizado para la detección y cuantificación de bacteriocinas en los sobrenadantes de cultivos productores, ó durante su purificación a homogeneidad, por lo que sería conveniente un mayor esfuerzo en cuanto al desarrollo de protocolos eficaces de detección y cuantificación de las bacteriocinas en diferentes alimentos o sustratos alimentarios, ya que pocos trabajos han tenido como objetivo la detección y cuantificación de bacteriocinas en sustratos alimentarios reales (Falahee y col., 1990; Stringer y col., 1995; Suárez y col., 1996b; Bouksaim y col., 1998, 1999; Daoudi y col., 2001).

No obstante, la utilización de técnicas inmunológicas ha tenido un impacto marginal en lo referente a la detección y cuantificación específica de bacteriocinas, comparado con la detección y cuantificación de otros péptidos y proteínas. Esto puede deberse, seguramente, a la dificultad de generar anticuerpos específicos frente a las bacteriocinas de interés. El principal obstáculo para la obtención de anticuerpos frente a las bacteriocinas es su pequeño tamaño. La mayoría de las bacteriocinas poseen un tamaño inferior a 5 KDa, lo que las convierte en haptenos, es decir, en sustancias antigénicas reconocidas por anticuerpos específicos pero no inmunógenos ó capaces de generar una respuesta inmune. Además, la utilización de las bacteriocinas como haptenos requiere purificarlas a homogeneidad, lo cual, además de difícil experimentalmente, genera cantidades de bacteriocina muy pequeñas, por lo que se requerirían de múltiples purificaciones antes de su aplicación.

II.4.2. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A BACTERIOCINAS

La obtención de anticuerpos específicos frente a inmunógenos requiere un protocolo de inmunización que garantice una buena respuesta inmunológica y una elevada producción de anticuerpos. Asimismo, tras obtener los anticuerpos, se hace necesario evaluar su especificidad y sensibilidad frente a la proteína o péptido de interés, y para ello, es importante la utilización de técnicas inmunológicas contrastadas.

II.4.2.1. Protocolo de inmunización: elección del inmunógeno

El principal componente de un buen protocolo de inmunización es el inmunógeno, el cual debe inducir una potente respuesta inmunológica. Como ya se ha descrito previamente, las bacteriocinas se consideran como haptenos, es decir, moléculas sin capacidad inmunógena. Por ello, la obtención de anticuerpos frente a bacteriocinas debe facilitarse mediante su conjugación a moléculas que les confieran inmunogenicidad. Estas moléculas son conocidas como proteínas vehiculadoras o portadoras. Las proteínas portadoras mejor descritas y más empleadas son la seroalbúmina bovina (BSA), la ovoalbúmina (OVA) y la KLH (del inglés "Keyhole Limpet Hemocyanin"), una hemocianina aislada del molusco *Megathura crenulata*. Estas proteínas suelen seleccionarse por su elevado tamaño, inmunogenicidad, lugares activos de unión al péptido y/o solubilidad. Otras proteínas portadoras menos empleadas son los toxoides colérico y tetánico y la mioglobina.

De los métodos de conjugación más empleados, destacan la conjugación por el glutaraldehído (Avrameas y Ternynck, 1969; Briand y col., 1985), maleimidias (Yoshitake y col., 1979) y carbodiimidias (Williams e Ibrahim, 1981). Los residuos del péptido habitualmente implicados en su conjugación a la molécula portadora son los aminoácidos lisina, a través de su grupo ϵ -amino, el aminoácido cisteína, los grupos amino y carboxi terminales libres y otros residuos aminoácídicos capaces de unirse a otras moléculas. Además, los péptidos empleados como antígenos inmovilizados en ciertos inmunoensayos, deben igualmente conjugarse a moléculas portadoras, ya que son incapaces de unirse por sí mismos a determinadas superficies (Harlow y Lane, 1988). Asimismo, las proteínas portadoras a las que se conjuga el péptido para su empleo como inmunógeno o como antígeno inmovilizado deben ser diferentes, con el fin de evitar la interferencia ocasionada por los anticuerpos generados frente a la molécula portadora empleada en la inmunización.

Una vez se obtiene el inmunógeno apropiado, se procede a su inoculación en animales de experimentación. Dicha inoculación se acompaña del empleo de "adyuvantes", sustancias que potencian la respuesta inmune de manera inespecífica (Audibert y Lise, 1993; Gupta y col., 1993). Los adyuvantes más empleados son el completo e incompleto de Freund. El mecanismo de acción de los adyuvantes es complejo e incluye una liberación lenta y prolongada del antígeno, así como una activación de los linfocitos por componentes bacterianos. En concreto, el adyuvante completo de Freund se compone de células de *Mycobacterium tuberculosis* inactivadas por calor y vehiculadas en aceite de parafina y otras grasas. El aceite mineral impide la dispersión y retarda el catabolismo del antígeno, proporcionando una fuente de estimulación antigénica prolongada. El adyuvante incompleto de Freund carece de las células de *M. tuberculosis*.

Hasta ahora, los protocolos de inmunización utilizados para la obtención de anticuerpos específicos frente a bacteriocinas se han basado en la elección de dos tipos de inmunógenos: (i) utilización de la bacteriocina (semi)purificada; y (ii) utilización de péptidos sintéticos de

especificidad predeterminada y diseñados de la secuencia aminoacídica conocida de la bacteriocina de interés.

11.4.2.1.1. Utilización de bacteriocinas (semi)purificadas

A pesar de la hipótesis razonable de que las bacteriocinas deben conjugarse a proteínas portadoras para adquirir inmunogenicidad, algunos investigadores han obtenido anticuerpos mediante la inmunización de animales de experimentación con bacteriocinas purificadas no conjugadas a moléculas portadoras (Tabla II.6). Sin embargo, los resultados negativos de dichos ensayos justifican aún más la utilización de proteínas portadoras. En este contexto, la obtención de anticuerpos específicos frente a bacteriocinas conjugadas a moléculas inmunógenas ha generado mejores resultados (Tabla II.6). No obstante, la conjugación de la bacteriocina a moléculas portadoras no es siempre una garantía de éxito (Tabla II.6), de lo que se deduce la importancia de una elección adecuada de las proteínas portadoras, de los procedimientos de conjugación y de los inmunoformatos utilizados en la determinación de la sensibilidad y especificidad de los inmunoseros obtenidos, con resultados difícilmente extrapolables en la mayoría de los casos.

Tabla II.6. Bacteriocinas frente a las que se han obtenido anticuerpos utilizando como inmunógenos bacteriocinas purificadas o parcialmente purificadas

Bacteriocina	Clase ^a	Molécula portadora ^b	Animal de experimentación	Tipo de anticuerpos	Inmunoformato utilizado ^c	Límite de detección (µg/ml) ^d	Referencia
Enterocina B	Ic	BSA	Conejo	Policlonal	ELISA	0,05	Rose y col., 2001
Nisina	IA						
Nisina A		OVA	Oveja	Policlonal	ELISA	0.0005	Falahee y col., 1990
"		-	Conejo	"	Spot-blot	-	Stringer y col., 1995
"		TC	Ratón	"	ELISA	1-5	Suárez y col., 1996a
"		KLH	"	"	"	0.005-0.01	Suárez y col., 1996a
"		KLH	"	Monoclonal	"	0,001	Suárez y col., 1996b
"		-	Conejo	Policlonal	"	1,3	Leung y col., 2002
Nisina Z		KLH	"	"	Spot-blot, Western-blot	0,003	Bouksaim y col., 1998
"		KLH	"	"	ELISA, Spot-blot	0,0004-0,0008	Bouksaim y col., 1999
"		KLH	Ratón	Monoclonal	ELISA, Western-blot	0,08	Daoudi y col., 2001
Pediocina PA-1	Ila	-	Ratón, conejo	Policlonal	ELISA, Western-blot	-	Bhunia y col., 1990
"		BSA	Ratón	"	ELISA, western-blot	-	Bhunia y col., 1990
"		-	Conejo	"	ELISA	-	Moreira, 1994
"		CM	Ratón	"	ND	-	Bhunia, 1994
"		PA	"	Monoclonal	Western-blot, Spot-blot	10	Bhunia, 1994
Propionicina PLG-1	NC	-	Conejo	Policlonal	ELISA, Western-blot	0,08	Leversee y Glatz, 2001

^a Clase a la que pertenece la bacteriocina. NC: no clasificada.

^b Molécula portadora o vehiculadora: BSA, seroalbúmina bovina; CM, células inactivadas; KLH, hemocianina de *Megathura crenulata*; OVA ovoalbúmina; PA, poliacrilamida; TC, toxina colérica.

^{c,d} ND, no determinado. -, no descrito.

Además del pequeño tamaño de las bacteriocinas y, por tanto, de su condición de haptenos, la ausencia de preparados comerciales de bacteriocinas de gran pureza, excepto en el caso de la nisina, unido al pequeño rendimiento de los métodos de purificación, dificultan la obtención de cantidades suficientes de bacteriocinas para su empleo en la inmunización de animales de experimentación. No obstante, la obtención de bacteriocinas por síntesis química puede paliar la dificultad de su purificación a homogeneidad de los sobrenadantes de los cultivos productores. Sin embargo, el elevado coste económico y la dificultad de la síntesis química y purificación posterior de los péptidos de más de 40 aminoácidos (tamaño aproximado de la mayoría de las

bacteriocinas de interés), hace inviable su empleo por la mayoría de los laboratorios. Por el contrario, la síntesis de péptidos de menor tamaño, de entre 5 y 15 aminoácidos, tiene un coste mucho menor. Esta circunstancia permite abordar protocolos de inmunización con péptidos diseñados de secuencias aminoacídicas conocidas de las bacteriocinas de interés (péptidos de especificidad predeterminada) y conjugados a moléculas portadoras. Los anticuerpos obtenidos frente a péptidos sintéticos reaccionan antigénicamente con la bacteriocina de la que se dedujo su secuencia, con lo que se evita emplear la bacteriocina completa purificada a homogeneidad u obtenida de síntesis química.

11.4.2.1.2. Utilización de péptidos sintéticos de especificidad predeterminada

Los anticuerpos generados frente a péptidos sintéticos frecuentemente reconocen a la bacteriocina nativa de la que derivan (Tabla II.7), mientras su especificidad puede considerarse como "predeterminada", es decir, es posible determinar con antelación la región de la proteína nativa frente a la que se obtendrán anticuerpos específicos, mediante la inmunización de animales con un péptido sintético diseñado de dicha región.

No obstante, existen dos consideraciones que condicionan la obtención de anticuerpos frente a péptidos sintéticos: (a) algunos péptidos son escasamente antigénicos, por lo que es conveniente que las regiones seleccionadas del antígeno, a partir de las cuales se diseñarán los péptidos sintéticos, sean lo suficientemente antigénicas; y (b) los anticuerpos generados frente a péptidos conjugados a moléculas portadoras no siempre reconocen a la proteína nativa. La mayoría de resultados negativos, en cuanto al reconocimiento de la bacteriocina nativa (Martínez y col., 1997; Criado y col., 2004; tabla II.7), muestran un reconocimiento adecuado del péptido sintético. La ausencia de reconocimiento de la proteína nativa puede deberse a diversos factores, como por ejemplo: (i) inaccesibilidad de los anticuerpos a la región diana de la proteína nativa; (ii) cambios estructurales del péptido sintético como consecuencia de su conjugación a la molécula portadora; (iii) diferencias conformacionales entre el péptido sintético y la región homóloga de la proteína nativa; y/o (iv) utilización de inmunoformatos no adecuados.

De lo descrito previamente, se deduce que tanto el diseño y conjugación de los péptidos a moléculas portadoras, como la evaluación de la especificidad y sensibilidad de los inmunoseros mediante inmunoformatos adecuados, constituyen puntos críticos en la obtención de anticuerpos antipeptídicos específicos. La elección del procedimiento de conjugación del péptido es muy importante, ya que puede afectar decisivamente a la actividad antigénica del péptido (Briand y col., 1985); no obstante, y dado que la mayoría de anticuerpos antipeptídicos generados hasta ahora se han obtenido utilizando la misma molécula portadora (KLH), las etapas cruciales para la obtención de anticuerpos de especificidad predeterminada quedan reducidas a: (i) la elección de una región aminoacídica adecuada; y (ii) el desarrollo de inmunoformatos apropiados.

En relación al potencial antigénico de una secuencia peptídica, los parámetros a considerar son los siguientes (Martínez, 2000):

- (1). Hidrofilicidad: por lo general, los residuos hidrofóbicos de una proteína forman parte de estructuras globulares, mientras que las cadenas laterales hidrofílicas suelen situarse en la superficie de las proteínas, donde interactúan con el medio acuoso. Por ello, las regiones hidrofílicas de un péptido o proteína se consideran potencialmente portadoras de epítopos lineales.

- (2). Localización dentro de la proteína: los péptidos derivados de regiones N- y C-terminales de las proteínas suelen ser los más adecuados para inducir la producción de anticuerpos.
- (3). Carga neta: la presencia de aminoácidos cargados suele incrementar la antigenicidad de un péptido.
- (4). Presencia de hélices anfífilas: los péptidos deducidos de regiones que constituyen hélices anfífilas de una proteína, suelen generar anticuerpos específicos frente a dicha proteína.
- (5). Accesibilidad de la región: las secuencias aminoacídicas situadas en la superficie de las proteínas suelen ser más hidrofílicas y móviles, por lo que son más accesibles al sistema inmune.

Tabla II.7. Bacteriocinas frente a las que se han obtenido anticuerpos utilizando como inmunógenos péptidos de especificidad predeterminada

Bacteriocina	Clase ^a	Inmunógeno (KLH-péptido) ^b	Animal de experimentación	Inmunofórmula utilizado	Límite de detección (µg/ml) ^c	Referencia
Enterocina A	Ila	KLH-PH4 (14 aa, extremo N-terminal)	Conejo	ELISA	0,1	Martínez y col., 2000
"	"	KLH-PH5 (11 aa, extremo C-terminal)	"	"	"	Martínez y col., 2000
Enterocina L50A	Ilc	KLH-LR1 (14 aa, extremo C-terminal)	"	"	0,0025	Criado y col., 2004
Enterocina L50B	Ilc	KLH-LR2 (13 aa, extremo C-terminal)	"	"	0,0025	Criado y col., 2004
Enterocina Q	Ilc	KLH-Q1 (9 aa, extremo N-terminal)	"	"	-	Criado y col., 2004
Divercina V41	Ila	KLH-DvnCt (25 aa, extremo C-terminal)	"	ELISA, Western-blot	ND	Richard y col., 2003
Lactocina RM	NC	KLH-RM1 (19 aa, región intermedia)	"	ELISA	0,18	Keren y col., 2004
"	"	"	"	Spot-blot	0,16	Keren y col., 2004
"	"	"	"	Western-blot	1,9	Keren y col., 2004
Pediocina PA-1	Ila	KLH-PH1 (9 aa, extremo N-terminal)	Ratón	ELISA	-	Martínez y col., 1997
"	"	"	Conejo	"	0,01	Martínez y col., 1999
"	"	"	"	Spot-blot	5	Martínez y col., 1999
"	"	KLH-PH2 (11 aa, extremo C-terminal)	Ratón	ELISA	1	Martínez, 2000
"	"	"	Conejo	"	0,025	Martínez y col., 1998
"	"	"	"	Spot-blot	2,5	Martínez y col., 1998

^a Clase a la que pertenece la bacteriocina. NC, no clasificada.

^b Péptido conjugado a la hemocianina. Entre paréntesis se indica el número de aminoácidos (aa) del péptido y la región de la bacteriocina a la que pertenece.

^c ND, no determinado. -, no descrito.

Sin duda la obtención de anticuerpos anti-peptídicos de especificidad predeterminada, constituye una alternativa válida de producción de anticuerpos frente a las bacteriocinas (Tablas II.6 y II.7). No obstante, en ocasiones, los anticuerpos anti-peptídicos pueden reconocer varias bacteriocinas. Un claro ejemplo de esta inespecificidad se deduce de los trabajos de Martínez (2000) y Richard y col. (2003), en los que anticuerpos específicos frente a las regiones N-terminal de la enterocina A (Martínez, 2000) y divercina V41 (Richard y col., 2003) no sólo reconocieron a estas bacteriocinas, sino también a otras bacteriocinas de la misma subclase II. El que las bacteriocinas de la subclase citada compartan una secuencia consenso N-terminal puede limitar la especificidad de anticuerpos obtenidos frente a dicha región. No obstante, dichos resultados deben evaluarse con propiedad porque, puede ocurrir, que la obtención de anticuerpos anti-peptídicos frente a una región determinada faculte el reconocimiento de dos o más bacteriocinas simultáneamente, lo que facilitaría su detección y cuantificación sin necesidad de generarlos específicamente para cada una de ellas. En el caso de anticuerpos obtenidos frente a bacteriocinas completas, la posibilidad de generar reactividades cruzadas suele ser

menor, puesto que pequeñas modificaciones de su secuencia aminoacídica modifican su antigenicidad (Falahee y Adams, 1992; Suárez y col., 1996a y b).

II.4.2.2. Producción de anticuerpos

La mayoría de anticuerpos generados frente a las bacteriocinas se han obtenido como anticuerpos policlonales o monoclonales (Martínez, 2000).

II.4.2.2.1. *Producción de anticuerpos policlonales*

Los protocolos de inmunización para la obtención de anticuerpos policlonales contemplan el empleo de conejos, cabras u ovejas y deben realizarse al menos dos inoculaciones para el desencadenamiento de una respuesta inmune eficaz. Las inoculaciones deben estar separadas por un período de entre 1 y 6 semanas y la sangría de los animales inmunizados permite la obtención de suero sanguíneo, del que los anticuerpos pueden ser posteriormente purificados. También es posible obtener anticuerpos policlonales de ratones en cantidades relativamente elevadas, induciendo el desarrollo de ascitis mediante la inoculación intraperitoneal de células de mieloma de ratón en individuos previamente inmunizados y la posterior recolección del líquido ascítico.

II.4.2.2.2. *Producción de anticuerpos monoclonales*

La metodología de obtención de anticuerpos policlonales es más sencilla que la de obtención de anticuerpos monoclonales. Sin embargo, esta última permite la producción de anticuerpos homogéneos en cantidades ilimitadas gracias a la obtención de células híbridas (hibridomas), resultantes de la fusión entre linfocitos productores del anticuerpo de interés y de células de mieloma de ratón. Además, la utilización de anticuerpos monoclonales dota a los inmunoformatos de detección de bacteriocinas de elevada especificidad, derivada del reconocimiento por los anticuerpos de un único epítipo antigénico.

II.4.2.2.3. *Producción de anticuerpos recombinantes*

La mayoría de estrategias de obtención de anticuerpos recombinantes se basan en la producción heteróloga de anticuerpos en bacterias, principalmente *E. coli*. Ello requiere la clonación de genes que codifican los anticuerpos de interés en un vector de expresión y su producción por el microorganismo hospedador. Las metodologías de obtención de anticuerpos recombinantes son más complejas que las empleadas en la generación de anticuerpos policlonales o monoclonales y todavía no se ha descrito ningún anticuerpo recombinante de especificidad y sensibilidad apropiadas para la detección y cuantificación de ninguna bacteriocina.

II.4.2.3. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos generados: elección del inmunoensayo y del inmunoformato

Antes de decidir que tipo de inmunoensayo e inmunoformato se va a utilizar para evaluar la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos generados, es aconsejable comprobar el título del suero de los animales a lo largo del proceso de inmunización. El título de un inmunosuero se define como el inverso de la máxima dilución que permite la detección del antígeno en unos valores que llegan a ser de hasta dos veces más altos que los que muestra la dilución

equivalente de un suero procedente de un animal no inmunizado. En la mayoría de los casos, los inmunoseros de mayor título contienen anticuerpos de elevada especificidad y sensibilidad.

Después de las pruebas de serotitulación, se puede proceder al desarrollo de diferentes tipos de inmunoensayos e inmunoformatos que permitan explotar al máximo el potencial de los anticuerpos generados.

II.4.2.3.1. Tipos de inmunoensayos

Actualmente, un gran número de inmunoensayos se basan en el empleo de anticuerpos marcados con enzimas que permiten una visualización rápida del complejo antígeno-anticuerpo después de la incorporación de diferentes tipos de sustratos (colorimétricos, luminiscentes, fluorescentes...). Estos inmunoensayos pueden dividirse en 3 grandes grupos (figura II.15):

- (a) Competitivo/no competitivo: en el ensayo competitivo, una concentración conocida del antígeno se fija a una superficie inerte y, a continuación, se añaden simultáneamente el anticuerpo específico y la muestra problema. Si la muestra problema posee los mismos antígenos, éstos competirán por la unión al anticuerpo con el antígeno inmovilizado, de modo que cuanto mayor sea la concentración del antígeno de la muestra, menor será el anticuerpo retenido. El ensayo no competitivo es mucho más sencillo, ya que en este caso, la muestra problema se fija a la superficie para que pueda ser reconocida por los anticuerpos específicos, por lo que cuanto mayor sea la concentración del antígeno de la muestra, mayor será el anticuerpo presente.
- (b) Directo/indirecto: en el ensayo directo, los anticuerpos específicos se conjugan a una enzima determinada, mientras que en el caso del ensayo indirecto el complejo antígeno-anticuerpo formado se detecta con un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente, que reconoce como antígenos a los anticuerpos específicos.
- (c) "Sandwich": en este ensayo, la muestra problema se añade a una superficie previamente tapizada con los anticuerpos específicos. Posteriormente, si la muestra problema posee el antígeno de interés, la reacción anticuerpo-antígeno será reconocida por el mismo anticuerpo específico.

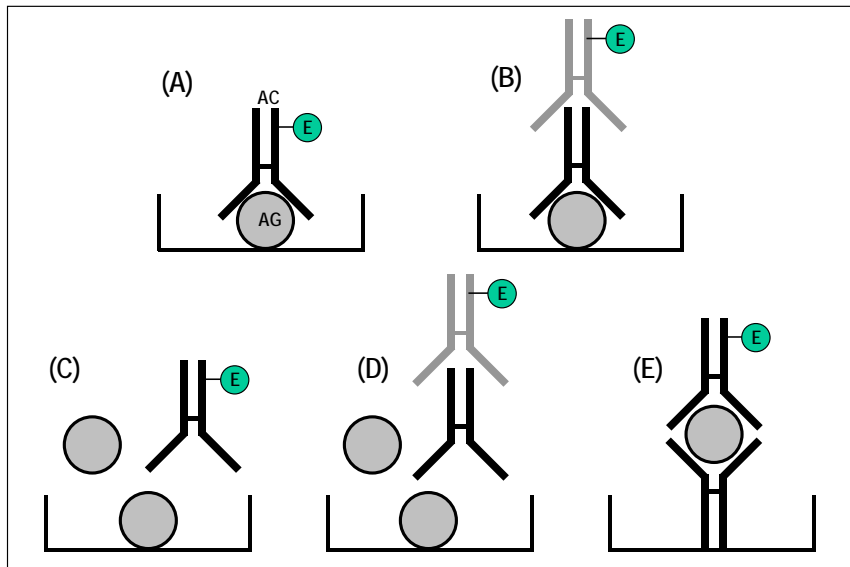
II.4.2.3.2. Tipos de inmunoformatos

Como ya se indicó en la sección II.4.1.3 de esta memoria, el tipo de inmunoformato depende de las características de la superficie inerte sobre la que se fijarán los antígenos de interés. Existen una gran variedad de superficies de adsorción, aunque, en líneas generales, éstas podrían dividirse en 2 grandes grupos: (i) las que se desarrollan en placas de poliestireno o polietileno (*ELISA*, del inglés "*Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay*"); y (ii) las que utilizan membranas de nitrocelulosa (*blotting*).

II.4.2.4. Otras aplicaciones de los anticuerpos generados frente a bacteriocinas

Además de facilitar la detección y cuantificación de bacteriocinas en diferentes de sustratos, los anticuerpos generados frente a bacteriocinas pueden permitir otras aplicaciones, como las de inmunolocalización de las bacteriocinas de interés en células productoras, microorganismos sensibles y en sustratos donde desarrollan su actividad, así como facilitar su purificación en un solo paso por inmunocromatografía de afinidad.

Figura 11.15. Tipos de inmunoensayos enzimáticos



En esta figura se muestran los siguientes inmunoensayos: (A) directo no competitivo; (B) indirecto no competitivo; (C) directo competitivo; (D) indirecto competitivo; y (E) "sandwich" directo no competitivo. El ensayo "Sandwich" también podría ser indirecto y/o competitivo. AG: antígeno; AC: anticuerpo; E, enzima. El anticuerpo específico del antígeno se muestra en negro, mientras que el anticuerpo que reconoce al anticuerpo específico se indica en gris. Fuente: Hefle, 1995

11.4.2.4.1. Inmunolocalización antigénica

En experiencias de inmunolocalización antigénica se utilizan anticuerpos específicos marcados con partículas de oro, lo que facilita la visualización de las interacciones antígeno-anticuerpo mediante microscopía electrónica. Las técnicas de inmunolocalización antigénica pueden facilitar el estudio de la biosíntesis de las bacteriocinas y de su mecanismo de acción. De todas maneras, su empleo se ha limitado a los trabajos de Bouksaim y col. (1999) y Benech y col. (2002a, 2002b). Estos investigadores utilizaron con éxito anticuerpos marcados para la inmunolocalización de la nisina Z, lo que les permitió observar su modo de acción en células sensibles.

11.4.2.4.2. Inmunopurificación

Los anticuerpos generados frente a proteínas y péptidos pueden emplearse también para recuperarlas y purificarlas de sustratos complejos por cromatografía de inmunoafinidad. Para ello, es necesaria la inmovilización de los anticuerpos específicos en un soporte o superficie apropiados, desde columnas cromatográficas con matrices de fijación de los anticuerpos a partículas magnéticas (Suárez y col., 1997; Prioult y col., 2000). El empleo de columnas cromatográficas con anticuerpos fijados a matrices adecuadas ha facilitado la purificación a homogeneidad de las bacteriocinas nisina A (Suárez y col., 1997), pediocina PA-1 (Martínez, 2000), enterocina B (Rose y col., 2001) y divercina V41 (Richard y col., 2003).

II.5. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS

Como ya se ha comentado en la sección II.1.3 de esta memoria, las bacteriocinas producidas por BAL se consideran como péptidos antimicrobianos naturales de origen ribosomal, con o sin modificaciones postraduccionales, y potencialmente útiles como "bioconservadores" de los alimentos. No obstante, su utilidad como bioconservantes puede encontrarse limitada por factores como: (i) un espectro de acción reducido; (ii) la inexistencia de protocolos de purificación que permitan rendimientos de recuperación aceptables; (iii) la consideración de la cepa productora como microorganismo GRAS; (iv) la escasa adaptación de la cepa bacteriocinogénica a los sustratos alimentarios de interés; o (v) el desarrollo de bacterias resistentes a las bacteriocinas. Por ello, la producción heteróloga de bacteriocinas en otros hospedadores podría constituir una alternativa válida para evitar algunas de las situaciones previamente citadas.

En este contexto, se ha propuesto que las bacteriocinas de las BAL de origen alimentario o las cepas productoras de bacteriocinas, solas o combinadas con otras barreras antimicrobianas, contribuirían a asegurar la estabilidad y la calidad higiénica y microbiológica de muchos alimentos, mientras la producción de bacteriocinas en otros hospedadores permitiría: (a) incrementar la producción de bacteriocinas, (b) producirlas en hospedadores más seguros, (c) construir cepas multibacteriocinogénicas productoras de varias bacteriocinas, (d) mejorar la adaptación de los hospedadores seleccionados para su implantación y desarrollo en diversos sustratos alimentarios y (e) proveer de una actividad antagonista, mayor o más específica, a bacterias lácticas utilizadas como cultivos iniciadores, protectores o probióticos de los alimentos. Asimismo, la clonación, producción y expresión funcional de las proteínas codificadas por los genes de biosíntesis de las bacteriocinas puede facilitar el estudio de su función. De lo descrito previamente, no es de extrañar que el estudio y evaluación de la clonación, producción y expresión funcional de las bacteriocinas en hospedadores heterólogos sea de un gran interés científico y aplicado.

Sin embargo, el diseño de un sistema de producción y expresión eficaz de proteínas o péptidos recombinantes depende de numerosos factores (Makrides, 1996), entre los que se incluyen: (i) las características del hospedador heterólogo; (ii) los elementos genéticos utilizados, como vectores de expresión, promotores, lugares de unión al ribosoma y señales de transcripción y traducción; (iii) la existencia o no de modificaciones postraduccionales; (iv) la localización y nivel de producción y expresión funcional del producto final; y/o (v) la ausencia de efectos tóxicos del producto final, tanto en el hospedador que lo produce como del producto purificado a homogeneidad.

La producción de bacteriocinas en hospedadores heterólogos se basó, primeramente, en la clonación de los genes de biosíntesis de la bacteriocina de interés en diferentes vectores de expresión, lo que permitió la producción de la pediocina PA-1 en *E. coli* (Marugg y col., 1992), de la lactocina A en *P. acidilactici* PAC1.0 y de la pediocina PA-1 y leucocina A en *L. lactis* (Chikindas y col., 1995; van Belkum y col., 1995). No obstante, el reconocimiento de que la región N-terminal de la secuencia líder de las pre-probacteriocinas posee una gran homología, ha conducido a la hipótesis de que sus sistemas de procesado y secreción podrían ser homólogos e intercambiables (Allison y col., 1995a, b). Experiencias exitosas, en las que los genes estructurales de las bacteriocinas de interés se han expresado en hospedadores con un sistema transportador-ABC heterólogo, son los de la producción de la lactocina F en *C. piscicola* LV17 (Allison y col., 1995a) y de la mesentericina Y105 en *Lb. johnsonii* (Fremaux y col., 1995). Otro sistema eficaz de producción heteróloga de bacteriocinas es el desarrollado por Axelsson y col., (1998). Este sistema de expresión requiere la utilización de dos plásmidos complementarios,

uno de los cuales, contiene los genes necesarios para la inducción del promotor de la sakacina A, así como los que intervienen en su procesado y secreción, mientras el otro, contiene los genes estructurales y de inmunidad de la bacteriocina de interés bajo el control del promotor de la sakacina.

Al mismo tiempo, el conocimiento de que la síntesis de la nisina en *L. lactis* se encuentra regulada por un inductor (nisina), que activa la transcripción de los genes involucrados en su síntesis, procesado y excreción, ha permitido el desarrollo de sistemas de expresión controlados por la nisina (sistema NICE, del inglés "*Nisin Controlled Expression*"). Estos sistemas han demostrado su utilidad en la expresión de diversas proteínas y péptidos en diferentes bacterias lácticas (De Ruyter y col., 1996; Kleerebezem y col., 1997; Kuipers y col., 1998), de modo, que la construcción de nuevos vectores de expresión controlados por la nisina y que contengan los genes de la biosíntesis de péptidos bajo el control del promotor inducible de la nisina (P_{nisA} , Bryan y col., 2000), sin duda, pueden permitir la producción de diversas bacteriocinas en otros hospedadores.

No obstante, otra alternativa experimental que merece una atención especial es aquella basada en la posibilidad de utilizar el sistema *sec*-dependiente (GTS) en lugar del sistema dedicado de transporte (DTS), mediante la sustitución de la secuencia líder de la bacteriocina de interés por un péptido señal (PS), lo que podría conducir a un sistema generalizado de procesado, transporte y secreción de bacteriocinas. La caracterización bioquímica y genética de la divergicina A producida por *Carnobacterium divergens* (Worobo y col., 1995) permitió determinar que su procesado, transporte y secreción no parecía ligado a un sistema dedicado (DTS) sino a uno general de transporte de péptidos (*sec*-dependiente). La producción de la divergicina A de *Cb. divergens* en una cepa de *L. lactis* transformada con un vector, que contenía el gen estructural y de inmunidad de dicha bacteriocina, demostró la viabilidad de su mecanismo de procesado, transporte y secreción en un hospedador heterólogo (Worobo y col., 1995). Posteriormente, la transformación de *Cb. divergens* con un vector de expresión que contenía la fusión entre el péptido señal de la divergicina A y la carnobacteriocina B2 madura permitió la coproducción de ambas bacteriocinas en la misma cepa (McCormick y col., 1996). Asimismo, la sustitución de la secuencia líder de la colicina V por el péptido señal de la divergicina A, ha permitido la expresión de la colicina V, una bacteriocina eficaz frente a microorganismos Gram-negativos, en *Cb. piscicola*, *Cb. divergens* y *L. lactis*. Dicho modelo experimental puede permitir la expresión de otras bacteriocinas y péptidos antimicrobianos activos frente a microorganismos Gram-negativos en diversas bacterias lácticas (McCormick y col., 1999).

Por consideraciones y argumentos razonablemente teóricos y, fundamentalmente, prácticos la producción heteróloga de bacteriocinas en otros hospedadores debería comprender su clonación, producción y expresión funcional en *E. coli*, en otras bacterias lácticas y en levaduras.

II.5.1. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA EN *Escherichia coli*

Escherichia coli es uno de los hospedadores utilizados para la producción heteróloga de bacteriocinas (Marugg y col., 1992; Bukhtiyarova y col., 1994), lo cual es razonable si se considera que es uno de los microorganismos mejor caracterizado genéticamente y que muchos de sus procesos biológicos son bien conocidos, además de disponer de un número casi ilimitado de protocolos genéticos experimentales que facilitan su manipulación (Billman-Jacobe, 1996). Por ello, en los primeros trabajos acerca de la producción heteróloga de bacteriocinas en otros hospedadores, el operón de la pediocina PA-1 fue expresado en *E. coli*, lo que permitió su análisis funcional (Marugg y col., 1992). Posteriormente, Coderre y Somkuti (1999) produjeron la

pediocina PA-1 en *E. coli* mediante la clonación del operón completo de la bacteriocina bajo el control del promotor ST_{P2201}, un promotor de *Streptococcus thermophilus*. No obstante, el número de trabajos relacionados con la producción heteróloga de bacteriocinas en *E. coli* no es muy extenso (Tabla II.8).

Tabla II.8. Producción heteróloga de bacteriocinas por *Escherichia coli*

Bacteriocina	Clase ^a	Productor nativo	Hospedador heterólogo (<i>Escherichia coli</i>) ^b	Referencia
Brococina C	IIb	<i>Brochothrix campestris</i> ATCC 43754	DH5 α ; XL1-Blue	McCormick y col., 1998
"		<i>Brochothrix campestris</i> ATCC 43754	BL21 (DE3)	Garneau y col., 2003
Carnobacteriocina B2	IIa	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17B	JM107	Quadri y col., 1997
Divercina V41	IIa	<i>Carnobacterium divergens</i> V41	Origami (DE3)(pLysS)	Richard y col., 2004
Divergicina A	IIc	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13	MC4100 (pHK22); BL21 (DE3)	Van Belkum y col., 1997
Mesentericina Y105	IIa	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Y105	DH5 α	Biet y col., 1998
Mundticina KS	IIa	<i>Enterococcus mundtii</i> NFRI 7393	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	Kawamoto y col., 2002
Pediocina PA-1	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC1.0	V850	Marugg y col., 1992
"		<i>Pediococcus acidilactici</i> LB42-923	JM109	Bukhtiyarova y col., 1994
"		<i>Pediococcus acidilactici</i> LB42-923	E609L	Miller y col., 1998
"		<i>Pediococcus acidilactici</i> F	DH5 α	Coderre y Somkuti, 1999
Piscicolina 126	IIa	<i>Carnobacterium piscicola</i> JG126	AD494 (DE3)	Gibbs y col., 2004

^a Clase a la que pertenece la bacteriocina.

^b Cepa de *E. coli* productora de la bacteriocina.

II.5.1.1. Producción heteróloga basada en el empleo de sistemas de procesado, transporte y secreción propios de las bacteriocinas

Además de los resultados obtenidos por Marugg y col. (1992) y Bukhtiyarova y col. (1994), tras la clonación de los genes del operón de la pediocina PA-1 en *E. coli*, el primer trabajo relacionado con la producción heteróloga de bacteriocinas en *E. coli* que utiliza sistemas de procesado, transporte y secreción propios de éstas, es el descrito por van Belkum y col. (1997). Dichos investigadores emplearon genes del sistema transportador-ABC de la colicina V, una bacteriocina producida por *E. coli*, para la producción heteróloga de la divergicina A de *Cb. divergens* en *E. coli*. Para ello, se requirió la utilización de 3 plásmidos diferentes, pLED1, pLAD6, y pCOD1, y de una cepa de *E. coli* (MC4100) transformada con un plásmido que poseía los genes de la biosíntesis y transporte de la colicina V (pHK22). Los plásmidos pLED1, pLAD6 y pCOD1 se obtuvieron del vector pMG36e (van de Guchte y col., 1989) y contenían la secuencia nucleotídica que codifica el péptido maduro de la divergicina A fusionado a la secuencia líder de las bacteriocinas leucocina A, lactococina A y colicina V, respectivamente. Después de la transformación de *E. coli* MC4100 (pHK22) con cada uno de estos plásmidos, se observó que las células transformadas con pLED1 y pCOD1 producían un halo de inhibición frente a un microorganismo indicador de la actividad antagonista de la divergicina A. Cuando *E. coli* MC4100 se transformó con los mismos plásmidos, ninguna de las cepas recombinantes mostraron actividad antimicrobiana, lo que demostró la necesidad de utilizar el plásmido pHK22 para el transporte y secreción de la divergicina A.

Por otro lado, van Belkum y col. (1997) demostraron la importancia de la proteína TolC en el transporte y secreción de bacteriocinas en *E. coli*. TolC es una proteína de la membrana externa que permite el transporte de la colicina V desde el periplasma de *E. coli* hasta el medio extracelular. Para ello, pHK22, en combinación con pCOD1 o pLED1, se introdujo en *E. coli*

ZK796, un derivado de *E. coli* MC4100 que carecía del gen que codifica TolC. Tanto *E. coli* ZK796 (pHK22+pCOD1) como *E. coli* ZK796 (pHK22+pLED1) fueron incapaces de producir divergicina A, lo que sugiere que TolC es imprescindible para el procesado, transporte y secreción de la divergicina A en *E. coli*.

Los trabajos publicados con posterioridad a los de van Belkum y col. (1997) se han basado en el empleo del péptido señal de la divergicina A (Worobo y col., 1995) como señal de procesado y secreción de otras bacteriocinas en *E. coli*. Biet y col. (1998) observaron que células de *E. coli* DH5 α transformadas con el plásmido pFBYC02 secretaban la mesentericina Y105 de *Lc. mesenteroides* Y105. El plásmido recombinante pFBY02 se construyó mediante la clonación del gen híbrido péptido señal de la divergicina A/mesentericina Y105 madura en el vector de expresión pBSSKII y bajo el control del promotor inducible de la lactosa. No obstante, la inducción de la producción de mesentericina Y105 en *E. coli* originaba su lisis celular. Paralelamente, McCormick y col. (1998) intentaron expresar la brococina C de *Brochothrix thermosphacta* en *E. coli* utilizando los plásmidos pJKM61 y pJKM64. La construcción de ambos plásmidos se realizó mediante la clonación de los genes híbridos péptido señal de la divergicina A/péptido A maduro de la brococina C (*dvn::brcA*) y péptido señal de la divergicina A/péptido B maduro de la brococina C (*dvn::brcB*) bajo el control de los promotores de la lactosa (pJKM61) o de la polimerasa T7 (pJKM64). Desafortunadamente, la transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α y XL1-Blue con pJKM61 y pJKM64, respectivamente, originó la lisis celular de ambos hospedadores. Posteriormente, Garneau y col. (2003) transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) con pSG1 y pSG15, plásmidos que contenían los genes *dvn::brcA* y *dvn::brcB*, respectivamente, bajo el control del promotor T7. Sin embargo, la expresión de los genes híbridos pareció originar múltiples fragmentos peptídicos de muy baja actividad.

De los resultados descritos, puede deducirse que el empleo de sistemas de procesado, transporte y secreción propios de las bacteriocinas faculta la producción heteróloga de éstas en *E. coli*. Sin embargo, en algunos casos, su producción resulta mediatizada por las fusiones génicas empleadas y/o por la toxicidad o lisis celular derivada de su producción. Biet y col., (1998) han propuesto que la lisis celular derivada de la clonación y producción de bacteriocinas en *E. coli* puede estar originada por la presencia de bacteriocina activa en el espacio periplásmico, mientras Garneau y col. (2003) han determinado que la presencia de peptidasas activas puede originar péptidos derivados de la bacteriocina que sean inactivos o de muy baja actividad. No obstante, también es posible atribuir los inconvenientes descritos al tipo de bacteriocina y/o al vector de expresión utilizado, y no al propio hospedador.

II.5.1.2. Producción heteróloga basada en el empleo de sistemas de procesado, transporte y secreción de proteínas de *E. coli*

La pediocina PA-1 se ha expresado en *E. coli* en ausencia de los genes del sistema transportador-ABC y mediante la fusión de sus genes estructural y de inmunidad a la proteína de unión a la maltosa (MBP, del inglés "*Maltose Binding Protein*"), una proteína sintetizada con un péptido señal que es reconocido por la ruta general de secreción (GSP) o sistema *sec* de *E. coli*. De esta manera, la pediocina PA-1 se liberó al exterior celular en mutantes de *E. coli* con una mayor permeabilidad periplásmica (Miller y col., 1998), lo que permitió, además, iniciar estudios acerca de la estructura y función de dicha bacteriocina. Trabajos posteriores de Quadri y col. (1997), también han demostrado que la carnobacteriocina B2 es exportada al periplasma de *E. coli* tras su fusión al péptido señal de la proteína MBP.

II.5.1.3. Otros sistemas de producción heteróloga de bacteriocinas en *E. coli*

En contraste con el empleo de sistemas que permiten el procesado, transporte y secreción de bacteriocinas al exterior celular, la producción intracelular de bacteriocinas y su posterior purificación del citoplasma de *E. coli* puede ofrecer algunas ventajas. En este contexto, Kawamoto y col. (2002) han descrito la purificación de la mundticina KS de *E. mundtii* del citoplasma de *E. coli*. Ello requirió la construcción de pEM3B, un plásmido derivado del vector pET-3a que contenía el gen estructural de la mundticina KS madura (MunKS) fusionada a una cola de histidinas (His) y a una región diana de la proteasa rTEV. La transformación de *E. coli* con pEM3B se tradujo en la producción citoplásmica de la proteína recombinante His-rTEV-MunKS. Posteriormente, la purificación de la quimera His-rTEV-MunKS, por cromatografía de afinidad, y su hidrólisis con la proteasa rTEV, permitió la recuperación de la mundticina KS biológicamente activa en cantidades elevadas.

Recientemente, Gibbs y col. (2004) han descrito un nuevo sistema de producción de bacteriocinas que mejora, significativamente, los rendimientos de recuperación tras su purificación. El sistema utiliza como modelo la sobreexpresión de la piscicolina 126 (Pis126) de *Cb. piscicola* en el citoplasma de *E. coli* AD494 (DE3). Para ello, el gen que codifica la bacteriocina madura se clonó en el vector pET32a, bajo el control del promotor T7 y fusionado a los genes que codifican la proteína tioredoxina (Trx) y una cola de histidinas (His). El éxito de esta estrategia de clonación, que permite la purificación de hasta 26 mg de bacteriocina tras la producción de la proteína recombinante Trx/His/Pis126 en 1 litro de cultivo de *E. coli*, se basa en: (i) la selección de un hospedador heterólogo que facilita la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma celular; (ii) la utilización de la Trx como proteína de fusión para mejorar la solubilidad de la proteína recombinante y la formación de enlaces disulfuro; (iii) la fusión de la piscicolina 126 a la cola His para facilitar su purificación mediante el empleo de columnas de afinidad; y (iv) la incorporación de un residuo metionina al inicio de la secuencia aminoacídica de la bacteriocina madura para facilitar la separación de la bacteriocina del resto de la proteína recombinante, una vez purificada, mediante el empleo de bromuro de cianógeno, un reactivo que hidroliza proteínas a través de sus residuos metionina.

Simultáneamente, Richard y col. (2004) han descrito un protocolo similar al de Gibbs y col. (2004) que permite la expresión heteróloga de la divercina V41 de *Cb. divergens* V41 en el citoplasma de *E. coli*, aunque con ligeras modificaciones respecto al vector de expresión empleado y al hospedador (pET-32b y *E. coli* Origami [DE3] [pLysS], respectivamente). Al igual que en el trabajo descrito previamente, los rendimientos de purificación de la divercina V41 fueron muy elevados (alrededor de 20 mg de bacteriocina activa recuperada por litro de cultivo de *E. coli*).

II.5.2. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA EN BACTERIAS LÁCTICAS

Obviamente, las bacterias lácticas constituyen una buena elección para la producción heteróloga de bacteriocinas, ya que son consideradas como seguras (GRAS), y, por ello, hospedadores apropiados como biorreactores para la producción heteróloga de proteínas o péptidos de interés en el sector alimentario (Billman-Jacobe, 1996; Rodríguez y col., 2002).

Además, algunas bacterias lácticas, como *L. lactis*, son muy apropiadas para su uso como hospedadores heterólogos, dado la disponibilidad de herramientas para su manipulación genética y como resultado de recientes avances relacionados con la estabilización de genes heterólogos en estas bacterias y con la regulación y control de su expresión (Venema y col.,

1999). Igualmente, las cepas de *L. lactis* que se utilizan en la mayoría de los laboratorios de investigación poseen características que las convierten en uno de los hospedadores heterólogos más adecuados para la expresión y secreción de proteínas recombinantes (Nouaille y col., 2003). Estas características incluyen: (i) la secuenciación completa de su genoma; (ii) el reducido número de proteínas que secretan; y (iii) su limitada actividad proteolítica.

Asimismo, las estrategias de producción de bacteriocinas, empleando como hospedadores bacterias lácticas, se han basado en la expresión de sus genes nativos o en el intercambio de líderes y/o sistemas de secreción de unas bacteriocinas con otras.

II.5.2.1. Producción heteróloga basada en la expresión de genes nativos

La utilización y transferencia de los genes implicados en la síntesis, procesado, transporte y secreción de una bacteriocina es el procedimiento más sencillo para su producción en un hospedador heterólogo. De hecho, ésta ha sido la estrategia seguida para la clonación, producción y secreción de numerosas bacteriocinas de distintas clases y subclases en otras BAL (Tabla II.9).

Tabla II.9. Producción heteróloga de bacteriocinas por bacterias lácticas (BAL) tras la clonación de sus genes de procesado, síntesis, transporte y secreción

Bacteriocina ^a	Productor nativo	Hospedador heterólogo	Referencia
Clase I			
Lacticina 3147 (A)	<i>Lactococcus lactis</i> DPC3147	<i>Enterococcus faecalis</i> FA2-2	Ryan y col., 1999
Lactocina S (A)	<i>Lactobacillus sakei</i> L45	<i>Lactobacillus plantarum</i> NC8	Skaugen y col., 1999
Nisina A (A)	<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	<i>Enterococcus</i> sp. S12β	Li y O'Sullivan, 2002
Clase II			
Acidocina A (a)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> TK9201	<i>Lactobacillus casei</i> TK9008	Kanatani y col., 1995
Acidocina B (c)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> M46	<i>Lactobacillus plantarum</i> 80	Van der Vossen y col., 1994
"	<i>Lactobacillus acidophilus</i> M46	<i>Lactobacillus plantarum</i> 80	Leer y col., 1995
Bacteriocina ABP-118 (b)	<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIMB 8826	Flynn y col., 2002
"	<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	Flynn y col., 2002
Divergicina A (c)	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13	<i>Carnobacterium piscicola</i> UAL 26; LV17A, B y C	Worobo y col., 1995
"	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13	<i>Lactococcus lactis</i> MG1363; IL1403	Worobo y col., 1995
Enterocina A (a)	<i>Enterococcus faecium</i> DPC1146	<i>Enterococcus faecalis</i> OG1X	O'Keefe y col., 1999
"	<i>Enterococcus faecium</i> DPC1146	<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	O'Keefe y col., 1999
Enterocina Q (c)	<i>Enterococcus faecium</i> L50	<i>Lactobacillus sakei</i> LB790	Criado y col. (NP)
Lactococina A (c)	<i>Lactococcus lactis</i> WM4	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC1.0	Chikindas y col., 1995
Mundticina KS (a)	<i>Enterococcus mundtii</i> NFRI 7393	<i>Enterococcus faecium</i> IFO13712	Kawamoto y col., 2002
"	<i>Enterococcus mundtii</i> NFRI 7393	<i>Lactobacillus curvatus</i> JCM1096	Kawamoto y col., 2002
"	<i>Enterococcus mundtii</i> NFRI 7393	<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	Kawamoto y col., 2002
Pediocina PA-1 (a)	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC 1.0	<i>Pediococcus pentosaceus</i> PPE1.2	Chikindas y col., 1995
"	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC 1.0	<i>Lactococcus lactis</i> IL1403; LL108	Chikindas y col., 1995
"	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC 1.0	<i>Pediococcus pentosaceus</i> PPE1.2	Venema y col., 1995
"	<i>Pediococcus acidilactici</i> F	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST128	Coderre y Somkuti, 1999
"	<i>Pediococcus acidilactici</i> F	<i>Lactococcus lactis</i> ML3; SLAD1.1	Coderre y Somkuti, 1999
"	<i>Pediococcus acidilactici</i> F	<i>Enterococcus faecalis</i> DL3	Coderre y Somkuti, 1999
Clase III			
Helveticina J	<i>Lactobacillus helveticus</i> NCDO481	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCK64	Joerger y Klaenhammer, 1986
Clase V			
Circularina A	<i>Clostridium beijerinckii</i> ATCC25752	<i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2	Kemperman y col., 2003a

^a Entre paréntesis se indica la clase o subclase a la que pertenece la bacteriocina.

11.5.2.1.1. Bacteriocinas de la clase I

Las bacteriocinas de la clase I producidas por BAL heterólogas, se muestran en la Tabla II.9. En primer lugar, Broadbent y col., (1995) intentaron producir la nisina A en bacterias lácticas diferentes a las productoras naturales de esta bacteriocina, y para ello, transfirieron el transposón Tn5307 de *L. lactis* ATCC 11454 al enterococo de origen lácteo *Enterococcus* sp. S12 β . El elemento genético Tn5307 es un transposón conjugativo que posee los determinantes requeridos para la síntesis de la nisina A y que se transfiere de unas BAL a otras sin la necesidad de utilizar técnicas sofisticadas de transferencia genética. Dichos investigadores obtuvieron la cepa transconjugante *Enterococcus* sp. N12 β que manifestaba inmunidad frente a la nisina A pero que no la producía en el medio extracelular. Recientemente, Li y O'Sullivan (2002) han observado que la incorporación de nisina A en el medio de cultivo de las células transconjugantes de *Enterococcus* sp. N12 β es necesaria para la secreción de dicha bacteriocina al medio extracelular.

Posteriormente, Ryan y col. (1999) intentaron la producción heteróloga de la lacticina 3147 de *L. lactis* 3147 mediante la transformación directa de *E. faecalis* FA2-2 con pMRC01, un plásmido conjugativo que codifica los dos operones necesarios para la biosíntesis de la lacticina 3147. Tras varios intentos fallidos de obtener una cepa recombinante de *E. faecalis* FA2-2 mediante conjugación, dichos investigadores consiguieron introducir en la cepa FA2-2 un vector de expresión (pOM02) que contenía los dos operones de la lacticina 3147. Aunque la nueva construcción permitió la producción heteróloga del antibiótico, la actividad antimicrobiana de *E. faecalis* FA2-2 (pOM02) fue menor que la del lactococo productor de la lacticina 3147. Finalmente, Skaugen y col. (1999) han descrito la producción de la lactocina S de *Lb. sakei* en *Lb. plantarum*, mediante la clonación de un fragmento de 16 Kb, que contiene el operon completo de los genes que codifican la lactocina S, en el vector de expresión pELS100.

11.5.2.1.2. Bacteriocinas de la clase II.

La clonación, producción, transporte y secreción de la pediocina PA-1, una bacteriocina producida por numerosas cepas de *P. acidilactici* de diversos orígenes y sustratos, en otras BAL de origen alimentario han constituido el objetivo de muchos investigadores que trabajan con bacteriocinas. Probablemente, uno de los motivos para ello es la potente actividad antimicrobiana que muestra esta bacteriocina frente a *L. monocytogenes* y otros patógenos de los alimentos. No obstante, los trabajos relacionados con la producción heteróloga de bacteriocinas de la clase II en otras bacterias lácticas no sólo incluyen a la pediocina PA-1 (Tabla II.9).

La transferencia de pCV461, un plásmido de 14 kb que codifica la biosíntesis de la acidocina B de *Lb. acidophilus* M46, permitió la producción heteróloga de esta bacteriocina en *Lb. plantarum* (van der Vossen y col., 1994). Posteriormente, Leer y col. (1995) obtuvieron 2 plásmidos derivados de pCV461 (pGKV21 y pLPE24M), con los que se consiguió, nuevamente, la producción de acidocina B en *Lb. plantarum* y *Lb. fermentum*. Casi al mismo tiempo, Venema y col. (1995) clonaron el operón completo de la pediocina PA-1 (operón *ped*), incluyendo su propio promotor, en *P. pentosaceus* PPE1.2. La producción heteróloga de la pediocina PA-1 en este hospedador, una cepa originalmente sensible a dicha bacteriocina, permitió el análisis funcional del operón *ped*. También Chikindas y col. (1995) consiguieron producir la pediocina PA-1 en *P. pentosaceus* PPE1.2., aunque, en este caso, mediante la utilización de un plásmido (pMC117) que contenía el promotor lactocócico P₃₂ (van der Vossen y col., 1987) en lugar del promotor de la pediocina PA-1. La producción de pediocina PA-1 en las cepas recombinantes fue

de hasta cuatro veces superior a la obtenida con la cepa silvestre de *P. acidilactici* PAC1.0. En el mismo trabajo, también se procedió a la transformación de 2 cepas de *L. lactis* (IL1403 y LL108) con el plásmido recombinante pMC117. Aunque la producción de pediocina PA-1 en *L. lactis* IL1403 representó menos del 1% de la producida por *P. acidilactici* PAC1.0, el nivel de producción de dicha bacteriocina aumentó hasta el 50% cuando se empleó la cepa de *L. lactis* LL108 como hospedador. Esta cepa posee varias copias del gen *repA* y, por tanto, permite incrementar el número de copias del plásmido recombinante pMC117. Cabe también destacar que cuando el promotor P₃₂ fue sustituido por el promotor del operón *ped*, las cepas recombinantes de *L. lactis* no produjeron pediocina PA-1 activa en sus sobrenadantes. Los investigadores previamente citados construyeron otro plásmido, el pKV4, que contenía los 4 genes requeridos para la biosíntesis de la lactococina A. Consecuentemente, la transformación de *P. acidilactici* PAC1.0 con pKV4 resultó en la co-producción de la pediocina PA-1 y lactococina A por el mismo hospedador.

Simultáneamente, Worobo y col. (1995) construyeron dos plásmidos recombinantes (pCD4.4 y pRW5.6) que únicamente portaban los genes estructural (*divnA*) y de inmunidad (*dviA*) de la divergicina A. La transformación de cepas de *Cb. piscicola* y *L. lactis* con cualquiera de los plásmidos permitió la producción de divergicina A en el sobrenadante de las cepas recombinantes. Por otro lado, la clonación de todos los elementos genéticos que intervienen en la biosíntesis de la acidocina A de *Lb. acidophilus* TK9201, microorganismo utilizado como cultivo iniciador en la producción de leche fermentada ácida, permitió su producción en *Lb. casei* TK9008, una cepa originalmente sensible a la acidocina A (Kanatani y col., 1995).

Más tarde, O'Keefe y col. (1999) transformaron cepas competentes de *E. faecalis* y *L. lactis* con los plásmidos recombinantes pENT02 y pENT03. El plásmido pENT02 fue construido mediante la clonación de los genes estructural (*entA*), de inmunidad (*entIA*) y de transporte (*entTD*) de la enterocina A (EntA) en pMG36e, mientras que pENT03 fue obtenido tras la incorporación de los genes requeridos para la biosíntesis de la enterocina A en un vector de expresión con replicación en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (pCI372). La introducción de pENT03 en *E. faecalis* permitió la producción de la EntA en medio sólido y líquido aunque, en este último, fue necesaria la adición del factor de inducción al medio de cultivo. La transformación de *L. lactis* con pENT03 no se tradujo en una actividad bacteriocinogénica detectable, incluso en medios que contenían el factor de inducción. No obstante, la transformación de ambas cepas con el plásmido pENT02 permitió la producción y expresión funcional de la EntA en ambos hospedadores.

Coderre y Somkuti (1999) utilizaron un vector de expresión, con el operón *ped* bajo el control del promotor ST_{P2201} (ver sección II.5.1), para la producción heteróloga de la pediocina PA-1 en *L. lactis*, *E. faecalis* y *S. thermophilus*. La actividad antimicrobiana de la pediocina PA-1 se detectó en el sobrenadante de las cepas hospedadoras, aunque su producción fue variable en cada hospedador. Posteriormente, Kawamoto y col. (2002) construyeron un plásmido recombinante (pRK1) que portaba los genes responsables de la biosíntesis de la mundticina KS de *E. mundtii* NFRI 7393 (genes estructural, de transporte y de inmunidad). La transformación de células competentes de *E. faecium*, *Lb. curvatus* y *L. lactis* con pRK1 se tradujo en una producción de mundticina KS biológicamente activa que fue comparable a la de la cepa silvestre de *E. mundtii* NFRI 7393. De igual modo, Flynn y col. (2002) demostraron que la clonación del operón de la bacteriocina ABP-118 de *Lb. salivarius* UCC118 en el vector de expresión pNZ8048 (Kuipers y col., 1998), era suficiente para la producción y expresión funcional de dicha bacteriocina en los sobrenadantes de *Lb. plantarum* y *L. lactis*. No obstante, la producción de la

bacteriocina ABP-118 en dichos sobrenadantes fue inferior a la detectada en la cepa silvestre de *Lb. salivarius* UCC118.

II.5.2.1.3. Bacteriocinas de la clase III

Hasta ahora, la helveticina J de *Lb. helveticus* 481 es la única bacteriocina de la clase III producida en hospedadores heterólogos (Joerger y Klaenhammer, 1986). Para ello, dichos investigadores transformaron células competentes de *Lb. johnsonii* NCK249 con el plásmido recombinante pTRK135, el cual contenía el gen estructural de la helveticina J.

II.5.2.1.4. Bacteriocinas de otras clases

La circularina A de *C. beijerinckii* ATCC 25752 es una bacteriocina que pertenece a la clase V o grupo de las bacteriocinas "cíclicas" (Kemperman y col., 2003a). El análisis funcional de los genes que intervienen en su producción fue evaluado mediante la clonación de su operón en el vector pMG36e. La transformación de *E. faecalis* con el nuevo plásmido recombinante permitió la producción de circularina A biológicamente activa en dicho hospedador heterólogo.

II.5.2.2. Producción heteróloga basada en el intercambio de sistemas de procesado, transporte y secreción

Como se ha descrito previamente en otras secciones de esta memoria, el que la mayor parte de las bacteriocinas se sinteticen con extensiones N-terminales homólogas, ha conducido a la hipótesis de que sus sistemas de procesado y secreción podrían ser intercambiables. Por ello, de gran interés ha sido la producción de bacteriocinas en diferentes hospedadores mediante la utilización y/o el intercambio de secuencias líder y/o de genes del sistema transportador-ABC o sistema de transporte dedicado (DTS) de algunas bacteriocinas, así como la utilización y/o el intercambio de secuencias líder de unas bacteriocinas por péptidos señal de otras que sean reconocidos por la ruta general de secreción (GSP) ó sistema *sec* de procesado, transporte y secreción (Tablas II.10 y II.11).

II.5.2.2.1. Intercambio de secuencias líder y/o de genes del sistema transportador-ABC ó sistema de transporte dedicado (DTS)

La extensión N-terminal que codifica las secuencias líder de la lactacina F de *Lb. johnsonii* VPI 11088 y de las carnobacteriocinas A, BM1 y BM2 de *Cb. piscicola* LV17 muestran la mayor homología de entre todas las bacteriocinas de la clase II. Por ello, inicialmente, Allison y col. (1995b) determinaron si el sistema de procesado, transporte y secreción de la lactacina F era homólogo al de las carnobacteriocinas A, BM1 y BM2. Para ello, se procedió a la transformación de la cepa productora de las 3 carnobacteriocinas (*Cb. piscicola* LV17) con un plásmido que contenía los genes estructural (*lafA*) y de inmunidad (*orfz*) de la lactacina F. La producción simultánea de lactacina F y de las 3 carnobacteriocinas en la cepa recombinante demostró que la secuencia líder de la lactacina F era reconocida y procesada por el sistema de procesado y secreción de las carnobacteriocinas. No obstante, la cantidad de lactacina F producida fue inferior a la de la cepa nativa, por lo que se sugirió que, probablemente, los precursores de la lactacina F competían ineficazmente con los de las carnobacteriocinas por su procesado, transporte y secreción, o que, también, existían diferencias significativas en el entorno intracelular de microorganismos que pertenecen a dos géneros diferentes.

Tabla II.10. Bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (BAL) empleando la secuencia líder y/o transportadores-ABC de otras bacteriocinas

Bacteriocina	Clase ^a	Productor nativo	Hospedador heterólogo	Referencia
Carnobacteriocina B2	Ila	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV61	<i>Lactobacillus sakei</i> Lb709 (pSAK20)	Axelsson y col., 1998
Colicina V	-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactococcus lactis</i> IL1403 (pMB500)	Van Belkum y col., 1997
"	-	<i>Escherichia coli</i> ATCC14763	<i>Lactococcus lactis</i> FI5876; FI7847	Horn y col., 2004
Divergicina A	IIc	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13	<i>Lactococcus lactis</i> IL1403 (pMB500)	Van Belkum y col., 1997
"	IIc	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13	<i>Leuconostoc gelidum</i> UAL 187-22	Van Belkum y col., 1997
Enterocina A	Ila	<i>Enterococcus faecium</i> T136	<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	Martínez y col., 2000
Enterocina B	IIc	<i>Enterococcus faecium</i> BFE 900	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17A	Franz y col., 1999b
Lactacina F	IIb	<i>Lactobacillus johnsonii</i> VPI 11088	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17	Allison y col., 1995a
"	IIb	<i>Lactobacillus johnsonii</i> VPI 11088	<i>Leuconostoc gelidum</i> UAL 187-22	Allison y col., 1995b
Lactococina A	IIc	<i>Lactococcus lactis</i> WM4	<i>Leuconostoc gelidum</i> UAL 187-22	Van Belkum y Stiles, 1995
Mesentericina Y105	Ila	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Y105	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCK64	Fremaux y col., 1995
"	Ila	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Y105	<i>Leuconostoc cremoris</i> LC	Biet y col., 1998
Pediococina PA-1	Ila	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC1.0	<i>Lactobacillus sakei</i> Lb709 (pSAK20)	Axelsson y col., 1998
"	Ila	<i>Pediococcus acidilactici</i> 347	<i>Lactococcus lactis</i> IL1403; MG1614; FI5876	Horn y col., 1998; 1999
"	Ila	<i>Pediococcus acidilactici</i> 347	<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	Martínez y col., 2000
"	Ila	<i>Pediococcus acidilactici</i> 1521	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DSM20484	Morisset y Frère, 2002
"	Ila	<i>Pediococcus acidilactici</i> 347	<i>Lactococcus lactis</i> FI5876; FI7847	Horn y col., 2004
Piscicolina 61	IIc	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV61	<i>Lactobacillus sakei</i> Lb709 (pSAK20)	Axelsson y col., 1998
"	IIc	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV61	<i>Lactobacillus sakei</i> Lb709 (pSAK20)	Axelsson y col., 1998

^a Clase a la que pertenece la bacteriocina.

De forma similar, Fremaux y col. (1995) intentaron demostrar que los sistemas de procesado y secreción de la mesentericina Y105 de *Lc. mesenteroides* y de la lactacina F de *Lb. johnsonii* eran intercambiables. Por ello, dichos investigadores construyeron un plásmido que portaba el gen estructural (*mesY*) de la mesentericina Y105. La introducción de este plásmido en *Lb. johnsonii* NCK64, una cepa no bacteriocinogénica que contiene los genes de procesado, transporte y secreción de la lactacina F, permitió la producción de mesentericina Y105 en el medio extracelular. Nuevamente, la producción de mesentericina Y105 en el hospedador utilizado fue pequeña, lo que posiblemente se deba, como en el caso anterior, a una menor afinidad del sistema de procesado, transporte y secreción de la lactacina F por la mesentericina Y105. Por otro lado, van Belkum y Stiles (1995) compararon los sistemas de procesado y secreción de la leucocina A de *Lc. gelidum* UAL187 y de la lactococina A de *L. lactis* WM4. La clonación del gen estructural (*IcaA*) y de inmunidad (*IcaB*) de la leucocina A en una cepa de *L. lactis* que contenía los genes necesarios para el procesado y secreción de la lactococina A no se tradujo en la producción de la leucocina A. Por el contrario, el sistema de procesado y secreción de la leucocina A de *Lc. gelidum* UAL187 permitió la producción de lactococina A, tras la transformación de esta cepa con un plásmido que poseía los genes estructural (*IcnA*) y de inmunidad (*IciA*) de la lactococina A. De forma simultánea, Allison y col. (1995a) clonaron el operon de la lactacina F (*IafA*, *IafX* y *orfz*) en la cepa de *Lc. gelidum* UAL187, lo que permitió la co-producción de la leucocina A y lactacina F.

Más tarde, Franz y col. (1999b) investigaron la posibilidad de que la secuencia líder de la enterocina B de *E. faecium* BFE 900 pudiera ser reconocida por el sistema de procesado, transporte y secreción de la carnobacteriocina A de *Cb. piscicola* LV17A, una bacteriocina que comparte homología con la secuencia líder de la enterocina B. Efectivamente, la transformación de una cepa productora de carnobacteriocina A (*Cb. piscicola* LV17A) con un plásmido que contenía los genes estructural (*entB*) y de inmunidad (*eniB*) de la enterocina B permitió la co-producción de ambas bacteriocinas.

Casi simultáneamente, Horn y col. (1998) desarrollaron un sistema de expresión, constituido por el vector de expresión pFI2126 y por el hospedador heterólogo *L. lactis* IL1403, que permitió la producción de la pediocina PA-1 de *P. acidilactici* 347 (Moreira, 1994) en dicho hospedador. El plásmido pFI2126 contiene el promotor de la lactococina A de *L. lactis* WM4 y un gen híbrido en el que la secuencia líder de la lactococina A está fusionada a la secuencia nucleotídica de la pediocina PA-1 madura, mientras que *L. lactis* IL1403 es una cepa que posee en su cromosoma genes análogos (*lcnC* y *lcnD*) a los que codifican las proteínas de procesado, transporte y secreción de la lactococina A. La transformación de *L. lactis* IL1403 con pFI2126 dio lugar a una cepa recombinante de *L. lactis* FI9043 que secretó pediocina PA-1 activa, aunque en una cantidad inferior a la del productor natural *P. acidilactici* 347. Posteriormente, Horn y col. (1999) incrementaron la producción de pediocina PA-1 en *L. lactis* IL1403. Para ello, fue necesaria la construcción de pFI2160, un plásmido que incorporaba los genes de procesado y secreción de la lactococina A (genes *lcnCD*) junto al gen híbrido “líder de lactococina A/ pediocina PA-1 madura”. La transformación de *L. lactis* IL1403 con pFI2160, mejoró los niveles de producción de pediocina PA-1, los cuales fueron muy próximos a los observados en *P. acidilactici* 347. En este mismo trabajo, la transformación de *L. lactis* FI5876, una cepa productora de nisina A, con el plásmido pFI2160 permitió la co-producción de nisina A y pediocina PA-1 en la cepa recombinante de *L. lactis* FI9267. Aunque *L. lactis* FI9267 mantuvo la misma producción de nisina A que la cepa original, la producción de pediocina PA-1 fue inferior a la esperada.

En base a los resultados de trabajos anteriores, Horn y col. (2004) han desarrollado un sistema de expresión que permite la producción de pediocina PA-1 y colicina V, bajo el control del promotor inducible de la nisina A (*PnisA*), en 2 cepas de *L. lactis* (FI7847 y FI5876). Estas dos cepas contienen los genes necesarios para el control de la transcripción regulada por *PnisA* (genes *nisK* y *nisR*). Los plásmidos pFI2391 y pFI2436 portaban los genes híbridos “secuencia líder de la lactococina A/ pediocina PA-1 madura” (pFI2391) y “secuencia líder de la lactococina A/ colicina V madura” (pFI2436), respectivamente, mientras que el plásmido pFI2148 portaba los genes *lcnCD*. La transformación de *L. lactis* FI7847 con pFI2391/pFI2148 y pFI2436/pFI2148 permitió la producción de pediocina PA-1 y colicina V, respectivamente. Por otro lado, la introducción de las mismas parejas de plásmidos en la cepa de *L. lactis* FI5876, productora de nisina A, permitió la co-producción de nisina A con pediocina PA-1 o con colicina V. La producción de pediocina PA-1 en las cepas transformadas de *L. lactis* representó un 20-30% de la producida por la cepa de *P. acidilactici* 347, mientras que la producción de colicina V fue de un 25-35% con respecto a su producción por *E. coli* ATCC 14763. La producción de nisina A en las cepas hospedadoras se mantuvo en unos niveles casi idénticos a los de la cepa original.

Por otra parte, Martínez y col. (2000) consiguieron la producción de pediocina PA-1 y enterocina A en *L. lactis* IL1403. Para ello, se procedió a la clonación de los genes estructural (*pedA*) y de inmunidad (*pedB*) de la pediocina PA-1 en pHB04, un plásmido derivado de pMG36c que contenía los genes estructural (*entA*) y de inmunidad (*entIA*) de la enterocina A bajo el control del promotor P₃₂. Además, estos autores construyeron otro plásmido recombinante (pJM03) mediante la clonación de los genes *pedA* y *pedB* en pMG36c y bajo el control del mismo promotor. La transformación de *L. lactis* IL1403 con los plásmidos pHB04 (*entA::entIA*), pJM03 (*pedA::pedB*) y pJM04 (*entA::entIA::pedA::pedB*) permitió la producción independiente de enterocina A y pediocina PA-1 y la co-producción de ambas bacteriocinas en la misma cepa. La producción de enterocina A y pediocina PA-1 en los sobrenadantes de *L. lactis* IL1403 (pHB04) y *L. lactis* IL1403 (pJM03) representó un 4-8% de la producida por las cepas de *E. faecium* T136 y *P. acidilactici* 347, respectivamente. La co-producción de enterocina A y pediocina PA-1 en *L. lactis* (pJM04) tampoco mejoró los niveles de producción de las dos bacteriocinas, con respecto a los de las cepas productoras silvestres. Probablemente, la baja producción de enterocina A y

pediocina PA-1 por las cepas recombinantes de *L. lactis* se deba a la existencia de una sola copia de los genes *lcnC* y *D* localizados en el cromosoma bacteriano y/o a que los productos de ambos genes no reconozcan eficazmente los lugares de procesado y secreción de la extensión N-terminal que contiene las secuencias líder de la enterocina A y de la pediocina PA-1.

Morriset y Frére (2002) también han conseguido producir heterológamente a la pediocina PA-1. En este caso, dichos investigadores construyeron un vector que contenía el gen híbrido “secuencia líder de la mesentericina Y105/pedocina PA-1 madura” y los genes del procesado y secreción de la mesentericina Y105 (*mesCDE*). La transformación de *Lc. mesenteroides* con el plásmido recombinante se tradujo en niveles de producción de pediocina PA-1 similares a los del pediococo original..

Por último, conviene citar el modelo de expresión que desarrollaron Axelsson y col. (1998) para la producción heteróloga de bacteriocinas en *Lb. sakei* Lb790. El modelo se basa en el empleo de los genes de síntesis, regulación transcripcional, procesado y secreción de la sakacina A de *Lb. sakei* Lb706 (genes *orf4sapKRTE*). Para ello, dichos investigadores transformaron la cepa de *Lb. sakei* Lb790 con 2 plásmidos recombinantes. El primero de ellos (pSAK20) contenía los genes de la activación transcripcional del promotor de la sakacina A (SakA), así como los de procesado y secreción del precursor de la SakA, mientras que el segundo portaba los genes estructural y de inmunidad de la sakacina P de *Lb. sakei* Lb674, la pediocina PA-1 de *P. acidilactici* PAC1.0 o la piscicolina 61 de *Cb. piscicola* LV61 bajo el control de sus propios promotores (plásmidos pSPP1, pPED1 ó pPSC1, respectivamente) o del promotor de la sakacina A (plásmidos pSPP2, pPED2 ó pPSC2, respectivamente). Además, estos autores construyeron otro plásmido recombinante (pSPP3) que portaba la fusión “secuencia líder de la sakacina A/sakacina P madura” y el gen de inmunidad de la sakacina P por detrás del promotor de la sakacina A. La introducción de pSPP2, pSPP3, pPED2, pPSC1 y pPSC2 en *Lb. sakei* Lb790 (pSAK20) permitió la producción de sakacina P, pediocina PA-1 y piscicolina 61 en cantidades similares ó incluso superiores a la producida por las cepas originales.

11.5.2.2.2. Intercambio de secuencias líder por péptidos señal reconocidos por la ruta general de secreción (GSP) ó sistema *sec*

Como ya se ha descrito en otras secciones de esta memoria, al contrario de lo que ocurre en la mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL, las cuales son procesadas, transportadas y secretadas mediante transportadores-ABC ó sistema de transporte dedicado (DTS), solamente unas pocas bacteriocinas, como la acidocina B (Leer y col., 1995), la divergicina A (Worobo y col., 1995), la bacteriocina 31 (Tomita y col., 1996), la enterocina P (Cintas y col., 1997), la lactococina 972 (Martínez y col., 1999) y la enterolisina A (Nilsen y col., 2003), se sintetizan con extensiones N-terminales que codifican un péptido señal reconocido por la ruta general de secreción (GSP) ó sistema *sec*. Así pues, dado que las bacteriocinas sintetizadas con un péptido señal no requieren genes específicos para su procesado, transporte y secreción, resulta de gran interés determinar si su péptido señal es reconocido eficazmente por otras bacterias hospedadoras, tanto Gram-negativas como Gram-positivas, así como si el intercambio de la secuencia líder de una bacteriocina por la del péptido señal de otra permite el procesado, transporte y secreción de la bacteriocina madura por componentes de la ruta general de secreción (GSP) o sistema *sec* de aquellos hospedadores de mayor interés.

La producción heteróloga de la divergicina A de *Cb. divergens* LV13 se demostró en cepas de *Cb. piscicola* y *L. lactis* transformadas con vectores de expresión que contenían los genes

estructural (*dvnA*) y de inmunidad (*dviA*) de la divergicina A, lo que sugirió que los componentes de la ruta general de secreción de ambos hospedadores reconocían la señal de procesado, transporte y secreción de la divergicina A (Worobo y col., 1995). Posteriormente, McCormick y col. (1996) construyeron un vector de expresión con el péptido señal de la divergicina A fusionado a la secuencia nucleotídica de la carnobacteriocina B2 madura de *Cb. piscicola* LV17 y bajo el control del promotor P₃₂. La transformación de *Cb. divergens* LV13 con el plásmido recombinante resultó en la co-producción de divergicina A y carnobacteriocina B2. Asimismo, la introducción de este plásmido en *L. lactis* IL1403 también permitió la producción de carnobacteriocina B2. Más tarde, McCormick y col. (1999) utilizaron la misma estrategia para la producción de la colicina V de *E. coli* en *Cb. piscicola*, *Cb. divergens* y *L. lactis*. En este caso, el gen que codifica la carnobacteriocina B2 madura fue sustituido por el que codifica la colicina V madura. De forma similar, Bohaychuk y col. (1999) produjeron la brococina C de *B. campestris* ATCC 43754 en *Cb. piscicola* y *Cb. divergens* utilizando un vector de expresión con el péptido señal de la divergicina A fusionado a los 2 péptidos de la brococina C. Por otro lado, la clonación del gen híbrido “péptido señal de la divergicina A/ enterocina B madura” en el vector de expresión pMG36e y su transferencia por transformación a *E. faecalis* ATCC 19435 (Franz y col., 1999b) permitió la producción de la enterocina B por este hospedador heterólogo.

Tabla II.11. Bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (BAL) mediante la fusión de un péptido señal a la secuencia nucleotídica de la bacteriocina madura

Bacteriocina	Clase ^a	Hospedador nativo	Hospedador heterólogo	Referencia
Brococina C	IIb	<i>Brochotrix campestris</i> ATCC 43754	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17C; UAL 26	Bohaychuk y col., 1999
"		<i>Brochotrix campestris</i> ATCC 43754	<i>Carnobacterium divergens</i> UAL278	Bohaychuk y col., 1999
Carnobacteriocina B2	IIa	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13; UAL 128	McCormick y col., 1996
"		<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17	<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	McCormick y col., 1996
Colicina V		<i>Escherichia coli</i>	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13	McCormick y col., 1999
"		<i>Escherichia coli</i>	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17C; UAL 26	McCormick y col., 1999
"		<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	McCormick y col., 1999
Enterocina B	IIc	<i>Enterococcus faecium</i> BFE 900	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	Franz y col., 1999b
Mesentericina Y105	IIa	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Y105	<i>Leuconostoc cremoris</i> LC	Biet y col., 1998

^aClase a la que pertenece la bacteriocina.

Nuevamente, Biet y col. (1998) utilizaron el péptido señal de la divergicina A para la producción heteróloga de la mesentericina Y105 de *Lc. mesenteroides* Y105 en *Lc. mesenteroides* DSM20484 y *Lc. cremoris* LC, tras su transformación con un plásmido que contenía el gen híbrido “péptido señal de la divergicina A/ mesentericina Y105 madura”. En el mismo estudio, Biet y col. (1998) compararon la producción de la mesentericina Y105, bajo el control de la ruta general de secreción ó sistema *sec*, con el sistema de transporte dedicado mediado por transportadores-ABC específicos. Para ello, células competentes de *Lc. mesenteroides* DSM20484 y *Lc. cremoris* LC se transformaron con un plásmido que poseía el operón completo de la mesentericina Y105, resultando que la producción de mesentericina Y105 bajo el control de un sistema dedicado de procesado y secreción fue cuatro veces mayor que la obtenida con el sistema *sec*.

Como ya ha sido previamente considerado por McCormick y col. (1996), no se comprende bien como la mayor parte de las bacteriocinas producidas por BAL poseen sistemas específicos de procesado y secreción (DTS) cuando acceden a la ruta general de secreción (GSP) con un péptido señal adecuado. Probablemente, ello se deba a que los sistemas de procesado,

transporte y secreción dedicados (DTS) parecen más eficaces que los de la ruta general de secreción (GSP) (Biet y col., 1998). No obstante, esta hipótesis procede de resultados obtenidos con el péptido señal de la divergicina A (ver Tabla II.2) fusionado a la secuencia madura de otras que poseen una secuencia N-terminal diferente a la de la divergicina A madura (ver Tabla II.3) y cuyo procesado, transporte y secreción se realiza en hospedadores que puede que reconozcan ineficazmente su lugar de procesado y secreción. Por ello, generalizar que los sistemas de procesado, transporte y secreción dedicados (DTS) son más eficaces que los que emplean componentes de la ruta general de secreción (GSP) constituye una hipótesis, cuanto menos, no suficientemente contrastada experimentalmente.

II.5.2.3. Aplicaciones y perspectivas futuras de la producción heteróloga de bacteriocinas en bacterias lácticas

La utilización de bacterias lácticas o de otros microorganismos considerados como seguros puede constituir una alternativa válida para la producción homóloga o heteróloga de bacteriocinas que sean interesantes por su potencial aplicación como conservantes naturales de los alimentos. Sin embargo, es también importante que los sistemas de producción heteróloga de bacteriocinas puedan recurrir a la utilización de vectores de “grado alimentario”. A este respecto, de Vos (1999a) propone que los denominados “sistemas de grado alimentario” deberían estar constituidos por vectores que contengan ADN procedente de un hospedador heterólogo considerado GRAS, o al menos, de otro hospedador considerado como seguro.

En general, los sistemas de grado alimentario se clasifican en 3 grandes grupos: (a) sistemas de expresión controlados; (b) sistemas que emplean marcadores de selección y; (c) sistemas de integración cromosómica (De Vos, 1999a).

Los sistemas de expresión controlados se presentan como una importante “herramienta” de expresión, puesto que permiten que el gen clonado sea expresado independientemente del desarrollo del hospedador (Kuipers y col., 1997). Actualmente, se dispone de un gran número de sistemas de expresión que inducen la transcripción controlada de genes en bacterias lácticas (De Vos, 1999a). No obstante, de los sistemas de expresión controlados descritos hasta la fecha, el más exitoso y utilizado es el conocido como sistema NICE (del inglés, “*Nisin Controlled Expression*”) (Kuipers y col., 1998). Los elementos destacados del sistema NICE son: (i) una cepa que contenga los genes *nisRK* del operón de la nisina; (ii) el empleo de nisina como molécula inductora; y (iii) que el gen de interés se encuentre bajo el control del promotor de la nisina (P_{nisA}). La presencia de nisina en el medio extracelular 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 (ver Figura II.3).

Entre las ventajas del sistema NICE, para la producción de péptidos ó proteínas en bacterias lácticas, destacan: (i) su flexibilidad, puesto que la relación dosis-respuesta entre la concentración del inductor y la producción de la proteína de interés es lineal; (ii) su inducción controlada, fácil y de bajo coste, ya que no requiere la utilización de nisina purificada y puede realizarse directamente con el sobrenadante de una cepa productora de nisina; (iii) la elevada transcripción del promotor inducible, lo que permite la producción del péptido fusionado ó proteína de interés en cantidades elevadas; (iv) su aplicación, ya que también puede ser utilizado para detectar pequeñas concentraciones de nisina en sustratos alimentarios; y (v) su versatilidad, puesto que puede emplearse en la expresión controlada del gen de interés en un gran número de bacterias lácticas (Kleerebezem y col., 1997; Eichenbaum et al., 1998; Kuipers y col., 1998; De Vos, 1999b; Neu y col., 2003). El sistema NICE se ha utilizado con éxito en la

producción de una gran variedad de proteínas de interés médico y biotecnológico (Chatel y col., 2001; Enouf y col., 2001; Bermúdez-Humarán y col., 2002; Drouault y col., 2002; Ribeiro y col., 2002; Sybesma y col., 2003; Hickey y col., 2004).

En cuanto a los sistemas basados en la utilización de marcadores de selección, pueden considerarse 3 grupos en función del tipo de marcador utilizado: (i) marcadores basados en el empleo de azúcares (De Vos, 1999a); (ii) marcadores auxotróficos, es decir, marcadores basados en la supresión de la expresión de un determinado gen que codifica la síntesis de componentes necesarios para la supervivencia celular (Dickely y col., 1995; Sørensen y col., 2000; Bron y col., 2002; Glenting y col., 2002); y (iii) marcadores que confieren resistencia o inmunidad a sustancias consideradas como seguras (De Vos, 1999a) como, por ejemplo, la lactacina F (Allison y Klaenhammer, 1996) o la nisina A (Froseth y McKay, 1991; Hughes y McKay, 1991; Takala y Saris, 2002). Generalmente, la mayoría de los sistemas de expresión heteróloga utilizan vectores con marcadores de selección, con el inconveniente de que requieren una presión selectiva constante.

Sin embargo, los inconvenientes asociados a la utilización de sistemas de expresión con marcadores de selección podrían reducirse mediante la utilización de los llamados sistemas de integración cromosómica, desarrollados y utilizados por algunos investigadores para la expresión de genes y la producción de péptidos y proteínas recombinantes en *L. lactis* (Leenhouts y col., 1998) y *Lb. casei* (Gosalbes y col., 2000; Martín y col., 2000). Por otro lado, casi todas las BAL utilizadas como hospedadores heterólogos en la producción de péptidos y proteínas recombinantes pertenecen al grupo de las denominadas “cepas de laboratorio”. Inicialmente, dichas cepas deberían servir de ayuda y referencia en los primeros ensayos, pero una vez evaluados los resultados obtenidos, sería importante sustituirlas por otras con utilidad industrial (Ryan y col., 1996; Buyong y col., 1998; Coffey y col., 1998; Hickey y col., 2001; Johansen, 2003; Reviriego y col., 2005).

De lo descrito hasta ahora, puede decirse que la futura aplicación práctica de las bacteriocinas producidas por hospedadores heterólogos debería considerar la utilización de vectores de grado alimentario y de hospedadores seguros y de utilidad contrastada en la industria alimentaria. No obstante, tampoco es conveniente perder el rumbo y, por ello, debe considerarse crucial el desarrollo, evaluación y optimización de cualquier sistema de clonación, producción heteróloga y expresión funcional de bacteriocinas antes de su aplicación práctica. Es obvio que la mayoría de los sistemas de producción heteróloga de bacteriocinas manifiestan limitaciones, como los bajos niveles de producción y actividad biológica de las bacteriocinas secretadas o la versatilidad de su aplicación en diversos hospedadores.

II.5.3. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA EN LEVADURAS

En general, las levaduras combinan la facilidad de su manipulación genética y las características de crecimiento de los procariotas con los mecanismos de modificación postraduccional de los eucariotas. Por ello, diversas especies de levaduras se consideran potencialmente útiles como sistemas de producción heteróloga de proteínas y péptidos de interés biotecnológico (Cregg y col., 1993).

La primera levadura evaluada como sistema de producción heteróloga de proteínas y péptidos ha sido *Saccharomyces cerevisiae* (Cregg y col., 1993). Como en el caso de *E. coli*, *S. cerevisiae* es uno de los microorganismos mejor caracterizados genética y fisiológicamente. Además, su consideración de microorganismo seguro para las personas favorece su elección

como hospedador para la producción heteróloga de proteínas y péptidos de interés. Sin embargo, la utilización de *S. cerevisiae* como hospedador heterólogo no siempre se considera ideal para la producción de proteínas recombinantes. En este contexto, el empleo de levaduras metilotróficas (Hollenberg y Gellissen, 1997) supone una alternativa frente a los inconvenientes de *S. cerevisiae*, derivados de: (i) su bajo nivel de producción; (ii) la inestabilidad de las cepas recombinantes; (iii) su alto grado de glucosilación; y/o (iv) su difícil adaptación a ensayos de tipo industrial.

De entre las levaduras metilotróficas, *Pichia pastoris* es el microorganismo más utilizado como modelo para el desarrollo de sistemas de producción heteróloga de proteínas. En líneas generales, la utilización de *P. pastoris* como hospedador heterólogo permite obtener buenos resultados de producción de proteínas recombinantes y la adaptabilidad de los ensayos de laboratorio a situaciones de tipo industrial (Cregg y col., 1993; Cereghino y Cregg, 2000).

Por lo que respecta a la producción heteróloga de bacteriocinas en levaduras, Schoeman y col. (1999) han descrito la producción heteróloga de la pediocina PA-1 en *S. cerevisiae*. Para ello, dichos investigadores utilizaron un vector de expresión con la pediocina PA-1 madura fusionada al péptido señal del factor α , una feromona de la levadura que se sintetiza en forma de preproteína, y bajo el control del promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa. La transformación de *S. cerevisiae* con el plásmido recombinante se tradujo en la producción de pediocina PA-1 biológicamente activa. Desafortunadamente, la actividad antimicrobiana de la pediocina PA-1 presente en los sobrenadantes de los cultivos de las levaduras recombinantes fue muy pequeña, lo que se atribuyó a que la pediocina PA-1 se mantenía asociada a la membrana o a la pared celular de las células productoras. Sin embargo, la ausencia de técnicas analíticas fiables de detección y cuantificación de la pediocina PA-1 en los sobrenadantes de los cultivos productores no permitió determinar la relación entre la pediocina PA-1 producida y su actividad biológica, probablemente, disminuída por una posible glucosilación de su molécula, por la actividad de enzimas proteolíticos, por agregación entre sí o a otras moléculas ó por otras razones bioquímicas o biofísicas. Recientemente, van Reenen y col. (2003) han expresado la plantaricina 423 de *Lb. plantarum* 423 en *S. cerevisiae*, observándose las mismas limitaciones que las encontradas por Schoeman y col. (1999). Por ello, es posible que la utilización de *P. pastoris* como hospedador heterólogo y el empleo de métodos apropiados de detección y cuantificación de la producción y de la actividad biológica de las bacteriocinas producidas por las levaduras recombinantes puedan mejorar los resultados obtenidos hasta ahora.

III. CARACTERIZACIÓN
INMUNOQUÍMICA Y
PURIFICACIÓN DE LA
ENTEROCINA P

Artículo publicado en el *Journal of
Agricultural and Food Chemistry*

Performance and Applications of Polyclonal Antipeptide Antibodies Specific for the Enterococcal Bacteriocin Enterocin P

JORGE GUTIÉRREZ, RAQUEL CRIADO, ROSANNA CITTI, MARÍA MARTÍN,
 CARMEN HERRANZ, MARÍA F. FERNÁNDEZ, LUIS M. CINTAS, AND
 PABLO E. HERNÁNDEZ*

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

Polyclonal antibodies with specificity for enterocin P (EntP) have been generated by immunization of rabbits with two chemically synthesized N-terminal peptides (P1 and P2) and a C-terminal peptide (P3) of this bacteriocin conjugated to the carrier protein KLH. The sensitivity and specificity of the peptide–KLH-generated antibodies were evaluated by a noncompetitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA) and a competitive indirect (CI)-ELISA. The NCI-ELISA but not the CI-ELISA was valuable for detecting the existence of EntP specific antibodies in the sera of the P2–KLH and P3–KLH immunized animals and to detect and quantify the EntP in the supernatant of producer strains. The anti-P2–KLH sera cross-reacted with the supernatant of a strain producer of sakacin A, a bacteriocin closely related to EntP. Immunoaffinity chromatography columns with anti-P2–KLH or anti-P3–KLH immunoglobulins retained the EntP from the supernatant of the producer strain. Western blotting of EntP with the anti-P2–KLH-generated antibodies suggests that purified EntP tends to the formation of aggregates with no antimicrobial activity. Monitoring the purification of EntP with antipeptide antibodies suggests that while the performance of the evaluated purification procedures would be reasonably acceptable in terms of recovery of the antimicrobial activity of the bacteriocin, their yield is far from attractive in terms of recovery of the initial concentration of enterocin P.

KEYWORDS: Enterococci; bacteriocins; enterocin P; antipeptide antibodies; ELISA

INTRODUCTION

Bacteriocins are ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by different bacterial species including many members of the lactic acid bacteria (LAB) and are attracting a considerable interest for their potential use as natural and nontoxic food preservatives (1, 2). The LAB bacteriocins are often cationic, amphiphilic, membrane-permeabilizing peptides classified into three main groups: class I consists of the modified bacteriocins, the lantibiotics; class II comprises the nonmodified heat stable bacteriocins including the subclass IIa (pediocin-like bacteriocins), the subclass IIb (two peptide bacteriocins), and the subclass IIc (other peptide bacteriocins); and finally, class III consists of the protein bacteriocins (3–8). The subclass IIa bacteriocins are characterized by the occurrence of a hydrophilic conserved YGNGVxCxxxxCxV sequence motif in their N-terminal half including two cysteines that form a disulfide bridge and a hydrophobic variable C-terminal domain of equivalent size; another characteristic of these bacteriocins

is their strong inhibitory effect on *Listeria* (8). It has been determined that enterocin P (EntP) produced by *Enterococcus faecium* is synthesized as a prepeptide that after cleavage produces the mature bacteriocin of 44 amino acids; it seems to be processed and secreted by the *sec*-dependent pathway and exhibits a broader spectrum of antimicrobial activity when compared to other subclass IIa bacteriocins (9–11). The EntP has also been shown to deplete the intracellular level of ATP dissipating the membrane potential but not the transmembrane pH gradient of energized cells and to form specific, potassium ion-conducting pores in the cytoplasmic membrane of target cells (12, 13). However, it is still not known how the peptide inserts into the membrane to form a structured pore.

Because of the potential use of bacteriocins as food preservatives, a myriad of applications is envisaged for them. Bacteriocins, either alone or in combination with other antimicrobial barriers, may be useful tools to reduce the load of foodborne pathogens and spoilage bacteria. Also, because some bacteriocins such as the enterocins are produced by microorganisms coding for potential virulence factors (14, 15) and many industrial strains with interest as protective or starter cultures

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +34-91-3943752. Fax: +34-91-3943743. E-mail: ehernan@vet.ucm.es.

do not produce such antagonistic peptides, interest in the heterologous expression or coexpression of class II bacteriocins is growing rapidly (16–18). The generation of antibodies against bacteriocins may provide sensitive and specific methods for identification and detection of different bacteriocins and their producing strains and for their evaluation in different substrates by the use of immunochemical assays (19–21). Antibodies also offer potential alternative methods for the purification of bacteriocins by the use of immunoaffinity chromatography strategies (22–25).

Reports on the generation of antibodies against bacteriocins have been scarce. Initial attempts to generate antibodies against bacteriocins relied on the use of whole bacteriocin molecules, either alone or conjugated to carriers, as the immunogen. However, while this approach would be valid for bacteriocins such as the lantibiotics nisin A and Z (20, 21, 26, 27) and the subclass IIc bacteriocins enterocin B (24) and propionin PLG-1 (28), antibodies generated against bacteriocins of the subclass IIa with strong consensus similarities may show a lack of specificity although changes in single amino acid residues drastically affect protein recognition (29, 37). We report in this work the generation of specific rabbit polyclonal antibodies against chemically synthesized N-terminal and C-terminal fragments of the bacteriocin EntP and the development of sensitive immunoassays for EntP analysis. The antibodies were further evaluated for the sensitive and specific detection and quantification of EntP by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blotting, for purification of EntP by immunoaffinity chromatography, and for evaluation of the recovery of such bacteriocin during its purification using two multistep chromatographic procedures.

MATERIALS AND METHODS

Materials. The amino acid sequences of the N-terminal fragments of EntP used in this work were NH₂-ATRSYGN-COOH (peptide P1) and NH₂-ATRSYGNVYC-COOH (peptide 2), while the amino acid sequence of the C-terminal fragment of EntP was NH₂-ASGLAGMGH-COOH (peptide P3). All peptides were synthesized by 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry with an Applied Biosystems 413A automated solid phase peptide synthesizer in the Protein Chemistry Facility at the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Madrid, Spain). Purity of the peptides was monitored by HPLC, being higher than 95%, and the peptide identity was confirmed by mass spectrometry (MS). Ovalbumin (OA) (grade III and fraction VII), Tween 20, glutaraldehyde, ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)], and Freund's adjuvants were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The Inject Maleimide Activated mK₁LH kit and the Inject Immunogen EDC kit with mK₁LH were obtained from Perbio Science UK Ltd. (Cheshire, U.K.). The Immunopure Protein A gel, the immunopure rProtein A IgG Plus Orientation kit, the disposable columns sample kit, and the immunopure binding/elution buffer system were also obtained from Perbio Science. Goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) conjugated to HRP was obtained from Cappel Laboratories (West Chester, PA). The Novex 16% tricine gels, the tricine sodium dodecyl sulfate (SDS) buffer kit, and the XCell SureLock mini-Cell chamber were obtained from Invitrogen S. A. (Barcelona, Spain). The Amberlite XAD-16 hydrophobic polyaromatic resin, the molecular weight marker ultralow range for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (1060–26 600), and the color marker for SDS-PAGE and protein transfer ultralow range (1060–26 600) were also from Sigma. The econo-column chromatography support (5.0 cm × 30 cm) and the Silver Stain Plus reagent were obtained from Bio-Rad laboratories (Madrid, Spain). The Hybond ECL membrane, the ECL Plus Western blotting detection kit, the Hyperfilm ECL MP, the desalting and buffer exchange PD-10 columns, the cation exchanger SP Sepharose Fast Flow gel, the hydrophobic interaction Octyl Sepharose CL-4B gel, the ion exchange Resource S 1 mL column, and

the reversed phase PepRPC HR 5/5 chromatography column, as well as the automated fast-performance liquid chromatography (FPLC) system were all from Amersham Biosciences Europe GmbH (Cerdanyola, Spain). The 0.25 μm pore size filters (PES 25 mm GD/X, sterile syringe filters) and the Whatman 3M cellulose membranes were from Whatman Int. Ltd. (Maidstone, U.K.). The LAB strains were grown in the MRS broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, U.K.). Pediocin PA-1 produced by *P. acidilactici* 347 was purified to homogeneity as described previously (19). Pure enterocin Q was chemically synthesized at the Molecular Biology Unit (University of Newcastle Upon Tyne, U.K.) with a peptide purity >95% by HPLC. Pure nisin A (30 000 IU/mg) was purchased from NBS Biologicals (Hartfield, U.K.). Rabbits (New Zealand White females) were purchased from a local supplier (Navarra, Spain).

Preparation of Immunoconjugates and Immunization. Peptides P1 and P3 were conjugated to the carrier protein keyhole limpet haemocyanin (KLH) (P1–KLH and P3–KLH, 1:2 w/w) by EDC coupling using the components of the Inject Immunogen EDC kit for use as the immunogens. Peptide P2 was conjugated to maleimide-activated KLH (P2–KLH, 1:2 w/w) using the components of the Inject Maleimide activated KLH kit, also for use as the immunogen. The chemically synthesized peptides P1, P2, and P3 were also conjugated to OA (peptide–OA, 11:1 mol/mol) by the glutaraldehyde method (30) for use as the solid phase antigens. The immunogenic potential of the peptide fragments according to their hydrophilicity and antigenic index was determined by the use of a sequence analysis software package (31). Rabbits were immunized with the immunogens (P1–KLH, P2–KLH, and P3–KLH), according to a previously described scheme (19). Rabbits were bled via marginal ear veins on days 28 and 61, and a final bleed was performed on day 63 by cardiac puncture.

ELISAs. Most of the procedures were performed as previously described (29) with modifications. Briefly, for antisera titration, flat-bottom polystyrene microtiter plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight (4 °C) with 100 μL of peptide P (either P1, P2, or P3) conjugated to OA (5 μg/mL) in 0.1 M sodium carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6 (coating buffer, CB). Plates were washed three times with washing solution (0.05% Tween 20 in phosphate-buffered saline 0.01 M, pH 7.4, PBS). Wells were blocked for 1 h at 37 °C with 300 μL of 1% (w/v) OA (grade III) in PBS (OA–PBS) and then washed six times. Next, 50 μL of serially diluted serum was added to each well and incubated for 1 h at 37 °C. Unbound antibody was removed by washing four times, and 100 μL of goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (diluted 1:500 in OA–PBS) was added to each well. Plates were incubated for 30 min at 37 °C and washed eight times, and bound peroxidase was determined with ABTS as the substrate by measuring the absorbance of the wells at 405 nm with a Labsystems iEMS reader (Helsinki, Finland) with a built-in software package for data analysis. The titer of each serum sample was arbitrarily set as the maximum dilution that yielded at least twice the absorbance of the same dilution of nonimmune control serum.

For determination of antiserum specificity and sensitivity to EntP, two types of ELISA were designed. In the noncompetitive indirect (NCI)-ELISA, wells of microtiter plates were coated with 100 μL of different concentrations of pure EntP, pure pediocin PA-1, pure nisin A, pure OA, or neutralized and filter-sterilized supernatants from a number of LAB strains in CB. The plates were maintained for 16 h at 4 °C and then blocked and washed as described for the antiserum titration procedure. Next, 50 μL of antiserum (diluted 1:100 in PBS) was added, and the plates were incubated for 1 h at 37 °C. After a washing step and the addition of goat anti-rabbit IgG–peroxidase conjugate (diluted 1:500 in OA–PBS), the amount of bound peroxidase was determined with the ABTS substrate as previously described. The increase in the absorbance was proportional to the amount of specific antigen in the samples. In the competitive indirect (CI)-ELISA, microtiter plates were coated with 100 μL of EntP (0.5 μg/mL) in CB and then blocked and washed as described for the antiserum titration procedure. Next, 50 μL of the analytes was simultaneously incubated with 50 μL of antiserum (diluted 1:100 in PBS) for 1 h at 37 °C. After the washing step and addition of the goat anti-rabbit IgG peroxidase, the bound peroxidase was determined with the ABTS substrate as described previously. Relative antibody affinity was arbitrarily desig-

nated as the bacteriocin concentration required to inhibit antibody binding by 50%. For both immunoassays, the concentrations of antibodies, hapten conjugates, or enzyme tracers were optimized by checkerboard titration. Competition curves were obtained by plotting absorbance against the logarithm of the analyte concentration. Sigmoid curves were fitted to a four parameter logistic equation by use of the Labsystems software package (Genesis version 1.60).

Construction of the Immunoaffinity Columns and Immunopurification of EntP. For recovery of total IgGs from the immunosera of interest, 5 mL of a protein A gel slurry was packed into a 5 mL disposable polystyrene column. After the column was equilibrated with binding buffer (10 mM Tris, pH 8), 1 mL aliquots of the anti-P3-KLH serum diluted in binding buffer (1:7, v/v) were applied to the column. The column was then washed with 40 mL of binding buffer, and the retained IgG fraction was eluted with 10 mL of elution buffer (0.1 M glycine buffer, pH 2.8). The eluted fractions (2 mL each) were neutralized by the addition of 100 μ L of binding buffer, and those showing higher absorbances at 280 nm were desalted using PD-10 columns (Sephadex G-25M) and further lyophilized. This purification procedure was repeated three times, and 17.64 mg of IgGs was obtained by measuring absorbance of the fractions at 280 nm and the calculated extinction coefficient for total IgGs (an A_{280} of 1.35 corresponds to 1 mg/mL). This fraction was named fraction A. The same procedure was followed for the recovery of total IgGs from the anti-P2-KLH serum. A total of 14.75 mg of such IgGs was obtained and named fraction B.

The fractions A and B were further used for construction of immunocolumn A (anti-C-terminal EntP) and immunocolumn B (anti-N-terminal EntP). For construction of immunocolumn A, 16 mg of IgGs from fraction A was dissolved in 2 mL of antibody binding/wash buffer (50 mM sodium borate, pH 8.2) and deposited in a 2 mL immunopure rProtein A Plus Orientation column, and bound antibodies were cross-linked to the matrix with disuccinimidyl suberate (DSS). For construction of immunocolumn B, 14.75 mg of IgGs from fraction B was cross-linked to another 2 mL Immunopure rProtein A column as previously described. The performance of immunocolumns A and B on the immunopurification of bacteriocins was evaluated with culture supernatants of *E. faecium* P13, an EntP producer strain (9), and with *Lactobacillus sakei* 706, a sakacin A producer (32). Microorganisms were grown in MRS broth at 32 °C for 16 h, and the supernatants were obtained by centrifugation of the cultures at 12000g for 10 min at 4 °C, adjusted to pH 6.2 with 1 N NaOH, and filtered through 0.2 μ m pore size filters. Then, supernatants diluted in binding buffer (1:1, v/v) were applied to the immunocolumns. The columns were washed with 10 mL of binding buffer, and bacteriocins were eluted with 10 mL of elution buffer. The eluted fractions were neutralized by addition of 100 μ L of binding buffer and further desalted by passage through gel filtration PD-10 columns. For both immunoaffinity columns, the elution of bound bacteriocins was monitored by the anti-P2-KLH and anti-P3-KLH antibodies and the NCI-ELISA, as previously described.

Protein Electrophoresis, Western Hybridization, and Overlay Assay. Aliquots of immunopurified EntP and sakacin A were subjected to Tricine-SDS-PAGE as described by Schägger and Von Jagow (33). Protein electrophoresis was performed on preformed Novex 16% Tricine gels in a XCell SureLock mini-Cell, at 80 V constant current. Gels were silver-stained with the Silver Stain Plus reagent or blotted onto a Hybond ECL membrane (pore size, 0.2 μ m). The electrophoresed gel was first immersed in buffer K (0.025 M Tris, 0.04 M 6-amino-*n*-hexanoic, and 20% methanol [v/v]) during 10 min before contact with the nitrocellulose membrane. Above the gel and toward the cathode, six membranes of Whatman 3M paper embedded in buffer K were placed, while under the nitrocellulose membrane three membranes of Whatman 3M paper embedded in buffer A2 (0.025 M Tris with 20% methanol [v/v]) were allocated, followed by another set of Whatman 3M paper embedded in buffer A1 (0.03 M Tris with 20% methanol [v/v]). After allocation of a 2 kg weight tare over the cathode, blotting was performed by application of an electrical current of 0.08 A for 1 h. The transfer of peptides from the gel to the membrane was monitored by the use of a color marker. Further treatment of the blotted membrane included blocking in 50 mL of defatted milk powder (5% defatted milk in PBS-T) at 37 °C for 1 h and incubation with 30 mL of the anti-P3-KLH serum (diluted 1:100 in PBS) for 1 h at 37 °C. Incubation of

Table 1. Reactivities of Anti-P2-KLH and Anti-P3-KLH Serum Polyclonal Antibodies against Culture Supernatants of LAB As Determined by a NCI-ELISA^a

strain (bacteriocin produced)	source ^b	cross-reactivity (%) ^c	
		anti-P2	anti-P3
<i>E. faecium</i> P13 (EntP)	LAB 1153	90	93
<i>E. faecium</i> AA13 (EntP)	LAB 1507	93	92
<i>E. faecium</i> G16 (EntP)	LAB 1505	100	100
<i>E. faecium</i> LA5 (enterocins L50A, L50B, and P)	FVM	80	82
<i>E. faecium</i> L50 (enterocins L50A, L50B, P, and Q)	FVM	59	66
<i>E. faecium</i> T136 (enterocins A and B)	LAB 1152	NR	NR
<i>E. faecium</i> P21 (enterocins A and B)	LAB 1508	NR	1
<i>E. faecalis</i> INIA-4 (enterocin AS-48)	INIA	NR	1
<i>Lb. sakei</i> 706 (sakacin A)	NHL	100	NR
<i>Lb. sakei</i> LTH673 (sakacin P)	NHL	NR	NR
<i>L. lactis</i> BB24 (nisin A)	LAB 1154	NR	1
<i>L. lactis</i> IL1403 (nonbacteriocin producer)	IFR	NR	NR
<i>P. acidilactici</i> 347 (pediocin PA-1)	LAB 1497	2	3
<i>P. pentosaceus</i> FBB61 (pediocin A)	TNO	3	3

^a NR, no reactivity. ^b Source: LAB is the designation for strains of our collection at the BCCM/LMG, Universiteit Gent, Gent, Belgium; FVM, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; INIA, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid, Spain; NHL, Laboratory of Microbial Gene Technology, Agricultural University of Norway, Ås, Norway; IFR, Institute of Food Research, Norwich Laboratory, Norwich, U.K.; TNO, Nutrition and Food Research, Zeist, The Netherlands. ^c Cross-reactivity defined as (absorbance reading produced by a culture supernatant above the absorbance reading produced by MRS/absorbance reading produced by supernatant of *E. faecium* P13 above the absorbance reading produced by MRS) \times 100.

the membrane with 30 mL of the goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (diluted 1:5000 in defatted milk powder) permitted visualization of the expected antigen-antibody interactions by chemiluminescence with the ECL Plus Western blotting detection kit. The light emission was detected by a short exposure of the membrane to a blue light sensitive Hyperfilm ECL MP autoradiography film. To determine the antimicrobial activity of pure bacteriocins, an overlay assay was performed (34). Briefly, the electrophoresed gel was fixed in a solution of 20% 2-propanol and 10% acetic acid in distilled water (v/v) and further washed during 1, 16, and 1 h in distilled water. The first 1 h wash was performed at room temperature with agitation, while the other two washings were carried without agitation at 4 °C. After the gel was fixed, washed, and drained, it was overlaid with the indicator strain *Lb. sakei* NCFB 2714 (National Collection of Food Bacteria, Shinfield, Reading, U.K.) at 1×10^5 cfu/mL in soft 0.8% MRS agar and incubated overnight at 32 °C.

Microorganisms, Media, and Bacteriocin Assays. The LAB strains tested for antibody cross-reactivity and EntP production are listed in Table 1. All microorganisms were propagated in MRS broth at 32 °C, and the supernatants were obtained by centrifugation at 12000g for 10 min at 4 °C, adjusted to pH 6.2 with 1 M NaOH, filtered through 0.2 μ m pore size filters, and stored at -20 °C until use. The antimicrobial activity of the supernatants against the most appropriate indicator strains was evaluated by an agar diffusion test and, when stated, by a microtiter plate assay (MPA), performed as previously described by Cintas et al. (11).

Purification of EntP. The antimicrobial activity of *E. faecium* P13 (9), used as the source of EntP, was purified to homogeneity using two different procedures. In the first procedure, performed as described by Casaus et al. (35) with modifications, the bacteriocin was purified from a 1 L *E. faecium* P13 culture grown in MRS at 32 °C until the late logarithmic phase ($A_{620} = 0.8$). The cells were removed by centrifugation at 10000g for 10 min at 4 °C, and 40 g of Amberlite XAD-16 was added to the supernatant. The supernatant with the hydrophobic resin was maintained for 2 h at 4 °C with stirring and further loaded into an econo-column chromatography support. After elution of the supernatant, the resin was washed with 100 mL of distilled water in the first step and with 75 mL of 40% ethanol in water (v/v) later, to remove weak or nonhydrophobic compounds. The adsorbed bacteriocin was eluted with 200 mL of 85% 2-propanol, pH 2.0, in water (v/v) and after addition of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) was

subjected to cation exchange chromatography in a Resource S column, integrated in an automated FPLC system. The column was washed with 200 mM sodium phosphate buffer in 50% methanol/water (v/v), pH 5, plus 0.1% TFA (buffer A), and the bacteriocin was eluted with a gradient of buffer A with 1 M NaCl. The eluted fractions with antimicrobial activity were further subjected to reverse phase chromatography in a C₂ to C₁₈ column (PepRPC HR 5/5) integrated in a FPLC system (RP-FPLC). The bacteriocin was eluted from the column with a 55 min linear gradient of 20–35% 2-propanol in aqueous 0.1% TFA at a flow rate of 0.5 mL/min. Fractions with high bacteriocin activity were mixed and rechromatographed on the same RP column to obtain chromatographically pure bacteriocin. During purification, bacteriocin activity was calculated by a MPA with *Lb. sakei* NCFB 2714 as the indicator microorganism. Growth inhibition was measured spectrophotometrically at 620 nm with a microtiter plate reader after 14 h of incubation at 32 °C. One bacteriocin unit (BU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the bacteriocin causing 50% growth inhibition (50% of the turbidity of the control culture without bacteriocin).

In the second purification procedure, EntP was purified as previously described (9–11). Briefly, supernatants from early stationary phase 1 *E. faecium* P13 cultures grown in MRS broth at 32 °C were subjected to precipitation with ammonium sulfate (50%, w/v). The sample was kept at 4 °C with stirring for 3 h. After centrifugation at 12000g for 30 min at 4 °C, the pellet and floating materials were mixed and solubilized in 100 mL of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6. The fraction was applied to gel filtration PD-10 columns and further subjected to cation exchange (SP Sepharose Fast Flow) and hydrophobic interaction (Octyl Sepharose CL-4B) chromatographies, followed by RP chromatography in a C₂ to C₁₈ column (PepRPC HR 5/5) integrated in a FPLC system. Fractions with high bacteriocin activity were mixed and rechromatographed on the RP column to obtain chromatographically pure bacteriocin. Bacteriocin activity was determined as described above.

RESULTS

Sensitivity of Rabbit Antipeptide Antibodies for EntP.

Three regions within the EntP amino acid sequence were selected for production of chemically synthesized peptides. Synthetic peptides P1 (amino acid residues 1–7) and P3 (amino acid residues 34–42) were conjugated to KLH by EDC coupling, while synthetic peptide P2 (amino acid residues 1–11) was conjugated to maleimide activated KLH and used to immunize rabbits. On day 63 of the immunization process after six doses of the immunogens were administered, all animals had apparent titers in serum ranging from 1/3200 to 1/102 400. The sensitivity of the anti-P1–KLH, anti-P2–KLH, and anti-P3–KLH antibodies for EntP was determined by a NCI-ELISA. **Figure 1** shows the results obtained with the most sensitive sera for detection of pure bacteriocins in either CB or MRS broth. The anti-P1–KLH evaluated sera were not able to detect EntP in this assay (results not shown), while the anti-P2–KLH and anti-P3–KLH sera recognized the EntP present in the wells of the microtiter plates, although recognition of EntP was higher in CB than in MRS broth. The detection limits for EntP when using the anti-P2 antibodies were 0.05 µg/mL in CB and 0.25 µg/mL in MRS broth, while those when using the anti-P3 antibodies were 0.01 µg/mL in CB and 0.1 µg/mL in MRS broth. Such antibodies could not detect the presence of equivalent concentrations of pure pediocin PA-1 and nisin A in the wells of the microtiter plates. The sensitivity for EntP of the peptide-generated antibodies was also determined by a CI-ELISA. In this assay, the plates were coated with pure EntP. However, when using this assay (results not shown), the average detection limits for EntP by the anti-P2 or anti-P3 antibodies were not improved as compared to those obtained with the NCI-ELISA, while the amount of free EntP required for 50% binding inhibition was higher than 10 µg/mL.

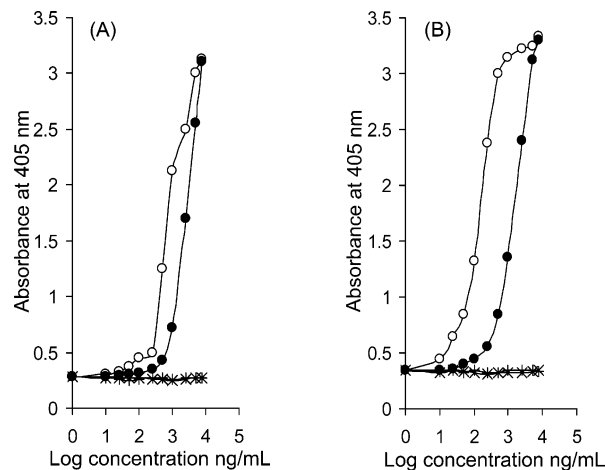


Figure 1. NCI-ELISA detection of EntP in CB (○) or MRS broth (●), pediocin PA-1 in CB (×), and nisin A in CB (+), using the anti-P2–KLH (A) or anti-P3–KLH (B) antibodies.

Table 2. EntP Concentration in the Culture Supernatants of *E. faecium* Producers As Determined by a NCI-ELISA

strains	EntP concentration (ng/mL)	
	anti-P2–KLH	anti-P3–KLH
<i>E. faecium</i> P13	7300	7250
<i>E. faecium</i> AA13	7500	7200
<i>E. faecium</i> G16	7900	7900
<i>E. faecium</i> LA5	6500	6300
<i>E. faecium</i> L50	4700	5060

Immunoreactivity of the Antipeptide Antibodies to Different Bacteriocins. The specificities of serum polyclonal anti-P2–KLH and anti-P3–KLH antibodies in neutralized and filter-sterilized supernatants of 16 h cultures of representative LAB strains were evaluated by NCI-ELISA (**Table 1**). The anti-P2–KLH and anti-P3–KLH antibodies showed a high cross-reactivity with the supernatants of the *E. faecium* strains P13, AA13, G16, LA5, and L50, producers of EntP, with negligible to no reaction against supernatants of strains producing bacteriocins such as enterocin A, sakacin A, sakacin P, and pediocin PA-1, four subclass IIa bacteriocins with the N-terminal amino acid motif KYYGNGVxC (residues 1–9). However, it should be noticed that the anti-P2–KLH antibodies displayed a high cross-reactivity (100%) against the supernatant of *Lb. sakei* 706, producer of sakacin A, a bacteriocin of the subclass IIa sharing with EntP nine identical amino acids RSYGNGVYC (residues 2–10) at the N-terminal end. The concentration of EntP in the supernatants of *E. faecium* strains previously isolated from Spanish fermented sausages and producing EntP was also determined (**Table 2**). While the *E. faecium* strains P13, AA13, and G16 displayed a similar EntP production (91–100%), this was slightly lower (59–82%) in *E. faecium* LA5 and *E. faecium* L50, both strains producing more than one bacteriocin.

Immunoaffinity Columns and Immunopurification of EntP. The antipeptide anti-P2–KLH and anti-P3–KLH IgGs were recovered from the immunosera of interest by adsorption and elution from a Protein A gel. A total of 17.64 mg of IgGs (fraction A) was obtained from the anti-P3–KLH serum, while 14.75 mg of such IgGs (fraction B) was also obtained from the corresponding anti-P2–KLH serum. The fractions A and B were further used to construct immunocolumn A (recognizes the C-terminal fragment of EntP) and immunocolumn B (recognizes the N-terminal fragment of EntP) by the cross-linking with DSS of the purified IgGs to 2 mL of Immunopure rProtein A Plus

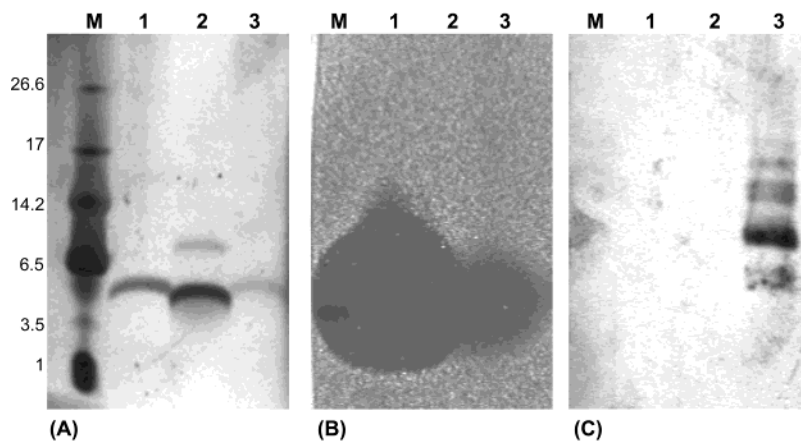


Figure 2. Tricine-SDS-PAGE of different bacteriocins after silver staining (A), antimicrobial activity after overlay with the indicator strain *Lb. sakei* NCFB 2714 (B), and Western blotting with the anti-P2-KLH antibodies (C). M, molecular weight marker with sizes indicated in the left margin. Lane 1, 1 μ g of pure pediocin PA-1; lane 2, 1 μ g of pure enterocin Q; and lane 3, 2 μ g of pure EntP.

Table 3. Immunoaffinity Chromatography Recovery of EntP from the Supernatants of *E. faecium* P13 As Determined by a NCI-ELISA

EntP incorporated (ng)	immunocolumn A (C-terminal)		immunocolumn B (N-terminal)	
	EntP eluted (ng)	recovery (%)	EntP eluted (ng)	recovery (%)
1000	1076	100	1102	100
1500	1405	94	1520	100
2500	1590	64	1509	60
5000	2366	47	1690	34
10 000	2556	26	1635	16
20 000	1964	10	3062	15
30 000	2668	9	4125	14
40 000	4135	10	5925	15

Orientation matrix. The performance of immunocolumns A and B on the immunopurification of bacteriocins was evaluated with culture supernatants of *E. faecium* P13 and *Lb. sakei* 706. The results obtained (Table 3) indicate that EntP from the supernatant of the producer *E. faecium* P13 is retained with maximum efficiency (94–100%) on immunocolumns A and B until the EntP incorporated in columns is 1500 ng but with a lower recovery (10–64%) when the EntP incorporated on the columns was progressively higher (2500–40 000 ng). Although the saturation level for recovery of EntP by both columns seems to be low, the immunopurification of EntP in a single step gives a reasonably high yield as compared to that obtained by the use of multistep chromatographic techniques, as evaluated below. The results obtained indicate that 0.15–4.5 mL of neutralized and filter-sterilized supernatants of *E. faecium* P13 grown in MRS permit the recovery of 1.0–4.1 μ g of EntP by immunocolumn A and 1.1–5.9 μ g of EntP by immunocolumn B. Supernatants (2 mL) of *Lb. sakei* 706 producing sakacin A were also subjected to immunopurification of this bacteriocin on immunocolumn B. The anti-P2-KLH antibodies recognized the presence of sakacin A on the eluted fractions, although a precise quantification of the immunopurified bacteriocin was not pursued.

The purity of EntP and sakacin A eluted from the immunoaffinity columns was also evaluated. Eluted fractions containing the bacteriocins were desalted and lyophilized. Aliquots of the samples were sent for amino acid sequencing at the University of Oslo (Oslo, Norway) and also subjected to protein electrophoresis by Tricine-SDS-PAGE on preformed 16% tricine gels. Both the immunopurified EntP and the sakacin A samples gave multiple amino acid sequences indicating that they

were not purified to homogeneity, while the electrophoretic pattern of the same samples on Tricine-SDS-PAGE gels showed an intense protein smearing of the gel slots containing the immunopurified EntP and sakacin A (results not shown).

Western Blotting of Purified EntP. The anti-P2-KLH antibodies with specificity for the N-terminal end of EntP were used for characterization of this bacteriocin purified by a multiple step chromatographic procedure comprising an initial ammonium sulfate precipitation step, followed by gel filtration, cation exchange, hydrophobic interaction, and RP chromatographies. As shown in Figure 2A, visualization of purified pediocin PA-1, enterocin Q, and EntP by silver staining indicates that the chemically synthesized enterocin Q tends to the formation of aggregates and that all bacteriocins show a strong antimicrobial activity in the overlay assay (Figure 2B), with the highest activity being displayed by pediocin PA-1. However, after Western blotting (Figure 2C), the anti-P2-KLH antibodies only recognized reactive antigenic bands in the lane corresponding to the purified EntP. These results suggest that EntP has a strong tendency to the formation of aggregates not visualized by silver staining and not displaying antimicrobial activity.

Use of the Anti-P3-KLH Antibodies To Monitor Purification of EntP. Bacteriocins have been mostly subjected to purification procedures based on measurement of their antimicrobial activity after each purification step. Accordingly, the performance of most of the purification procedures relies on the evaluation of the antimicrobial activity and not on the specific detection and quantification of the bacteriocin being subjected to purification. In this work, the antimicrobial activity of *E. faecium* P13, used as the source of EntP, was purified using two different multistep chromatographic procedures. In the first procedure, EntP was purified by adsorption onto a XAD-16 polymeric resin followed by cation exchange and RP chromatographies. Results shown in Table 4 indicate that although the antimicrobial activity of the fraction subjected to adsorption onto a XAD-16 polymeric resin remains the same (100%) as in the supernatant, the presence of EntP is reduced to a 0.63% of the initial concentration. When the resulting fraction was subjected to cation exchange chromatography, the antimicrobial activity of the resulting fraction was reduced to a 2.4%, while the recovery of EntP was 0.46%. After purification of the sample by RP-FPLC, two chromatographic fractions with antimicrobial activity were obtained. In fraction A, the antimicrobial activity was 0.9% of the original and the recovery of EntP was 0.004%, while the antimicrobial activity of fraction

Table 4. Purification of EntP from *E. faecium* P13 Using the First Purification Procedure

purification stage	volume (mL)	total A_{254}^a	total activity ^b ($10^3 \times$ BU)	total activity (%)	enterocin P ^c (μ g)	enterocin P (%)
culture supernatant	1000	28 500	1550	100	8840	100
adsorption to XAD-16 polymeric resin	200	888	1560	100	56.4	0.63
cation exchange chromatography	50	22.75	37.01	2.4	41.5	0.46
reverse phase chromatography						
fraction A	0.400	0.077	14.96	0.9	0.41	0.004
fraction B	0.675	0.082	38.01	2.4	0.54	0.006

^a A_{254} multiplied by the volume in milliliters. ^b Antimicrobial activity in BU. ^c EntP concentration as determined by ELISA.

Table 5. Purification of EntP from *E. faecium* P13 Using the Second Purification Procedure

purification stage	volume (mL)	total A_{254}^a	total activity ^b ($10^3 \times$ BU)	total activity (%)	enterocin P ^c (μ g)	enterocin P (%)
culture supernatant	1000	28 500	1550	100	8840	100
ammonium sulfate precipitation	100	3670	1509	97	2656	30
gel filtration chromatography	200	1620	1478	95	2450	28
cation exchange chromatography	50	17	764	49	160	1.8
hydrophobic interaction chromatography	10	4.04	1196	77	22.60	0.2
reverse phase chromatography						
fraction A	0.675	0.05	49.93	3	0.50	0.006
fraction B	0.700	0.04	443.12	28	1.53	0.017

^a A_{254} multiplied by the volume in milliliters. ^b Antimicrobial activity in BU. ^c EntP concentration as determined by ELISA.

B was 2.4% of the original in the supernatant with a recovery of 0.006% of the initial concentration of EntP.

In the second purification procedure, EntP from *E. faecium* P13 was purified by precipitation with ammonium sulfate, followed by gel filtration, cation exchange, hydrophobic interaction, and RP chromatographies. The results shown in **Table 5** suggest that although after the ammonium sulfate and gel filtration steps the purified sample shows a 95% of the antimicrobial activity of the supernatant, detection and quantification of EntP by the anti-P3-KLH antibodies and the NCI-ELISA indicate that only a 28% of the initial bacteriocin remains. When the resulting fraction was subjected to cation exchange chromatography, 49% of the original antimicrobial activity remains with a recovery of a 1.8% of the initial EntP concentration. The hydrophobic interaction step further improves the antimicrobial activity (77%) of the bacteriocin, although only a 0.2% of the initial EntP is present in the purified sample. Finally, after the RP-FPLC, two chromatographic fractions with antimicrobial activity were resolved. In fraction A, the antimicrobial activity was 3% of the original while the recovery of EntP was 0.005%, while the antimicrobial activity of fraction B was 28% of the original with a recovery of 0.017% of the initial concentration of EntP.

DISCUSSION

Although during the past decade a large effort has been carried out on the biochemical and genetic characterization of bacteriocins produced by LAB, their detection and quantification have relied mostly on the use of bioassay-based and other biochemical tests in which nonspecificity is a major drawback. Moreover, although highly specific immunochemistry-based methods have been developed and routinely used as analytical tools in many areas of research, surprisingly, the impact of these techniques in the bacteriocin research field has been marginal. Furthermore, the lack of commercially pure bacteriocins makes difficult their availability while their low molecular masses (<5000 Da) make them poorly immunogenic or nonimmunogenic. In addition, peculiar characteristics of the bacteriocin molecules (6, 8) such as the occurrence of hydrophilic conserved

sequence motifs, their hydrophobicity, the formation of intra-chain disulfide rings, and, in the case of lantibiotics, the presence of modified amino acids might also interfere with the sensitivity and specificity of the antibodies and with the development of immunoassay formats. However, antibodies generated against a short chemically synthesized fragment of a bacteriocin of interest might be useful to generate antibodies of predetermined specificity (18, 19, 29).

Of great interest is the generation of antibodies and the development of sensitive immunoassays for detection and quantification of EntP. This bacteriocin may be employed as a mixture with other bacteriocins to increase the antimicrobial activity of the resulting pool and to reduce the presence of resistant microorganisms, while it also shows potential for its production in heterologous hosts that may produce the bacteriocin in larger quantities, may facilitate its purification, or may be considered as safer producers of EntP for their direct use in foods. However, because EntP is a subclass IIa bacteriocin, it exhibits a strong amino acid sequence homology with other bacteriocins at the N terminus. Accordingly, for generation of antibodies specific for EntP, the peptide fragments P1 and P2 (N-terminal residues) were designed to generate antibodies, which could be either specific or show cross-reactivity against related bacteriocins, while peptide fragment P3 (C-terminal residues) might display a high specificity for EntP. All peptide fragments were potentially highly immunogenic according to its hydrophilicity and antigenic index.

The sensitivity of the P1-KLH-, P2-KLH-, and P3-KLH-generated polyclonal antibodies for EntP was evaluated by a NCI-ELISA. The anti-P1-KLH sera were not able to detect EntP probably because the epitope was too short to induce an antibody response (36), while the anti-P2-KLH and anti-P3-KLH sera recognized the EntP (**Figure 1**) with a higher sensitivity of the anti-P2 as compared to the anti-P3 antibodies and with a larger recognition in CB than in MRS broth. The effect of CB to enhance the detection of EntP was similar to that observed for detection of enterocin A (18) and pediocin PA-1 (29). However, the results obtained with the CI-ELISA suggest that contrary to results obtained for detection of pediocin

PA-1 (29) and enterocin B (24), but similarly to those obtained for enterocin A (18), this immunochemical format significantly reduces the detection of free EntP. These results heighten the importance of the development of proper immunoassay formats for detection of each bacteriocin. The limit of detection and sensitivity of the NCI-ELISA developed for EntP were in the range of values previously reported for nisin A (22, 26), nisin Z (25, 27), pediocin PA-1 (19, 29), enterocin A (18), and enterocin B (24).

Both the anti-P2-KLH- and the anti-P3-KLH-generated antibodies showed a high affinity for EntP in the supernatants of *E. faecium* P13, AA13, G16, LA5, and L50 grown in MRS broth with a nonsignificant cross-reactivity with cell culture supernatants from enterocin A, enterocin B, enterocin AS-48, sakacin P, nisin A, pediocin PA-1, and pediocin A producer strains (Table 1), some of which share the shorter (YGNCVxC) consensus amino acid motif with EntP at their N-terminal end. This absence of cross-reactivity is not surprising since it has been reported that closely related proteins have been distinguished by the use of antisera as a probe for a specific sequence within the protein molecule (29, 36) and that changes in a single amino acid residue drastically affect protein recognition (37). However, the anti-P2 (N-terminal) but not the anti-P3 (C-terminal) antibodies showed a high affinity for supernatants of *Lb. sakei* 706 producer of sakacin A (32), a bacteriocin identical to curvacin A (8) that shares with EntP the long (RSYNGGVYC) N-terminal consensus amino acid motif, permitting the simultaneous recognition by these antibodies of the two distinct bacteriocins, EntP and sakacin A. Thus, the specificity of any antipeptide antibody should be fully addressed considering the potential cross-reactivity of such antibodies against closely related bacteriocins. The EntP produced by a number of *E. faecium* strains was also quantified by a NCI-ELISA (Table 2). While the use of both sera gave comparable results on the production of EntP by all *E. faecium* strains, the lower production of EntP by the *E. faecium* strains LA5 and L50 may be reasonably ascribed to their multiple bacteriocin production (11). EntP production by *E. faecium* P13 displays primary metabolite kinetics (9, 38), and its production as well as that of other bacteriocins may also depend on strains, pH, and other environmental factors (39). With the results obtained, it is hypothesized that the use of the P3-KLH-generated antibodies would constitute a valuable tool for detection of EntP in the supernatant of LAB isolates producing still unknown antagonistic peptides and for quantification of the EntP produced by LAB isolates in which the existence of the structural gene for production of this bacteriocin has been genetically determined. Such antibodies might also be useful for quantification of EntP in foods after fermentation with an EntP-producer strain and to evaluate the production of EntP by genetically modified hosts producers or coproducers of EntP and other bacteriocins, as it has been already shown during coproduction of pediocin PA-1 and nisin A (17), and pediocin PA-1 and enterocin A (18), by *Lactococcus lactis*.

Immunoaffinity chromatography columns containing immunoglobulins with specificity for EntP retained the EntP from supernatants of *E. faecium* P13 grown in MRS (Table 3), with an efficiency of 9–100% for column A and 15–100% for column B, depending on the initial content of EntP incorporated into the columns. Although the recovery of EntP, as measured by the NCI-ELISA, from both column A (1.0–4.1 μg) and column B (1.1–5.9 μg) seems to be low, the immunopurification of EntP in a single step and from very low volumes of supernatants (0.15–4.5 mL) gives a reasonably high yield as

compared to those obtained by the use of multistep chromatographic techniques. The column B also retained the sakacin A produced by *Lb. sakei* 706. However, the eluted fractions containing either EntP or sakacin A were not purified sufficiently to give a unique sequence, while the electrophoretic pattern of the same samples on Tricine-SDS-PAGE showed an intense protein smearing (results not shown), suggesting that for these bacteriocins the possibility exists for formation of aggregates and/or protein complexes with proteins and peptides from the cytoplasm of dead cells or from those present in the MRS broth. An immunoaffinity chromatography column with polyclonal antibodies has also been developed for purification of enterocin B in a single step (24), but higher amounts and better yields of pure nisin A (22) and nisin Z (20, 23) have been attained by the use of immunoaffinity matrixes coated with monoclonal antibodies with specificity for nisin A or nisin Z. Thus, the construction of immunoaffinity columns with a higher amount of IgGs or monoclonal antibodies with specificity for EntP would further improve the recovery of this bacteriocin in a single step.

The anti-P2-KLH antibodies have been also useful to identify a relevant feature of EntP. Western blotting of pure pediocin PA-1, enterocin Q, and EntP with the anti-P2-KLH antibodies has shown that these antibodies only recognize reactive antigenic bands in the slot containing purified EntP (Figure 2). These results further strengthen the recognition that these antibodies do not cross-react with closely related bacteriocins of the subclass IIa and confirm previous hypotheses suggesting that EntP is a hydrophobic bacteriocin with a strong tendency to the formation of aggregates (9). The results obtained may also help to explain the formation of an intense smearing after Tricine-SDS-PAGE of EntP and sakacin A retained by immunoaffinity chromatography. Furthermore, although the molecular structure of such aggregates is not yet known, their formation in the purified EntP significantly reduces its biological activity (i.e., antimicrobial activity on sensitive microorganisms). Clearly, the impact of this behavior for the biotechnological potential of EntP as a natural food preservative in the food industry should be evaluated further.

For the first time in the bacteriocin research field, antipeptide (anti-P3-KLH) antibodies have been also used to monitor the purification of EntP by two different multistep chromatographic procedures. When EntP produced by *E. faecium* P13 was purified by adsorption onto a XAD-16 polymeric resin followed by cation exchange and RP chromatographies, the results obtained (Table 4) show the existence of two chromatographic fractions for purification of EntP. The existence of multiple chromatographic peaks after purification to homogeneity of EntP (10) and other bacteriocins such as nisin Z (40), pediocin PA-1 (41, 42), and carnobacteriocin BMI (42) has been ascribed to the coexistence after RP-FPLC of two peptide forms, oxidized and nonoxidized, of the same bacteriocin. The results obtained (Table 4) also suggest that while the purification procedure for EntP would be reasonably acceptable in terms of final recovery of the initial antimicrobial activity (3.3%), its final yield is far from attractive (0.95 μg EntP) in terms of recovery of the initial concentration of the bacteriocin (0.010%). Furthermore, while it is recognized that the apparent increase in the antimicrobial activity of bacteriocins during its purification may be the result of removal of antimicrobial inhibitors, disaggregation of the bacteriocin or conformational change to a more active form of the bacteriocin in the hydrophobic solvent (9, 11, 19), the results obtained in this work suggest that reduced adsorption/desorption of EntP to the XAD-16 polymeric resin and to the RP

chromatographic column are the rate-limiting steps for purification of larger quantities of EntP. When EntP was purified by a second purification procedure (Table 5), the results obtained indicate that while this purification procedure for EntP would also be acceptable in terms of recovery of the initial antimicrobial activity (31%), its final yield is again far from attractive (2.03 µg of EntP) in terms of recovery of the initial concentration of this bacteriocin (0.023%). The high losses of EntP after ammonium sulfate precipitation, cation exchange, hydrophobic interaction, and RP-FPLC suggest that these are also rate-limiting steps for purification of larger quantities of EntP using this purification procedure.

In most efforts toward development of improved methods to increase the yield of purified bacteriocins (44–46), the presence of bacteriocins in the purified fractions has been evaluated by measurement of their antimicrobial activity, by determination of protein concentrations by colorimetric assays, or by measuring UV absorption at 280 nm, which is converted to protein concentration using molecular extinction coefficients, calculated from the contribution of individual amino acid residues. However, all of these methods used to determine bacteriocin concentrations suffer from lack of specificity, and thus, bacteriocin recovery yields are difficult to ascertain. The use of specific anti-peptide antibodies to monitor purification of EntP suggests that while both of the evaluated purification protocols are useful for purification of EntP to homogeneity (9–11), however, the yield of pure EntP is far from attractive. If the food industry demands larger quantities of EntP for their use as a natural food preservative, the use of antibodies of predetermined specificity for EntP would be of help on the development and optimization of more efficient purification protocols of this bacteriocin. For the food industry, the current application of LAB bacteriocins other than nisin relies mainly on bacteriocin production *in situ* by starter or protective cultures. Such applications would greatly benefit from sensitive and specific methods for the quantification of bacteriocins in foodstuffs, and the antibodies described here may prove to be instrumental in developing such methods. Their suitability for food analysis, however, remains to be established.

ACKNOWLEDGMENT

We express our gratitude to Prof. Ingolf F. Nes (Department of Chemistry and Biotechnology, Laboratory of Microbial Gene Technology, Agricultural University of Norway, Ås, Norway) for providing us with bacterial strains and the chemically synthesized enterocin Q and for help on the amino acid sequencing of EntP and sakacin A. The help of Dr. José M. Martínez is also recognized.

LITERATURE CITED

- Cleveland, J.; Montville, T. J.; Nes, I. F.; Chikindas, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *71*, 1–20.
- O'Sullivan, L.; Ross, R. P.; Hill, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* **2002**, *84*, 593–604.
- Nissen-Meyer, J.; Nes, I. F. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* **1997**, *167*, 67–77.
- Nes, I. F.; Holo, H. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* **2000**, *55*, 50–61.
- Ennahar, S.; Sashihara, T.; Sonomoto, K.; Ishizaki, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, *24*, 85–106.
- Cintas, L. M.; Casaus, P.; Herranz, C.; Nes, I. F.; Hernández, P. E. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* **2001**, *7*, 281–305.
- McAuliffe, O.; Ross, R. P.; Hill, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, *25*, 285–308.
- Eijsink, V. G. H.; Axelsson, L.; Diep, D. B.; Håvarstein, L. S.; Holo, H.; Nes, I. F. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria: an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek* **2002**, *81*, 639–654.
- Cintas, L. M.; Casaus, P.; Håvarstein, L. S.; Hernández, P. E.; Nes, I. F. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 4321–4330.
- Herranz, C.; Mukhopadhyay, S.; Casaus, P.; Martínez, J. M.; Rodríguez, J. M.; Nes, I. F.; Cintas, L. M.; Hernández, P. E. Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains isolated from fermented sausages. *Curr. Microbiol.* **1999**, *39*, 282–290.
- Cintas, L. M.; Casaus, P.; Herranz, C.; Håvarstein, L. S.; Holo, H.; Hernández, P. E.; Nes, I. F. 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.* **2000**, *182*, 6806–6814.
- Herranz, C.; Chen, Y.; Cintas, L. M.; Hernández, P. E.; Montville, T. J.; Chikindas, M. L. Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 1689–1692.
- Herranz, C.; Cintas, L. M.; Hernández, P. E.; Moll, G. N.; Driessen, A. J. M. Enterocin P causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 901–904.
- Franz, C. M. A. P.; Muscholl-Silberhorn, A. B.; Yousif, N. M. K.; Vancanneyt, M.; Swings, J.; Holzapfel, W. M. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 4385–4389.
- Eaton, T. J.; Gasson, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 1628–1635.
- Biet, F.; Berjeaud, J. M.; Worobo, R. W.; Cenatiempo, Y.; Fremaux, C. Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway. *Microbiology* **1998**, *144*, 2845–2854.
- Horn, N.; Martínez, M. I.; Martínez, J. M.; Hernández, P. E.; Gasson, M. J.; Rodríguez, J. M.; Dodd, H. M. Enhanced production of pediocin PA-1 and coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 4443–4450.
- Martínez, J. M.; Kok, J.; Sanders, J. W.; Hernández, P. E. Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3543–3549.
- Martínez, J. M.; Martínez, M. I.; Suárez, A. M.; Herranz, C.; Casaus, P.; Cintas, L. M.; Rodríguez, J. M.; Hernández, P. E. Generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity against pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 4536–4545.
- Benech, R. O.; Kheadr, E. E.; Laridi, R.; Lacroix, C.; Fliss, I. Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by *in situ* production in mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3683–3690.
- Leung, P. P.; Khade, M.; Shellhammer, T. H.; Yousef, A. E. Immunoassay method for quantitative determination of nisin in solution and on polymeric films. *Lett. Appl. Microbiol.* **2002**, *34*, 199–204.

- (22) Suárez, A. M.; Azcona, J. I.; Rodríguez, J. M.; Sanz, B.; Hernández, P. E. One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 4990–4992.
- (23) Prioult, G.; Turcotte, C.; Labarre, L.; Lacroix, C.; Fliss, I. Rapid purification of nisin Z using specific monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Int. Dairy J.* **2000**, *10*, 627–633.
- (24) Rose, N. L.; Sporns, P.; McMullen, L. M. Production of antibodies against enterocin B for immunological detection and purification purposes. *Food Agric. Immunol.* **2001**, *13*, 225–239.
- (25) Daoudi, L.; Turcotte, C.; Lacroix, C.; Fliss, I. Production and characterization of anti-nisin Z monoclonal antibodies: suitability for distinguishing active from inactive forms through a competitive enzyme immunoassay. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *56*, 114–119.
- (26) Suárez, A. M.; Rodríguez, J. M.; Hernández, P. E.; Azcona, J. I. Generation of polyclonal antibodies against nisin: immunization strategies and immunoassays development. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 2117–2121.
- (27) Bouksaim, M.; Lacroix, C.; Bazin, R.; Simard, R. E. Production and characterization of polyclonal antibodies against nisin in an ELISA and for immuno-location of nisin in producing and sensitive bacterial strains. *J. Appl. Microbiol.* **1999**, *87*, 500–510.
- (28) Leverage, J. A.; Glatz, B. A. Detection of bacteriocin propionicin PLG-1 with polyvalent anti-PLG-1 antiserum. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 2235–2239.
- (29) Martínez, J. M.; Martínez, M. I.; Herranz, C.; Suárez, A. M.; Fernández, M. F.; Cintas, L. M.; Rodríguez, J. M.; Hernández, P. E. Antibodies to a synthetic 1–9-N-terminal amino acid fragment of mature pediocin PA-1: sensitivity and specificity for pediocin PA-1 and cross-reactivity against Class IIa bacteriocins. *Microbiology* **1999**, *145*, 2777–2787.
- (30) Avrameas, S.; Ternynck, T. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. *Immunochemistry* **1969**, *6*, 53–56.
- (31) Devereux, J.; Haerberli, P.; Smithies, O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 387–395.
- (32) Holck, A.; Axelsson, L.; Birkeland, S. E.; Aukrust, T.; Blom, H. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Gen. Microbiol.* **1992**, *138*, 2715–2720.
- (33) Shägger, H.; Von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range 1 to 100 KDa. *Anal. Biochem.* **1987**, *166*, 368–379.
- (34) Bhunia, A. K.; Johnson, M. C.; Ray, B. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Ind. Microbiol.* **1987**, *2*, 319–322.
- (35) Casaus, P.; Nilsen, T.; Cintas, L. M.; Nes, I. F.; Hernández, P. E.; Holo, H. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* **1997**, *143*, 2287–2294.
- (36) Groome, N. P. Immunoassays of proteins and anti-peptide antibodies. In *Peptide Antigens: A Practical Approach*; Wisdom, G. R., Ed.; IRL Press: Oxford, London, 1994; pp 139–179.
- (37) Rolland, M. P.; Bitri, L.; Besancon, P. Monospecificity of the antibodies to bovine α_{s1} -casein fragment 140–149: application to the detection of bovine milk in caprine dairy products. *J. Dairy Res.* **1995**, *62*, 83–88.
- (38) Herranz, C.; Martínez, J. M.; Rodríguez, J. M.; Hernández, P. E.; Cintas, L. M. Optimization of enterocin P production by batch fermentation of *Enterococcus faecium* P13 at constant pH. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *16*, 378–383.
- (39) Aasen, I. M.; Møretrø, T.; Katla, T.; Axelsson, L.; Storrø, I. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *53*, 159–166.
- (40) Meghrou, J.; Lacroix, C.; Bouksaim, M.; Lapointe, G.; Simard, R. E. Genetic and biochemical characterization of nisin Z produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* UL719. *J. Appl. Microbiol.* **1979**, *83*, 133–138.
- (41) Daba, H.; Lacroix, C.; Huang, J.; Simard, R. E.; Lemieux, L. Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *J. Appl. Bacteriol.* **1994**, *77*, 682–688.
- (42) Johnsen, L.; Fimland, G.; Eijsink, V.; Nissen-Meyer, J. Engineering increased stability in the antimicrobial peptide pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 4798–4802.
- (43) Quadri, L. E. N.; Sailer, M.; Roy, K. L.; Vederas, J. C.; Stiles, M. E. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12204–12211.
- (44) Carolissen-Mackay, V.; Arendse, G.; Hastings, J. W. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.* **1997**, *34*, 1–16.
- (45) Guyonnet, D.; Fremaux, C.; Cenatiempo, Y.; Berjeaud, J. M. Method for rapid purification of Class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 1744–1748.
- (46) Uteng, M.; Hauge, H.; Bronz, I.; Nissen-Meyer, J.; Fimland, G. Rapid two-step procedure for large-scale purification of pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 952–956.

Received for review July 30, 2003. Accepted February 2, 2004. This work was partially supported by Grants 07G/0026/2000 from the Comunidad de Madrid, Spain, and AGL2000-0706 from the Ministerio de Educación y Cultura, Spain. J.G. is the recipient of a fellowship from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT), Spain. R.C. and M.M. hold fellowships from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD), Spain. R.C. is the recipient of a fellowship from the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela, Caracas.

JF030551J

IV. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA
DE LA ENTEROCINA P EN
Escherichia coli

Artículo en prensa en el *International
Journal of Food Microbiology*



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

INTERNATIONAL JOURNAL OF
Food Microbiology

International Journal of Food Microbiology xx (2005) xxx–xxx

www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Cloning, production and functional expression of enterocin P, a *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, in *Escherichia coli*

J. Gutiérrez^a, R. Criado^a, R. Citti^a, M. Martín^a, C. Herranz^a, I.F. Nes^b,
L.M. Cintas^a, P.E. Hernández^{a,*}

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

^b*Laboratory of Microbial Gene Technology, Department of Biotechnological Sciences, Agricultural University of Norway, N-1432 Ås, Norway*

Received 12 November 2003; received in revised form 23 June 2004; accepted 29 November 2004

Abstract

The cloning and expression of enterocin P (EntP), a *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, was studied in *Escherichia coli*. PCR-amplified products of the preenterocin P gene (*entP*) or *entP* plus the putative EntP immunity gene (*entiP*), were cloned in plasmid pETBlue-1 under the control of the inducible T7lac promoter. Although target genes in derivative plasmids pJG01 (*entP*) and pJG02 (*entP* plus *entiP*) did not generate products with antimicrobial activity after an in vitro combined transcription/translation reaction, they were expressed as biologically active products following transformation and induction in the *E. coli* Tuner(DE3)pLacI host. The use of specific antibodies and an ELISA permitted the detection and quantification of EntP in the supernatant (SN), cellular soluble protein fraction (CSF), and inclusion bodies (IB) of *E. coli* Tuner(DE3)pLacI cells transformed with either pJG01 or pJG02. Functional EntP from the supernatants of *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) cultures grown in a complex medium was recovered, at a high efficiency, by immunoaffinity chromatography in a single step. A purification method based on hydrophobic adsorption and reverse-phase chromatographies also permitted the recovery of active EntP from the supernatants of the same cultures grown in a minimally defined medium. The *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) cells would merit consideration as an alternative experimental model for the heterologous production and functional expression of EntP, as well as for the fast and efficient recovery of this bacteriocin from the supernatant of this recombinant producer.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Enterocin P; *Enterococcus*; Heterologous expression; *Escherichia coli*

* Corresponding author. Tel.: +34 913943752; fax: +34 913943743.

E-mail address: ehernan@vet.ucm.es (P.E. Hernández).

1. Introduction

Ribosomally synthesized antimicrobial peptides are produced by all types of living organisms including bacteria and constitute the most abundant and diverse group of bacterial defense systems (Nes and Holo, 2000; Eijsink et al., 2002; Riley and Wertz, 2002). Such antimicrobial peptides are referred to as bacteriocins when they are produced by bacteria. In recent years bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB) have been the focus of extensive studies due to their potential application in foods (Cleveland et al., 2001; O'Sullivan et al., 2002). Many bacteriocins produced by LAB inhibit not only closely related species but also a variety of species of gram-positive spoilage bacteria and food-borne pathogens. Most antimicrobial peptides from LAB are synthesized with an N-terminal leader. They are cationic, amphiphilic/hydrophobic membrane permeabilizing peptides, usually consisting between 30 and 60 amino acids, and are grouped in three main classes. Class I consists of modified bacteriocins, the lantibiotics. Class II is comprised of non-modified, heat-stable bacteriocins, which are divided into subclasses IIa (pediocin-like, strong antilisterial bacteriocins), IIb (two-peptide bacteriocins) and IIc (other peptide bacteriocins). Class III consists of the protein bacteriocins (Nes and Holo, 2000; Ennahar et al., 2000; Cintas et al., 2001; McAuliffe et al., 2001; Eijsink et al., 2002). The largest group in Class II bacteriocins is subclass IIa. These bacteriocins share an overall amino acid sequence identity of between 40 and over 70% with the conserved sequence motif (YYGNGVxCxKxxCxVD) in the N-terminal part of the molecule (Eijsink et al., 2002).

Among the LAB, the enterococci produce a diverse and heterogeneous group of bacteriocins with different spectra of antimicrobial activities, structures, and processing and secretion mechanisms (Franz et al., 1999; Cintas et al., 2001; Franz et al., 2002; Kawamoto et al., 2002; Hickey et al., 2003; Nilsen et al., 2003). Enterocin P produced by *Enterococcus faecium* P13 isolated from a Spanish dry fermented sausage is a subclass IIa bacteriocin synthesized as a prepeptide of 71 amino acids that, after cleavage, produces the mature enterocin of 44 amino acids, it is probably processed and secreted by the *sec*-dependent pathway, and exhibits a broad spectrum of antimicro-

bial activity (Cintas et al., 1997). EntP has been shown to dissipate the membrane potential of energized cells and to form specific, potassium ion-conducting pores in the cytoplasmic membranes of target cells (Herranz et al., 2001a, b). The EntP structural gene (*entP*) seems to be widespread in enterococci and has been found in a number of other *E. faecium* strains of different origins (Herranz et al., 1999; Cintas et al., 2000; Moreno et al., 2002; De Vuyst et al., 2003; Foulquié Moreno et al., 2003; Mareková et al., 2003).

LAB bacteriocins or bacteriocin-producing strains, either alone or in combination with other antimicrobial barriers, may be useful tools for food preservation. However, since enterocins can be produced by enterococcal species clinically involved in infections and antibiotic resistance (Jett et al., 1994; Morrison et al., 1997; Haas et al., 2002; Shankar et al., 2002) and coding for potential virulence factors (Franz et al., 2001; Eaton and Gasson, 2001; Franz et al., 2003), interest in the heterologous production and functional expression of enterocins in other bacterial hosts is growing rapidly. Moreover, the development of strategies for the cloning and expression of enterocins in other microbial hosts may facilitate their production and purification, produce the bacteriocins in larger quantities and/or permit the use of the bacterial hosts in foods as starter, protective or probiotic cultures. It would be also desirable to develop efficient methods of purification of enterocins in larger quantities if they are going to be used in industrial and/or medical applications. The present work studies the cloning, production, and purification of EntP in *E. coli*.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Polyclonal antibodies with specificity for enterocin P were obtained as previously described (Gutiérrez et al., 2004). Ovalbumin (OA) (grade III) Tween 20, ABTS (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]), X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) and IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) were from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. Goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) conjugated to HRP (horse rabbit

peroxidase) was obtained from Cappel Laboratories, West Chester, PA, USA. The 0.25- μm pore-size filters (PES 25 mm GD/X, sterile syringe filters) were from Whatman Int., Maidstone, UK. The Perfectly Blunt™ Cloning Kit with the blunt vector pETBlue™-1, the NovaBlue Singles™ and the Tuner™ (DE3)pLacI Competent Cells were obtained from Novagen Inc. (Bionova, Madrid, Spain). The Novex 16% tricine gels, the tricine SDS buffer kit and the XCell SureLock mini-Cell chamber were obtained from Invitrogen, Barcelona, Spain. The Silver Stain Plus reagent was obtained from Bio-Rad laboratories, Madrid, Spain. The Amberlite XAD-16 hydrophobic polyaromatic resin and the molecular weight marker ultra low range for SDS-PAGE (1060–26,600) were from Sigma. The desalting and buffer exchange PD-10 columns, the cation exchanger SP Sepharose Fast Flow gel, the hydrophobic interaction Octyl Sepharose CL-4B gel, the ion exchange Resource S 1 ml column and the reversed phase PepRPC HR 5/5 chromatography column, as well as the automated Fast-Performance Liquid Chromatography (FPLC) system were all from Amersham Biosciences Europe GmbH, Cerdanyola, Spain.

2.2. Bacterial strains, media and bacteriocin assays

E. faecium P13 (LAB 1153, BCCM/LMG, Universiteit Gent, Gent, Belgium) was used as the source of EntP (Cintas et al., 1997, 2000; Gutiérrez et al., 2004), while *E. faecium* T136 (LAB 1152, BCCM/LMG) and *Lactobacillus sakei* NCFB 2714 were used as indicator strains for determination of enterocin P antimicrobial activity. These microorganisms were propagated in MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). *Escherichia coli* cells (Novagen) and derivatives were grown in LB (Lennox L broth) (Sigma) and, when stated, in the minimal M9 medium prepared as described by Miller (1977). Cell-free culture supernatants (SN) obtained by centrifugation of cultures at 12,000 *g* at 4 °C for 10 min were adjusted to pH 6.2 with 1 M NaOH, filtered through 0.2- μm pore-size filters and stored at –20 °C until use. The antimicrobial activity of individual colonies was screened by the stab-on-agar test (Cintas et al., 1997) and that of the supernatants by an agar diffusion test (ADT) and, when stated, by a microtitre plate assay (MPA), performed as previously described

(Cintas et al., 2000). With the MPA growth inhibition of the sensitive *L. sakei* NCFB 2714 was measured spectrophotometrically at 620 nm with a microtitre iEMS plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland) after incubation of the microorganism at 32 °C for 14 h. One bacteriocin unit (BU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the bacteriocin causing 50% growth inhibition.

2.3. Cloning of enterocin P in *E. coli*

Total genomic DNA from *E. faecium* P13 was obtained by the alkalyne lysis method (Anderson and McKay, 1983) and used as target DNA for PCR amplification of the gene *entP* (fragment P, 216 bp) with primers EntP1 (5'-ATGAGAAAAAATTATT-TAGTTTAGCTCTTATTGG-3') and EntP2 (5'-TTAATGTCCCATACCTGCCAAACCAG-3'), while genes *entP* and *entiP* (fragment PI, 488 bp) were also amplified with primers EntP1 and EntP3 (5'-TCAAAGTCCCGACCATGCTTTGG-3'). Fragments P and PI were further cloned in the blunt plasmid pETBlue™-1 according to the procedure recommended by the manufacturer, and the resulting plasmids transformed in *E. coli* NovaBlue Singles™ Competent Cells. Transformants were selected on LB plates with carbenicillin (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$), tetracycline (15 $\mu\text{g ml}^{-1}$), X-Gal (70 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and IPTG (80 μM) at 37 °C. Further identification and selection of white colonies containing plasmids pJG01 (fragment P) and pJG02 (fragment PI) with inserts in the correct orientation were performed by PCR amplification of DNA from single *E. coli* colonies and primers EntP1 and pETBlue-Down (Novagen). Oligonucleotide primers were obtained from Sigma-Genosys (Cambridge, UK). PCR amplifications were performed in 50- μl reaction mixtures using 1–3 μl of purified DNA, 70 pmol of each primer and 1 U of Biotools DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain). Samples were subjected to an initial cycle of denaturation (97 °C for 2 min), followed by 35 cycles of denaturation (94 °C for 45 s), annealing (64 °C for 30 s) and elongation (72 °C for 30 s to 2 min), ending with a extension at 72 °C for 7 min, in a DNA thermal cycler (Techgene; Techne, Cambridge, UK). PCR-generated fragments were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) before cloning into the pETBlue™-1 vector or nucleotide sequencing. PCR

products were also analyzed by electrophoresis in 2% agarose (Pronadisa, Madrid, Spain) gels, with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad) used for acquisition and computer analysis of the images. Confirmation of the correct nucleotide sequence of inserts P and PI was performed by nucleotide sequencing of purified PCR-amplified fragments using the ABI PRISM® BigDye™ Terminator cycle sequence reaction kit and the automatic DNA sequencer ABI PRISM, model 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the ADN Sequencing Service (Sistemas Genómicos, Valencia, Spain). Plasmids pJG01 and pJG02 purified from *E. coli* NovaBlue hosts using the High Pure Plasmid Purification kit (Roche Diagnostics S.L., Madrid, Spain) were further transformed into *E. coli* Tuner (DE3)pLacI Competent Cells and transformants selected on LB plates with carbenicillin (50 µg ml⁻¹), chloramphenicol (34 µg ml⁻¹) and D-glucose (1%, w/v) at 37 °C.

2.4. *In vitro* transcription/translation of cloned *entP* fragments

Plasmids pJG01 (*entP*) and pJG02 (*entP* plus *entiP*) were used as templates for synthesis of enterocin P using the *E. coli* T7 S30 Extract System for Circular DNA (Promega, Madison, WI, USA). The combined transcription/translation reactions were carried out at 37 °C for 2 h, using plasmid pETBlue-1 as a control. The antimicrobial activities of samples (45 µl) were determined by ADT and MPA, while the EntP concentration of the reaction mixtures was determined by a non-competitive indirect ELISA (NCI-ELISA) as described below. Plasmid pJG03 containing as the insert the PCR product obtained using primers EntP4 (5'-ATGGCTACGCGTTCATATGGTAATGG-3') and EntP2, and coding for mature EntP, was also used for the transcription/translation of mature EntP without its peptide signal and with an additional Met residue at its N-terminal end.

2.5. Recovery of the cellular soluble protein fraction (CSF) and soluble proteins from inclusion bodies (IB)

The BugsBuster™ Protein Extraction Reagent plus Benzonase Nuclease (Novagen) was used, following the manufacturer's instructions, to disrupt the cell

walls of *E. coli* recombinant cells with the liberation of the periplasmic and cytoplasmic soluble proteins (CSF) and the digestion of the nucleic acids. The insoluble fraction and cell debris were removed by centrifugation of the samples at 16,000 g at 4 °C for 20 min. The B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent (Perbio Science, Cheshire, UK), used according to the manufacturer's instructions, was used to obtain supernatant containing solubilized proteins from inclusion bodies (IB). The BCA Protein assay kit (Perbio) was used as a compatible reagent for determination of the protein concentration of the intracellular soluble protein fraction (CSF), while the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) was used as a compatible reagent for determination of the protein concentration of solubilized proteins from inclusion bodies (IB). When indicated, proteins and peptides from SN, CSF and IB were concentrated by precipitation with trichloroacetic acid (TCA, 10% w/v). The samples were incubated with TCA at room temperature for 30 min, then were centrifuged at 12,000 g at 4 °C for 5 min, and the pellet resuspended in the same volume of PBS, pH 7.4.

2.6. NCI-ELISA for detection and quantification of enterocin P

Enterocin P was detected and quantified using polyclonal antibodies and NCI-ELISA, as previously described (Gutiérrez et al., 2004). Briefly, flat-bottom polystyrene microtitre plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight (4 °C) with 100 µl of different concentrations of pure EntP, neutralized and filter-sterilized supernatants from *E. faecium* P13 or derivative *E. coli* strains, transcription/translation mixtures, intracellular soluble proteins (SCF) or soluble proteins from inclusion bodies (IB) in 0.1 M sodium carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6 (coating buffer, CB). Plates were washed three times with a washing solution (0.05% Tween 20 in phosphate-buffered saline 0.01 M, pH 7.4, PBS) and were incubated at 37 °C for 1 h with 300 µl of 1% (w/v) OA (ovoalbumin, grade III) in PBS (OA-PBS) and then washed six times. Next, 50 µl of anti-P3-KLH serum diluted 1:100 in PBS was added, and the plates were incubated at 37 °C for 1 h. Unbound antibody was removed by washing four times, and 100 µl of goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (diluted

1:500 in OA-PBS) was added to each well. Plates were incubated at 37 °C for 30 min, washed eight times and bound peroxidase was determined with ABTS as the substrate by measuring the absorbance of the wells at 405 nm using a iEMS reader (Labsystems) with a built-in software package for data analysis.

2.7. Immunopurification of enterocin P

Enterocin P was retained from the supernatant of the *E. faecium* P13 cultures grown in MRS at 32 °C using an immunoaffinity chromatography column containing purified IgG specific for EntP conjugated to a matrix of Immunopure rProtein A (Gutiérrez et al., 2004). The same immunopurification procedure was applied for recovery of EntP from the *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) producer cells grown in LB at 37 °C until the mid logarithmic phase ($A_{280}=0.50$) and induced during 3 h with 1 mM IPTG. Supernatants of the producer cultures obtained by centrifugation at 12,000 g at 4 °C for 10 min, adjusted to pH 6.2 with NaOH and filtered through 0.22- μ m pore-size filters were diluted in binding buffer (1:1, v/v) and applied to the immunocolumn. The column was washed with 10 ml of binding buffer and the bacteriocin eluted with 10 ml of elution buffer. The eluted fractions were neutralized by addition of 100 μ l of binding buffer and further desalted by passage through gel filtration PD-10 columns. The elution of the bound bacteriocin was monitored by the anti-P3-KLH antibodies and the NCI-ELISA, as described above.

2.8. Other purification procedures for enterocin P

The antimicrobial activity of enterocin P produced by *E. faecium* P13 was purified as previously described (Cintas et al., 2000; Gutiérrez et al., 2004). Briefly, supernatants from early stationary phase 1-1 *E. faecium* P13 cultures grown in MRS broth at 32 °C were subjected to precipitation with ammonium sulfate (50%, w/v). The sample was kept at 4 °C with stirring for 3 h. After centrifugation at 12,000 g for 30 min at 4 °C, the pellet and floating materials were mixed and solubilized in 100 ml of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6. The fraction was applied to gel filtration PD-10 columns and further

subjected to cation exchange (SP Sepharose Fast Flow) and hydrophobic interaction (Octyl Sepharose CL-4B) chromatographies, followed by reverse-phase chromatography in a C₂ to C₁₈ column (PepRPC HR 5/5) integrated in a FPLC system (RP-FPLC). Fractions with high bacteriocin activity were mixed and rechromatographed on the reverse-phase column to obtain chromatographically pure bacteriocin. During purification, bacteriocin activity was calculated by MPA with *Lb. sakei* NCFB 2714 as the indicator microorganism.

The enterocin P produced by the *E. coli* Tuner (DE3)pLacI (pJG01) cells was also purified. Briefly, a 1-1 *E. coli* recombinant culture grown at 37 °C in the minimal M9 medium until the mid logarithmic phase ($A_{620}=0.50$) and induced during 3 h with 1 mM IPTG was centrifuged at 10,000 g at 4 °C for 10 min to remove cells, and 20 g of Amberlite XAD-16 was added to the supernatant. The supernatant with the hydrophobic resin was maintained at 4 °C for 2 h with stirring, and further loaded into an econo-column chromatography support. After elution of the supernatant, the resin was washed with 100 ml of distilled water in the first step and with 75 ml of 40% ethanol in water (v/v) later, to remove weak or non-hydrophobic compounds. The adsorbed bacteriocin was eluted with 200 ml of 85% 2-propanol pH 2.0 in water (v/v) and the remaining 2-propanol was eliminated by mild heating (35–40 °C) of the sample in a rotavapor (Büchi, Switzerland). After addition of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) to the sample the antimicrobial activity was further subjected to reverse-phase chromatography in a C₂ to C₁₈ column (PepRPC HR 5/5) integrated in a FPLC system (RP-FPLC). The bacteriocin was eluted from the column with a 55-min linear gradient of 20 to 35% 2-propanol in aqueous 0.1% TFA at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹. During purification bacteriocin activity was determined as described above, while the enterocin P concentration was determined using the antibodies and the NCI-ELISA described above.

2.9. Protein electrophoresis

Portions of immunopurified enterocin P produced by *E. faecium* P13 and *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) cells were subjected to Tricine-SDS-PAGE as described by Shägger and Von Jagow (1987).

Protein electrophoresis was performed on preformed Novex 16% Tricine gels in a XCell SureLock Mini-Cell, at 80 V constant current. Gels were silver-stained with the Silver Stain Plus reagent as previously described (Gutiérrez et al., 2004).

3. Results

3.1. Cloning and production of enterocin P in *E. coli*

DNA from *E. faecium* P13 was used for PCR amplification of fragments containing the preenterocin P gene (*entP*) or *entP* plus the putative EntP immunity gene (*entiP*), being ligated to the expression plasmid pETBlue-1 and generating the recombinant-derived plasmids pJG01 (*entP*) and pJG02 (*entP* plus *entiP*). However, neither of the purified plasmids produced translated products with antimicrobial activity against the indicator *E. faecium* T136 cells when used as templates for the in vitro transcription/translation assay with the *E. coli* T7 S30 Extract System. Detection and quantification of EntP in the extracts were, however, possible using a NCI-ELISA and both templates (pJG01 and pJG02) produced the peptide in a concentration of $3.6 \mu\text{g ml}^{-1}$. Similarly, the amount of the modified EntP produced by the transcription/translation assay with plasmid pJG03 (*entP* insert without the signal peptide and with the Met codon in the 5'-end of the gene) was determined to be $2.1 \mu\text{g}$

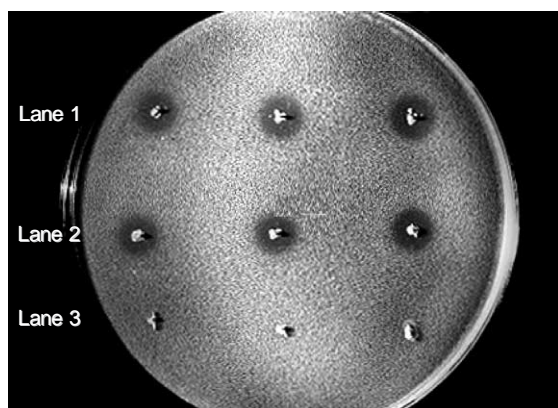


Fig. 1. Detection of the antimicrobial activity by the stab-on-agar test of *Escherichia coli* Tuner(DE3) pLacI cells transformed with plasmid pJG01 (lane 1), pJG02 (lane 2) and pETBlue-1 (lane 3), using *Enterococcus faecium* T136 as indicator microorganism.

Table 1

NCI-ELISA detection and quantification of enterocin P in the supernatants (SN), cellular soluble protein fraction (CSF) and solubilized proteins from inclusion bodies (IB) of *Escherichia coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) (A) and *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG02) (B) cultures, induced with different concentrations of IPTG (isopropyl β -D-galactopyranoside)

(A)				
IPTG (μM)	Enterocin P (ng ml^{-1})			Total cellular protein ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
	SN	CSF	IB	
0	3.1	49.2	16.7	166.3
10	5.8	36.5	24.2	161.9
50	28.2	23.1	209.4	131.2
100	37.1	46.9	103.5	118.4
200	39.2	36.0	61.0	99.4
500	39.5	33.8	43.8	88.4
1000	40.0	54.6	22.6	89.4
(B)				
IPTG (μM)	Enterocin P (ng ml^{-1})			Total cellular protein ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
	SN	CSF	IB	
0	8.5	115.3	19.0	235.6
10	13.0	110.5	18.4	252.4
50	47.1	93.3	170.8	194.3
100	51.1	105.8	89.5	180.3
200	43.8	91.6	79.6	155.8
500	52.8	84.9	69.0	115.9
1000	55.0	112.8	33.8	126.5

ml^{-1} by NCI-ELISA, but no antimicrobial activity was detected by the ADT and MPA assays.

Purified pJG01 and pJG02 were further transformed into *E. coli* Tuner(DE3)pLacI and the antimicrobial activity produced by the *E. coli* Tuner (DE3)pLacI (pJG01) and *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG02) clones, was detected against the indicator *E. faecium* T136 cells on LB agar plates containing $10 \mu\text{M}$ of the IPTG inducer (Fig. 1). Then, quantification of EntP production by the two *E. coli* clones was carried out. The induction of cultures with IPTG arrested the growth but did not produced cell lysis (results not shown) even at maximum inducer concentrations, while production of EntP was determined by the use of anti-peptide antibodies by the NCI-ELISA in a plate format. As shown in Table 1, the concentration of EntP in the supernatants (SN) of the induced cultures increased with higher concentrations of IPTG, its amount was fairly constant in the cellular soluble protein fraction (CSF) and its presence was related to the concentration of the inducer in the

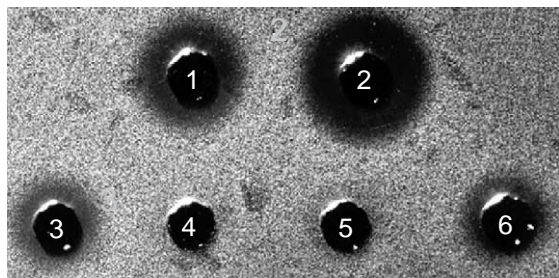


Fig. 2. Determination of antimicrobial activity by the agar diffusion test (ADT) of enterocin P of cell-free culture supernatants of *Enterococcus faecium* P13 at 2000 ng ml⁻¹ (1) and 8000 ng ml⁻¹ (2), as well as from immunopurified enterocin P (1000 ng ml⁻¹) from *E. faecium* P13 (3), and *Escherichia coli* (DE3)pLacI (pJG01) (6) cultures. Buffer of elution from the immunoaffinity columns (4), and sample eluted from *E. coli* (DE3)pLacI (pETBlue-1) control culture (5).

solubilized proteins from inclusion bodies (IB). The presence of EntP in the cell-free culture supernatants was 40 ng ml⁻¹ in cells transformed with pJG01

(*entP*) and 55 ng ml⁻¹ in cells transformed with pJG02 (*entP* plus *entiP*).

3.2. Recovery of enterocin P produced by *E. coli* by immunoaffinity chromatography

The EntP in the cell-free supernatants of *E. coli* Tuner (DE3)pLacI (pJG01) cells was recovered in a single step with purified IgG antibodies with specificity for enterocin P conjugated to a matrix of Immunopure rProtein A. When three 4-ml portions of 25-fold concentrated supernatants (100 ml) were eluted from the immunoaffinity column and the eluted fractions desalted, it was determined by the NCI-ELISA that the EntP recovery was of 1700, 1615 and 1564 ng (average 1626 ng). Since the supernatants were previously determined to have a concentration of 1700 ng 100 ml⁻¹, the average recovery of EntP from the samples was of 92 to 100%. When the antimicrobial activity of the EntP recovered by immunoaffinity

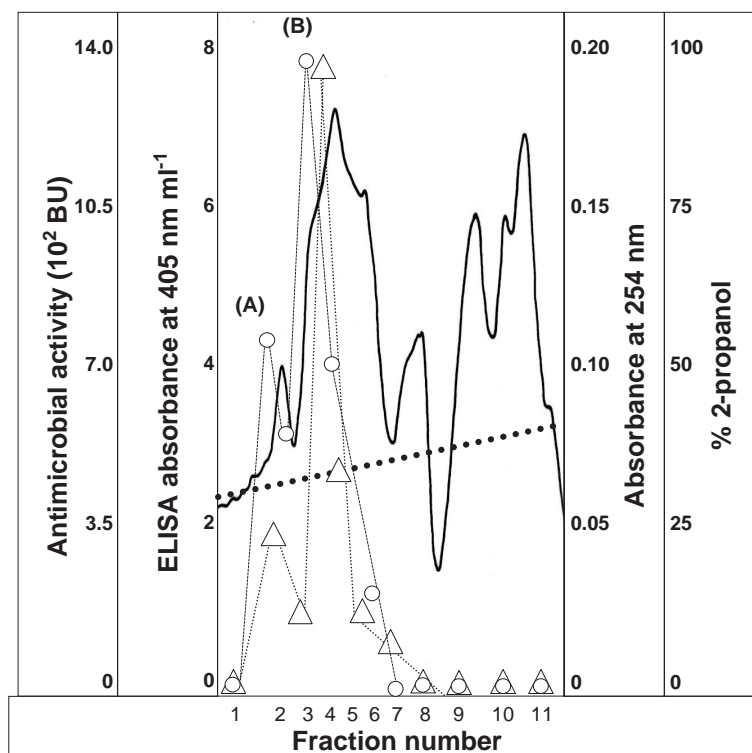


Fig. 3. First run reverse-phase chromatography purification of enterocin P produced by *Escherichia coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01). Antimicrobial activity (-△-) and enterocin P recognition by a NCI-ELISA (· · · · ·). Protein absorbance at 254 nm (—) and 2-propanol elution (· · · · ·). Fractions A and B with antimicrobial activity and immunochemical reactivity.

chromatography was tested by an ADT (Fig. 2), equivalent amounts (1000 ng ml^{-1}) of immunopurified EntP from the *E. faecium* P13 and *E. coli* (pJG01) cultures, displayed comparable antimicrobial activity as determined by the diameter of the halos of inhibition. However, when the purity of the immunopurified enterocin P produced by *E. coli* was evaluated, the immunopurified EntP samples gave multiple amino acid sequences indicating that they contain additional proteins/peptides. The samples were also subjected to protein electrophoresis by Tricine–SDS-PAGE on preformed 16% tricine gels resulting in an intense protein smearing in the gel slots containing the immunopurified EntP (results not shown).

3.3. Enterocin P produced by *E. coli* *entP* clones grown in a minimal medium

To facilitate the development of simpler and faster procedures for purification of the EntP produced by the recombinant *E. coli* cells, *E. coli* Tuner(DE3) pLacI (pJG01) cultures were grown in the M9 minimally defined medium and their cell-free supernatants subjected to purification by a simplified procedure involving adsorption chromatography and reverse-phase chromatography (RP-FPLC). The recovery of EntP during its purification (Fig. 3 and Table 2) was recorded measuring the antimicrobial activity of the fractions by MPA, as well as determining the EntP-immunoreactivity of the sam-

ples by a NCI-ELISA. The amount of EntP in the cell-free culture supernatant of *E. coli* Tuner(DE3) pLacI (pJG01) (Table 2) was of 6120 ng, and its purification yielded two fractions, named fraction A and fraction B. After rechromatography of the fractions of interest by RP-FPLC, the final specific activity of fractions A and fraction B increased by 1772 and 6432-fold, respectively, and the final recoveries of the total antimicrobial activity were 6.9 and 13.1%, respectively. The final recovery of active EntP from fraction A and fraction B as measured by an NCI-ELISA was of 134 (2.2%) and 190 ng (3.1%), respectively.

4. Discussion

In this work, the PCR-amplified genes of interest from *E. faecium* P13 and comprising the gene *entP* encoding preenterocin P, and the genes *entP* plus *entiP*, encoding preenterocin P and the putative immunity protein for EntP (Cintas et al., 1997), were cloned in the blunt plasmid pETBlue-1 which facilitates expression of proteins from inserts that start with an ATG initiation codon. The selection of the recombinant plasmids pJG01 (*entP*) and pJG02 (*entP* plus *entiP*) was performed in *E. coli* NovaBlue cells, that permit maintenance of the recombinant plasmids under non-expression conditions. This successful approach to generate stable expression vectors based on the use of inducible *sec*-dependent bacteriocin signals, contrasts to the failure to generate

Table 2
Purification of enterocin P from *Escherichia coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01)

Purification stage	Volume (ml)	Total A_{254} ^a	Total activity ^b (BU)	Specific activity ^c	Total activity (%)	Enterocin P ^d (ng)	Enterocin P (%)
Culture supernatant	1000	54	2640	48.9	100	6120	100
Adsorption to XAD-16 polymeric resin	30	19.32	6213	321.6	235	6073	99
Reverse-phase chromatography							
Fraction A							
First run	1.900	0.180	668	3711	25.3	256	4.1
Second run	0.525	0.002	182	86,666	6.9	134	2.2
Fraction B							
First run	1.275	0.300	1818	6060	68.9	558	9.1
Second run	0.750	0.001	346	314,545	13.1	190	3.1

^a A_{254} multiplied by the volume in milliliters.

^b Antimicrobial activity in bacteriocin units (BU).

^c BU divided by A_{254} .

^d Enterocin P concentration as determined by ELISA.

expression plasmids in *E. coli* encoding the signal peptide of the bacteriocin divergicin A fused to the structural genes of either brochocin A and brochocin B (McCormick et al., 1998) or colicin V (McCormick et al., 1999), under the control of constitutive promoters.

However, when plasmids pJG01 and pJG02 were used as templates for in vitro transcription/translation reactions, none of the resulting mixtures displayed antimicrobial activity although EntP was present in the samples at concentrations above those required for measurable antimicrobial activity. Neither pJG03 produced translated products with antagonistic activity. This situation contrasts with previous results in which enterocins L50 (L50A and L50B), two bacteriocins with no hydrophobic N-terminal extensions nor intrachain disulfide bridges, were synthesized by combined transcription/translation reactions and the products containing both peptides exhibited antimicrobial activity (Cintas et al., 1998). Most probably, the in vitro translation system is unable to form intramolecular disulfide bonds to produce a biologically active EntP. Thus, the possibilities of using plasmids pJG01, pJG02 and pJG03 for larger in vitro production of EntP using automated translation systems such as the Rapid Translation System RT 500 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for cell-free protein expression were truncated.

Target genes in plasmids pJG01 and pJG02 were fully expressed by transforming the host *E. coli* Tuner(DE3)pLacI, allowing a dose-dependent IPTG induction of target proteins throughout the culture. The 27-amino acid hydrophobic N-terminal extension of preenterocin P contains a Val-Asp-Ala (positions -3 to -1) cleavage site, and may act as a signal peptide that accesses the *sec*-dependent pathway of the host and does not require a dedicated secretion machinery for export of EntP (von Heijne and Abrahmsen, 1989; Håvarstein et al., 1995; Worobo et al., 1995; Cintas et al., 1997). However, the induction of *E. coli* Tuner(DE3)pLacI cells, either containing pJG01 or pJG02 with 1 mM IPTG indicates that the amount of EntP in the supernatant and cellular compartments of both recombinant cultures is low in relation to the total cellular protein. The low production of EntP may be a response to subtle differences between N-terminal signal peptides. It may also be hypothesized that precursors may be

trapped in the cytoplasm because the *sec* machinery is unable to keep pace with fusion protein synthesis under inducing conditions (Miller et al., 1998). Although the central components of the main protein secretion system (Sec system) of gram-negative and gram-positive bacteria show a high degree of conservation, several differences have been identified (van Wely et al., 2001). Alternatively, it is possible that the *Enterococcus* transcription and translation signals may not be proficiently read in the *E. coli* environment. Production of EntP in the transformed *E. coli* Tuner(DE3)pLacI cells also indicated that the amount of total cellular protein is inversely related to the concentration of the inducer, implying that the rate of growth of the cells declined as the concentration of the inducer increased. Thus, induction of synthesis of EntP seems to be toxic to the cells, which is not surprising since the intracellular production of components of the nisin specialized secretion machinery (Fath and Kolter, 1993) and the accumulation of other bacterial integral membrane proteins (Miller et al., 1993), have been shown to interfere with *E. coli* growth and viability when overexpressed (Miller et al., 1998).

The use of anti-peptide antibodies of predetermined specificity for EntP and an NCI-ELISA in a plate format (Gutiérrez et al., 2004) has been shown crucial for detection and quantification of EntP in the supernatants and cellular compartments of the *E. coli* Tuner (DE3)pLacI cultures, containing plasmids pJG01 or pJG02. This has permitted to detect and quantify the EntP at concentrations below those required to show antimicrobial activity or under situations of impaired antagonistic activity in which the reduction conditions of the surrounding environment strongly disfavors intrachain disulfide bond formation, adequate protein folding and protein activity (Bessette et al., 1999; Cornelis, 2000). The use of anti-peptide antibodies also has been valuable for quantification of the co-production of enterocin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts (Martínez et al., 2000).

The EntP in the supernatants of the *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) cultures grown in the complex LB broth was recovered by a single-step immunoaffinity chromatography. Although the production of EntP in the supernatants of the *E. coli* recombinant cells is a 0.2% of the EntP produced by

E. faecium P13 in MRS broth, however, the recovery by immunoaffinity chromatography of EntP (1626 ng) produced by the *E. coli* host represents 116% of the optimal recovery of the EntP purified (about 1405 ng) by the same procedure from a culture supernatant of *E. faecium* P13 grown in MRS (Gutiérrez et al., 2004). Polyclonal antibodies and immunoabsorption chromatography strategies have been developed for purification of enterocin B in a single step (Rose et al., 2001), but higher amounts and better yields of pure bacteriocins have been attained by the use of immunoaffinity matrices coated with monoclonal antibodies with specificity for nisin A (Suárez et al., 1997) and nisin Z (Prioult et al., 2000; Benech et al., 2002). Thus, the construction of immunoaffinity columns with higher amounts of IgGs or monoclonal antibodies with specificity for EntP, would further improve the recovery of this bacteriocin from the *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) supernatants in a single step.

Since *E. coli* cells hold over other potential hosts for the heterologous production of bacteriocins the ability to grow in minimally defined media that could benefit the development of faster and simpler procedures for purification of EntP from cell-free culture supernatants, cultures of *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) were grown in M9 broth (Miller, 1977) and induced with IPTG for production and expression of EntP. Purification of EntP by a two-step hydrophobic adsorption and reverse-phase chromatographies, indicates that its purification originated two chromatographic fractions. The existence of multiple chromatographic peaks after purification of EntP and other bacteriocins such as nisin Z, pediocin PA-1 and carnobacteriocin BM1 has been ascribed to the co-existence after RP-FPLC of two peptide forms, oxidized and non-oxidized of the same bacteriocin (Gutiérrez et al., 2004). The results obtained suggest that although *E. coli* Tuner(DE3) (pJG01) cells produce in M9 a 0.07% of the EntP produced by *E. faecium* in MRS (about 8 mg l⁻¹), the recovery of EntP produced by *E. coli* by the use of a simplified two-step chromatography procedure (324 ng l⁻¹) is a 5.3% of the total EntP produced and almost 210-fold more effective than the purification of the EntP produced by *E. faecium* P13 using a multi-step chromatographic procedure (Gutiérrez et al., 2004).

The results described in this work indicate that fully biologically active EntP and immunologically reactive is present in the supernatant of the *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) cells. Moreover, EntP is produced, expressed and functional in absence of its putative immunity protein. Other bacteriocins have been also reported to become secreted via the general secretory pathway or *sec*-dependent system of *E. coli* (Zhang et al., 1995; Worobo et al., 1995; Biet et al., 1998; Miller et al., 1998). However, while the production of *sec*-dependent bacteriocins in *E. coli* and other hosts is lower than expected (McCormick et al., 1998, 1999; Biet et al., 1998), the results of this work indicates that although production of EntP is low, its recovery from the supernatant of the producer *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) cells may be faster, easier and with high yields using a single-step immunoaffinity chromatography or a two-step hydrophobic adsorption and reverse-phase chromatographies (RP-FPLC). Although other bacteriocins such as acidocin B (Leer et al., 1995), bacteriocin 31 (Tomita et al., 1996), lactococcin 972 (Martínez et al., 1999), propionicin T1 (Faye et al., 2000), and enterolysin A (Nilsen et al., 2003) have been also described to contain an N-terminal extension which would be proteolytically cleaved concomitantly with export by the general secretory pathway, no reports have been published yet on their heterologous production and expression in other microbial hosts.

Finally, the presence of active enterocin P in the supernatant of *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) cells and its production in absence of its putative immunity protein permit to hypothesize that the small amount of genetic material required for independent EntP expression would be of interest for the development of vectors for multiple-bacteriocin expression for use in *E. coli* and/or LAB of interest in the food industry. With fusions between the signal peptide of EntP and the structural genes of other bacteriocins, it may be possible for selected hosts to secrete bacteriocins in the absence of specific immunity and specific proteins.

Acknowledgements

The authors wish to express their gratitude to K. Sletten (Department of Biochemistry, University of

Oslo, Norway) for helping in the amino acid sequencing of enterocin P. This work was partially supported by grants 07G/0026/2000 from the Comunidad de Madrid, Spain, and AGL2000-0707 AGL2003-01508 from the Ministerio de Educación y Cultura, Spain. J. Gutiérrez is recipient of a fellowship from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT), Spain. R. Criado and M. Martín hold a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD), Spain. R. Citti is recipient of a fellowship from the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela, Caracas.

References

- Anderson, D.G., McKay, L.L., 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 549–552.
- Benech, R.O., Kheadr, E.E., Laridi, R., Lacroix, C., Fliss, I., 2002. Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3683–3690.
- Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J., Georgiou, G., 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13703–13708.
- 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.
- 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.M., Casaus, P., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F., Håvarstein, L.S., 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180, 1988–1994.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, 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.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Nes, I.F., Hernández, P.E., 2001. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* 7, 281–305.
- 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.
- Cornelis, P., 2000. Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 450–454.
- De Vuyst, L., Foulquié Moreno, M.R., Revets, H., 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 299–318.
- 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.
- Eijssink, V.G.H., Axelsson, L., Diep, D.B., Håvarstein, 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.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A., 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 85–106.
- Fath, M.J., Kolter, R., 1993. ABC-transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* 57, 995–1017.
- Faye, T., Langsrud, T., Nes, I.F., Holo, H., 2000. Biochemical and genetic characterization of propionin T1, a new bacteriocin from *Propionibacterium thoenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4230–4236.
- Foulquié Moreno, M.R., Callewaert, R., Devreese, B., Van Beeumen, J., De Vuyst, L., 2003. Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.* 94, 214–229.
- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, 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., Holzapfel, W.M., 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4385–4389.
- Franz, C.M.A.P., Grube, A., Herrmann, A., Abriouel, H., Starke, J., Lombardi, A., Tauscher, B., Holzapfel, W.H., 2002. Biochemical and genetic characterization of the two-peptide bacteriocin enterocin 1071 produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2550–2554.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H., 2003. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 105–122.
- Gutiérrez, J., Criado, R., Citti, R., Martín, M., Herranz, C., Fernández, M.F., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2004. Performance and applications of polyclonal anti-peptide antibodies with specificity for the enterococcal bacteriocin enterocin P. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2247–2255.
- 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.
- 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.
- Herranz, C., Mukhopadhyay, S., Casaus, P., Martínez, J.M., Rodríguez, J.M., Nes, I.F., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 1999. Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains isolated from fermented sausages. *Curr. Microbiol.* 39, 282–290.

- Herranz, C., Chen, Y., Cintas, L.M., Hernández, P.E., Montville, T.J., Chikindas, M.L., 2001a. Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1689–1692.
- Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., Moll, G.N., Driessen, A.J.M., 2001b. Enterocin P causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 901–904.
- Hickey, R.M., Twomey, D.P., Ross, R.P., Hill, C., 2003. Production of enterolysin A by raw milk enterococcal isolate producing multiple virulence factors. *Microbiology* 149, 655–664.
- Jett, B.D., Huycke, M.M., Gilmore, M.S., 1994. Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 462–478.
- Kawamoto, S., Shima, S., Sato, R., Eguchi, T., Ohmomo, S., Sameshima, T., 2002. Biochemical and genetic characterization of mundtucin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7973. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3830–3840.
- Leer, J.R., van der Voosen, J.M.B.M., van Gieze, M., van Noor, J.M., Pouwels, P.H., 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* 141, 1629–1635.
- Mareková, M., Lauková, A., De Vuyst, L., Skaugen, M., Nes, I.F., 2003. Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13. *J. Appl. Microbiol.* 94, 523–530.
- Martínez, B., Fernández, M., Suárez, J.E., Rodríguez, A., 1999. Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiology* 145, 3155–3161.
- 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.
- McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C., 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 285–308.
- McCormick, J.K., Poon, A., Sailer, M., Gao, Y., Roy, K.L., McMullen, L.M., Vederas, J.C., Stiles, M.E., van Belkum, M.J., 1998. Genetic characterization and heterologous expression of brochocin-C, and antibotulinal two-peptide bacteriocin produced by *Brochothrix campestris* ATCC 43754. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4757–4766.
- McCormick, J.K., Klaenhammer, T.R., Stiles, M.E., 1999. Colicin V can be produced by lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 37–41.
- Miller, J.H., 1977. Appendix 1: formulas and recipes. In: Miller, J.H. (Ed.), *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 431–432.
- Miller, K.W., Konen, P.L., Olson, J., Ratanavanich, K.M., 1993. Membrane protein topology determination by proteolysis of maltose binding protein fusions. *Anal. Biochem.* 215, 118–128.
- Miller, K.W., Schamber, R., Chen, Y., Ray, B., 1998. Production of active chimeric pediocin AcH in *Escherichia coli* in the absence of processing and secretion genes from the *Pediococcus pap* operon. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 14–20.
- Moreno, M.R.F., Leisner, J.J., Tee, L.K., Ley, C., Radú, S., Rusul, G., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., 2002. Microbial analysis of the Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Appl. Microbiol.* 92, 147–157.
- Morrison, D., Woodford, N., Cookon, B., 1997. Enterococci as emerging pathogens in humans. *J. Appl. Microbiol. (Suppl.)* 83, 89S–99S.
- Nes, I.F., Holo, H., 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* 55, 50–61.
- Nilsen, T., Nes, I.F., Holo, H., 2003. Enterolysin A, a cell-wall degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2975–2984.
- O’Sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C., 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84, 593–604.
- Prioult, G., Turcotte, C., Labarre, L., Lacroix, C., Fliss, I., 2000. Rapid purification of nisin Z using specific monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Int. Dairy J.* 10, 627–633.
- Riley, M.A., Wertz, J.E., 2002. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 117–137.
- Rose, N.L., Sporns, P., McMullen, L.M., 2001. Production of antibodies against enterocin B for immunological detection and purification purposes. *Food Agric. Immunol.* 13, 225–239.
- Shägger, H., Von Jagow, G., 1987. Tricine–sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range 1 to 100 KDa. *Anal. Biochem.* 166, 368–379.
- Shankar, N., Baghdayan, A.S., Gilmore, M.S., 2002. Modification of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 417, 746–750.
- Suárez, A.M., Azcona, J.I., Rodríguez, J.M., Sanz, B., Hernández, P.E., 1997. One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4990–4992.
- Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., Ike, Y., 1996. Cloning and characterization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-response conjugative plasmid pY117. *J. Bacteriol.* 178, 3585–3593.
- van Wely, K.H.M., Swaving, J., Freudl, R., Driessen, A.J.M., 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 437–454.
- van Heijne, G., Abrahmsen, L., 1989. Species-specific variations in signal peptide design: implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett.* 244, 439–446.
- Worobo, R.W., van Belkum, M.J., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E., 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.* 177, 3143–3149.
- Zhang, L.H., Fath, M.J., Mahanty, H.K., Tai, P.C., Kolter, R., 1995. Genetic analysis of colicin V secretion pathway. *Genetics* 141, 25–32.

V. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA
DE LA ENTEROCINA P EN
Methylobacterium extorquens

Artículo enviado al *FEMS Microbiology
Letters* para su evaluación

1
2
3
4
5 **Heterologous production of enterocin P from *Enterococcus faecium***
6 **P13 in the methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens***
7
8
9

10
11
12 **Jorge Gutiérrez ^a, Denis Bourque ^b, Raquel Criado ^a, Young J. Choi ^b, Luis M.**
13 **Cintas ^a, Pablo E. Hernández ^{a,*}, Carlos B. Míguez ^b**
14
15
16

17
18
19
20
21 ^a *Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de*
22 *Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain*
23
24

25
26
27 ^b *Microbial and Enzyme Technology Group, Bioprocess Sector, Biotechnology Research*
28 *Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Ave., Montréal,*
29 *Québec, Canada H4P 2R2*
30
31
32

33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43 * *Corresponding author.* Tel. +34 91 3943752; Fax: +34 91 3943743
44 *E-mail address:* ehernan@vet.ucm.es (Pablo. E. Hernández)
45
46
47

48
49
50
51
52 *Keywords:* enterocin P; General secretory pathway; heterologous gene expression;
53 *Methylobacterium extorquens*
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Enterocin P (EntP), a strong antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, was produced by *Methylobacterium extorquens*. For heterologous expression of EntP in the methylotrophic bacterium *M. extorquens*, a recombinant plasmid was constructed. The gene encoding the EntP structural gene (*entP*) was cloned into the plasmid vector pCM80, under control of the methanol dehydrogenase promoter (P_{mxhF}), to generate plasmid pS25. When *M. extorquens* ATCC55366 was transformed with pS25, EntP was detected and quantified in supernatants of the recombinant *M. extorquens* S25 strain by using specific anti-EntP antibodies and a non-competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA). Purification of EntP by hydrophobic adsorption and reverse-phase (RP-FPLC) chromatographies, permitted recovery of active EntP from the supernatants of *M. extorquens* S25 grown in a synthetic defined medium.

1. Introduction

Most bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) are ribosomally synthesized as biologically inactive precursors or pre-peptides containing an N-terminal extension. The mature peptides are often cationic, amphiphilic membrane permeabilizing molecules of 20 to 60 amino acid residues classified into three main groups: Class I consists of modified bacteriocins, the lantibiotics, Class II is comprised of non-modified, heat-stable bacteriocins, which are divided into subclasses IIa (pediocin-like, strong antilisterial bacteriocins), IIb (two-peptide bacteriocins) and IIc (other peptide bacteriocins). Class III consists of the protein bacteriocins [1-3]. N-terminal extensions of lantibiotics and most non-lantibiotics are of the so-called double-glycine type (leader sequence) and are cleaved off concomitantly with export across the cytoplasmic membrane by specific ATP-binding cassette transporters (ABC-transporters) and their accessory proteins [4,5]. However, some class II bacteriocins, such as acidocin B [6], divergicin A [7], bacteriocin 31 [8], enterocin P [9], and lactococcin 972 [10] contain an N-terminal extension of the so-called *sec*-type (signal peptide), which could be proteolytically cleaved and externalized by the general secretory pathway (GSP) or *sec*-dependent pathway [11-13].

Enterocin P (EntP) is a bactericidal pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13 isolated from Spanish dry-fermented sausages [9], and by other *E. faecium* strains of diverse origin [14-16]. EntP is synthesized as a 71-amino acid pre-peptide consisting of a 44-amino acid mature bacteriocin and a 27-amino acid signal peptide. The mature EntP shows a broad antimicrobial spectrum against *Listeria monocytogenes* and a wide range of spoilage and food-borne gram-positive pathogenic bacteria [9], suggesting its potential application as a natural food antimicrobial agent in the food industry. However, the use of enterococci as producers of bacteriocins may be cautioned since many *Enterococcus* isolates code potential virulence factors [17-19]. Accordingly, the cloning and production of bacteriocins produced by enterococci in safer heterologous hosts should be evaluated. A novel expression platform using *M. extorquens* ATCC 55366 as a host capable of over expressing recombinant proteins in high cell density fermentations using methanol as the sole source of organic carbon and energy has been recently described [20-23]. Contributing factors to the development of the *M. extorquens* expression systems are: (i), the inexpensive carbon (methanol)

1
2
3 source (<http://www.methanex.com>) and a synthetic defined medium [24] (Bourque et al.,
4 1992), (ii) the development of a high cell density fermentation process [22,24]; (iii), the
5 availability of the partial genome sequence of *M. extorquens* AM1
6 (<http://www.integratedgenomics.com/genomere-leases.html>), and the development and
7 availability of genetic tools and expression vectors [20,23,25]. We report in this
8 communication the cloning and production of EntP by *M. extorquens*.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids, and growth conditions

The EntP-producing strain *E. faecium* P13 [9] and the indicator strain *E. faecium* T136 [26] were grown in MRS broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 32°C. Plasmid pCR2.1-TOPO and competent *Escherichia coli* TOP-10 One Shot® Electrocomp™ cells, were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Plasmid pCM80 was kindly provided by Dr. M. Lidstrom (Microbiology Department, University of Washington, WA, USA). The *E. coli* Tuner(DE3) pLacI (pETBlue-1) and *E. coli* Tuner (DE3)pLacI (pJG01) cells, were obtained as previously described [27]. The *E. coli* cells were propagated in Luria-Bertani (LB) broth at 37°C, while *M. extorquens* ATCC 55366 [24] was grown at 30°C in the synthetic CHOI-medium containing methanol (0.5% v/v) [28]. Agar plates were made by the addition of 1,5% (w/v) agar to the broth media. The following selective agents were used: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal, 80 μg ml⁻¹), glucose (1% w/v), kanamycin (kan, 50 μg.ml⁻¹) and/or tetracycline (tet, 20 μg.ml⁻¹), all from Sigma Chemical Co., (St Louis, MO, USA). Competent *M. extorquens* cells were obtained and transformed as described by Figueira et al. [20].

2.2. Construction of the recombinant plasmid pS25

Total genomic DNA from *E. faecium* P13 was isolated using the Genomic DNA Isolation Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and was used as template for PCR amplification of a 247-bp *Bam*HI-*Kpn*I fragment (S19) carrying *entP* and its Ribosome Binding Site (RBS), using S1Up-Bam (5'-GGGATCCAAGGAGGTATTGATTTATGAGAA-3') and S1Dn-Kpn (5'-CCGGTACCTTAATGTCCCATACCTGCC AAA-3') as specific PCR primers. The forward primer, S1Up-Bam, contained a *Bam*HI cleavage site (nucleotides underlined in primer above), while the reverse primer, S1Dn-Kpn, included a *Kpn*I cleavage site (nucleotides underlined in primer above). The PCR-amplified S19 fragment was cloned into pCR2.1-TOPO to generate plasmid pS19, and competent *E. coli* TOP-10 cells were chemically transformed with this recombinant plasmid. Plasmid pS19 was isolated from transformed cells using a QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany), and digested with *Bam*HI and *Kpn*I (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA). The resulting 242-bp *Bam*HI-*Kpn*I cleaved fragment (insert S25) was recovered from agarose gels with a QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) and ligated (T4DNA ligase;

1
2
3 New England BioLabs; Beverley, MA, USA) into plasmid pCM80 [25], previously
4 digested with *Bam*HI and *Kpn*l, to generate plasmid pS25. Competent *E. coli* TOP-10
5 cells transformed with pS25 were assayed for its direct antimicrobial activity. Competent
6 *M. extorquens* ATCC55366 cells were also transformed with pS25, and the presence of
7 pS25 in the *M. extorquens* S25 isolate was confirmed by a direct antimicrobial test and
8 PCR-amplification using the *entP* specific primers S1Up-Bam and S1Dn-Kpn and the
9 pCM80 specific primers pLAC_F (5'-GCTTTACTTTATGCTTCCG-3') and lac_Z_R (5'-
10 GCTTTACTTTATGCTTCCG-3'). Primers used for amplification of the inserts were
11 designed from the published nucleotide sequence of the EntP operon [9] and pCM80
12 [25], and were obtained from Hukabel Scientific Ltd. (Montréal, Québec, Canada). PCR-
13 amplification of the inserts was performed in 100 µl reaction mixtures using 1 µl of
14 purified DNA, 70 pmol of each primer and 5 U of *Taq*[®] DNA polymerase (Amersham
15 Biosciences), and the PCR conditions included a hot start at 94°C (5 min), primer
16 annealing at 50°C (30 s), primer elongation at 72°C (30 s), and denaturation at 94°C (30
17 s). Amplification reactions (35 cycles) and a final extension at 72°C for 7 min were
18 carried out in a GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA,
19 USA). PCR fragments were analyzed by electrophoresis on 2% (w/v) agarose gels at
20 90 V for 1 h, using the 100-bp DNA ladder (Gibco-BRL, Life Technologies Inc., Grand
21 Island, NY, USA) as a molecular weight marker.

2.3. Antimicrobial activity assays

22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41 The antimicrobial activity of *E. coli* and *M. extorquens* cells was assayed by a stab-
42 on-agar test, as previously described [15]. Briefly, the *E. coli* isolates were stabbed onto
43 LB plates containing glucose (1% w/v) and incubated at 37°C for 6 h to initiate bacterial
44 growth and bacteriocin production, and the *M. extorquens* isolates were developed on
45 CHOI plates at 30°C for 36 h. Then, 15 ml of MRS soft agar (0.8% agar) containing
46 about 10⁵ cfu ml⁻¹ of the indicator *E. faecium* T136 were poured over the plates.
47 Following incubation at 32°C for 18 h, the plates were examined for growth inhibition
48 zones. Cell-free culture supernatants from *E. faecium*, *E. coli* and *M. extorquens* cells
49 were obtained by centrifugation of cultures at 12,000 *g* for 10 min at 4°C, adjusted to pH
50 6.2 with 1 M NaOH, filtered through 0,22 µm-pore-size-filters (Millipore Corp., Bedford,
51 MA, USA) and stored at -20°C until use. The antimicrobial activity of supernatants, and
52 fractions obtained during purification of EntP was evaluated by an agar well diffusion
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 test (ADT) as previously described [15], using *E. faecium* T136 as the indicator
4 microorganism.
5
6
7

8 9 2.4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

10 Polyclonal antibodies with specificity for EntP and a non-competitive indirect ELISA
11 (NCI-ELISA), used as previously described [29], were employed to detect and quantify
12 production of EntP by *M. extorquens* S25. Briefly, wells of flat-bottom polystyrene
13 microtitre plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight (4 °C)
14 with pure EntP or supernatants of *M. extorquens* S25. After coating, wells were blocked
15 and then washed. Next, diluted anti-P3-KLH (C-terminal epitope EntP) serum was
16 added to each well, unbound antibodies were removed by washing, and goat anti-rabbit
17 IgG peroxidase conjugate (Cappel Laboratories, West Chester, PA, USA) was added.
18 Bound peroxidase was determined with ABTS (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-
19 sulfonic acid], Sigma) as the substrate by measuring the absorbance of the wells at 405
20 nm with a Labsystems iEMS reader (Helsinki, Finland). Known concentrations of EntP
21 in MRS and CHOI were used to construct standard curves.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 2.5. Purification of enterocin P, protein electrophoresis and Western blotting

35 Ent P was purified from *E. faecium* P13 as previously described [29]. Briefly,
36 supernatants from 1-liter cultures were subjected to precipitation with ammonium
37 sulfate, desalting by gel filtration and further subjected to cation-exchange and
38 hydrophobic-interaction chromatography, followed by reverse-phase chromatography in
39 a FPLC system (RP-FPLC). The purification of the EntP produced by *M. extorquens*
40 S25 was achieved from a 1-liter culture grown in CHOI at 30°C with shaking for 48 h.
41 Cells were removed by centrifugation at 12,000 *g* for 10 min at 4°C, and the supernatant
42 filtered through 0,22 µm-pore-size-filters (Millipore). Then, 50 g (5% [w/v]) of Amberlite
43 XAD-16 (Sigma) was added to the supernatant, and the sample kept at 4°C with stirring
44 for 2 h. The sample was loaded into an econo-column chromatography support (Bio-
45 Rad) and, when the supernatant drained off, the matrix was washed with 100 ml distilled
46 water in the first step and with 75 ml of 40% ethanol in water (v/v) later, to remove weak
47 or non-hydrophobic compounds. The adsorbed bacteriocin was eluted with 200 ml of
48 85% 2-propanol pH 2.0 in water (v/v) and the remaining 2-propanol was eliminated by
49 mild heating (35-40°C) of the sample in a rotavapor (Büchi, Switzerland). After addition
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) to the sample, the antimicrobial activity was further
4 subjected to reverse-phase chromatography in a C₂ to C₁₈ column (PepRPC HR 5/5)
5 integrated in a FPLC system (RP-FPLC). The bacteriocin was eluted from the column
6 with a 55 min linear gradient of 20 to 35% 2-propanol in aqueous 0.1% TFA at a flow
7 rate of 0.5 ml min⁻¹. Purified EntP was stored in 60% 2-propanol with 0.1% TFA at -
8 20°C. Pure enterocin Q, pediocin PA-1, and EntP from *E. faecium* P13 and *M.*
9 *extorquens* S25 were subjected to Tricine-SDS-PAGE, as described by Shägger and
10 Von Jagow [30]. Protein electrophoresis was performed on Novex 16% Tricine gels in a
11 XCell *SureLock* Mini-Cell at 80 V constant current. Gels were blotted onto a PVDF
12 membrane, and the Western blotting completed as previously described [29].
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

3. Results

3.1. Heterologous production of EntP by *M. extorquens*.

A 242-bp *Bam*HI-*Kpn*I cleaved fragment (S25), carrying the structural EntP gene (*entP*) and its ribosome binding site (RBS) from *E. faecium* P13, was cloned into plasmid pCM80 resulting in the recombinant plasmid pS25 (**Figure 1**). *E. coli* TOP-10 colonies transformed with pS25 produced biologically active EntP, as evidenced by halos of inhibition against *E. faecium* T136 by the stab-on-agar test (**Figure 2**). However, when competent *M. extorquens* ATCC55366 were transformed with pS25, colonies of the recombinant *M. extorquens* S25 host did not show antimicrobial activity against *E. faecium* T136. To evaluate production of EntP under control of the $P_{\max F}$ promoter, *M. extorquens* S25 cells were grown in the CHOI medium at 30°C for 72 h, and production of EntP in the culture supernatants was measured by specific anti-EntP antibodies and a NCI-ELISA. As shown in **Figure 3** production of EntP by *M. extorquens* S25 was apparent after 36 h of growth, reached its maximum after 48 h and remained stable after 72 h of growth. Moreover, growth kinetic parameters were not affected by production of EntP in *M. extorquens* S25 as compared to *M. extorquens* (pCM80) (results not shown). Strikingly, production of EntP by *M. extorquens* S25 could not be detected in supernatants of *M. extorquens* S25 by using an antimicrobial activity assay (ADT) with *E. faecium* T136 as the indicator microorganism.

3.2. Purification of enterocin P and Western blotting

The recombinant EntP produced by *M. extorquens* S25 was further purified by hydrophobic adsorption and reverse-phase (RP-FPLC) chromatographies. The purification process permitted recovery of an 0.8 ml-fraction containing, as determined by NCI-ELISA, 160 ng of EntP in 40% 2-propanol, which represents a 0.1% of the bacteriocin initially determined in the cell-free culture supernatant. Most importantly, as shown in **Figure 4**, the heterologously EntP produced by *M. extorquens* S25 showed antimicrobial activity against *E. faecium* T136. Western blotting results of purified EntQ, pediocin PA-1 and EntP produced by *E. faecium* P13 and *M. extorquens* S25 shows (**Figure 5**), that the anti-EntP antibodies only recognizes reactive antigenic bands in lanes corresponding to purified EntP from both microorganisms, and that such bacteriocin shows a great tendency to form aggregates.

4. Discussion

Bacteriocins produced by LAB have received increased scrutiny over the past few years due to their potential use as food preservatives [31,32]. In order for the application of bacteriocins to be economically viable, certain concerns must be addressed, namely product yield, production costs and ease of scale up. Attempts to increase product yield through the development of expression systems, mostly for food-grade LAB have been investigated [33]. However, low production yields of recombinant bacteriocins by LAB have been the norm rather than the exception. The pink facultative methylotrophic bacteria, *M. extorquens*, has been developed for its potential as an expression system of recombinant proteins in high cell density fermentation. Recombinant green fluorescent protein (GFP), the *Lactobacillus casei* esterase, the *Bifidobacterium infantis* β -galactosidase, and the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin have been produced by *M. extorquens* at yields ranging from milligrams to grams per litre [22,23].

The heterologous production of EntP by *M. extorquens* S25, a transformed derivative of *M. extorquens* ATCC 56366 with the recombinant plasmid pS25, was determined by using specific anti-EntP antibodies and a NCI-ELISA. The maximum amount of EntP in the supernatants of *M. extorquens* S25 was 155 ng ml^{-1} (Figure 3), which represents, approximately, a 2% of the EntP produced by *E. faecium* P13 in MRS (7.5 to $8.0 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$). Despite of this, the production of EntP by *M. extorquens* S25 constitutes a 25-fold increase respect to the EntP produced by *E. coli* Tuner(DE3)placI (pJG01), under the control of the inducible T7 promoter [27]. Moreover, in contrast to the toxicity produced by synthesis of EntP in the recombinant *E. coli* cells [27], the growth profile of the *M. extorquens* S25 remained unchanged as compared to the wild type (untransformed) culture. Biomass yield (dry weight/ methanol substrate consumed) and maximum specific growth rates of recombinant *M. extorquens* remained essentially unaffected by production of EntP (results not shown). The EntP was also produced by *M. extorquens* S25 in absence of its putative immunity protein. Consequently, *M. extorquens* S25 may be employed as alternative host for production and secretion of EntP. Nevertheless, contrary to the situation with the EntP produced by *E. coli* [27], the EntP produced by *M. extorquens* S25 was not biologically active in the supernatant of the producing cells.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Purification of EntP from the supernatant of *M. extorquens* S25 permitted recovery of 160 ng of EntP, which represents a 0.1% of the bacteriocin initially present in the culture supernatants. This purification protocol permits a higher recovery of the EntP produced by *M. extorquens* S25 than from *E. faecium* P13 (0.01-0.02%) [27], although lower than the 13.3% recovery of the EntP produced by *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) [29]. Most importantly, the EntP purified from *M. extorquens* S25 was biologically active (**Figure 4**). The absence of EntP active in the supernatants of *M. extorquens* S25 may be due to the formation of inactive aggregates or to the existence of compounds in the growth media interfering with bacteriocin activity. Salt inhibition has been already reported to reduce the inhibitory activity of antimicrobial peptides, including nisin [34]. Western blotting of pure pediocin PA-1, enterocin Q, and EntP with anti-EntP antibodies (**Figure 5**), suggests that EntP is a hydrophobic bacteriocin with a strong tendency to form aggregates and, although the molecular structure of such aggregates is not yet known, their formation would reduce the biological activity of EntP.

The heterologous expression system developed in this work has permitted production of EntP by the Gram-negative methylotrophic bacterium *M. extorquens*, presumably through the involvement of the heterologous host *sec*-dependent pathway. Moreover, EntP purified from *M. extorquens* S25 was biologically active. However, the low production of EntP in Gram-negative bacteria, such as *E. coli* and *M. extorquens*, as compared to the Gram-positive bacterium *E. faecium* may respond to several factors: (i) N-terminal signal peptides and other components of the General Secretory Pathway (GSP) in Gram-negative bacteria may differ from that of the Gram-positive bacteria; (ii) differences in codon usage, stability and translational efficiency of the mRNA; (3) in contrast to Gram-negative bacteria, secreted proteins of Gram-positive bacteria only need to traverse a single membrane to enter the extracellular environment; and (4), rapid degradation of secreted recombinant proteins by cell proteases. Nevertheless, the ability of this *M. extorquens* S25 to grow and produce EntP in an economical and simple medium facilitates purification of this bacteriocin for its use as a natural preservative in the food industry. Moreover, the production of EntP by *M. extorquens* S25 might permit the heterologous production in this host of other bacteriocins, peptides and proteins of interest, by fusing their structural genes to the nucleotide fragment encoding the EntP signal peptide.

Acknowledgements

This work was partially supported by grants 07G/0026/2000 from the Comunidad de Madrid, and grants AGL2000-0707 and AGL2003-01508 from the Ministerio de Educación y Cultura, Spain. J. Gutiérrez is recipient of a fellowship from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT), and R. Criado holds a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD), Spain. We thank L. Beaulieu for helpful discussions.

References

- [1] Nes, I.F. and Holo, H. (2000) Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* 55, 50-61.
- [2] Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Nes, I.F. and Hernández, P.E. (2001) Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int.* 7, 281-305.
- [3] Eijsink, V.G.H., Axelsson, L., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Holo, H. and 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.
- [4] Håvarstein, L.S., Diep, D.B. and 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.
- [5] Sahl, H.G., Jack, R.W. and Bierbaum, G. (1995) Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique postranslational modifications. *European J. Biochem.* 230, 827-853.
- [6] Leer, J.R., van der Vossen, J.M.B.M., van Gieze, M., van Noort, J.M. and Pouwels, P.H. (1995) Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol.* 141, 1629-1635.
- [7] Worobo, R.W., Van Belkum, M.J., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. (1995) A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.* 177(11), 3143-3149.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- [8] Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K. and 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.
- [9] Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E. and 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.
- [10] Martínez, B., Fernández, M., Suárez, J.E. and Rodríguez, A. (1999) Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiol.* 145, 3155-3161.
- [11] Pugsley, A.P. (1993) The complete General Secretory Pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57, 50-108.
- [12] Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J.D., Bron, S. and van Dijk, J.M. (2000) Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 515-547.
- [13] Van Wely, K.H.M., Swaving, J., Freudl, R. And Driessen, A.J.M. (2001) Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 437-454.
- [14] Herranz, C., Mukhopadhyay, S., Casaus, P., Martínez, J.M., Rodríguez, J.M., Nes, I.F., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (1999) Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains isolated from fermented sausages. *Curr. Microbiol.* 39, 282-290.
- [15] Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E. and 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.
- [16] Foulquie Moreno, M.R., Callewaert, R., Devreese, B., Van Beeumen, J. and de Vuyst, L. (2003) Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.* 94, 214-29.
- [17] Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H. and Stiles, M.E. (1999) Enterococci at the crossroads of food safety?. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 1-24.

- 1
2
3 [18] Eaton, T.J. and Gasson, M.J. (2001) Molecular screening of *Enterococcus*
4 virulence determinants and potential for genetic exchange between food and
5 medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1628-1635.
6
7
8 [19] Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M.,
9 Swings, J. and Holzappel, W.M. (2001) Incidence of virulence factors and antibiotic
10 resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67,
11 4385-4389.
12
13
14 [20] Figueira, M.M., Laramée, L., Murrel, J.C., Groleau, D. and Míguez, C.B. (2000)
15 Production of green fluorescent protein by the methylotrophic *bacterium*
16 *Methylobacterium extorquens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 193: 195-200.
17
18 [21] Fitzgerald, K.A. and Lidstrom, M.E. (2003) Overexpression of a heterologous
19 protein, haloalkane dehalogenase, in a poly-beta-hydroxybutyrate-deficient strain
20 of the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1. *Biotechnol.*
21 *Bioeng.* 81(3),263-268.
22
23 [22] Bélanger, L., M. M. Figueira, D. Bourque, L. Morel, M. Béland L. Laramée, D.
24 Groleau, and C.B. Miguez. (2004) Production of heterologous protein by
25 *Methylobacterium extorquens* in high cell density fermentation. *FEMS Microbiol.*
26 *Lett.* 231:197-204.
27
28 [23] Choi, Y.J., Míguez, C.B. and Lee, B.H. (2004) Cloning, sequence analysis, and
29 heterologous expression of a novel esterase gene, *estI* from *Lactobacillus casei*
30 CL96 in methylotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3213-3221.
31
32 [24] Bourque, D., Ouellette, B., André, G. and Groleau, D. (1992) Production of poly- β -
33 hydroxybutyrate from methanol: characterization of a new isolate of
34 *Methylobacterium extorquens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 7-12.
35
36 [25] Marx, C. J. and Lidstrom, M. E. (2001) Development of improved versatile broad-
37 host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria.
38 *Microbiol.* 147, 2065-2075.
39
40 [26] Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E. and Holo, H.
41 (1997) Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can
42 act synergistically with enterocin A. *Microbiol.* 143, 2287-2294.
43
44 [27] Gutiérrez, J., Criado, R., Citti, R., Martín, M., Herranz, C., Nes, I.F., Cintas, L.M.
45 and Hernández, P.E. (2004) Cloning, production and functional expression of
46 enterocin P, a *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13,
47 in *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* (accepted for publication).
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- [28] Bourque, D., Pomerleau, Y. and Groleau, D. (1995) High cell density production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecular-mass PHB. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44, 367-376.
- [29] Gutiérrez, J., Criado, R., Citti, R., Martín, M., Herranz, C., Fernández, M.F., Cintas, L.M. and Hernández, P.E. (2004) Performance and applications of polyclonal anti-peptide antibodies specific for the enterococcal bacteriocin enterocin P. J. Agric. Food Chem. 52, 2247-2255.
- [30] Shägger, H. and Von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range 1 to 100 KDa. Anal. Biochem. 166, 368-379.
- [31] Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int. J. Food Microbiol. 71:1-20.
- [32] O'Sullivan, L., Ross, R.P. and Hill, C. (2002) Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie 84, 593-604.
- [33] Rodríguez, J.M., Martínez, M.I., Horn, N. and Dodd, H.M. (2002) Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 80, 101-116.
- [34] Zhang, H., Yoshida, S., Aizawa, T., Murakami, R., Suzuki, M., Koganezawa, N., Matsuura, A., Miyazawa, M., Kawano, K., Nitta, K. and Kato Y. (2000) *In vitro* antimicrobial properties of recombinant ASABF, an antimicrobial peptide isolated from the nematode *Ascaris suum*. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 2701-2705.

Figure legends

Figure 1. Construction of plasmid pS25, derived from pCM80, containing the EntP structural gene (*entP*) with its signal sequence and putative ribosome binding site (RBS). Size of plasmids are given in base pairs. Only relevant restriction enzyme sites are given. ColE1 ori, origin of replication of *E. coli*; oriV, oriT, *traJ'* and *trfA* are the minimal IncP replicon that allow an efficient transfer and replication in *M. extorquens*; *tetA* and *tetR* are associated to the tetracycline resistance; *Plac*, lactose promoter; *PmaxF*, methanol dehydrogenase promoter; and *lacZ*, β -galactosidase gene.

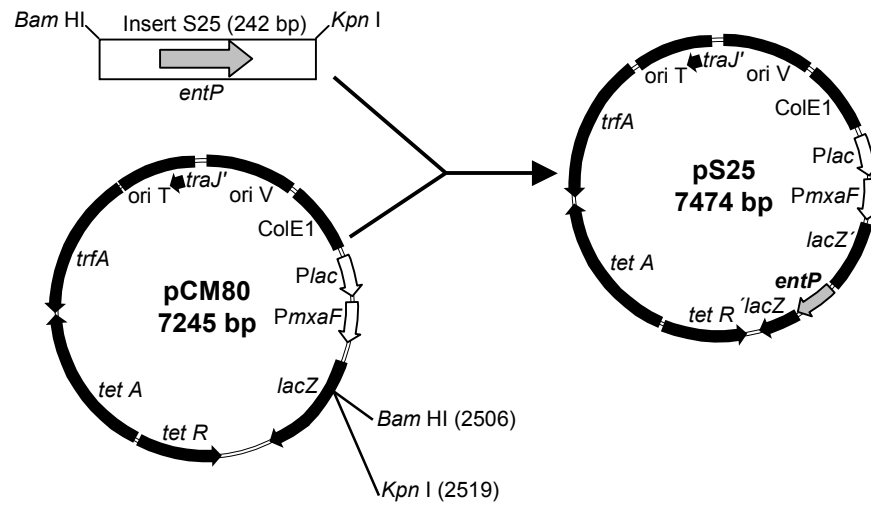
Figure 2. Antimicrobial activity of (1) *E. coli* TOP-10 (pS25) and (2) *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) by the stab-on-agar test, using *E. faecium* T136 as the indicator strain. The strains of (3) *E. coli* TOP-10 (pCM80) and (4) *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pETBlue-1) were used as negative controls.

Figure 3. Production of EntP during growth of *M. extorquens* S25 in CHOI at 30°C. Optical density at 600 nm (— Δ —). Production of EntP (— \circ —).

Figure 4. Antimicrobial activity by ADT of supernatants from *E. faecium* P13 containing: (1), 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and (2), 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of EntP; (3), a solution of 40% 2-propanol; (4), 0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of purified EntP produced by *M. extorquens* S25; (5), supernatant from *E. faecium* T136.

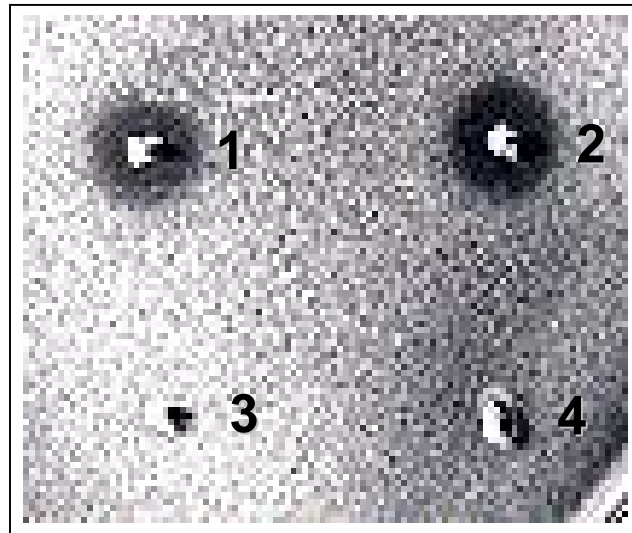
Figure 5. Western blotting with specific anti-EntP antibodies of: lane 1, 1 μg of pure pediocin PA-1; lane 2, 1 μg of pure enterocin Q; lane 3, 0.15 μg of purified enterocin P from *E. faecium* P13; and lane 4, 0.15 μg of purified enterocin P from *M. extorquens* S25. M, protein molecular weight marker with sizes in kDa indicated in the left margin.

Figure 1



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

Figure 2



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

Figure 3

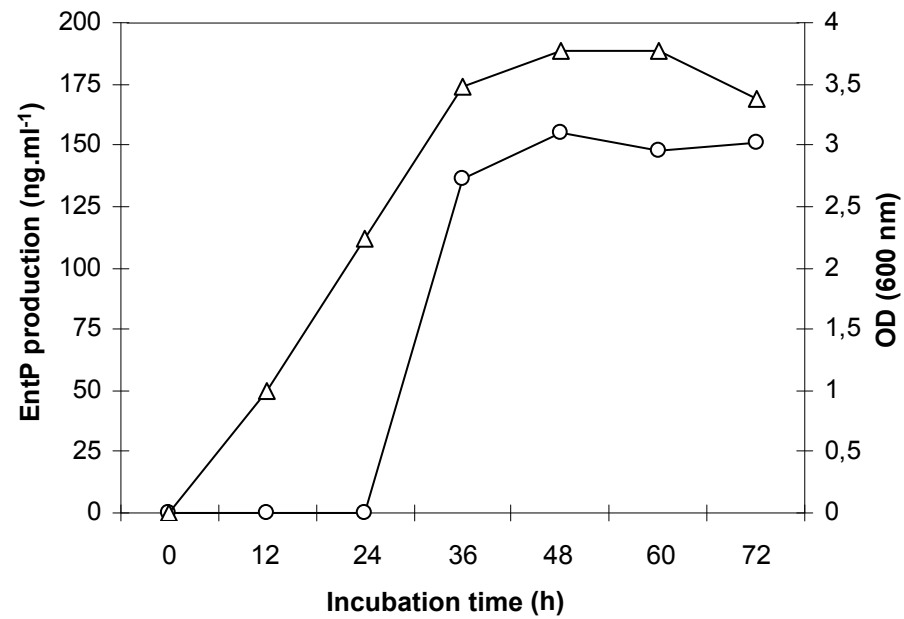
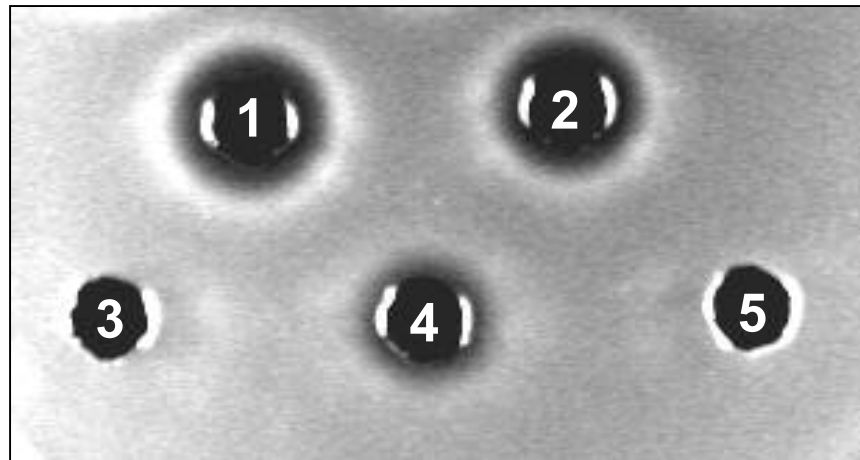
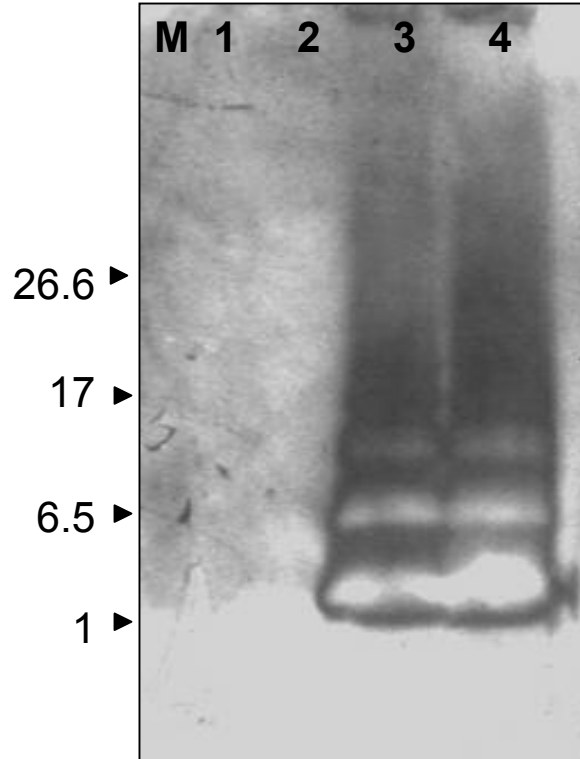


Figure 4



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

Figure 5



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

VI. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA
DE LA ENTEROCINA P EN
Lactococcus lactis

Artículo enviado al *Applied and
Environmental Microbiology* para su
evaluación

Date: Mon, 07 Feb 2005
From: bslinker@asmusa.org
Subject: Manuscript submission (AEM00283-05 Version 1)
To: ehernan@vet.ucm.es

Prof. PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA
Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid
Avda. Puerta de Hierro s/n
28040 Madrid
Spain

Re: High-level Heterologous Production and Functional Expression of the sec-dependent Enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis* (AEM00283-05 Version 1)

Dear Dr. HERNÁNDEZ:

You have successfully submitted your manuscript via the Rapid Review system. The control number of your manuscript is AEM00283-05 Version 1. Take note of this number, and refer to it in any correspondence with the Journals Department or with the editor. You may log onto the Rapid Review system at any time to see the current status of your manuscript and the name of the editor handling it. The URL is <http://www.rapidreview.com/ASM2/author.html>, and your user name is ehernan. To find contact information for the editor handling your manuscript, go to the following URL: <http://www.asm.org/journals/editors.asp>

In submitting your manuscript to Applied and Environmental Microbiology (AEM), the author(s) guarantees that a manuscript with substantially the same content has not been submitted or published elsewhere.

By publishing in the journal, the authors agree that any plasmids, viruses, and living materials such as microbial strains and cell lines newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes.

If your manuscript is accepted for publication, a condition of acceptance is that you assign copyright to the American Society for Microbiology. A copyright transfer agreement is sent with each letter of acceptance after the manuscript has been scheduled for publication.

If your manuscript is accepted for publication in a 2005 issue, page charges (subject to change without notice) will be assessed at \$65 per page for the first five pages and \$80 for each page in excess of five for a corresponding author who is an ASM member or \$75 per page for the first five pages and \$92 for each page in excess of five for a nonmember corresponding author. To obtain the member rate, a member corresponding author must include his 2005 member number on the reprint/page charge form that will be included with the proofs. To obtain the member rate, a nonmember corresponding author should complete the ASM membership application available online at <http://www.asm.org/MemberShip> and submit it and payment of the membership fee to ASM. If the research was not supported, you may send a request for a waiver of page charges to the Director, Journals, at the following address: Journals Department, American Society for Microbiology, 1752 N St., NW, Washington, DC 20036. The fax number is 1-202-942-9355. The

request must indicate how the work was financed and must be accompanied by copies of the title page and the Acknowledgments section of the paper.

Minireviews and Guest Commentaries are not subject to page charges.

Thank you for submitting your manuscript for consideration.

Barbara Slinker
Production Editor
Applied and Environmental Microbiology (AEM)

1
2 **High-level Heterologous Production and Functional Expression of**
3 **the sec-dependent Enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in**
4 ***Lactococcus lactis***

5
6
7 Jorge Gutiérrez,¹ Rasmus Larsen,² Luis M. Cintas,¹ Jan Kok,²
8 and Pablo E. Hernández^{1*}

9
10 *Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de*
11 *Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain,¹ and*
12 *Department of Genetics, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology*
13 *Institute, University of Groningen, 9751 AA Haren, The Netherlands²*

14
15
16
17
18
19
20
21 Running title: High-level heterologous production of enterocin P

22
23
24
25
26
27
28
29 Corresponding author: Mailing address: Departamento de Nutrición, Bromatología y
30 Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense,
31 28040 Madrid, Spain. Phone: +34-913943752. Fax: +34-913943743. E-mail:
32 ehernan@vet.ucm.es
33

34
35

ABSTRACT

1
2
3 Enterocin P (EntP), a *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13,
4 was produced by *Lactococcus lactis*. The enterocin P structural gene (*entP*) with or
5 without the putative EntP immunity gene (*entiP*) was cloned in (i), plasmid pMG36c
6 under control of the lactococcal constitutive promoter P₃₂, (ii) in plasmid pNG8048e
7 under control of the inducible *PrisA* promoter, and (iii) in the integration vector pINT29.
8 Introduction of the recombinant vectors in *L. lactis* resulted in production of biologically
9 active EntP in the supernatants of *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 and *L. lactis* subsp.
10 *cremoris* NZ9000, and the co-production of nisin A and EntP in *L. lactis* subsp. *lactis*
11 DPC5598. The level of production of EntP by the recombinant *L. lactis* strains,
12 detected and quantified by specific anti-EntP antibodies and a non-competitive indirect
13 enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA) depended on the host strain, the
14 expression vector, and the presence in the constructs of the *entiP* gene. A high
15 production of EntP was obtained in *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 but the highest
16 amount of EntP was produced with derivatives containing *entP* and *entiP*, for both *L.*
17 *lactis* IL1403 and *L. lactis* NZ9000. These derivatives produced up to 5 to 6-fold more
18 EntP than *E. faecium* P13. Purification of EntP from the supernatant of *L. lactis* IL1403
19 (pJP214) suggests that the bacteriocin has a strong tendency to form aggregates with
20 antimicrobial activity. Mass spectrometry analysis revealed that EntP purified from *L.*
21 *lactis* IL1403 (pJP214) has a molecular mass identical to that purified from *E. faecium*
22 P13, suggesting that the synthesis, processing and secretion of EntP proceeds
23 efficiently in recombinant *L. lactis* hosts.

24
25
26
27
28
29 **Keywords:** Enterocin P; heterologous expression; *Lactococcus lactis*; *sec*-dependent
30 secretion
31
32
33
34
35
36
37
38

INTRODUCTION

1
2
3 Bacteriocins are ribosomally-synthesized antimicrobial compounds produced by all
4 types of living organisms, including members of lactic acid bacteria (LAB), and
5 constitute the most abundant and diverse group of bacterial defense systems (18, 48).
6 Since certain bacteriocins produced by LAB inhibit not only closely related species but
7 also Gram-positive spoilage bacteria and food-borne pathogens, they attract
8 considerable interest for their potential use as natural and non-toxic food preservatives
9 (12, 51). LAB bacteriocins or bacteriocin-producing strains, either alone or in
10 combination with other antimicrobial barriers, may be useful tools for food
11 preservation, and the heterologous production of bacteriocins in different hosts could
12 lead to: (i), increased bacteriocin production (ii), production of bacteriocins in safer
13 hosts for their biotechnological use as natural antimicrobial agents (iii), construction of
14 multibacteriocinogenic strains with a wider antagonistic spectrum and better equipped
15 to prevent the emergence of bacteriocin-resistant bacteria (iv), better adaptation of the
16 selected hosts to food environments, and (v) providing antagonistic properties to LAB
17 already used as starter, protective or probiotic cultures.

18
19 Most bacteriocins from LAB are synthesized as biologically inactive precursors or
20 prepeptides containing an N-terminal extension. The mature peptides are often
21 cationic, amphiphilic, membrane-permeabilizing molecules of 20 to 60 amino acid
22 residues and are classified into three main groups. Class I consists of modified
23 bacteriocins, the lantibiotics. Class II is comprised of non-modified, heat-stable
24 bacteriocins, which are divided into subclasses IIa (pediocin-like, strong antilisterial
25 bacteriocins), IIb (two-peptide bacteriocins) and IIc (other peptide bacteriocins). Class
26 III consists of the protein bacteriocins (11, 18, 48). N-terminal extensions of most
27 lantibiotics and non-lantibiotics are of the so-called double-glycine type (leader
28 sequence) and are cleaved off concomitantly with export across the cytoplasmic
29 membrane by dedicated ATP-binding cassette transporters (ABC-transporters) and
30 their accessory proteins (29, 66). However, some class II bacteriocins, such as acidocin
31 B (41), divergicin A (67), bacteriocin 31 (59), enterocin P (8), lactocin 972 (42),
32 propionicin T1 (19), and enterolysin A (50) contain an N-terminal extension of the so-
33 called *sec*-type (signal peptide), which are proteolytically cleaved concomitantly with
34 bacteriocin externalization by the general secretory pathway (GSP) or *sec*-dependent

1 pathway (52, 64). Several bacteriocins produced by enterococci, such as enterocins
2 L50 (L50A and L50B), enterocin Q and enterocin EJ97 (9, 10, 55), have been shown
3 to be synthesized without an N-terminal leader sequence and may represent a new
4 class of bacteriocins with a novel secretion mechanism.

5
6 Among the LAB, the enterococci produce a diverse and heterogeneous group of
7 bacteriocins coined enterocins, which are mutually different with respect to their
8 antimicrobial activity, structure, processing and secretion (11, 22, 25, 37, 50). Since
9 enterocins may be produced by enterococcal species carrying antibiotic resistance
10 genes (36, 57) and/or genes coding for potential virulence factors (17, 24), interest in
11 the heterologous production and functional expression of enterocins in other bacterial
12 hosts is growing rapidly. In this context, the broad antimicrobial spectrum of enterocin
13 P (EntP) produced by *E. faecium* P13, a strain of food origin (8), could find potential
14 application in the food industry if the bacteriocin were produced by food grade LAB.
15 The EntP structural gene (*entP*) seems to be widespread in enterococci and has been
16 found in a number of *E. faecium* strains of different origins (10, 21, 30). EntP is
17 synthesized as a pre-peptide consisting of the 44-amino-acid mature bacteriocin and a
18 27-amino-acid signal peptide (8). EntP has been shown to dissipate the membrane
19 potential of energized cells and to form specific potassium ion-conducting pores in the
20 cytoplasmic membrane of target cells (31, 32). We report in this paper the cloning,
21 production, and functional expression of EntP using different lactococcal expression
22 vectors and derivatives of *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* as the
23 production hosts.

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. The LAB strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. Lactococcal strains were grown in M17 medium (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) supplemented with 0.5% (wt/vol) glucose (GM17) at 30°C. *E. faecium* P13 was used as the source of EntP (8), while *E. faecium* T136 (4) was used as the indicator strain for determination of the EntP antimicrobial activity. Both microorganisms were propagated in MRS broth (Oxoid Ltd.) at 32°C. Agar plates were made by the addition of 1,5% (wt/vol) agar to the broth media. Chloramphenicol (Cm) or erythromycin (Em) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was added to the cultures of *L. lactis* at 5 µg/ml.

Antimicrobial activity assays. Antimicrobial activity of individual colonies was examined by the stab-on-agar test, as previously described (10). Cell-free culture supernatants were obtained by centrifugation of cultures at 12,000 g at 4°C for 10 min. They were adjusted to pH 6.2 with 1 M NaOH, filtered through 0.2 µm pore-size filters (Whatman Int. Ltd., Maidstone, UK.), and stored at -20 °C until use. The antimicrobial activity of the supernatants was examined by an agar well diffusion test (ADT) and a microtitre plate assay (MPA), as previously described (10), using *E. faecium* T136 (sensitive to EntP) and *L. lactis* MG1363 (resistant to EntP) as the indicator microorganisms. With the MPA, growth inhibition of the sensitive culture was measured spectrophotometrically at 620 nm with a microtitre Labsystems iEMS plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). One bacteriocin unit (BU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the bacteriocin causing 50% growth inhibition (50% of the turbidity of the control culture without bacteriocin). Recombinant cultures of *L. lactis* NZ9000 were induced for production of EntP when they had reached an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.5, using as the inducer either a 4x10⁻³-fold diluted supernatant of *L. lactis* BB24 (NisA producer) or nisin Z purified to homogeneity from *L. lactis* NIZO 22186 (15), both at 10 ng per ml.

Basic genetic techniques and enzymes. Total genomic DNA from *E. faecium* P13 was isolated using the Wizard[®] DNA Purification Kit (Promega, Madrid, Spain). Plasmid DNA from the *L. lactis* strains was obtained using the the High Pure Plasmids Isolation kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), as suggested by

1 the manufacturer but with the *L. lactis* cells previously suspended in solution A (3) with
2 lysozyme (10 mg/ml) and incubated at 55°C for 10 min, before following the kit
3 instructions. All DNA-modifying enzymes were obtained from New England BioLabs
4 (Beverly, MA, USA) or Roche Molecular Biochemicals and used as recommended by
5 the supplier. Ligations were performed with the T4 DNA ligase (Roche Molecular
6 Biochemicals). The *L. lactis* cells were transformed according to the method of Holo
7 and Nes (33), with a Gene Pulser™ and Pulse Controller apparatus (Bio-Rad
8 Laboratories, Hercules, CA, USA)

9
10 **Recombinant plasmids derived from pMG36c.** The primers and inserts used for
11 construction of the recombinant plasmids are listed in Table 2. Derivatives of plasmid
12 pMG36c were constructed as follows: primers LJ-1 and LJ-2 were used for PCR-
13 amplification from total genomic DNA of *E. faecium* P13 of a 261-bp *SacI-HindIII*
14 fragment (insert JP) containing the P₃₂ ribosome binding site (RBS) and the *entP*
15 gene. Primers LJ-1 and LJ-3 were used for PCR-amplification from the same DNA
16 target of a 533-bp *SacI-HindIII* fragment (insert JPi), containing the P₃₂ RBS and the
17 *entP* and *entiP* genes. Fragments JP and JPi were digested with the indicated
18 restriction enzymes and inserted in pMG36c cut with the same enzymes. The ligation
19 mixtures were used to transform *L. lactis* IL1403. The proper clones, pJP26 and
20 pJP24, respectively, were checked by bacteriogenicity tests, PCR and sequencing of
21 the inserts.

22
23 **Recombinant plasmids derived from pNG8048e.** To construct the recombinant
24 plasmids derived from pNG8048e, the purified pJP26 and pJP214 plasmids were
25 used, respectively, as the PCR targets using the primer pairs RL-1 and RL-2 or RL-1
26 and RL-3, for generation of a 231-bp product containing the *entP* gene (insert JR), and
27 for amplification of a 503-bp stretch of DNA containing the *entP* and *entiP* genes
28 (insert JRi). The purified inserts were ligated as *RcaI/BglI* fragments into pNG8048e,
29 previously digested with the enzymes *NcoI* and *BglI*, and the ligation mixtures were
30 used to transform *L. lactis* NZ9000 electrocompetent cells. PCR with primers Nis-fw
31 and Nis-rev confirmed the existence of the adequate pNG8048e-derivatives (pJR22
32 [containing JR] and pJR199 [carrying JRi]) in *L. lactis* NZ9000.

33

1 **Recombinant plasmids derived from pINT29.** Using primers GB-1 and GB-2, and
2 pJP26 as the DNA template, a 507-bp fragment containing *entP* (insert JB) was
3 obtained. The same primers were used to amplify a PCR product of 779 bp containing
4 *entP* and *entiP* (insert JBi). The PCR fragments JB and JBi were inserted as
5 *Bam*HI/*Not*I fragments in pINT29. The ligation mixtures were used to transform *L.*
6 *lactis* LL108. PCR with primers PepX_Up(*AvrBsp*) and PepX_Down(*Spe*) on selected
7 transformants permitted identification of *L. lactis* LL108 (pJB3 [insert JB]) and *L. lactis*
8 LL108 (pJB19 [insert JBi]). Plasmids pJB3 and pJB19 were isolated and integrated in
9 the chromosome of *L. lactis* NZ9000 by the method of Leenhouts et al. (40).

10
11 **PCR amplification and nucleotide sequencing.** Oligonucleotide primers were
12 obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, UK) and Biolegio BV (Malden, The
13 Netherlands). PCR-amplifications of inserts JP and JPi were performed in 50 μ l
14 reaction mixtures containing 1 μ l of purified DNA, 70 pmol of each primer and 1 U of
15 Platinum *Taq*[®] DNA polymerase (Invitrogen S.A., Barcelona, Spain). Samples were
16 subjected to an initial cycle of denaturation (97 °C for 2 min), followed by 35 cycles of
17 denaturation (94 °C for 45 s), annealing (50 °C for 30 s) and elongation (72 °C for 45
18 s), ending with a final extension step at 72 °C for 7 min in a DNA thermal cycler
19 Techgene (Techne, Cambridge, UK). PCR-amplifications of inserts JR, JRi, JB and JBi
20 were performed in 100 μ l of reaction mixtures containing 1 μ l of purified plasmid, 100
21 pmol of each primer and 5 U of PWO polymerase (Roche Molecular Biochemicals),
22 and included a hot start at 94°C (2 min), primer annealing at 50°C (30 s), primer
23 elongation at 72°C (1 min), and denaturation at 94°C (45 s). Amplification reactions
24 (35 cycles) and a final extension at 72°C for 7 min were carried out in the thermal
25 cycler iCycler (BioRad Laboratories). *Taq* DNA polymerase (Roche Molecular
26 Biochemicals) was used for colony PCR assays. The PCR-generated fragments were
27 purified by a QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) or a High
28 Pure PCR Product Purification kit (Roche Molecular Biochemicals) before cloning into
29 the vectors, and for nucleotide sequencing. Nucleotide sequencing of purified PCR
30 products was done using the ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator cycle sequence
31 reaction kit and the automatic DNA sequencer ABI PRISM, model 377 (Applied
32 Biosystems, Foster City, CA, USA) at the DNA Sequencing Service Sistemas
33 Genómicos (Valencia, Spain).

1

2 **ELISA for detection and quantification of EntP.** Polyclonal antibodies with
3 specificity for EntP and a non-competitive indirect ELISA (NCI-ELISA) were used to
4 detect and quantify EntP, as previously described (27). Briefly, wells of flat-bottom
5 polystyrene microtitre plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated
6 overnight (4°C) with different concentrations of pure EntP or with supernatants from *E.*
7 *faecium* P13 or the recombinant *L. lactis* hosts. After addition of the anti-P3-KLH
8 serum and the goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Cappel Laboratories, West
9 Chester, PA, USA) bound peroxidase was determined with ABTS (2,2'-azino-bis[3-
10 ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]) (Sigma Chemical Co.) as the substrate by
11 measuring the absorbance of the wells at 405 nm with a Labsystems iEMS reader
12 (Labsystems) with a built-in software package for data analysis.

13

14 **Purification of EntP, and mass spectrometry analysis.** EntP was purified from *E.*
15 *faecium* P13 and *L. lactis* IL1403 (pJP26) as previously described (4, 27). Briefly,
16 supernatants from early stationary phase 1-liter cultures were subjected to
17 precipitation with ammonium sulfate, desalted by gel filtration and further subjected to
18 cation-exchange and hydrophobic-interaction chromatography, followed by reverse-
19 phase chromatography in an FPLC system (RP-FPLC) (Amersham Biosciences
20 Europe, Madrid, Spain). Final concentrations of purified EntP were estimated using the
21 extinction coefficient of the bacteriocin (an A_{280} of 4.3 corresponds to 1 mg/ml of EntP)
22 and the NCI-ELISA as previously described. During purification, the EntP activity was
23 calculated by MPA with *E. faecium* T136 as the indicator microorganism. Purified
24 fractions from the last reverse-phase chromatography step were subjected to matrix-
25 assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.
26 Briefly, 1 μ l sample was spotted onto a MALDI target plate and allowed to air-dry at
27 room temperature. Then, 0.4 ml of a 3 mg/ml α -cyano-4-hydroxy-transcinnamic acid
28 matrix (Sigma Chemical Co.) in 50% acetonitrile was added to the dried sample, which
29 was allowed again to air-dry at room temperature. MALDI-TOF analyses were
30 performed in a Voyager-DE STR Instrument (PerSeptive Biosystems, Foster City, CA,
31 USA) fitted with a nitrogen laser and operated in reflector mode, with an accelerating
32 voltage of 25000 V.

33

1 **Protein electrophoresis, Western blotting, and overlay assay.** Aliquots of
2 purified EntP, enterocin Q and pediocin PA-1 were subjected to Tricine-SDS-PAGE as
3 described by Shägger and Von Jagow (56). Protein electrophoresis was performed on
4 Novex 16% Tricine gels (Invitrogen S.A.) in an XCell *SureLock* Mini-Cell (Invitrogen
5 S.A.) at 80 V constant current. Gels were stained with the Silver Stain Plus reagent
6 (Bio-Rad Laboratories) or blotted onto an Immun-Blot™ PVDF membrane (pore size
7 0.2 μm) (Bio-Rad Laboratories), as previously described (27). To determine the
8 antimicrobial activity of pure bacteriocins, an overlay assay was performed (27), using
9 *E. faecium* T136 as the indicator microorganism. Pure pediocin PA-1 and enterocin Q
10 were obtained as previously described (27, 43).

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

RESULTS

1
2
3 **Construction of the recombinant *Lactococcus lactis* strains for production of**
4 **EntP.** Cloning of PCR fragments containing the pre-enterocin P structural gene (*entP*)
5 with or without the putative EntP immunity gene (*entiP*) into the vectors pMG36c,
6 pNG8048e and pINT29 resulted in the plasmids pJP26 (*entP*) and pJP214 (*entP* +
7 *entiP*), both derived from pMG36c, pJR22 (*entP*) and pJR199 (*entP* + *entiP*), both
8 derived from pNG8048e, and pJB3 and pJB19 (*entP* + *entiP*), both derived from
9 pINT29. The genetic map of the resulting plasmids is displayed in Figure 1, while the
10 various recombinant strains examined in this study are presented in Table 3.

11
12 **Heterologous production and functional expression of EntP by different *L.***
13 ***lactis* strains.** While the supernatants of the *L. lactis* IL1403 (pMG36c), *L. lactis*
14 NZ9000 (pNG8048e) and *L. lactis* JG1 (pINT29) control strains did not display any
15 antagonistic effect, the supernatants of all recombinant *L. lactis* hosts showed a potent
16 antimicrobial activity against *E. faecium* T136 (Fig. 2). Furthermore, the supernatants
17 of cultures of *L. lactis* IL1403 and *L. lactis* NZ9000 carrying either pJP26 or pJP214
18 produced large inhibition halos, of which the ones with pJP214 were the largest (Fig.
19 2A). Fig. 2B also shows that after induction with nisin, the inhibition zones of *L. lactis*
20 NZ9000 containing pJR22 or pJR199 are larger than those produced by *E. faecium*
21 P13. The *L. lactis* NZ9000 derivatives *L. lactis* JG5 (pJB3) and *L. lactis* JG8 (pJB19),
22 produce halos of inhibition which are smaller than those produced by *E. faecium* P13
23 (Fig. 2C). Interestingly, all *L. lactis* strains carrying vectors containing *entP* plus the
24 *entiP* genes showed the largest halos of antagonistic activity.

25
26 The heterologous production of EntP by the various recombinant *L. lactis* strains
27 was further quantified by a microtitre plate assay (MPA) and by using specific anti-
28 EntP antibodies in an NCI-ELISA. The highest production and antagonistic activity of
29 EntP in the supernatants of the recombinant *L. lactis* cultures occurred after growth for
30 8 to 12 h, coinciding with the initiation of the stationary phase, after which the
31 concentration of EntP and the activity of the supernatants decreased (results not
32 shown). As shown in Table 3, the production of EntP in the supernatant of *L. lactis*
33 IL1403 (pJP26) and *L. lactis* IL1403 (pJP214) was, respectively, 1.7 to 6.0-fold higher
34 than that of the supernatant of *E. faecium* P13, while the production of EntP in the

1 supernatants of *L. lactis* NZ9000 (pJP26) and *L. lactis* NZ9000 (pJP214) was 0.7 to
2 1.6-fold, respectively, that of *E. faecium* P13. Interestingly, the antimicrobial activity of
3 the supernatant of *L. lactis* IL1403 (pJP26) and *L. lactis* IL1403 (pJP214) was 2,2 to
4 3.6-higher than that in the supernatants of *L. lactis* NZ9000 (pJP26) and *L. lactis*
5 NZ9000 (pJP214). Furthermore, the content of EntP in the supernatants of *L. lactis*
6 NZ9000 (pJR22) and *L. lactis* NZ9000 (pJR199), was determined to be 3 to 5-fold
7 higher than in *E. faecium* P13, while the antimicrobial activity was about 14-fold higher
8 than that observed in *E. faecium* P13 supernatants. Finally, the EntP production and
9 antimicrobial activity of the supernatants of *L. lactis* JG5 and *L. lactis* JG8 were about
10 10% and 20%, respectively, of those determined in the supernatant of *E. faecium* P13.

11

12 **Coproduction of EntP and NisA by *L. lactis* DPC5598.** Initial stab-on-agar tests
13 showed that *L. lactis* DPC5598 inhibited *E. faecium* T136. The fact that it also had an
14 antagonistic effect on *L. lactis* MG1363, which is resistant to EntP and sensitive to
15 NisA, but not on *L. lactis* BB24, a strain resistant to EntP and NisA, suggested that *L.*
16 *lactis* DPC5598 is a nisin producer. This was confirmed by PCR, in which a 184-bp
17 fragment of *nisA* (54) was amplified with *nisA*-specific primers from DPC5598
18 chromosomal DNA and sequenced. Plasmid pJP26 or pJP214 was introduced in *L.*
19 *lactis* DPC5598 and the coproduction of EntP and NisA was determined by ELISA and
20 MPA (Table 3). The production of EntP in the supernatant of *L. lactis* DPC5598
21 (pJP26) and *L. lactis* DPC5598 (pJP214) was determined to be about a 57% and 78%,
22 respectively, of that of *E. faecium* P13. However, the specific antimicrobial activity of
23 the EntP produced by the *L. lactis* DPC5598 derivatives was lower than that calculated
24 for the *L. lactis* IL1403 and *L. lactis* NZ9000 strains carrying pJP26 or pJP214. The
25 production of NisA by *L. lactis* DPC5598 and its two EntP⁺ derivatives was similar in all
26 cases, but lower than that produced by *L. lactis* BB24 (Table 3).

27

28 **Purification of EntP, Western blotting, and mass spectrometry analysis.** The
29 results of the purification of EntP from the *E. faecium* P13 and *L. lactis* IL1403
30 (pJP214) supernatants are summarized in Table 4. Although, as expected, the total
31 antimicrobial activity was 6-fold larger in supernatants of the latter strain, and the
32 purification of EntP resulted, in both cases, in two fractions with EntP activity after RP-
33 FPLC, the final recovery of EntP activity was about 23% of the initial activity in *E.*
34 *faecium* P13, and 5.4% of the initial activity in *L. lactis* IL1403 (pJP214). Further

1 characterization of EntP in fractions B from *E. faecium* P13 and *L. lactis* IL1403
2 (pJP214) was performed by protein electrophoresis, Western blotting and an overlay
3 assay. Chemically synthesized EntQ tends to form aggregates (Fig. 3A), and pediocin
4 PA-1 and purified EntP show a strong antimicrobial activity in the overlay assay (Fig.
5 3B), with the largest activity displayed by EntP. After Western blotting (Fig. 3C), the
6 anti-P2-KLH antibodies with specificity for the N-terminal end of EntP, only recognized
7 reactive antigenic bands in the lanes corresponding to the purified EntP from *E.*
8 *faecium* P13 and *L. lactis* IL1403 (pJP214). Furthermore, when the EntP fraction B
9 purified from both supernatants was subjected to MALDI-TOF MS analysis, a major
10 fragment of identical molecular mass corresponding to the theoretical molecular mass
11 of pure EntP (4,630.1) was obtained in both cases (Fig. 4).

12

DISCUSSION

1
2
3 The cloning, production and functional expression of EntP, a *sec*-dependent
4 bacteriocin from *E. faecium* P13, has been achieved and evaluated in *L. lactis*. All the
5 recombinant *L. lactis* strains carrying the lactococcal vectors with the EntP structural
6 gene (*entP*) in the presence or absence of the putative EntP immunity gene (*entiP*)
7 displayed extracellular antagonistic activity, suggesting that the presence of *entP* is the
8 minimum requirement for production of biologically active EntP (Fig. 2). The 27-amino-
9 acid hydrophobic N-terminal extension of pre-enterocin P contains a Val-Asp-Ala
10 cleavage site at positions -3 to -1 that may act as a signal peptide for the *sec*-
11 dependent pathway of the host (8, 28, 64, 67). Specific anti-EntP antibodies and an
12 NCI-ELISA (27) permitted quantification of the heterologous production of active EntP
13 in supernatants of the recombinant *L. lactis* cultures (Table 3). The production of EntP
14 by the *L. lactis* IL1403 and *L. lactis* NZ9000 recombinant strains was generally higher
15 than in *E. faecium* P13. The production of EntP in *L. lactis* IL1403 (pJP26) was 2.2-fold
16 higher than in *L. lactis* NZ9000 (pJP26), while EntP production in *L. lactis* IL1403
17 (pJP214) was 3.7-fold higher than in *L. lactis* NZ9000 (pJP214). Differences in the
18 production of bacteriocins by lactococcal strains have been previously reported (34,
19 35) and may reflect unknown metabolic differences between *L. lactis* subsp. *lactis*
20 IL1403 and *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000. The specific antimicrobial activity of
21 EntP produced by the *L. lactis* IL1403 and *L. lactis* NZ9000 derivatives was rather
22 similar to that of EntP produced by *E. faecium* P13, suggesting that the synthesis,
23 processing, secretion and antagonistic activity of EntP are not affected by its
24 heterologous production in *L. lactis*.

25
26 The co-expression of the *entP* and *entiP* genes increased the production of EntP in
27 all *L. lactis* hosts. Increased EntP production may be explained by assuming that *L.*
28 *lactis* is relatively resistant to EntP but may stand more of the bacteriocin when it
29 expresses the EntiP product. Indeed, bacteriocin-producers are protected from their
30 own bacteriocin by the concomitant expression of a cognate immunity protein (49).
31 These proteins are located intracellularly and/or in the cytoplasm (53) and act either by
32 affecting bacteriocin aggregation and pore formation or by disturbing the interaction
33 between the bacteriocin and a membrane-located bacteriocin receptor (53, 65). In a
34 comparative study of immunity proteins, the functionality of the EntiP of *E. faecium*

1 P13 as an immunity protein has been confirmed (20). Alternatively, it may be that
2 EntiP participates in the processing, secretion and/or transport of EntP in *L. lactis*.

3
4 The level of production of EntP also depended on the lactococcal vector used
5 (Table 3). In *L. lactis* NZ9000 (pJR22) and *L. lactis* NZ9000 (pJR199) the production of
6 EntP after induction with nisin was 3.1 to 5.3-fold greater than in *L. lactis* NZ9000
7 (pJP26) or *L. lactis* NZ9000 (pJP214). The enhanced EntP production in cells with the
8 nisin-inducible constructs may be due to copy number differences between pNG8048
9 and pMG36c (14, 38) but, more likely, is caused by the different promoters used to
10 drive gene expression. Interestingly, the specific antimicrobial activity of EntP
11 produced by *L. lactis* NZ9000 (pJR22) and *L. lactis* NZ9000 (pJR199) is higher than
12 that observed in any other *L. lactis* host or in *E. faecium* P13, confirming the potential
13 of the nisin-controlled expression (NICE) system, with the pNG8048e-derived vectors
14 and the *L. lactis* NZ9000 host, for the overproduction and stability of (heterologous)
15 proteins or, as in this case, small (antimicrobial) peptides (13, 39). The increased
16 specific antimicrobial activity observed for EntP may be ascribed to the short
17 induction time for EntP production (3 h), which, most probable, prevented secreted
18 EntP from attaching to cell walls, to form aggregates, and/or to undergo protease-
19 degradation. The 10-fold lower yields of EntP in the supernatants of *L. lactis* JG5
20 (pJB3) and *L. lactis* JG8 (pJB19) are in agreement with the fact that pINT129 (a
21 derivative of pINT29) leads to single copy integrations in *L. lactis* MG1363 (40).
22 Effectively, production of EntP in *L. lactis* JG5 and *L. lactis* JG8 supernatants was 12%
23 and 13%, respectively, of that in supernatants of *L. lactis* NZ9000 (pJP26) and *L. lactis*
24 (pJP214), while the specific antimicrobial activities were similar to that of EntP
25 produced by *E. faecium* P13. Although *L. lactis* JG5 and *L. lactis* JG8 produce lower
26 amounts of EntP, they may provide a more stable EntP production platform, without
27 the need for selective antibiotic pressure, which may be considered safer for the
28 production of EntP as a natural food preservative or food ingredient for the food
29 industry.

30
31 *L. lactis* subsp. *lactis* DPC5598 was selected as a host for production of EntP since
32 it is an easily transformable, plasmid-free derivative of an industrial strain that is
33 extensively used because of its phage insensitivity and fast-acid producing ability (60).
34 We show here that it produces NisA and, thus, the co-production of NisA and EntP

1 was further investigated (Table 3). The lower production of EntP by *L. lactis* DPC5598
2 (pJP26) and *L. lactis* DPC5598 (pJP214) compared to that of *L. lactis* IL1403 and *L.*
3 *lactis* NZ9000 carrying the same plasmid may be attributed to production of more than
4 one bacteriocin in multi-bacteriocinogenic hosts (27). The lower specific antimicrobial
5 activity of EntP produced by the *L. lactis* DPC5598 recombinant strains may be
6 associated to genomic differences of this strain with *L. lactis* IL1403 (60) and related to
7 a higher extracellular proteinase activity of the former. The lower production of NisA by
8 recombinant *L. lactis* DPC5598 strains as compared to that of *L. lactis* BB24 may be
9 ascribed to unknown genetic and/or metabolic differences between the strains. In any
10 case, the *L. lactis* DPC5598 derivatives generated in this study were able to express
11 and secrete NisA together with EntP. NisA is particularly active against clostridia and
12 their spores, while EntP is a wide-spectrum bacteriocin with antilisterial activity. While
13 the use of pure bacteriocins is currently a controversial issue, employing "food grade"
14 organisms as producing strains may provide a means by which the potential benefits
15 of these antimicrobial compounds can be exploited (35).

16

17 During purification of EntP from the supernatants of *L. lactis* IL1403 (pJP214) and
18 *E. faecium* P13 two distinct chromatographic fractions were obtained (Table 4). The
19 existence of multiple chromatographic peaks after purification of EntP and other
20 bacteriocins such as nisin Z, pediocin PA-1, and carnobacteriocin BM1 has been
21 ascribed to the co-existence after RP-FPLC of oxidized and non-oxidized forms of the
22 same bacteriocin (27, 28). The recovery of EntP from the *L. lactis* (pJP214) supernatant
23 was lower than that from *E. faecium* P13. Reduced adsorption to and desorption from
24 the cation-exchange, hydrophobic interaction and RP-FPLC chromatographic supports
25 of EntP are rate-limiting steps for purification of larger quantities of this bacteriocin
26 from *L. lactis*. If the food industry would demand large quantities of EntP for use as a
27 natural food preservative, overproduction by heterologous hosts would not be useful
28 without the development and optimization of more efficient purification procedures for
29 this bacteriocin. EntP purified from either *E. faecium* P13 or *L. lactis* IL1403 (pJP214)
30 has a strong tendency to form aggregates with antimicrobial activity (Fig. 3). Similarly,
31 purified EntP from both cultures gives, after MALDI-TOF MS analysis, a major
32 fragment with a molecular mass corresponding to the theoretical molecular mass of
33 EntP (Fig. 4), suggesting that processing and secretion of this bacteriocin proceed in a
34 similar way in *E. faecium* and *L. lactis*. Whereas production of EntP by recombinant *E.*

1 *coli* cells was rather low as compared to that of *E. faecium* P13 (28), the results
2 presented here show that the *E. faecium* signals driving the processing and secretion
3 of EntP work adequately in *L. lactis*.

4
5 Two other bacteriocins, acidocin B produced by *Lactobacillus acidophilus* M46 (63)
6 and divergicin A produced by *Carnobacterium divergens* LV13 (67) have been
7 heterologously produced by LAB using the general secretory pathway, but a precise
8 quantitation of their production was not performed. In-frame fusions of the *sec*-
9 dependent signal peptide of divergicin A with the mature sequence of carnobacteriocin
10 B2 (44), brochocin C (45), colicin V (46) and enterocin B (23) has also permitted
11 production of these bacteriocins in the supernatants of different LAB hosts, including *L.*
12 *lactis*. It remains unclear why most LAB bacteriocins have a dedicated secretion and
13 processing system when they can access the general secretory pathway if provided
14 with an appropriate signal peptide. Data from Biet et al. (2), who compared the
15 heterologous secretion of mesentericin Y105 from *Leuconostoc mesenteroides* Y105
16 by different LAB either via a dedicated transport system or under control of the
17 divergicin A *sec*-dependent signal peptide, suggest that the dedicated export
18 machinery is more efficient.

19
20 The production of EntP in the supernatants of most of the recombinant *L. lactis*
21 strains and, above all, in those of the high-level producers *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403
22 (pJP214) and *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (pJR199) is, in most of the cases,
23 comparatively higher than production of a number of other bacteriocins in different
24 LAB hosts using dedicated ABC transport systems (1, 2, 5, 34, 35, 37, 43, 47, 61) or
25 the Sec pathway (2, 45, 46, 67), indicating that production of EntP by the *sec*-
26 dependent pathway is an efficient process in *L. lactis*. Protein secretion is a preferred
27 means of protein expression in the development of LAB as vehicles for the delivery of
28 biologically active molecules (16). The high-level production of active EntP in the
29 supernatants of *L. lactis* permits to hypothesize that fusions between the signal
30 peptide of EntP and the mature parts of other bacteriocins may allow to secrete
31 bacteriocins in the absence of specific immunity and secretion proteins. The signal
32 peptide of EntP may also serve as a model for secretion by *L. lactis* and other LAB of
33 numerous peptides or proteins of interest to the food industry.

34

Acknowledgements

The authors wish to express their gratitude to Prof. R. P. Ross (Teagasc Dairy Products Research Centre, Moorepark, Fermoy, Co. Cork, Ireland) for providing the strain *L. lactis* DPC5598. This work was partially supported by grants 07G/0026/2000 from the Comunidad de Madrid, and AGL2000-0707 and AGL2003-01508 from the Ministerio de Educación y Cultura, Spain. J. Gutiérrez is recipient of a fellowship from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT), Spain.

References

1. **Axelsson, L., T. Katla, M. Bjornslett, V. G. H. Eijsink, and A. Holck.** 1998. A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*. FEMS Microbiol. Lett. **168**:137-143.
2. **Biet, F., J. M. Berjeaud, R. W. Worobo, Y. Cenatempo, and C. Fremaux.** 1998. Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway. Microbiology **144**:2845-2854.
3. **Birnboim, H.C.** 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Methods Enzymol. **100**:243-255.
4. **Casaus, P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes, P. E. Hernández, and H. Holo.** 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enteriocin A. Microbiol. **143**:2287-2294.
5. **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.
6. **Chopin, M. C., A. Chopin, A. Moillo-Bott, and P. Langella.** 1984. Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. Plasmid **11**:260-263.
7. **Cintas, L. M.** 1995. Ph.D. thesis. Universidad Autónoma de Madrid. Spain.
8. **Cintas, L.M., P. Casaus, L. S. Håvarstein, P. E. Hernández, and I. F. Nes.** 1997. Biochemical and genetic characterization of enteriocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Appl. Environ. Microbiol. **63**:4321-4330.

- 1 9. **Cintas, L.M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernández, I. F. Nes, and L. S.**
2 **Håvarstein.** 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from
3 *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.*
4 **180**:1988-1994.
- 5 10. **Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E.**
6 **Hernández, and I. F. Nes.** 2000. Biochemical and genetic evidence that
7 *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-
8 dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal
9 extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* **182**:6806-6814.
- 10 11. **Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes, and P. E. Hernández.** 2001.
11 Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* **7**:281-305.
- 12 12. **Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes, and M. L. Chikindas.** 2001.
13 Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food*
14 *Microbiol.* **71**:1-20.
- 15 13. **De Ruyter, P. G. G. A., O. P. Kuipers, and W. M. de Vos.** 1996. Controlled gene
16 expression systems for *Lactococcus lactis* using the food-grade inducer nisin.
17 *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3662-3667.
- 18 14. **De Vos, W. M.** 1987. Gene cloning and expression in lactic streptococci. *FEMS*
19 *Microbiol. Rev.* **46**:281-295.
- 20 15. **De Vos, W. M., J. W. M. Mulders, R. J. Siezen, J. Hugenholtz, and O. P.**
21 **Kuipers.** 1993. Properties of nisin Z and distribution of its gene, *nisZ*, in
22 *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:213-218.
- 23 16. **Dieye, Y., A. J. W. Hoekman, F. Clier, V. Juillard, H. J. Boot, and J. C. Piard.**
24 2003. Ability of *Lactococcus lactis* to export viral capsid antigens: a crucial step
25 for development of live vaccines. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:7281-7288.
- 26 17. **Eaton, T. J., and M. J. Gasson.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus*
27 virulence determinants and potential for genetic exchange between food and
28 medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1628-1635.
- 29 18. **Eijsink, V. G. H., L. Axelsson, D. B. Diep, L. S. Håvarstein, H. Holo, and I. F.**
30 **Nes.** 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example
31 of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**:639-654.
- 32 19. **Faye, T., T. Langsrud, I. F. Nes, and H. Holo.** 2000. Biochemical and genetic
33 characterization of propionicin T1, a new bacteriocin from *Propionibacterium*
34 *thoenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4230-4236.

- 1 20. **Fimland, G., V. G. H. Eijsink, and J. Nissen-Meyer.** 2002. Comparative studies
2 of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology* **148**:3661-3670.
- 3 21. **Foulquié Moreno, M. R., R. Callewaert, B. Devreese, J. Van Beeumen, L. De**
4 **Vuyst.** 2003. Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by
5 enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.* **94**:214-229.
- 6 22. **Franz, C. M. A. P., W. H. Holzapfel, and M. E. Stiles.** 1999. Enterococci at the
7 crossroads of food safety?. *Int. J. Food Microbiol.* **47**:1-24.
- 8 23. **Franz, C. M. A. P., R. W. Worobo, L. E. N. Quadri, U. Schillinger, W. H.**
9 **Holzapfel, J. C. Vederas, and M. E. Stiles.** 1999. Atypical genetic locus
10 associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium*
11 BFE 900. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2170-2178.
- 12 24. **Franz, C. M. A. P., A. B. Muscholl-Silberhorn, N. M. K. Yousif, M. Vancanneyt,**
13 **J. Swings, and W. M. Holzapfel.** 2001. Incidence of virulence factors and
14 antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ.*
15 *Microbiol.* **67**:4385-4389.
- 16 25. **Franz, C. M. A. P., A. Grube, A. Herrmann, H. Abriouel, J. Starke, A.**
17 **Lombardi, B. Tauscher, and W. H. Holzapfel.** 2002. Biochemical and genetic
18 characterization of the two-peptide bacteriocin enterocin 1071 produced by
19 *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2550-2554.
- 20 26. **Gasson, M. J.** 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712
21 and other lactic Streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* **154**:1-9.
- 22 27. **Gutiérrez, J., R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, M. F. Fernández, L. M.**
23 **Cintas, and P. E. Hernández.** 2004. Performance and applications of polyclonal
24 antipeptide antibodies specific for the enterococcal bacteriocin enterocin P. *J.*
25 *Agric. Food Chem.* **52**:2247-2255.
- 26 28. **Gutiérrez, J., R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, I. F. Nes, L. M. Cintas,**
27 **and P. E. Hernández.** 2004. Cloning, production and functional expression of
28 enterocin P, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13,
29 in *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* (Accepted for publication).
- 30 29. **Håvarstein, L.S., D. B. Diep, and I. F. Nes.** 1995. A family of bacteriocin ABC
31 transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with
32 export. *Mol. Microbiol.* **16**:229-240.
- 33 30. **Herranz, C., S. Mukhopadhyay, P. Casaus, J. M. Martínez, J. M. Rodríguez, I.**
34 **F. Nes, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 1999. Biochemical and genetic

- 1 evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains
2 isolated from fermented sausages. *Curr. Microbiol.* **39**:282-290.
- 3 31. **Herranz, C., Y. Chen, L. M. Cintas, P. E. Hernández, T. J. Montville, and M. L.**
4 **Chikindas.** 2001. Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of
5 *Enterococcus faecium* T136. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1689-1692.
- 6 32. **Herranz, C., L. M. Cintas, P. E. Hernández, G. N. Moll, and A. J. M. Driessen.**
7 2001. Enterocin P causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136
8 cells. *Antimicrob. Agents Chemoth.* **45**:901-904.
- 9 33. **Holo, H., and I. F. Nes.** 1989. High-frequency transformation, by electroporation,
10 of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized
11 media. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3119-3123.
- 12 34. **Horn, N., M. I. Martínez, J. M. Martínez, P. E. Hernández, M. J. Gasson, J. M.**
13 **Rodríguez, and H. M. Dodd.** 1998. Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus*
14 *lactis* using the lactococcal A secretory apparatus. *Appl. Environ. Microbiol.*
15 **64**:818-823.
- 16 35. **Horn, N., M. I. Martínez, J. M. Martínez, P. E. Hernández, M. J. Gasson, J. M.**
17 **Rodríguez, and H. M. Dodd.** 1999. Enhanced production of pediocin PA-1 and
18 coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ.*
19 *Microbiol.* **65**:4443-4450.
- 20 36. **Jett, B. D., M. M. Huycke, and M. S. Gilmore.** 1994. Virulence of enterococci.
21 *Clin. Microbiol. Rev.* **7**:462-478.
- 22 37. **Kawamoto, S., S. Shima, R. Sato, T. Eguchi, S. Ohmomo, and T. Sameshima.**
23 2002. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial
24 peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7973. *Appl. Environ. Microbiol.*
25 **68**:3830-3840.
- 26 38. **Kok, J., M. B. Jos, M. van der Vossen, and G. Venema.** 1984. Construction of
27 plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus*
28 *subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:726-731.
- 29 39. **Kuipers, O. P., P. G. G. A. de Ruyter, M. Kleerebezem, W. M. de Vos.** 1998.
30 Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.*
31 **64**:15-21.
- 32 40. **Leenhouts, K., A. Bolhuis, G. Venema, and J. Kok.** 1998. Construction of a
33 food-grade multicopy integration system for *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol.*
34 *Biotechnol.* **49**:417-423.

- 1 41. **Leer, J. R., J. M. B. M. van der Voosen, M. van Gieze, J. M. van Noor, and P.**
2 **H. Pouwels.** 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced
3 by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* **141**:1629-1635.
- 4 42. **Martínez, B., M. Fernández, J. E. Suárez, and A. Rodríguez.** 1999. Synthesis of
5 lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA972, depends
6 on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiology*
7 **145**:3155-3161.
- 8 43. **Martínez, J. M., J. Kok, J. W. Sanders, and P. E. Hernández.** 2000.
9 Heterologous co-production of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus*
10 *lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.*
11 **66**:3543-3549.
- 12 44. **McCormick, J. K., R. W. Worobo, and M. E. Stiles.** 1996. Expression of the
13 antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal-peptide dependent general
14 secretory pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4095-4099.
- 15 45. **McCormick, J. K., A. Poon, M. Sailer, Y. Gao, K. L. Roy, L. M. McMullen, J. C.**
16 **Vederas, M. E. Stiles, and M. J. van Belkum.** 1998. Genetic characterization and
17 heterologous expression of brochocin-C, an antibotulinal two-peptide bacteriocin
18 produced by *Brochothrix campestris* ATCC 43754. *Appl. Environ. Microbiol.*
19 **64**:4757-4766.
- 20 46. **McCormick, J. K., T. R. Klaenhammer, and M. E. Stiles.** 1999. Colicin V can be
21 produced by lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**:37-41.
- 22 47. **Morisset, D., and J. Frere.** 2002. Heterologous expression of bacteriocins using
23 the mesentericin Y105 dedicated transport system by *Leuconostoc*
24 *mesenteroides*. *Biochimie* **84**:569-576.
- 25 48. **Nes, I. F., and H. Holo.** 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid
26 bacteria. *Biopolymers* **55**:50-61.
- 27 49. **Nes, I. F., H. Holo, G. Fimland, H. H. Hauge, and J. Nissen-Meyer.** 2002.
28 Unmodified peptide-bacteriocins (class II) produced by lactic acid bacteria. In
29 *Peptide Antibiotics, Discovery, Modes of Action and Application*. Edited by C.J.
30 Dutton, M.A. Haxell, H.A.I. McArthur and R.G. Wax. New York: Marcel Deckker.
- 31 50. **Nilsen, T., I. F. Nes, and H. Holo.** 2003. Enterolysin A, a cell-wall degrading
32 bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.*
33 **69**:2975-2984.

- 1 51. **O'Sullivan, L., R. P. Ross, and C. Hill.** 2002. Potential of bacteriocin-producing
2 lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* **84**:593-
3 604.
- 4 52. **Pugsley, A. P.** 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative
5 bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:50-108.
- 6 53. **Quadri, L. E. N., M. Sailer, M. R. Terbiznik, K. L. Roy, J. C. Vederas, and M. E.**
7 **Stiles.** 1995. Characterization of the protein conferring immunity to the
8 antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2
9 and BM1. *J. Bacteriol.* **177**:1144-1151.
- 10 54. **Rodríguez, J. M., L. M. Cintas, P. Casaus, N. Horn, H. M. Dodd, P. E.**
11 **Hernández, and M. J. Gasson.** 1995. Isolation of nisin-producing *Lactococcus*
12 *lactis* strains from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* **78**:109-115.
- 13 55. **Sánchez-Hidalgo, M., M. Maqueda, A. Gálvez, H. Abriouel, E. Valdivia, and M.**
14 **Martínez-Bueno.** 2003. The genes coding for enterocin EJ97 production by
15 *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. *Appl. Environ.*
16 *Microbiol.* **69**:1633-1641.
- 17 56. **Shägger, H., and G. Von Jagow.** 1987. Tricine-sodium dodecylsulfate-
18 polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range 1 to
19 100 KDa. *Anal. Biochem.* **166**:368-379.
- 20 57. **Shankar, N., A. S. Baghdayan, and M. S. Gilmore.** 2002. Modification of
21 virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus*
22 *faecalis*. *Nature* **417**:746-750.
- 23 58. **Suárez, A. M., J. M. Rodríguez, P. E. Hernández, and J. I. Azcona.** 1996.
24 Generation of polyclonal antibodies against nisin: Immunization strategies and
25 immunoassay development. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2117-2121.
- 26 59. **Tomita, H., S. Fujimoto, K. Tanimoto, and Y. Ike.** 1996. Cloning and
27 characterization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus*
28 *faecalis* pheromone-response conjugative plasmid pY117. *J. Bacteriol.* **178**:3585-
29 3593.
- 30 60. **Trotter, M., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and A. Coffey.** 2002. *Lactococcus*
31 *lactis* DPC5598, a plasmid-free derivative of a commercial starter, provides a
32 valuable alternative host for culture improvement studies. *J. Appl. Microbiol.*
33 **93**:134-143.

- 1 61. **Van Belkum, M. J., R. W. Worobo, and M. E. Stiles.** 1997. Double-glycine-type
2 leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V
3 secretion in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **23**:1293-1301.
- 4 62. **Van de Guchte, M., J. M. B. M. van der Vossen, J. Kok, and G. Venema.** 1989.
5 Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white
6 lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:224-228.
- 7 63. **Van der Vossen, J. M. B. M., M. H. M. van Herwijnen, R. J. Leer, B. ten Brink,**
8 **P. H. Pouwels, J. H. J. Huis in't Veld.** 1994. Production of acidocin B, a
9 bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* M46 is a plasmid encoded trait: plasmid
10 curing, genetic marking by in vivo plasmid integration, and gene transfer. *FEMS*
11 *Microbiol. Lett.* **116**:333-340.
- 12 64. **Van Wely, K. H. M., J. Swaving, R. Freudl, and A. J. M. Driessen.** 2001.
13 Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria.
14 *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:437-454.
- 15 65. **Venema, K., R. E. Haverkort, T. Abee, A. J. Haandrikman, K. J. Leenhouts, L.**
16 **de Leij, G. Venema, and J. Kok.** 1994. Mode of action of LciA, the lactococcin A
17 immunity protein. *Mol. Microbiol.* **14**:521-532.
- 18 66. **Venema, K., J. Kok, J. D. Marugg, M. Y. Toonen, A. M. Ledeboer, G. Venema,**
19 **and M. L. Chikindas.** 1995. Functional analysis of the pediocin operon of
20 *Pediococcus acidilactici* PAC1.0: PedB is the immunity protein and PedD is the
21 precursor processing enzyme. *Mol. Microbiol.* **17**:515-522.
- 22 67. **Worobo, R. W., M. J. van Belkum, M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas, and M.**
23 **E. Stiles.** 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from
24 *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.* **177**:3143-3149.
- 25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

1 **Legend to figures**

2
3
4 FIG. 1. Construction of the lactococcal recombinant plasmids. Sizes of plasmids are
5 given in base pairs. Only relevant restriction enzymes are given. P₃₂, constitutive
6 lactococcal promoter; *PnisA*, inducible nisin A promoter; T, transcription terminator;
7 Rep, lactococcal replicons pWV01 and pSH71; Ori⁺, pWV01 origin of replication;
8 *pepXP'* and *'pepXP*, 5' and 3' sequence of *pepX* gene, respectively; *entP*, enterocin P
9 structural gene; *entiP* enterocin P putative immunity gene; Cmr, chloramphenicol
10 resistance; Emr, erythromycin resistance.

11
12 FIG. 2. Production of enterocin P by *L. Lactis*. Agar well diffusion tests were performed
13 using the indicator strain *E. faecium* T136. **(A)** Supernatants of lactococcal strains
14 carrying constitutive promoter constructs: (1) *L. lactis* IL1403 (pMG36c); (2) *L. lactis*
15 IL1403 (pJP26); (3) *L. lactis* IL1403 (pJP214); (4) *L. lactis* NZ9000 (pMG36c); (5) *L.*
16 *lactis* NZ9000 (pJP26); and (6) *L. lactis* NZ9000 (pJP214). **(B)** Supernatants of *L.*
17 *lactis* NZ9000 carrying inducible promoter constructs: (1, 4) pNG8048e; (2, 5) pJR22;
18 and (3, 6) pJR199, before (1, 2, 3) and after (4, 5, 6) induction of the cultures with
19 nisin. **(C)** Supernatants of *L. lactis* NZ9000 cells transformed with the integrative
20 vectors: (1) pINT29; (2) pJB3; (3) pJB19; and from *E. faecium* P13 with 8 µg/ml (4),
21 2 µg/ml (5) and 0.5 µg/ml (6) of EntP. Supernatants of *E. faecium* P13 (7) and *E.*
22 *faecium* T136 (8) were used as controls.

23
24 FIG. 3. Tricine-SDS-PAGE of different bacteriocins after **(A)** silver staining, **(B)** overlay
25 with the indicator strain *E. faecium* T136, and **(C)** Western blotting with the anti-P2-
26 KLH antibodies. M, protein molecular weight marker with sizes in kDa indicated in the
27 left margin. Lane 1, 1 µg of pure pediocin PA-1; lane 2, 1 µg of pure enterocin Q; lane
28 3, 1 µg of pure enterocin P from *E. faecium* P13; lane 4, 2 µg of pure enterocin P from
29 *L. lactis* IL1403 (pJP214).

30
31 FIG. 4. Mass spectrometry analysis of enterocin P purified from **(A)** *E. faecium* P13
32 and **(B)** *L. lactis* IL1403 (pJP214).

Figure 1

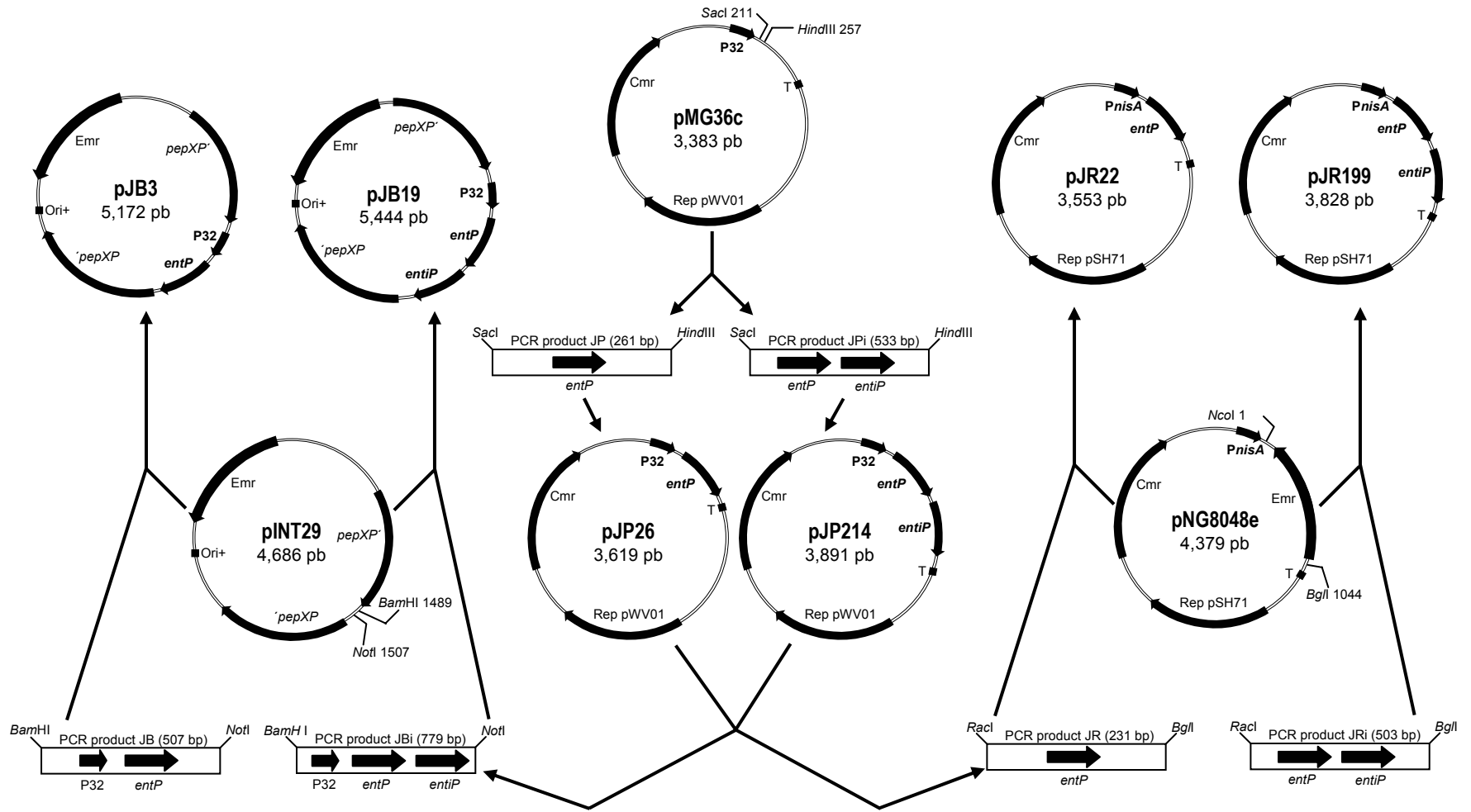


Figure 2

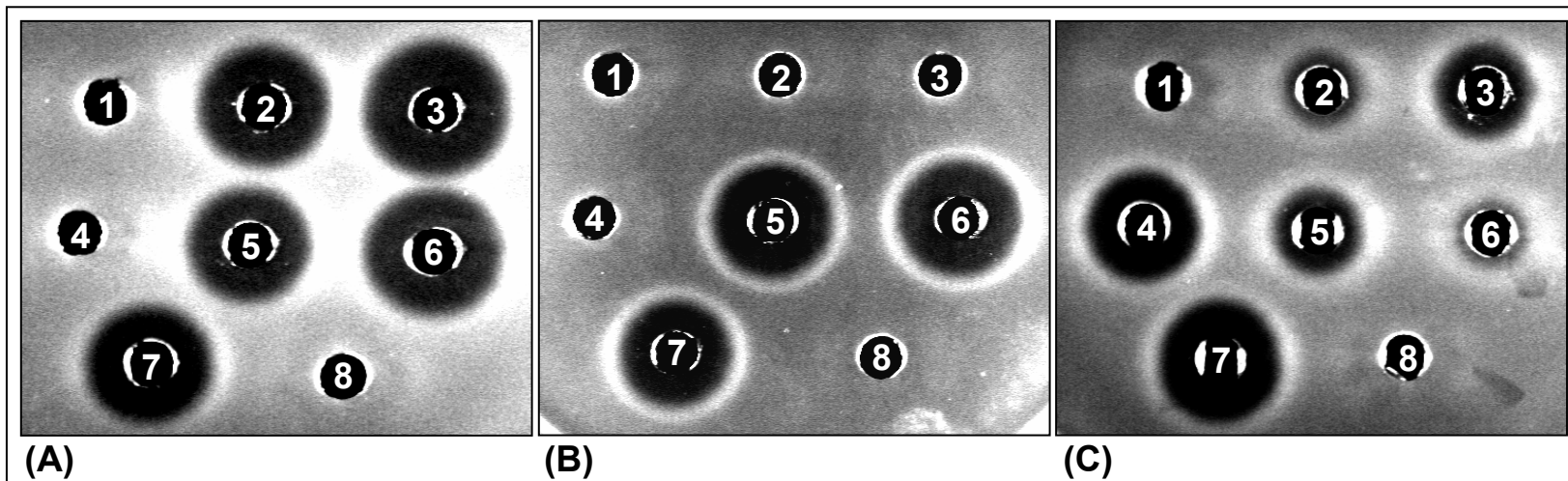


Figure 3

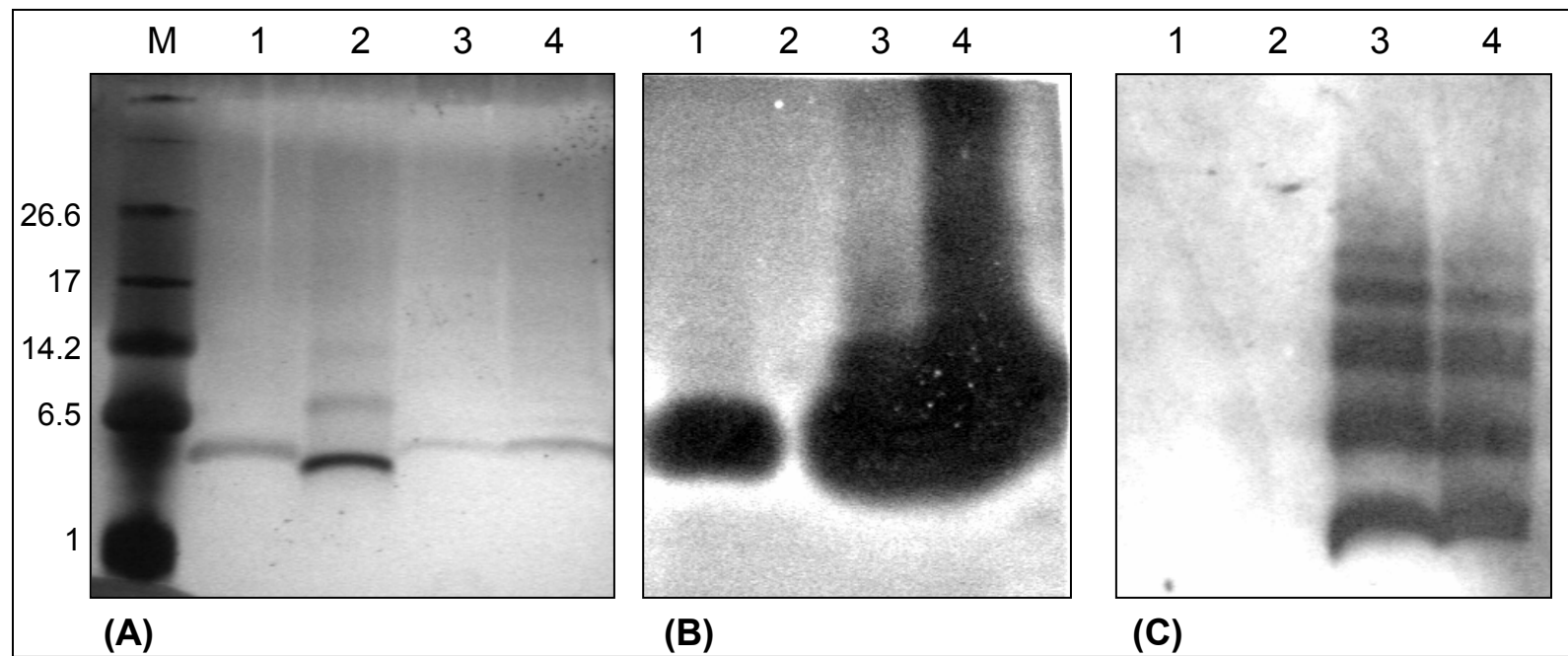
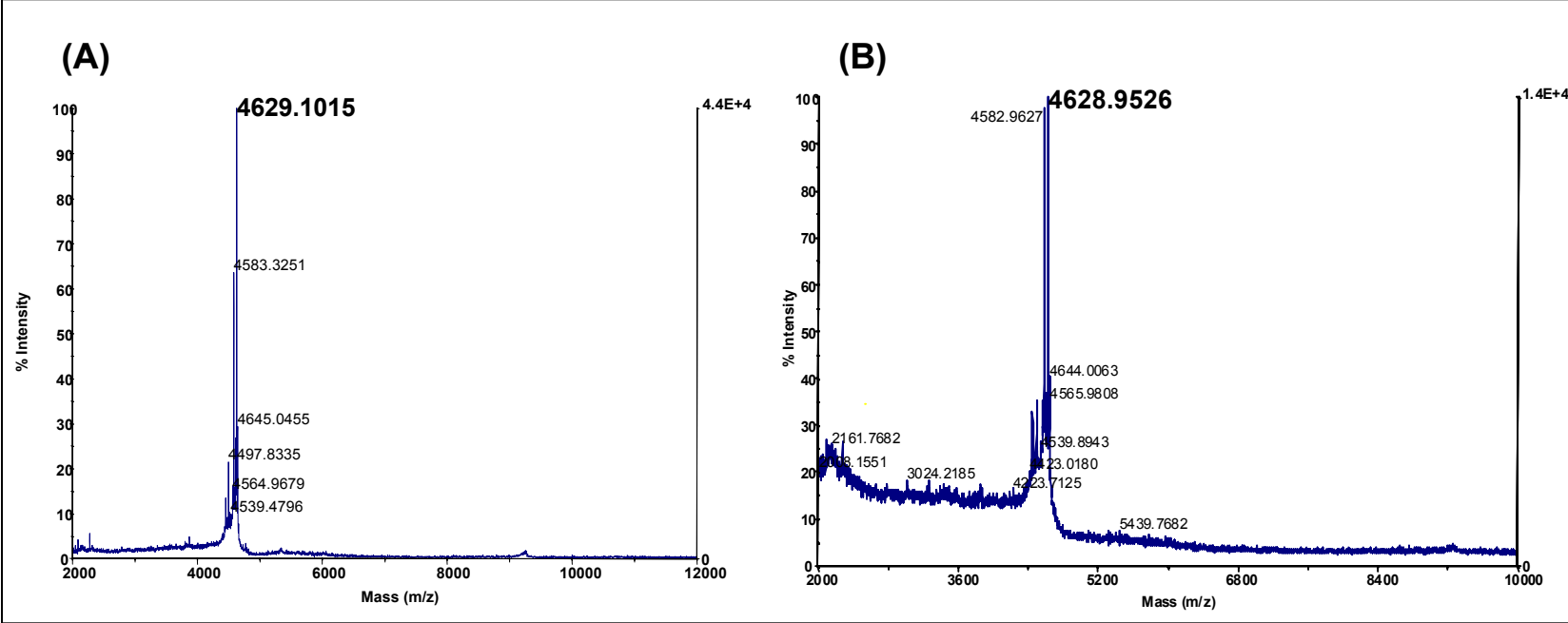


Figure 4



1
2

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description ^a	Source and/or reference ^b
Strains		
<i>E. faecium</i>		
P13	Enterocin P producer	NBTA (8)
T136	Enterocins A and B producer; ADT and MPA indicator	NBTA (4)
<i>L. lactis lactis</i>		
IL1403	Plasmid-free derivative of IL594	(6)
DPC5598	Plasmid-free derivative of DPC4268	DPC (60)
BB24	Nisin A producer	NBTA (7, 54)
<i>L. lactis cremoris</i>		
NZ9000	MG1363 <i>pepN::nisRK</i>	NIZO (39)
MG1363	Plasmid-free derivative of NCDO712	IFR (26)
LL108	MG1363 derivative carrying the pWV01 <i>repA</i> gene in its chromosome	Rug-MG (40)
JG1	Em ^r , NZ9000 derivative carrying pINT29 in its chromosome	This work
JG5	Em ^r , NZ9000 derivative carrying pJB3 in its chromosome	This work
JG8	Em ^r , NZ9000 derivative carrying pJB19 in its chromosome	This work
Plasmids		
pMG36c	Cm ^r , pMG36e derivative	Rug-MG (62)
pJP26	Cm ^r , pMG36c derivative carrying the PCR product JP (P ₃₂ ribosomal binding site and <i>entP</i> gene) under control of P32	This work
pJP214	Cm ^r , pMG36c derivative carrying the PCR product JPi (P ₃₂ ribosomal binding site, <i>entP</i> and <i>entiP</i> genes) under control of P ₃₂	This work
pNG8048e	Cm ^r , Em ^r , pNZ8048 derivative	NIZO (39)
pJR22	Cm ^r , pNG8048e derivative carrying the PCR product JR (<i>entP</i>) under control of <i>PnisA</i>	This work
pJR199	Cm ^r , pNG8048e derivative carrying the PCR product JRi (<i>entP</i> and <i>entiP</i>) under control of <i>PnisA</i>	This work
pINT29	Em ^r , ori ⁺ , repA ⁻ , partial sequence of <i>pepX</i> for integration	Rug-MG (40)
pJB3	Em ^r , pINT29 derivative carrying the PCR product JB (P ₃₂ and <i>entP</i>) into <i>pepX</i>	This work
pJB19	Em ^r , pINT29 derivative carrying the PCR product JBi (P ₃₂ , <i>entP</i> and <i>entiP</i>) into <i>pepX</i>	This work

3
4
5
6
7
8^a ADT, agar diffusion test; MPA, microtitre plate assay; Em, erythromycin; Cm, chloramphenicol; r, resistance; Ori⁺, origin of replication of pWV01.^b NBTA, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain); DPC, Teagasc Dairy Products Research Centre, Moorepark, Fermoy, Co. (Cork, Ireland); NIZO, Department of Biophysical Chemistry, NIZO Food Research (Ede, The Netherlands); IFR, Institute of Food Research (Norwich, United Kingdom); Rug-MG, Department of Molecular Genetics, University of Groningen (Haren, The Netherlands).

1
2
3
TABLE 2. Primers and PCR products used in this study

Primer or PCR product	Nucleotide sequence (5'-3') or description ^a	Purpose
Primers		
LJ-1	CATAGAGCTCTGTA AGGAGGA ATTTTGAATGAGAAAAAATTATTTAGTTTAGC	Amplification of JP and JPi
LJ-2	ATAAGTTAAGCTTGTATTAATG TCCCATACCTGCCAAACCAG	Amplification of JP
LJ-3	ATAAGTTAAGCTTGTATCAAAGTCCCGACCATGCTTTGG	Amplification of JPi
Cy5-P32uni	CGGAGGAATTTTAAAATGGC	Selection of plasmids from pMG36c
Cy5-P32rev	CCTCAACTCAA ATATCG	As above
RL-1	GCTCATGAGAAAAAATTATTTAG	Amplification of JR and JRi
RL-2	<u>GCCGCCACGGCG</u> TATTAATG TCCCATACC	Amplification of JR
RL-3	<u>GCCGCCACGGCG</u> TATCAAAGTCCCGACCATGC	Amplification of JRi
Nis-fw	GCTCTGATTAATTCTG	Selection of plasmids from pNG8048e
Nis-rev	TGTTTAATTGCCATTTTC	As above
GB-1	CGCGGATCCCGGTCCTCGGGATATGATAAG	Amplification of JB and JBi
GB-2	CATAGTTTAGCGGCCGCATTCTTCGTTTTTCAGACTTTGCAAGC	As above
PepX_Up(<i>AvrBsp</i>)	GATCCCTAGGAGAAAGGAGGTAAATCATGAGCTTTAACCATTTTTCAATTGTTGAC	Selection of plasmids from pINT29
PepX_Down(<i>Spe</i>)	CGACTAGTTTAATTTTTTCACACTTTC	As above
PCR products		
JP	261-bp <i>SacI/HindIII</i> fragment containing the P ₃₂ ribosome binding site and the <i>entP</i> gene	Cloning in pMG36c
JPi	533-bp <i>SacI/HindIII</i> fragment containing the P ₃₂ ribosome binding site and the <i>entP</i> and <i>entiP</i> genes	As above
JR	231-bp <i>RcaI/BglI</i> fragment containing the <i>entP</i> gene	Cloning in pNG8048e
JRi	503-bp <i>RcaI/BglI</i> fragment containing the <i>entP</i> and <i>entiP</i> genes	As above
JB	507-bp <i>BamHI/NotI</i> fragment containing the <i>entP</i> gene and the upstream P ₃₂ promoter	Cloning in pINT29
JBi	779-bp <i>BamHI/NotI</i> fragment containing the <i>entP</i> and <i>entiP</i> genes and the upstream P ₃₂ promoter	As above

4
5 Cleavage site for restriction enzymes is underlined in the primers; P₃₂ Ribosome binding site is shown in bold.

6
7
8
9
10
11
12

1 TABLE 3. Bacteriocin production and antimicrobial activity of supernatants from recombinant *L. lactis* strains
2

Strain	Bacteriocin production ($\mu\text{g}/\text{mg}$ cell dry weight)		Antimicrobial activity (BU/ mg cell dry weight) ^b		Sp. Antimicrobial Activity (BU/ μg EntP) ^c
	Enterocin P	Nisin A ^a	<i>E. faecium</i> T136	<i>L. lactis</i> MG1363	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>					
IL1403 (pMG36c)	NP		NA		NE
IL1403 (pJP26)	12.4		921		74.3
IL1403 (pJP214)	44.6		3,572		80.1
DPC5598 (pMG36c)	NP	1.5	70	4,038	NE
DPC5598 (pJP26)	4.2	1.5	97	3,950	23.0
DPC5598 (pJP214)	5.8	1.5	115	4,125	20.0
BB24 ^d	NP	2.6	116	7,020	NE
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>					
NZ9000 (pMG36c)	NP		NA		NE
NZ9000 (pJP26)	5.6		368		65.7
NZ9000 (pJP214)	12.2		946		77.5
NZ9000 (pNG8048e)	NP		NA		NE
NZ9000 (pJR22)	23.3		7,681		330.0
NZ9000 (pJR199)	39.6		8,174		206.4
JG1	NP		NA		NE
JG5	0.7		45		68.2
JG8	1.6		119		74.4
<i>E. faecium</i> ^d					
P13	7.4		564		76.2
T136	NP		NA		NE

3
4 ^a Production of nisin A by *L. lactis* BB24 was calculated as previously described (58). The production of NisA in *L. lactis* DPC5598 was estimated according
5 to its antimicrobial activity and related to the production of NisA and the antimicrobial activity of *L. lactis* BB24.

6 ^b Antimicrobial activity was calculated against *E. faecium* T136 (sensitive to EntP and NisA) and *L. lactis* MG1363 (sensitive to NisA and resistant to EntP).

7 ^c Specific antimicrobial activity refers to the antimicrobial activity against *E. faecium* T136 divided by the EntP produced.

8 ^d Cultures of *L. lactis* BB24, *E. faecium* P13 and *E. faecium* T136 were used as controls.

9 NP, no production. NA, no activity. NE, not evaluable.
10
11
12

1
2TABLE 4. Purification of enterocin P from *E. faecium* P13 and *L. lactis* IL1403 (pJP214) supernatants

Supernatant and purification stage	Volume (ml)	Total A_{254} ^a	Total activity (10^3 BU) ^b	Specific activity ^c	Increase in specific activity ^d (fold)	Yield (%)
<i>E. faecium</i> P13						
Culture supernatant	1,000	37,900	775	20	1	100
Fraction						
Ammonium sulfate precipitation	100	3,180	566	176	9	73
Gel filtration chromatography	200	2,200	545	248	12	70
Cation-exchange chromatography	50	21	276	13,143	657	36
Hydrophobic-interaction chromatography	10	8.95	305	34,078	1,704	40
RP-FPLC						
Fraction A	1.02	0.011	50	4,545,454	227,273	6
Fraction B	1.08	0.063	134	2,126,984	106,349	17
<i>L. lactis</i> IL1403 (pJP214)						
Culture supernatant	1,000	18,700	4,761	255	1	100
Fraction						
Ammonium sulfate precipitation	100	1,960	4,406	2,248	9	92
Gel filtration chromatography	200	1,160	1,603	1,382	5	34
Cation-exchange chromatography	50	10.5	292	27,809	109	6
Hydrophobic-interaction chromatography	10	9.05	330	36,464	110	7
RP-FPLC						
Fraction A	0.25	0.022	17	772,727	3,030	0.4
Fraction B	0.50	0.078	240	3,076,923	12,066	5

3
4
5
6
7
8^a Absorbance at 254 nm multiplied by the volume in milliliters.^b Antimicrobial activity in bacteriocin units per milliliter (BU/ml) and multiplied by the total volume.^c Specific activity is the number of bacteriocin units divided by the total A_{254} .^d The specific activity of a fraction divided by the specific activity of the culture supernatant.

VII. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA
DE LA ENTEROCINA P EN *Píchía*
pastoris

Artículo aceptado para su publicación en el
Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Date: Fri, 25 Feb 2005
From: barry.eisenstein@cubist.com
Subject: Decision on manuscript AAC01380-04 Version 2
To: ehernan@vet.ucm.es

Prof. PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA
Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid
Avda. Puerta de Hierro s/n
28040 Madrid
Spain

Re: Production of Enterocin P, an Antilisterial Pediocin-like Bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris* (AAC01380-04 Version 2)

Dear Dr. HERNÁNDEZ:

Your manuscript has been accepted, and I am forwarding it to the ASM Journals Department for publication. For your reference, ASM Journals' address is given below. Before it can be scheduled for publication, your manuscript must be checked by the ASM production editor to make sure that all elements meet the technical requirements for publication. Noel Lin, the production editor for Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC), or his assistant will contact you if anything needs to be revised before copyediting and production begin.

An official letter of acceptance and a copyright transfer agreement will be sent to the person listed as the corresponding author on the manuscript title page once your article has been scheduled for an issue.

Thank you for submitting your paper to AAC.

Best wishes,

Barry I. Eisenstein
Editor, Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC)

Journals Department
American Society for Microbiology
1752 N St., NW
Washington, DC 20036
nlin@asmusa.org
202-942-9231
202-942-9355

1
2
3 **Production of Enterocin P, an Antilisterial Pediocin-like Bacteriocin**
4 **from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris***
5

6
7 Jorge Gutiérrez, Raquel Criado, María Martín, Carmen Herranz, Luis M. Cintas, and
8 Pablo E. Hernández*

9
10
11 *Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de*
12 *Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain*
13

14
15
16
17
18
19
20
21 Running title: Production of enterocin P in *Pichia pastoris*
22

23
24
25
26
27
28
29 Corresponding author. Mailing address: Departamento de Nutrición, Bromatología y
30 Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de
31 Madrid, 28040 Madrid, Spain. Phone: +34-913943752. Fax: +34-913943743. E-mail:
32 ehernan@vet.ucm.es
33
34
35

ABSTRACT

1
2
3 Enterocin P (EntP), an antimicrobial peptide from *Enterococcus faecium* P13, was
4 produced by *Pichia pastoris*. The gene encoding mature EntP was cloned into the
5 expression vector pPICZ α A in-frame to the α -factor secretion signal peptide and under
6 control of the inducible alcohol oxidase promoter (P_{AOX1}), to generate plasmid pJC31.
7 This plasmid was integrated into chromosomal DNA of *P. pastoris* X-33, and EntP was
8 heterologously secreted from the recombinant *P. pastoris* X-33t₁ clone. The production
9 of extracellular EntP by *P. pastoris* X-33t₁ was larger and its antagonistic activity
10 higher than production and activity of EntP by *E. faecium* P13. Mass spectrometry
11 analysis revealed that EntP purified from *P. pastoris* X-33t₁ has a molecular mass
12 identical to that of EntP purified from *E. faecium* P13, suggesting that the synthesis,
13 processing and secretion of EntP proceeds efficiently in *P. pastoris*.

14
15
16
17
18 **Keywords:** Enterocin P; heterologous secretion; *Pichia pastoris*
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

INTRODUCTION

Compounds with antimicrobial activity are produced by a wide range of mammals, birds, insects, plants and microorganisms, while ribosomally-synthesized antimicrobial peptides produced by bacteria are generally referred to as bacteriocins (14, 31). Bacteriocin production is common in lactic acid bacteria (LAB), microorganisms generally recognized as safe (GRAS) contributing to the production of a wide variety of fermented foods (9, 33). Moreover, since bacteriocins produced by LAB may inhibit not only closely related species but also Gram-positive spoilage bacteria and food-borne pathogens, they are attracting considerable interest for their potential use as natural and non-toxic food preservatives (10, 32). Most bacteriocins from LAB are synthesized as biologically inactive precursors or pre-peptides containing an N-terminal extension. The mature peptides are often cationic, amphiphilic membrane permeabilizing molecules of 20 to 60 amino acid residues classified into three main groups: Class I consists of modified bacteriocins, the lantibiotics, Class II is comprised of non-modified, heat-stable bacteriocins, which are divided into subclasses IIa (pediocin-like, strong antilisterial bacteriocins), IIb (two-peptide bacteriocins) and IIc (other peptide bacteriocins). Class III consists of the protein bacteriocins (14, 26, 36). N-terminal extensions of lantibiotics and most non-lantibiotics are cleaved off concomitantly with export across the cytoplasmic membrane by dedicated ATP-binding cassette transporters (ABC-transporters) and their accessory proteins (19). However, some class II bacteriocins, such as enterocin P (7), contain an N-terminal extension of the so called *sec*-type (signal peptide), that is proteolytically cleaved concomitantly with bacteriocin externalization by the general secretory pathway (GSP) or *sec*-dependent pathway (40).

Enterocin P (EntP) is a class IIa bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13 (7), isolated from Spanish fermented sausages. The EntP structural gene (*entP*) encodes EntP as a 71-amino-acid pre-peptide consisting of a 44-amino-acid mature bacteriocin and a 27-amino-acid signal peptide. The mature EntP is a bacteriocin with a broad antimicrobial spectrum that inhibits spoilage bacteria and food-borne pathogens such as *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum* and *Staphylococcus aureus* (7). Moreover, the *entP* gene seems to be widely distributed in *E. faecium* strains of different origins (8, 12, 22). EntP has been also shown to

1 dissipate the membrane potential of energized cells and to form specific potassium
2 ion-conducting pores in the cytoplasmic membrane of target cells (20, 21). The broad
3 antimicrobial spectrum of EntP suggests its potential application as a natural
4 antimicrobial additive in the food industry. However, the use of enterococci as
5 producers of bacteriocins may be cautioned since many *Enterococcus* isolates code
6 potential virulence factors and carry antibiotic resistance genes (13, 15, 16). For
7 biotechnological, hygienic and safety reasons the cloning, production and functional
8 expression of bacteriocins produced by enterococci in heterologous hosts should be
9 evaluated. Moreover, the production of EntP in heterologous hosts may increase its
10 production and facilitate its purification. The yeast *Pichia pastoris* has proven valuable
11 for the heterologous production of peptides and proteins due to: (i) the simplicity of
12 techniques needed for its genetic manipulation, (ii) the ability to produce foreign
13 proteins at high levels, (iii) its growth at high cell densities, and (iv) the disponibility of
14 vectors driving high-level protein expression (6, 17). We report in this paper the
15 cloning, production, and functional expression of EntP by *P. pastoris*.

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. The EntP-producing strain *E. faecium* P13 (7) and the indicator strain *E. faecium* T136 (4) were grown in MRS broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 32°C for 16 h. The TOPO TA Cloning[®] kit with the pCR[®]2.1-TOPO[®] and the competent *Escherichia coli* TOP-10 One Shot[®] Electrocomp[™] cells were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The *E. coli* MAX Efficiency[®] DH5 α [™] competent cells, and the the EasySelect[™] *Pichia* Expression Kit with the expression vector pPICZ α A and the *Pichia pastoris* X-33 host, were also from Invitrogen. The *E. coli* cells were propagated in Luria-Bertani (LB) broth (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) at 37°C for 16 h, while *P. pastoris* X-33 was grown in yeast extract/peptone/dextrose (YPD) medium at 30°C with shaking for 24 h. Agar plates were made by the addition of 1.5% (wt/vol) agar (Oxoid) to the broth media. The following selective agents were used: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyrano-side (X-GAL, 80 μ g/ml), kanamycin (KAN, 50 μ g/ml) and/or zeocyn (ZEO, 25 μ g/ml for *E. coli* and 100 μ g/ml for *P. pastoris*). X-GAL and KAN were obtained from Sigma and ZEO from Invitrogen.

Basic genetic techniques and enzymes. Total genomic DNA from *E. faecium* P13 and *P. pastoris* was isolated using the Wizard[®] DNA purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Plasmid DNA from *E. coli* cultures was obtained using the High Pure Plasmids Isolation Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). All DNA-modifying enzymes were obtained from New England Biolabs (Beverly, MA, USA). Competent *P. pastoris* X-33 cells were obtained following the supplier's instructions (Invitrogen), and transformed using a Gene Pulser[™] and Pulse Controller apparatus (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA).

Construction of the recombinant plasmid pJC31. Primers JC1 (5'-AATTATACTCGAGAAAAGAGCTACGCGTTCATATGGTAATGGTG-3') and JC2 (5'-ATTAGTTTCTAGAATATTAATGTCCCATACCTGCCAAACCAG-3') were used for PCR-amplification from total genomic DNA of *E. faecium* P13 of a 170-bp *Xho*I-*Xba*I fragment (insert JC) carrying the α -factor *kex2* signal cleavage fused to the mature EntP (*entP*) nucleotide sequence. The forward primer JC1 contains a *Xho*I cleavage

1 site and the reverse primer JC2 a *Xba*I cleavage site (both underlined in primers
2 above). In primer JC1, the α -factor *kex2* signal cleavage is indicated in bold and the
3 codon GCT situated immediately after the *kex2* signal codify the first amino acid of
4 mature EntP. The fragment JC was cloned in plasmid pCR[®]2.1-TOPO[®] and
5 transformation of *E. coli* TOP-10 cells permitted selection of a clone containing
6 plasmid pJC14. Plasmid pJC14 was digested with enzymes *Xho*I and *Xba*I and the
7 resulting 154-bp *Xho*I-*Xba*I cleaved fragment ligated in plasmid pPICZ α A, previously
8 digested with *Xho*I and *Xba*I, to give plasmid pJC31. Competent *E. coli* DH5 α cells
9 were transformed with pJC31 and the resulting transformants confirmed by PCR
10 amplification with the pPICZ α A specific primers 5' α -Factor and 3' AOX1, while the
11 PCR products were sequenced to ensure that the the nucleotide sequence of insert
12 JC was in the correct reading frame. Finally, purified pJC31 was linearized with *Sac*I
13 and used to transform competent *P. pastoris* X-33 cells that were confirmed for the
14 presence of the integrated pJC31 genes by a bacteriocinogenicity test, PCR and DNA-
15 sequencing of the inserts.

16

17 **PCR amplification and nucleotide sequencing.** Primers used for amplification of
18 inserts were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, UK). PCR-amplification
19 of insert JC was performed in a 100 μ l reaction mixture containing 1 μ l of purified *E.*
20 *faecium* P13 DNA, 70 pmol of each primer and 2 U of Platinum *Taq*[®] DNA polymerase
21 (Invitrogen). Samples were subjected to an initial cycle of denaturation (97°C for 2
22 min), followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 45 s), annealing (50°C for 30 s)
23 and elongation (72°C for 15 s), ending with a final extension step at 72°C for 7 min.
24 The PCR reaction using primers 5' α -Factor and 3' AOX1, was performed in a 50 μ l
25 reaction mixture containing single *E. coli* colonies or 1 μ l of purified *P. pastoris* DNA,
26 70 pmol of each primer and 1 U of Biotools *Taq*[®] DNA polymerase (Biotools, Madrid,
27 Spain). All PCR products were amplified in a DNA thermal cycler Techgene (Techne,
28 Cambridge, UK) and analyzed by electrophoresis in 2% agarose gels, with the Gel
29 Doc 1000 documentation system (Bio-Rad) used for acquisition and computer
30 analysis of the images. The PCR-generated fragments were extracted from the
31 agarose gels using the REAL Clean Matrix Kit (C.E. Durviz S.L., Madrid, Spain) and
32 purified by the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), before
33 cloning into the vectors and for nucleotide sequencing. Nucleotide sequencing of

1 purified PCR products was done using the ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator cycle
2 sequence reaction kit and the automatic DNA sequencer ABI PRISM, model 377
3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the ADN Sequencing Service Sistemas
4 Genómicos (Valencia, Spain).

5
6 **Production and antimicrobial activity of EntP by *P. pastoris*.** The *P. pastoris* X-
7 33t₁ clone was inoculated into 25 ml of the buffered minimal medium BMG (1.34%
8 yeast nitrogen base [YNB], 4 x 10⁻⁵% biotin and 100 mM potassium phosphate [pH 6],
9 1% glycerol) and the culture was grown at 30°C with shaking for 16-18 h or until the
10 culture reached the log-phase of growth (OD₆₀₀ = 2 to 6). The cells were then
11 harvested by centrifugation and resuspended to an OD₆₀₀ of 1 in 25 ml of BMM
12 medium (BMG medium containing 0.5% methanol instead of 1% glycerol) to induce
13 production of EntP. The culture was grown at 30°C with shaking for 24 h. The *P.*
14 *pastoris* X-33t₁ cells were also grown and induced in the buffered complex media
15 BMGY (BMG with 1% yeast extract and 2% peptone) and BMMY (BMM with 1% yeast
16 extract and 2% peptone), essentially as described above. Cell-free culture supernatants
17 of the induced *P. pastoris* X-33t₁ cultures were obtained, and the heterologous
18 production and antimicrobial activity of EntP determined and quantified using the
19 antimicrobial activity and immunological assays described below.

20
21 **Antimicrobial activity assays.** The antimicrobial activity of selected *P. pastoris*
22 clones was assayed by a stab-on-agar test, as previously described (8). Briefly, yeast
23 colonies were stabbed onto BMMY plates and incubated at 30°C for 48 h to initiate
24 bacterial growth and bacteriocin production. Then, 15 ml of MRS soft agar (0.8% agar)
25 containing about 10⁵ CFU/ml of the indicator *E. faecium* T136 were poured over the
26 plates and following incubation at 32°C for 18 h, the plates were examined for growth
27 inhibition zones. Cell-free culture supernatants from *E. faecium* P13 and *P. pastoris*
28 were obtained by centrifugation of cultures at 12,000 *g* at 4°C for 10 min, adjusted to
29 pH 6.2 with 1 M NaOH, filtered through 0,22 µm-pore-size-filters (Millipore Corp.,
30 Bedford, MA, USA) and stored at -20° C until use. The antimicrobial activity of the
31 supernatants was screened by an agar well diffusion test (ADT) and a microtitre plate
32 assay (MPA) as previously described (8), using *E. faecium* T136 as the indicator
33 microorganism. With the MPA, growth inhibition of the sensitive culture was measured
34 spectrophotometrically at 620 nm with a microtitre Labsystems iEMS plate reader

1 (Helsinki, Finland). One bacteriocin unit (BU) was defined as the reciprocal of the
2 highest dilution of the bacteriocin causing 50% growth inhibition (50% of the turbidity
3 of the control culture without bacteriocin).

4
5 **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).** Polyclonal antibodies with
6 specificity for EntP and a non-competitive indirect ELISA (NCI-ELISA) were used to
7 detect and quantify EntP, as previously described (18). Briefly, wells of flat-bottom
8 polystyrene microtitre plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated
9 overnight (4°C) with different concentrations of pure EntP or with supernatants from *E.*
10 *faecium* P13 or from the recombinant *P. pastoris* hosts. After addition of the anti-P2-
11 KLH (N-terminal epitope EntP) or the anti-P3-KLH (C-terminal epitope EntP) serum
12 and the goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Cappel Laboratories, West
13 Chester, PA, USA), bound peroxidase was determined with ABTS (2,2'-azino-bis[3-
14 ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid], Sigma) as the substrate by measuring the
15 absorbance of the wells at 405 nm with a Labsystems iEMS reader (Helsinki, Finland).
16 Known concentrations of EntP in MRS, BMM or BMMY were used to construct
17 standard curves

18
19 **Purification of EntP and mass spectrometry analysis.** Ent P was purified from *E.*
20 *faecium* P13 and *P. pastoris* X33t₁, following the protocol described by Gutiérrez et al.,
21 (18). The purification of EntP from *P. pastoris* X-33t₁ was performed from a 400-ml
22 culture grown in the BMMY medium at 30°C with agitation for 6 h, while EntP from *E.*
23 *faecium* P13 was recovered from a 1-liter culture grown in MRS at 32°C for 16 h.
24 During purification, the EntP activity was calculated by MPA with *E. faecium* T136 as
25 the indicator microorganism. Purified EntP fractions were subjected to matrix assisted
26 laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. Briefly, 1 µl
27 sample was spotted onto a MALDI target plate and allowed to air-dry at room
28 temperature. Then, 0.4 ml of a 3 mg/ml α-cyano-4-hydroxy-transcinnamic acid matrix
29 (Sigma) in 50% acetonitrile was added to the dried sample and allowed again to air-
30 dry at room temperature. MALDI-TOF analyses were performed in a Voyager-DE STR
31 Instrument (PerSeptive Biosystems, Foster City, CA, USA) a model fitted with a
32 nitrogen laser and operated in reflector mode, with an accelerating voltage of 25000 V.

33

1 **Protein electrophoresis, overlay assay and Western blotting.** Purified EntP,
2 enterocin Q and pediocin PA-1 were subjected to Tricine-SDS-PAGE as described by
3 Shägger and Von Jagow (35). Protein electrophoresis was performed on Novex 16%
4 Tricine gels (Invitrogen) and the resulting gels were analyzed by silver staining,
5 Western blotting and overlay assay as previously described (18). Pure pediocin PA-1
6 and enterocin Q were obtained as previously described (18).

7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

RESULTS

Heterologous production and functional expression of EntP by *P. pastoris*.

When the recombinant plasmid pJC31 was linearized and used to transform competent *P. pastoris* X-33 cells, the *P. pastoris* X-33t₁ clone showed a potent direct antimicrobial activity against the indicator strain *E. faecium* T136 (Fig. 1). The heterologous production of EntP by *P. pastoris* X-33t₁ was further evaluated and quantified by ADT, MPA and by specific anti-EntP antibodies in an NCI-ELISA. Results from Fig. 2 indicates that supernatants of *P. pastoris* X-33t₁, grown in the minimal medium BMM, produced smaller halos of inhibition (Fig. 2A) that supernatants of the same culture, grown in the complex medium BMMY (Fig. 2B). Moreover, the halos generated by supernatants of the culture grown in BMMY were larger and its activity lasted longer during the fermentation period than those of the culture grown in BMM. The results shown in Table 1 further confirm that production of EntP by cultures of *P. pastoris* X33t₁, grown in BMM, increased during 10 h of growth, and decreased thereafter, whereas its antimicrobial activity was low and not coincident with the maximum EntP production. However, growth of *P. pastoris* X-33t₁ in BMMY showed that production of EntP reached its maximum level after 6 h, and decreased thereafter. Most importantly, the antimicrobial activity of EntP was higher and reached its maximum coinciding with its largest production (Table 1B). Results of Table 1 also indicates that maximum production of EntP during growth of *P. pastoris* X-33t₁ in BMM, represents a 2.6-fold increase compared to the EntP produced by *E. faecium* P13 (7.5 µg/ml), but its maximum antimicrobial activity was a 25% of that of the EntP produced by *E. faecium* P13 (625 BU/ml) (Table 1A). However, maximum production of EntP by *P. pastoris* X-33t₁ grown in BMMY was a 3.7-fold higher, and its antimicrobial activity a 16-fold higher, that production and activity of EntP by *E. faecium* P13 (Table 1B). The specific antimicrobial activity of EntP from the supernatant of *P. pastoris* X-33t₁ grown in BMMY (363 BU/µg), was also higher than that of EntP in the supernatant of *E. faecium* P13 (83 BU/µg).

Purification of EntP, Western blotting and mass spectrometry analysis. The results of the purification of EntP from *E. faecium* P13 and *P. pastoris* X-33t₁ are shown in Table 2. Although, as expected, the total antimicrobial activity was larger in

1 the supernatant of *P. pastoris* X-33t₁, and the purification of EntP resulted, in both
2 cases, in two fractions with EntP activity after RP-FPLC, the final recovery of EntP
3 activity was about 23% of the initial activity in *E. faecium* P13, and 5% of the initial
4 activity in *P. pastoris* X-33t₁. Further characterization of EntP in fractions B from *E.*
5 *faecium* P13 and *P. pastoris* X-33t₁ was performed by protein electrophoresis,
6 Western blotting and an overlay assay. Purified EntP from *P. pastoris* X-33t₁ has a
7 strong tendency to form aggregates (Fig. 3A), and both purified EntP from *E. faecium*
8 P13 and *P. pastoris* X-33t₁, show a strong antimicrobial activity in the overlay assay
9 (Fig. 3B), with the largest activity displayed by the EntP produced by the recombinant
10 yeast. Moreover, after Western blotting (Fig. 3C), the anti-EntP antibodies only
11 recognized reactive antigenic bands in the lanes corresponding to purified EntP from
12 *E. faecium* P13 and *P. pastoris* X-33t₁. When fraction B from both purified
13 supernatants was subjected to MALDI-TOF MS analysis, in both cases (Fig. 4) the
14 presence of a major fragment of identical molecular mass, and corresponding to the
15 theoretical molecular mass of pure EntP (4,630.1) was obtained.

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

DISCUSSION

1
2
3 Bacteriocins produced by LAB have received increased scrutiny over the past few
4 years due to their potential use as food preservatives (10, 32). The production of
5 bacteriocins include expression in the native strains, use of heterologous hosts, and
6 chemical synthesis. However, the heterologous production of bacteriocins could lead
7 to increased bacteriocin levels or production of bacteriocins in safer hosts.
8 Heterologous expression systems for production and secretion of cloned bacteriocins
9 have been already developed in bacteria, mostly in LAB hosts using dedicated ABC
10 transport signals (1, 2, 24, 25, 30) or the Sec pathway (2, 27-29). However, the use of
11 yeasts as alternative heterologous hosts for production of bacteriocins has not yet
12 been fully exploited.

13
14 Although several yeast species are being used as heterologous production
15 systems, *Saccharomyces cerevisiae* has not proven to be always ideal as a foreign
16 gene expression host, including the heterologous production of bacteriocins (34, 39).
17 In this work, we have produced EntP, a pediocin-like bacteriocin with strong
18 antagonistic activity against many food-borne pathogens, by using the methylotrophic
19 yeast *P. pastoris*. Plasmid pPICZ α A was selected as the expression vector because it
20 contains the *S. cerevisiae* alpha mating factor (α -MF prepro) leader sequence (11) or
21 α -factor secretion signal to target fused proteins to the secretory pathway, a methanol
22 inducible promoter (P_{AOX1}), and the AOX1 region that allows integration of the vector
23 into the *P. pastoris* genome. The gene encoding mature EntP was cloned in pPICZ α A
24 in-frame to the α -factor secretion signal peptide without the Glu-Ala spacers adjacent
25 to the Kex2 protease cleavage site (3), to generate plasmid pJC31. When pJC31 was
26 linearized and transformed into *P. pastoris* X-33 competent cells, the *P. pastoris* X-
27 33t₁ clone showed a potent antimicrobial activity (Fig. 1). It is likely that this clone is a
28 multicopy strain with several copies of the EntP expression cassette. Isolates with
29 multiple integrated copies of an expression cassette often synthesizes more
30 heterologous protein than single-copy strains.

31
32 The use of specific anti-EntP antibodies and an NCI-ELISA (18) permitted
33 quantification of the heterologous production of active EntP in the supernatants of *P.*

1 *pastoris* X-33t₁. Of interest is the observation that higher production and activity of
2 EntP is achieved during growth of the recombinant yeast in the complex BMMY
3 medium instead of the minimal BMM medium, although production and activity of EntP
4 decreases rapidly after 6 h growth of *P. pastoris* X-33t₁ in BMMY (Table 1). It may be
5 hypothesized that the EntP produced during growth of *P. pastoris* X-33t₁ in BMM or
6 BMMY either adheres to producer cells, tend to form larger aggregates or is degraded
7 by proteases. Salts and other components of the BMM medium may be also
8 responsible of the low antimicrobial activity of EntP in the presence of reasonable
9 amounts of the bacteriocin (Table 1A). Salt inhibition has been already reported to
10 reduce the inhibitory activity of antimicrobial peptides, including nisin (42). However,
11 neutral proteases with N-terminal and a higher C-terminal proteolytic activity (38),
12 might be responsible for the observed reduced antigen-epitope recognition leading to
13 a decrease of the EntP production and activity of the supernatants of *P. pastoris* X-
14 33t₁, grown in BMMY (Table 1B).

15

16 Purification of EntP from the supernatants of *E. faecium* P13 and *P. pastoris* X-33t₁
17 originated two chromatographic peaks with antagonistic activity (Table 2). The
18 existence of multiple chromatographic peaks after purification of EntP has been
19 already reported (18, 22), and is ascribed to the co-existence after RP-FPLC of
20 oxidized and non-oxidized forms of the bacteriocin. However, the yield of EntP was
21 lower from the *P. pastoris* X-33t₁ culture than from *E. faecium* P13. Reduced
22 adsorption/desorption of EntP to the cation-exchange, hydrophobic-interaction, and
23 RP-FPLC chromatographic supports are rate-limiting steps for purification of larger
24 quantities of this bacteriocin from *P. pastoris*. Thus, the overproduction of EntP from
25 recombinant yeast strains would not be useful without the development and
26 optimization of more efficient purification procedures for this bacteriocin. The EntP
27 produced by *P. pastoris* X-33t₁ has a strong tendency to form aggregates with
28 antimicrobial activity (Fig. 3). Purified EntP from both either *E. faecium* P13 or *P.*
29 *pastoris* X-33t₁ gives, after MALDI-TOF MS analysis, a major fragment of identical
30 molecular mass (Fig. 4), suggesting that the α -factor secretion signal of pJC31 directs
31 the processing and secretion of EntP adequately in *P. pastoris* X-33t₁.

32

33 From the results of this work it is clear that the heterologous production and
34 functional expression of EntP in *P. pastoris* has become a successful and readily

1 quantitative event. The heterologous production of proteins and peptides in yeasts
2 permits post-translational events such as proteolytic maturation, glycosylation and
3 disulfide bond formation. Although the amino acid sequence of EntP contains a
4 potential glycosylation site (Asn-Asn-Ser), the purified EntP from *P. pastoris* X-33t₁
5 showed the same molecular mass that the EntP purified from *E. faecium* P13 (Fig. 4)
6 suggesting that the EntP glycosylation site was not recognized. Pediocin PA-1 (34)
7 and plantaricin 423 (39) have been produced by recombinant *S. cerevisiae* hosts, but
8 no inhibitory activity was detected in the supernatants of the recombinant yeasts
9 without concentration, speculating that the bacteriocins remained cell wall-associated.
10 Moreover, EntP is the first fully active bacteriocin produced by *P. pastoris*. The large
11 production and high antimicrobial activity of the EntP in the supernatants of *P. pastoris*
12 X-33t₁ may facilitate future applications of this bacteriocin in the food industry. Many
13 pharmaceuticals and enzymes derived from methylotrophic yeasts have either entered
14 the market or are expected to do it in the near future (17, 23). Strategies for optimal
15 production of EntP by *P. pastoris* may include the use of protease-deficient host
16 strains and unbuffered media to inactivate neutral proteases (38), production in
17 fermentors (5), increase of the cellular mass using carbon sources that support growth
18 and do not represses methanol induction (37), and the use of appropriate flask
19 designs (41).

20

21

22 ACKNOWLEDGEMENTS

23

24 This work was partially supported by grants 07G/0026/2000 from the Comunidad de
25 Madrid, AGL2000-0706 and AGL2003-01508 from the Ministerio de Educación y
26 Cultura, Spain. J. Gutiérrez is recipient of a fellowship from the Ministerio de Ciencia y
27 Tecnología (MCYT), and R. Criado and M. Martín hold a fellowship from the Ministerio
28 de Educación, Cultura y Deporte (MECD), Spain.

29

30

31

32

33

34

REFERENCES

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1. **Axelsson, L., T. Katla, M. Bjornslett, V. G. H. Eijsink, and A. Holck.** 1998. A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*. FEMS Microbiol. Lett. **168**:137-143.
2. **Biet, F., J. M. Berjeaud, R. W. Worobo, Y. Cenatempo, and C. Fremaux.** 1998. Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway. Microbiology **144**:2845-2854.
3. **Brake, A. J., J. P. Merryweather, D. G. Coit, U. A. Heberlein, F. R. Masiarz, G. T. Mullenbach, M. S. Urdea, P. Valenzuela, and P.J. Barr.** 1984. α -Factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**:4642-4646.
4. **Casaus, P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes, P. E. Hernández, and H. Holo.** 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. Microbiology **143**:2287-2294.
5. **Cereghino, G. P. L., J. L. Cereghino, C. Ilgen, and J. M. Cregg.** 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Curr. Opin. Biotechnol. **13**:329-332.
6. **Cereghino, J. L., and J. M. Cregg.** 1999. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol. Rev. **24**:45-66.
7. **Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Håvarstein, P. E. Hernández, and I. F. Nes.** 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.
8. **Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E. Hernández, and I. F. Nes.** 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.
9. **Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes, and P. E. Hernández.** 2001. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Food Sci. Technol. Int. **7**:281-305.
10. **Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes, and M. L. Chikindas.** 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int. J. Food Microbiol. **71**:1-20.

- 1 11. **Cregg, J. M., T. S. Vedvick, and W. C. Raschke.** 1993. Recent advances in the
2 expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Tecnology* **11**:905-910.
- 3 12. **de Vuyst, L., M. R. Foulquie Moreno, and H. Revets.** 2003. Screening for
4 enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci
5 of different origins. *Int. J. Food Microbiol.* **84**:299-318.
- 6 13. **Eaton, T. J., and J. M. Gasson.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus*
7 virulence determinants and potential for genetic exchange between food and
8 medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1628-1635.
- 9 14. **Eijsink, V. G. H., L. Axelsson, D. B. Diep, L. S. Håvarstein, H. Holo, and I. F.**
10 **Nes.** 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example
11 of biological warfare and communication. *Antonie van Leuwenhoek* **81**:639-654.
- 12 15. **Franz, C. M. A. P., W. H. Holzapfel, and M. E. Stiles.** 1999. Enterococci at the
13 crossroads of food safety?. *Int. J. Food Microbiol.* **47**:1-24.
- 14 16. **Franz, C. M. A. P., A. B. Muscholl-Silberhorn, N. M. K. Yousif, N, M.**
15 **Vancanneyt, J. Swings, and W. M. Holzapfel.** 2001. Incidence of virulence
16 factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl.*
17 *Environ. Microbiol.* **67**:4385-4389.
- 18 17. **Gellisen, G.** 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts.
19 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**:741-750.
- 20 18. **Gutiérrez, J., R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, M. F. Fernández, L. M.**
21 **Cintas, and P. E. Hernández.** 2004. Performance and applications of polyclonal
22 anti-peptide antibodies specific for the enterococcal bacteriocin enterocin P. *J.*
23 *Agric. Food Chem.* **52**:2247-2255.
- 24 19. **Håvarstein, L. S., D. B. Diep, and I. F. Nes.** 1995. A family of bacteriocin ABC
25 transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with
26 export. *Mol. Microbiol.* **16**:229-240.
- 27 20. **Herranz, C., Y. Chen, L. M. Cintas, P. E. Hernández, T. J. Montville, and M. L.**
28 **Chikindas.** 2001. Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of
29 *Enterococcus faecium* T136. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1689-1692.
- 30 21. **Herranz, C., L. M. Cintas, P. E. Hernández, G. N. Moll, and A. J. M. Driessen.**
31 2001. Enterocin P causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136
32 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:901-904.
- 33

- 1 22. **Herranz, C., S. Mukhopadhyay, P. Casaus, J. M. Martínez, J. M. Rodríguez, I.**
2 **F. Nes, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 1999. Biochemical and genetic
3 evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains
4 isolated from fermented sausages. *Curr. Microbiol.* **39**:282-290.
- 5 23. **Hollenberg, C. P., and G. Gellissen.** 1997. Production of recombinant proteins
6 by methylotrophic yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**:554-560.
- 7 24. **Horn, N., M. I. Martínez, J. M. Martínez, P. E. Hernández, M. J. Gasson, J. M.**
8 **Rodríguez, and H. M. Dodd.** 1999. Enhanced production of pediocin PA-1 and
9 coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ.*
10 *Microbiol.* **65**:4443-4450.
- 11 25. **Martínez, J. M., J. Kok, J. W. Sanders, and P. E. Hernández.** 2000.
12 Heterologous co-production of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus*
13 *lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.*
14 **66**:3543-3549.
- 15 26. **McAuliffe, O., R. P. Ross, and C. Hill.** 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis
16 and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:285-308.
- 17 27. **McCormick, J. K., T. R. Klaenhammer, and M. E. Stiles.** 1999. Colicin V can be
18 produced by lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**:37-41.
- 19 28. **McCormick, J. K., A. Poon, M. Sailer, Y. Gao, K. L. Roy, L. M. McMullen, J. C.**
20 **Vederas, M. E. Stiles, and M. J. van Belkum.** 1998. Genetic characterization and
21 heterologous expression of brochocin-C, and antibotulinal two-peptide bacteriocin
22 produced by *Brochothrix campestris* ATCC 43754. *Appl. Environ. Microbiol.*
23 **64**:4757-4766.
- 24 29. **McCormick, J. K., R. W. Worobo, and M. E. Stiles.** 1996. Expression of the
25 antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal-peptide dependent general
26 secretory pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4095-4099.
- 27 30. **Morisset, D., and J. Frere.** 2002. Heterologous expression of bacteriocins using
28 the mesentericin Y105 dedicated transport system by *Leuconostoc*
29 *mesenteroides*. *Biochimie* **84**:569-576.
- 30 31. **Nes, I.F., and H. Holo.** 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid
31 bacteria. *Biopolymers* **55**:50-61.
- 32 32. **O'Sullivan, L., R. P. Ross, and C. Hill.** 2002. Potential of bacteriocin-producing
33 lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* **84**:593-
34 604.

- 1 33. **Sablon, E., B. Contreras, and E. Vandamme.** 2000. Antimicrobial peptides of
2 lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Adv. Biochem.*
3 *Engin. Biotechnol.* **68**:21-60.
- 4 34. **Schoeman, H., M. A. Vivier, M. du Toit, L. M. T. Dicks, and I. S. Pretorius.**
5 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the
6 *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*.
7 *Yeast* **15**:647-656.
- 8 35. **Shägger, H., and G. von Jagow.** 1987. Tricine-sodium dodecylsulfate-
9 polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range 1 to
10 100 KDa. *Anal. Biochem.* **166**:368-379.
- 11 36. **Skaugen, M., L. M. Cintas, and I. F. Nes.** 2003. Genetics of bacteriocin
12 production in lactic acid bacteria. In *Genetics of Lactic Acid Bacteria*. Kluwer
13 Academic/Plenum Publishers, N Y. Edited by Brian J.B. Wood and Philip J.
14 Warner. pp. 225-260.
- 15 37. **Sreekrishna, K., R. G. Brankamp, K. E. Kropp, D. T. Blankenship, J. T. Tsay,**
16 **P. L. Smith, J. D. Wierschke, A. Subramaniam, and L. A. Birkenberger.** 1997.
17 Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the
18 methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **190**:55-62.
- 19 38. **Trucksis, M., T. L. Conn, A. Fasano, and J. B. Kaper.** 1997. Production of *Vibrio*
20 *cholerae* accesory cholera enterotoxin (Ace) in the yeast *Pichia pastoris*. *Inf.*
21 *Immun.* **65**:4984-4988.
- 22 39. **Van Reenen, C. A., M. L. Chikindas, W. H. van Zyl, and L. M. T. Dicks.** 2002.
23 Characterization and heterologous expression of a class lia bacteriocin, plantaricin
24 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food*
25 *Microbiol.* **81**:29-40.
- 26 40. **Van Wely, K. H. M., J. Swaving, R. Freudl, and A. J. M. Driessen.** 2001.
27 Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria.
28 *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:437-454.
- 29 41. **Villate, F., A. S. Hussein, T. T. Bachmann, and R. D. Schmid.** 2001. Expression
30 level of heterologous proteins in *Pichia pastoris* is influenced by flask design. *Appl.*
31 *Microbiol. Biotechnol.* **55**:463-465.
- 32
33

- 1 42. **Zhang, H., S. Yoshida, T. Aizawa, R. Murakami, M. Suzuki, N. Koganezawa, A.**
2 **Matsuura, M. Miyazawa, K. Kawano, K. Nitta, and Y. Kato.** 2000. *In vitro*
3 antimicrobial properties of recombinant ASABF, an antimicrobial peptide isolated
4 from the nematode *Ascaris suum*. *Antimicrob. Agents Chemoth.* **44**:2701-2705.

5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1

2 **Legend to figures**

3

4 FIG. 1. Direct antimicrobial activity by the stab-on-agar test of *P. pastoris* X-33 (1)
5 and *P. pastoris* X-33t₁ (2), using (A) *E. faecium* T136 and (B) *E. faecium* P13 as the
6 indicator strains.

7

8 FIG. 2. Agar well diffusion test (ADT) for detection of enterocin P activity against *E.*
9 *faecium* T136. Wells contain supernatants of *P. pastoris* X-33t₁ cultures grown in the
10 minimal medium BMM (A) and the complex medium BMMY (B), after 0 (d), 4 (e), 6 (f),
11 8 (g), 10 (h), 12 (i) and 24 (j) hours of incubation. Supernatants of *P. pastoris* X-33
12 cultures propagated in BMM or BMMY after 0 (a), 6 (b) and 12 (c) hours of growth,
13 were used as negative controls. Supernatants of *E. faecium* P13 containing 8 (l), 2 (m)
14 and 0.5 µg/ml (n) of EntP, and the supernatant of *E. faecium* T136 (k) were used as
15 positive and negative controls, respectively.

16

17 FIG. 3. Tricine-SDS-PAGE of different bacteriocins after (A) silver staining, (B)
18 overlay with the indicator *E. faecium* T136, and (C) Western blotting with specific anti-
19 EntP antibodies. M, molecular weight markers with sizes indicated in the left margin.
20 Lane 1, 1 µg of pure enterocin Q; lane 2, 1 µg of pure pediocin PA-1; lane 3, 1 µg of
21 pure enterocin P from *E. faecium* P13; lane 4, 1 µg of pure enterocin P from *P.*
22 *pastoris* X-33t₁.

23

24 FIG. 4. Mass spectrometry analysis of enterocin P purified from (A) *E. faecium* P13
25 and (B) *P. pastoris* X-33t₁.

26

FIG. 1

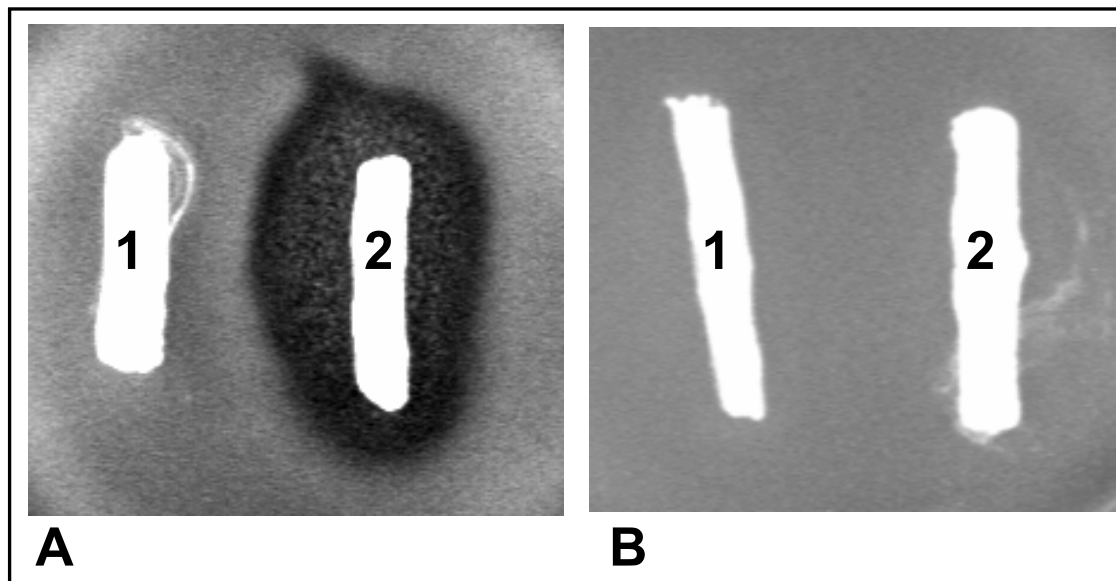


FIG. 2

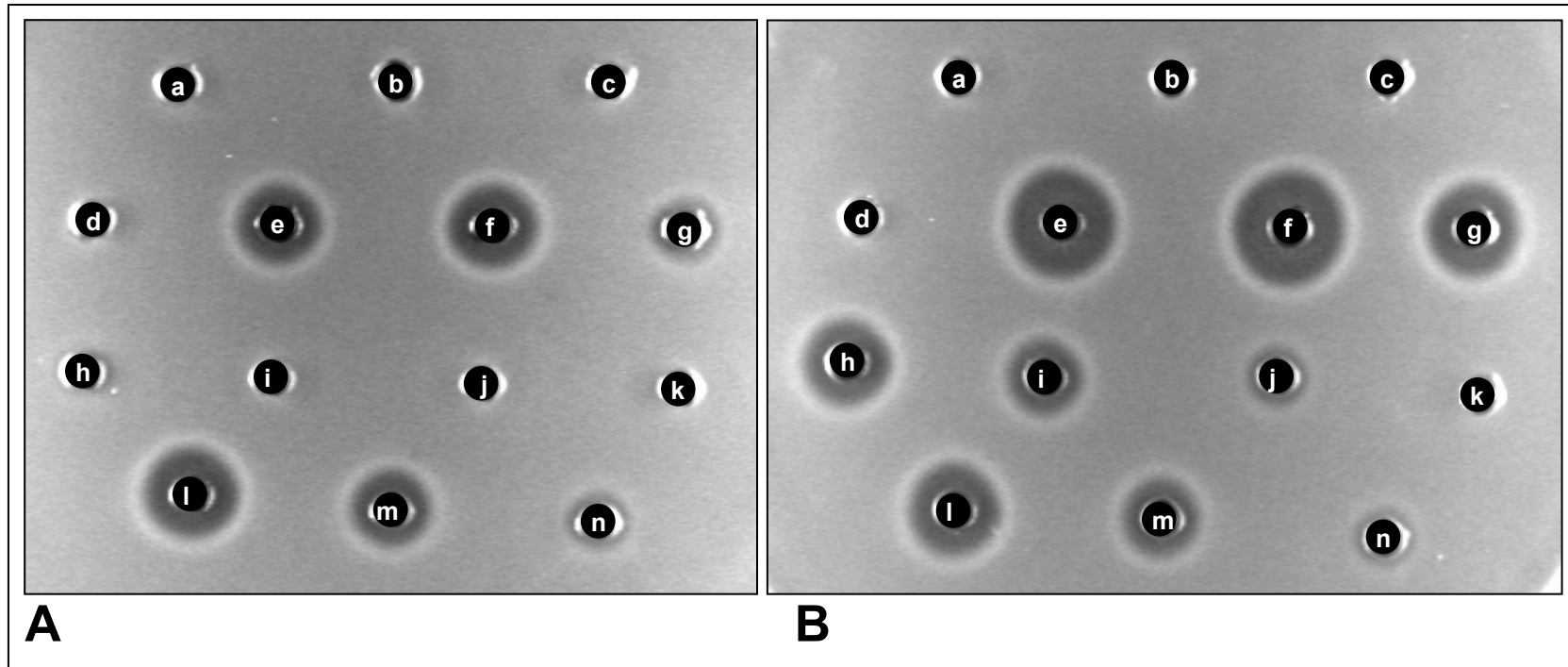


FIG. 3

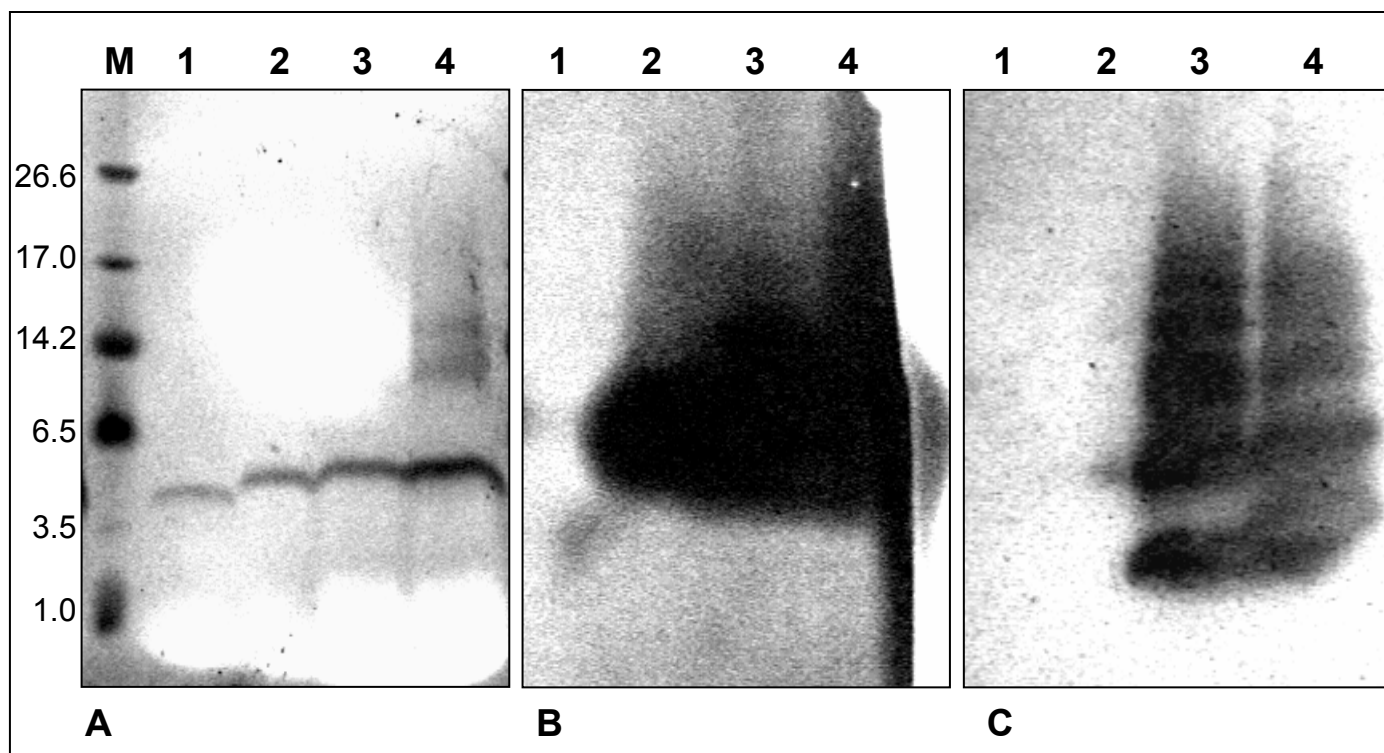
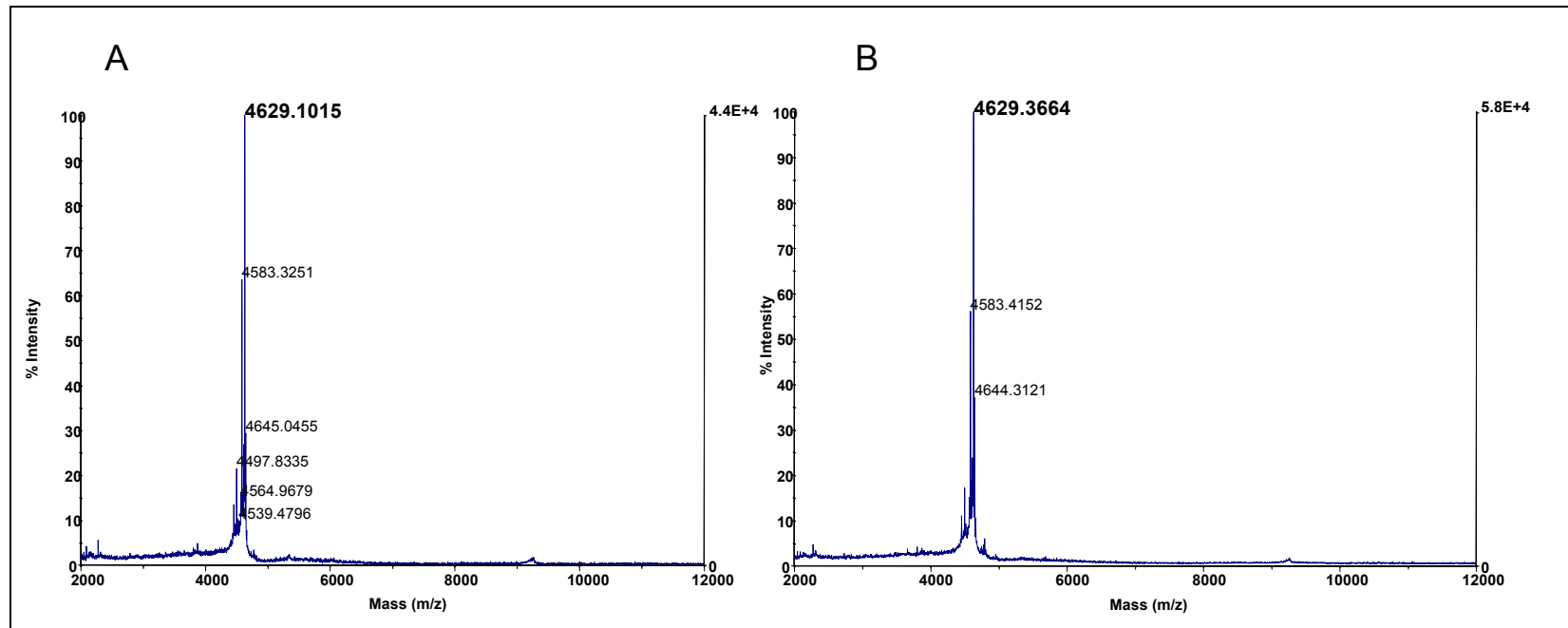


FIG. 4



1
2
3
4
5
6

TABLE 1. Production and antimicrobial activity of enterocin P from supernatants of *P. pastoris* X-33t₁ grown in the minimal medium BMM (A), and in the complex medium BMMY (B).

A. Incubation time (h)	OD _{600nm} ^a	EntP production (µg/ml) ^b		Antimicrobial activity ^c (BU/ml)
		N-terminal epitope	C-terminal epitope	
0	1.0	-	-	-
2	1.4	-	-	-
4	1.7	3.6	3.0	36
6	2.3	14.1	14.5	163
8	2.9	16.6	19.0	25
10	3.1	22.8	21.4	-
12	2.5	20.4	19.6	-
24	2.4	5.1	8.1	-

B. Incubation time (h)	OD _{600nm} ^a	EntP production (µg/ml) ^b		Antimicrobial activity ^c (BU/ml)
		N-terminal epitope	C-terminal epitope	
0	1.0	-	-	-
2	1.6	3.7	3.5	306
4	2.2	14.4	9.2	3,746
6	3.3	28.2	16.6	10,240
8	4.6	9.0	4.3	844
10	5.4	5.8	3.9	155
12	5.1	4.4	2.5	32
24	5.0	4.0	1.9	15

7
8

9
10
11
12
13
14
15
16
17

^a Optical density of the culture at 660 nm.

^b EntP production was calculated by a NCI-ELISA using specific polyclonal antibodies against the N- and C-terminal region of EntP.

^c Antimicrobial activity was calculated by the MPA.

1
2
3
4
5
6TABLE 2. Purification of enterocin P produced by *E. faecium* P13 and *P. pastoris* X-33t₁.

Purification stage	Volume (ml)	Total A ₂₅₄ ^a	Total activity (10 ³ BU) ^b	Specific activity ^b	Increase in specific activity ^c (fold)	Yield (%)
<i>E. faecium</i> P13						
Culture supernatant Fraction	1,000	37,900	775	20	1	100
Ammonium sulfate precipitation	100	3,180	566	176	9	73
Gel filtration chromatography	200	2,200	545	248	12	70
Cation-exchange chromatography	50	21	276	13,143	657	36
Hydrophobic-interaction chromatography	10	8.95	305	34,078	1,704	40
RP-FPLC						
Fraction A	1.02	0.011	50	4,545,454	227,273	6
Fraction B	1.08	0.063	134	2,126,984	106,349	17
<i>P. pastoris</i> X-33t ₁						
Culture supernatant Fraction	400	14,520	4,618	318	1	100
Ammonium sulfate precipitation	100	1,220	4,587	3,760	12	99
Gel filtration chromatography	200	740	1,147	1,550	5	25
Cation-exchange chromatography	50	9.05	295	32,597	102	6
Hydrophobic-interaction chromatography	10	8.2	406	49,512	156	9
RP-FPLC						
Fraction A	1.25	0.12	28	233,333	734	0.6
Fraction B	1.22	0.14	205	1,464,286	4,605	4.4

^a Absorbance at 254 nm multiplied by the volume in milliliters.^b Antimicrobial activity in bacteriocin units per milliliter (BU/ml) and multiplied by the total volume.^c Specific activity is the number of bacteriocin units divided by the total A₂₅₄.^d The specific activity of a fraction divided by the specific activity of the culture supernatant7
8
9
10
11

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL

Nota aclaratoria: a lo largo de este capítulo se muestran los resultados descritos en los capítulos III, IV, V, VI y VII, así como las conclusiones derivadas de los resultados presentados. Para ello, se hará referencia a figuras y tablas de los capítulos citados, las cuales se indicarán con el número del capítulo de dónde proceden seguido de su número de identificación en el capítulo correspondiente.

VIII.1. CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA Y PURIFICACIÓN DE LA ENTEROCINA P

Resumen: La obtención de anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada frente a la enterocina P (EntP) se ha conseguido mediante la inmunización de conejos con péptidos sintéticos diseñados del extremo N-terminal de dicha bacteriocina (P1 y P2) y de su región C-terminal (P3) y conjugados a la molécula portadora KLH. La sensibilidad y especificidad de los anticuerpos anti-péptido-KLH generados se evaluó mediante un ensayo inmunoenzimático no competitivo indirecto (ELISA-NCI) y otro competitivo indirecto (ELISA-CI). El ensayo ELISA-NCI demostró su utilidad para detectar la presencia de anticuerpos específicos frente a la EntP en el inmunosuero de los animales inmunizados con los conjugados P2-KLH y P3-KLH y para detectar y cuantificar la EntP de los sobrenadantes de los cultivos productores de dicha bacteriocina. Además, el inmunosuero anti-P2-KLH mostró reacción cruzada con el sobrenadante de un cultivo productor de sakacina A, una bacteriocina de secuencia aminoacídica homóloga a la de la EntP en su región N-terminal. La construcción de columnas cromatográficas de inmovilización que contenían inmunoglobulinas anti-P2-KLH y anti-P3-KLH permitieron la recuperación de la EntP del sobrenadante de los cultivos productores. Asimismo, el empleo de los anticuerpos generados frente al conjugado P2-KLH en experiencias de *Western blotting* mostraron la utilidad de estos anticuerpos en el reconocimiento de la EntP y que dicha bacteriocina tiende a la formación de agregados. Finalmente, la monitorización de la purificación multicromatográfica de la EntP mediante la utilización de anticuerpos anti-peptídicos sugiere que mientras la recuperación de la EntP parece aceptable respecto de la recuperación de su actividad antimicrobiana inicial, sin embargo, su eficacia se encuentra lejos de considerarse aceptable respecto de la recuperación de la concentración inicial de la EntP. Los anticuerpos generados frente a la EntP se evaluarán también para detectar y cuantificar la EntP de los sobrenadantes de organismos genéticamente modificados productores de dicha bacteriocina, así como para evaluar su purificación en un sólo paso por cromatografía de inmovilización.

VIII.1.1. Obtención de anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada frente a la enterocina P

Los péptidos sintéticos P1, P2 y P3 se conjugaron a la molécula portadora KLH y se utilizaron como inmunógenos para la obtención de anticuerpos policlonales específicos frente a la EntP. Dichos péptidos se diseñaron a partir de la secuencia aminoacídica de la EntP y comprendían los 7 y los 11 primeros aminoácidos de su extremo N-terminal (P1: NH₂-ATRSYGN-COOH; y P2: NH₂-ATRSYGNVYC-COOH) y los 9 últimos aminoácidos de su extremo C-terminal (P3: NH₂-ASGLAGHG-COOH). Los sueros de los conejos inmunizados se analizaron mediante los ensayos inmunoenzimáticos ELISA-NCI y ELISA-CI para determinar su sensibilidad y especificidad frente a la EntP. El inmunosuero anti-P1-KLH no detectó a la EntP, probablemente, porque su epitopo es pequeño para inducir una respuesta inmune, mientras que los inmunosueros anti-P2-KLH y anti-P3-KLH mostraron una elevada sensibilidad y especificidad frente a la EntP con el ELISA-NCI (Figura III.1). El límite de detección de la EntP fue de 0,1 µg EntP/ml para el inmunosuero anti-P3-KLH y de 0,25 µg EntP/ml para el anti-P2-KLH. Desafortunadamente, la sensibilidad y especificidad de los inmunosueros anti-P2-KLH y anti-P3-KLH fue notablemente inferior con el inmunoformato ELISA-CI. Los resultados obtenidos

destacan la importancia de desarrollar formatos adecuados de detección y cuantificación de cada bacteriocina. El límite de detección y sensibilidad del ELISA-NCI desarrollado para la EntP se mantuvo en el rango de otros previamente descritos para la detección y cuantificación de la nisina A (Suárez y col., 1996a), nisina Z (Daoudi y col., 2001), pediocina PA-1 (Martínez y col., 1998; 1999), enterocina A (Martínez y col., 2000) y enterocina B (Rose y col., 2001).

Posteriormente, la inmunoreactividad de los inmunosueros anti-P2-KLH y anti-P3-KLH se evaluó frente a los sobrenadantes de diversos microorganismos productores de bacteriocinas. De los resultados obtenidos (Tabla III.1), se deduce que los anticuerpos anti-P3-KLH (región C-terminal de la molécula) son específicos frente a la EntP, mientras los anti-P2-KLH (región N-terminal de la molécula) reconocen a la EntP y a la sakacina A. Diez de los once primeros aminoácidos del extremo N-terminal de la sakacina A (Holck y col., 1992) son idénticos a los del péptido P2, por lo que no es de extrañar que el inmunosuero resultante de este péptido reconozca ambas bacteriocinas. No obstante, dicho inmunosuero no mostró especificidad con otras bacteriocinas de la subclase IIa que poseen en su extremo N-terminal la secuencia consenso YGNGV, como la pediocina PA-1, la enterocina A y la sakacina P. La ausencia de reactividad cruzada de los inmunosueros evaluados frente a sobrenadantes de cultivos productores de otras bacteriocinas no debe sorprender, ya que modificaciones en un solo aminoácido de una secuencia peptídica afectan drásticamente a su reconocimiento inmunológico (Rolland y col., 1995). No obstante, la especificidad de cualquier anticuerpo anti-peptídico debe evaluarse siempre debido a la posible reactividad cruzada de dichos anticuerpos frente a bacteriocinas estrechamente relacionadas.

Los inmunosueros anti-P2-KLH y anti-P3-KLH también mostraron su utilidad para detectar y cuantificar la EntP de los sobrenadantes de cepas productoras de dicha bacteriocina. En la Tabla III.2 se observa que la producción de EntP fue mayor en aquellas que solamente producían la EntP (*E. faecium* AA13, G16 y P13). Por otro lado, la producción de EntP en aquellas productoras de más de una bacteriocina (*E. faecium* L50) representó, aproximadamente, el 65% de la producción de EntP por *E. faecium* P13. De los resultados obtenidos se desprende que los citados anticuerpos constituyen un reactivo de elevado valor analítico en la detección y cuantificación de la EntP de microorganismos de diversas fuentes y orígenes y en los que la existencia de genes asociados a su producción se ha determinado previamente por técnicas genéticas.

VIII.1.2. Inmunopurificación de la enterocina P

La obtención de los anticuerpos anti-P2-KLH y anti-P3-KLH ha permitido el diseño y desarrollo de columnas cromatográficas, denominadas A y B, respectivamente, capaces de retener a la EntP en un sólo paso de purificación y con una eficacia elevada. La utilización de ambas columnas cromatográficas ha permitido la recuperación de la EntP con una eficacia del 9-100% (Tabla III.3), dependiendo de la cantidad inicial de EntP incorporada en las columnas. Asimismo, aunque la cantidad de EntP recuperada por las columnas A y B parece pequeña (Tabla III.3), la inmunopurificación de la EntP en un sólo paso de purificación a partir de volúmenes pequeños del sobrenadante del cultivo productor significa una recuperación razonable, comparada con la derivada del empleo de diversas columnas multicromatográficas. La columna A también retuvo a la sakacina A de *Lb. sakei* 706. Sin embargo, cuando las fracciones eluidas, que contenían a la EntP y a la sakacina A, se sometieron a experiencias de secuenciación, éstas no resultaron lo suficientemente purificadas para mostrar una secuencia aminoacídica única. Además, el perfil electroforético de dichas fracciones mostró una tinción proteínica intensa de las bandas del gel, lo que sugiere la posibilidad de que ambas

bacteriocinas formen agregados o complejos proteicos con otras proteínas y/o péptidos de las células lisadas o de las del medio de cultivo.

Al igual que en el caso de la EntP, las bacteriocinas pediocina PA-1 (Martínez, 2000) y enterocina B (Rose y col., 2001) se han purificado mediante el empleo de columnas cromatográficas que contenían anticuerpos policlonales específicos frente a ellas. No obstante, la utilización de matrices cromatográficas con anticuerpos monoclonales específicos frente a la nisina A (Suárez y col., 1997) y nisina Z (Prioult y col., 2000; Benech y col., 2002) han permitido la recuperación de cantidades más elevadas de bacteriocinas y con unos mejores rendimientos de purificación. Por ello, la construcción de columnas cromatográficas con un mayor contenido de inmunoglobulinas G policlonales o de anticuerpos monoclonales específicos frente a la EntP, permitiría incrementar la recuperación de la EntP de dichas columnas, en un sólo paso de purificación, y con rendimientos de recuperación más elevados.

Asimismo, los anticuerpos anti-P2-KLH también han mostrado su utilidad en la determinación de una característica bioquímica relevante de la EntP. Cuando la pediocina PA-1, enterocina Q y EntP purificadas a homogeneidad se transfirieron de un gel de Tricina-SDS a una membrana de nitrocelulosa y se enfrentaron a los anticuerpos previamente citados, dichos anticuerpos solamente reconocieron péptidos reactivos en la sección de la membrana que contenía a la EntP (Figura III.2). Los resultados obtenidos confirman que dichos anticuerpos no manifiestan reacciones cruzadas con bacteriocinas similares de la subclase IIa y justifican la observación de bandas proteicas fuertemente teñidas tras experiencias de Tricina-SDS-PAGE con la EntP y la sakacina A recuperadas por cromatografía de inmunoafinidad. Más aún, aunque la estructura molecular de los agregados de la EntP no se conoce todavía, su formación parece reducir la actividad biológica de la EntP purificada a homogeneidad (Figura III.2).

VIII.1.3. Monitorización de la purificación a homogeneidad de la enterocina P

Tradicionalmente, la monitorización de la recuperación de las bacteriocinas durante su purificación se ha basado en la medida de su actividad antimicrobiana. En general, los ensayos microbiológicos de medida de la actividad antimicrobiana son rápidos y sencillos y, en la mayoría de los casos, simplifican los protocolos de purificación. No obstante, el incremento aparente de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas durante su purificación puede deberse a la eliminación de compuestos inhibidores de su actividad, a su desagregación molecular ó a modificaciones conformacionales de su molécula en presencia de solventes hidrofóbicos (Cintas y col., 1997; Martínez y col., 1998), lo que sobrevaloraría el resultado final de la cantidad de bacteriocina recuperada. Por ello, en este trabajo se ha determinado el porcentaje de recuperación de la EntP evaluando la actividad antimicrobiana y la cantidad de bacteriocina en cada una de las etapas del proceso de purificación.

Por primera vez en el campo de las bacteriocinas, la utilización de anticuerpos antipeptídicos específicos (anticuerpos anti-P3-KLH) ha permitido monitorizar la recuperación de una bacteriocina (EntP) purificada a través de dos procedimientos multicromatográficos distintos. Los resultados obtenidos tras la purificación de la EntP mediante la utilización de la resina polimérica XAD-16 y de las columnas cromatográficas de intercambio catiónico (Resource S) y de fase reversa (PepRPC HR 5/5) (Tabla III.4) muestran que, mientras el proceso de purificación de la EntP parece razonablemente aceptable respecto a la recuperación de su actividad antimicrobiana inicial (3,3%), su recuperación final se encuentra muy lejos de ser atractiva respecto a la recuperación de la cantidad inicial de bacteriocina de los sobrenadantes de los cultivos productores (0,010%). Los resultados obtenidos sugieren que una adsorción/desorción ineficaz de la EntP a la resina polimérica y a la matriz de fase reversa (RP-FPLC) constituyen

pasos limitantes en la recuperación de cantidades más elevadas de EntP. De igual modo, los resultados obtenidos tras la purificación de la EntP utilizando un segundo protocolo de purificación (Tabla III.5) muestran que, aunque su recuperación podría ser aceptable respecto a la recuperación de su actividad antimicrobiana inicial (31%), su recuperación queda muy lejos de ser satisfactoria respecto a la cantidad inicial de EntP recuperada (0,023%). Las pérdidas elevadas de EntP tras su precipitación con sulfato amónico y de su purificación posterior por cromatografías de intercambio catiónico, interacción hidrofóbica y de fase reversa (RP-FPLC), sugieren que dichas etapas consituyen pasos limitantes en la recuperación de cantidades más elevadas de EntP.

Hasta ahora, en la mayoría de estudios relacionados con el desarrollo de mejores y más avanzados métodos analíticos de purificación de bacteriocinas (Carolissen-Mackay y col., 1997; Guyonnet y col., 2000; Uteng y col., 2002), la presencia de dichos péptidos en las fracciones purificadas se ha evaluado determinando su actividad antimicrobiana y calculando la cantidad de bacteriocina de las muestras por métodos colorimétricos ó mediante la determinación de su absorbancia a 280 nm, la cual se convierte en concentración de proteína mediante la determinación previa de los coeficientes de extinción molecular de cada bacteriocina. Sin embargo, ninguno de los métodos descritos posee la suficiente especificidad, por lo que los porcentajes reales de recuperación de las bacteriocinas purificadas son difíciles de determinar. Por ello, si la industria alimentaria demandase cantidades mayores de EntP o de otras bacteriocinas purificadas ó parcialmente purificadas para su uso como aditivos antimicrobianos naturales de los alimentos, la utilización de anticuerpos de actividad predeterminada frente a la EntP u otras bacteriocinas, debería ayudar en el diseño y optimización de protocolos más eficaces de purificación de dichas bacteriocinas.

VIII.2. CLONACIÓN, PRODUCCIÓN Y EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LA ENTEROCINA P EN HOSPEDADORES HETERÓLOGOS

VIII.2.1. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA P EN *Escherichia coli*

Resumen: La clonación, producción y expresión funcional de la enterocina P (EntP), una bacteriocina *sec*-dependiente producida por *E. faecium* P13, se ha evaluado en *E. coli*. Para ello, fragmentos génicos amplificados por PCR, que codifican la preenterocina P (*entP*) ó *entP* más el gen (*entiP*) que codifica su proteína putativa de inmunidad (EntiP), se clonaron en el plásmido pETBlue-1 bajo el control del promotor inducible *T7lac*. Aunque los plásmidos recombinantes resultantes, pJG01 (*entP*) ó pJG02 (*entP* más *entiP*), no sintetizaron productos con actividad antimicrobiana en reacciones de transcripción/traducción *in vitro*, sin embargo, produjeron péptidos con actividad antimicrobiana tras su transformación y posterior inducción en células competentes de *E. coli* Tuner(DE3)pLacl. La utilización de anticuerpos de actividad predeterminada frente a la EntP y de un ensayo inmunoenzimático no competitivo indirecto (ELISA-NCI), permitió la detección y cuantificación de la EntP de los sobrenadantes (SN), de la fracción que contiene la proteína celular soluble (CSF) y de los cuerpos de inclusión (IB) de las células de *E. coli* Tuner(DE3)pLacl transformadas con los plásmidos recombinantes pJG01 y pJG02. Igualmente, la utilización de soportes cromatográficos que contienen anticuerpos policlonales anti-EntP permitió la recuperación de la EntP, de una forma eficaz y en un sólo paso, a partir de cultivos de *E. coli* Tuner(DE3)pLacl (pJG01) desarrollados en un medio de cultivo complejo. Además, el desarrollo de un método de purificación simplificado por adsorción hidrofóbica y cromatografía de fase reversa (RP-FPLC), también permitió la recuperación de EntP activa de los sobrenadantes de los mismos cultivos, aunque, en este caso, desarrollados en un medio de cultivo mínimo. De los resultados de este trabajo se concluye que las células

recombinantes de *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) merecen su reconocimiento y aceptación como modelo experimental de producción y expresión funcional de la EntP en otros hospedadores. Además, la utilización de *E. coli* Tuner(DE3) pLacI (pJG01) como sistema de producción heteróloga de la EntP ha permitido una recuperación rápida y eficaz de dicha bacteriocina de los sobrenadantes del cultivo productor mediante el empleo de técnicas inmunológicas y multicromatográficas relativamente sencillas.

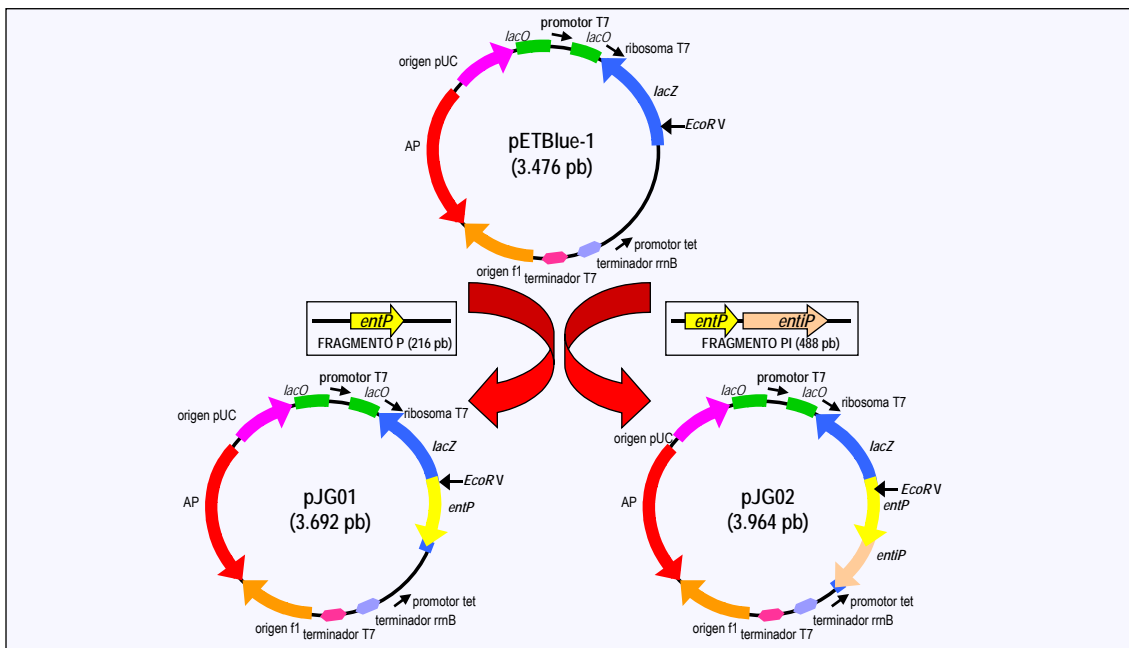
VIII.2.1.1 Clonación y producción de la enterocina P en *E. coli*

El ADN total de *E. faecium* P13 se utilizó como molde para generar por PCR fragmentos génicos que contenían a la preenterocina P (*entP*) ó el gen *entP* con su proteína putativa de inmunidad (*entiP*). La clonación de ambos fragmentos en el vector de expresión pETBlue-1, que facilita la producción de péptidos a partir de insertos con el triplete de iniciación ATG, generó los plásmidos recombinantes pJG01 (*entP*) y pJG02 (*entP* más *entiP*) (figura VIII.1). La selección de los plásmidos recombinantes se realizó en *E. coli* NovaBlue, un hospedador incapaz de activar la transcripción de los genes bajo el control del promotor T7lac. Esta estrategia de clonación, que facilita la estabilidad de vectores que contienen los genes necesarios para la síntesis de la preenterocina P (*entP*) bajo el control de un promotor inducible, contrasta con la utilizada por McCormick y col. (1998; 1999). Dichos autores describieron la imposibilidad de generar vectores de expresión estables en *E. coli* cuando el fragmento génico que codifica el péptido señal de la divergicina A, fusionado a la secuencia nucleotídica de la brococina (McCormick y col., 1998) o de la colicina V (McCormick y col., 1999), se coloca bajo el control de promotores constitutivos. Cuando los plásmidos pJG01 y pJG02 se utilizaron como molde en reacciones de transcripción/traducción *in vitro*, ninguna de las mezclas de reacción mostró actividad antimicrobiana, aún cuando la EntP se encontraba en las muestras a concentraciones que superaban las mínimas requeridas para visualizar su actividad antagonista. Probablemente, ello se deba a la incapacidad del sistema experimental utilizado de formar los enlaces disulfuro necesarios para una actividad biológica plena de la EntP, lo que truncó la posibilidad de utilizar sistemas automatizados de traducción de proteínas, como el "Rapid Translation System RT 500" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), para generar una elevada producción *in vitro* de la EntP en un sistema libre de células.

Sin embargo, los genes clonados en los plásmidos recombinantes pJG01 y pJG02 produjeron la EntP activa cuando se transfirieron por transformación a la cepa de *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (Fig. IV.1). La extensión N-terminal de la preenterocina P parece poseer un péptido señal hidrófobo que contiene un lugar de procesado, transporte y secreción reconocido por peptidasas señal y otros componentes activos de la ruta general de secreción (GSP) ó sistema sec de *E. coli*, lo que permite la liberación de la EntP al exterior celular. Posteriormente, la adición del agente inductor IPTG (isopropil tiogalactósido) en los cultivos recombinantes de *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01 ó pJG02), permitió una producción de EntP dependiente de la concentración de IPTG (Tabla IV.1). En líneas generales, la producción de EntP detectada en los sobrenadantes y en los compartimentos celulares de los cultivos recombinantes es pequeña, si se relaciona con la proteína total sintetizada (Tabla IV.1). Esta pequeña producción puede deberse a diferencias estructurales significativas entre los péptido señal de *E. coli* y de *Enterococcus* spp. ó al hecho de que la preenterocina P se acumula en el citoplasma, ya que, posiblemente, los componentes del sistema *sec* no pueden procesar rápidamente prepéptidos sintetizados en elevadas cantidades y bajos condiciones de inducción (Miller y col., 1998). Además, aunque los componentes del sistema *sec* de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas muestran un alto grado de conservación, éstos no llegar a ser completamente idénticos (van Wely y col., 2001). Igualmente, es posible que las señales de iniciación y terminación de la

transcripción y traducción de los enterococos no sean adecuadamente reconocidas en *E. coli*. Por otro lado, la inducción de la producción de EntP en las células transformadas de *E. coli* Tuner(DE3)pLacI también permite observar que la producción de proteína celular total se encuentra inversamente relacionada con la concentración del inductor (tabla IV.1), lo que implica que la síntesis de EntP podría resultar tóxica para las células hospedadoras. Esta posible toxicidad no debe sorprender, ya que se sabe que la sobreexpresión intracelular de muchas proteínas interfiere en el desarrollo y viabilidad de *E. coli* (Fath y Kolter, 1993; Miller y col., 1993; Miller y col., 1998).

Figura VIII.1. Construcción de los plásmidos recombinantes pJG01 y pJG02 derivados del vector de expresión pETBlue-1



Cuando los plásmidos recombinantes pJG01 y pJG02 se transfieren a *Escherichia coli* NovaBlue, los genes *entP* y *entIP* no se expresan ya que las células hospedadoras carecen del gen que codifica la ARN polimerasa T7 (en adelante, T7). Igualmente, el promotor tet dirige la expresión del gen *lacZ lo* que facilita la selección fenotípica de las células transformadas con los plásmidos de interés. Por el contrario, la transformación de *Escherichia coli* Tuner(DE3)pLacI con pJG01 y pJG02 permite la expresión de *entP* y *entIP*. En este caso, la cepa hospedadora posee el gen necesario para la síntesis de la T7, la cual inicia la transcripción de los genes bajo su control. Dichas células contienen también el gen *lacI*, que codifica un represor que reconoce al operador *lacO*. Cuando el operador es reconocido por el represor, se inactiva la transcripción del gen bajo su control. Para evitar esta represión, es necesario la incorporación del agente inductor IPTG (isopropil-tiogalactósido) al medio de cultivo. Promotor T7: promotor inducible de la ARN polimerasa T7; Ribosoma T7: zona de unión al ribosoma asociada al promotor T7; *lacO*: operador del promotor de la lactosa; *lacZ*: gen que codifica el enzima β -galactosidasa; *EcoRV*: sitio de restricción que indica el lugar de clonación; AP: resistencia a la ampicilina; origen pUC: origen de replicación del plásmido en *Escherichia coli*; origen f1: origen de replicación del bacteriófago f1.; promotor tet: promotor de la tetraciclina; terminador T7-rrnB: terminadores de la transcripción.

Sin duda alguna, los anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada frente a la EntP han sido cruciales para la detección de dicha bacteriocina en los sobrenadantes y compartimentos celulares de las células recombinantes de *E. coli*. Además, estos anticuerpos han permitido la cuantificación de la EntP en unas concentraciones menores de las requeridas para detectar su actividad antimicrobiana o bajo situaciones experimentales que no favorecen la

formación de enlaces disulfuro y/o un adecuado plegamiento estructural (Bessette y col., 1999; Cornellis, 2000).

VIII.2.1.2. Purificación de la enterocina P producida por cultivos recombinantes de *E. coli*

La utilización de columnas cromatográficas de inmunoafinidad que contienen inmunoglobulinas G (IgG's) específicas frente a la EntP ha permitido la recuperación de esta bacteriocina, en un solo paso de purificación, a partir de sobrenadantes de cultivos de *E. coli* Tuner(DE3)pLacl (pJG01) desarrollados en el medio complejo LB (Figura IV.2). Aunque la producción de EntP de los sobrenadantes de los cultivos recombinantes de *E. coli* es de un 0,2% de la EntP producida por los de *E. faecium* P13, la recuperación por inmunocromatografía de afinidad de la EntP producida por *E. coli* representa un 116% de la recuperación óptima de dicha bacteriocina a partir de los sobrenadantes de *E. faecium* P13. Igualmente, la utilización de anticuerpos policlonales y de técnicas de inmunocromatografía de afinidad han mostrado su utilidad en la recuperación de la enterocina B (Rose y col., 2001). No obstante, la utilización de matrices cromatográficas conjugadas con anticuerpos monoclonales específicos frente a la nisina A (Suárez y col., 1997) y nisina Z (Prioult y col., 2000; Benech y col., 2002), han permitido mejores rendimientos de purificación. Por ello, la construcción de columnas cromatográficas de inmunoafinidad con una mayor concentración de IgG's o de anticuerpos monoclonales específicos frente a la EntP, deberían mejorar la recuperación de esta bacteriocina a partir de los sobrenadantes de *E. coli* Tuner(DE3)pLacl (pJG01).

Ya que *E. coli* se diferencia de muchos otros hospedadores bacterianos por su capacidad de desarrollo en medios mínimos que permiten el empleo de métodos más rápidos y simples de purificación de metabolitos de interés, los cultivos de *E. coli* Tuner(DE3)pLacl (pJG01) se desarrollaron en el medio mínimo M9. Después de la inducción de los cultivos recombinantes se procedió a la purificación de la EntP mediante un procedimiento simplificado de adsorción hidrofóbica y de cromatografía de fase reversa (RP-FPLC). Como se observa en la figura IV.3 y en la tabla IV.2, este protocolo de purificación originó dos picos cromatográficos. La existencia de múltiples picos cromatográficos durante la purificación de la EntP y de otras bacteriocinas, como la nisina Z (Meghrouy y col., 1979), pediocina PA-1 (Daba y col., 1994) y carnobacteriocina BM1 (Johnsen y col., 2000), se ha adscrito a la co-existencia, tras la RP-FPLC, de dos formas peptídicas, oxidada y no oxidada, de la misma bacteriocina. Los resultados obtenidos sugieren que, aunque las células de *E. coli* Tuner(DE3)pLacl (pJG01) producen en el medio M9 un 0,07% de la EntP producida por *E. faecium* P13, la recuperación de la EntP producida por las células recombinantes de *E. coli* mediante un proceso cromatográfico simplificado es de un 5,3% de la EntP producida y casi 210 veces más eficaz que la purificación de la EntP a partir de *E. faecium* P13 utilizando un proceso multicromatográfico más complejo.

Los resultados descritos previamente han determinado la presencia de EntP, biológicamente activa e inmunológicamente reactiva, en los sobrenadantes de las células recombinantes de *E. coli* Tuner(DE3)pLacl (pJG01). Experiencias realizadas por otros investigadores también han permitido la producción de otras bacteriocinas mediante la ruta general de secreción (GSP) ó sistema *sec*-dependiente de *E. coli* (Zhang y col., 1995; Worobo y col., 1995; Biet y col., 1998; Miller y col., 1998). Desafortunadamente, la producción, transporte y secreción de bacteriocinas mediante el sistema *sec* de *E. coli* y de otros hospedadores es menor de lo esperado. (McCormick y col., 1998, 1999; Biet y col., 1998). Sin embargo los resultados de este trabajo sugieren que, aunque la producción de EntP es pequeña, su recuperación a partir de los sobrenadantes de los cultivos de la cepa de *E. coli* Tuner(DE3)pLacl (pJG01) es rápida, simple y con unos buenos rendimientos en la purificación. Además, aunque otras bacteriocinas, como la

acidocina B (Leer y col., 1995), la bacteriocina 31 (Tomita y col., 1996), la lactococina 972 (Martínez y col., 1999), la propionicina T1 (Faye y col., 2000) y la enterolisina A (Nilsen y col., 2003), se sintetizan con una extensión N-terminal del tipo péptido señal, que podría ser proteolíticamente hidrolizada conjuntamente con su transporte mediante la ruta general de secreción (GSP) ó sistema *sec*-dependiente, sin embargo, no se conocen todavía resultados experimentales de su producción y expresión heteróloga en otros hospedadores.

Finalmente, la presencia de EntP biológicamente activa en el sobrenadante de las células recombinantes de *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) y su producción en ausencia de su proteína putativa de inmunidad, permiten argumentar que la pequeña cantidad de material genético requerido para su producción debería propiciar el diseño y desarrollo de vectores de expresión que permitan la producción ó multi-producción de la EntP y de otras bacteriocinas en *E. coli* ó en otros hospedadores de interés en la industria alimentaria. Igualmente, el desarrollo de quimeras génicas con fusiones del péptido señal de la EntP a los genes estructurales de otras bacteriocinas, podría permitir su producción en otros hospedadores en ausencia de sus genes específicos de inmunidad, procesado y secreción.

VIII.2.2. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA P EN *Methylobacterium extorquens*

Resumen: La construcción del plásmido recombinante pS25 ha permitido la producción heteróloga de la enterocina P (EntP) en la bacteria metilotrófica *Methylobacterium extorquens* ATCC 55366. Este plásmido recombinante resultó de la clonación del gen estructural de la enterocina P (*entP*) en el vector de expresión pCM80 bajo el control de los promotores de la utilización de la lactosa (P_{lac}) y de la síntesis del enzima metanol deshidrogenasa (P_{mxaf}). La transformación de células competentes de *M. extorquens* ATCC 55366 con el plásmido pS25 y la utilización de anticuerpos de actividad predeterminada frente a la EntP en un ensayo inmunoenzimático no competitivo indirecto (ELISA-NCI), permitió la detección y cuantificación de EntP en el sobrenadante del cultivo recombinante de *M. extorquens* S25. Por otro lado, el empleo de columnas cromatográficas de adsorción hidrofóbica y de fase reversa permitieron la purificación de EntP activa del sobrenadante de un cultivo de *M. extorquens* S25 desarrollado en un medio mínimo y mejoraron los rendimientos de recuperación obtenidos tras la purificación de la EntP de *E. faecium* P13.

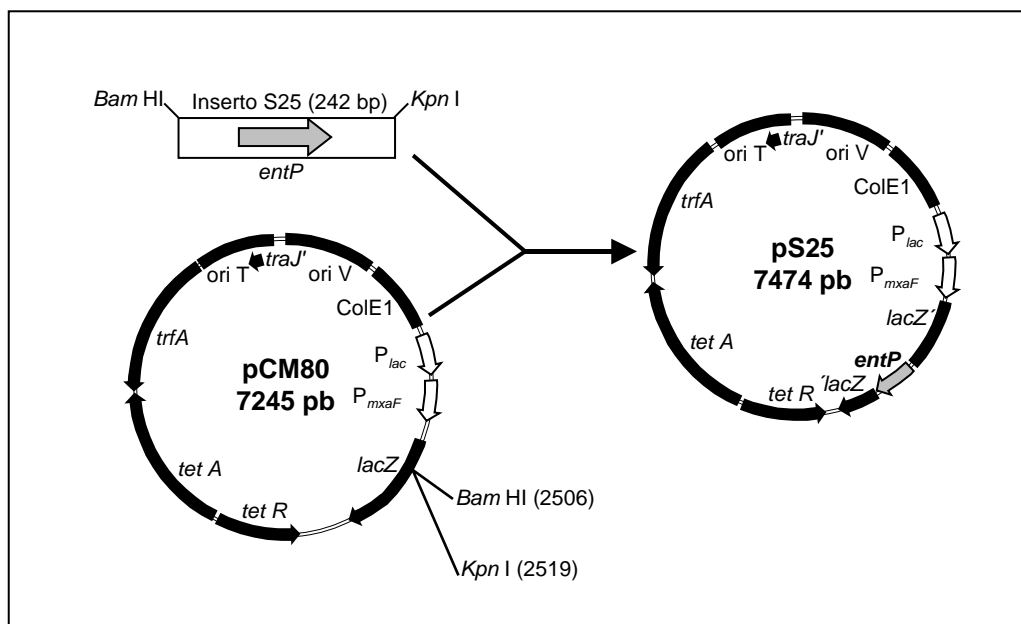
VIII.2.2.1. Clonación y producción heteróloga de la enterocina P en *M. extorquens*

La amplificación por PCR de un fragmento que contenía la secuencia nucleotídica del gen *entP* y su posterior clonación en el vector de expresión pCM80, bajo el control de los promotores P_{lac} y P_{mxaf} , originó el plásmido recombinante pS25 (Figura VIII.2). Sin embargo, cuando células competentes de *E. coli* TOP-10 y de *M. extorquens* ATCC 55366 se transformaron con el plásmido recombinante pS25, las de *E. coli* TOP-10 (pS25) permitieron la producción y secreción de EntP biológicamente activa (Figura V.2), mientras que las de *M. extorquens* S25 (*M. extorquens* ATCC 55366 con pS25) no mostraron actividad antimicrobiana alguna frente al microorganismo indicador *E. faecium* T136.

No obstante, el empleo de los anticuerpos anti-P3-KLH y de un ELISA-NCI permitió la detección y cuantificación de EntP en el sobrenadante de un cultivo de *M. extorquens* S25 desarrollado en el medio mínimo CHO1. Aunque la máxima producción de EntP en los sobrenadantes de *M. extorquens* S25 representó un 2% de la producida por *E. faecium* P13, su producción llega a ser de hasta 25 veces superior a la de *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01)

desarrollado en el medio mínimo M9. Además, y a diferencia de lo observado con la cepa recombinante de *E. coli*, la producción de EntP en *M. extorquens* S25 no se tradujo en una reducción de su desarrollo celular (Figura V.3), lo que sugiere que la síntesis, procesado y secreción de EntP no es tóxica para este hospedador. De los resultados descritos, se deduce que *M. extorquens* S25 produce EntP en ausencia de su proteína putativa de inmunidad, por lo que dicho microorganismo podría considerarse como un hospedador alternativo de producción y secreción de dicha bacteriocina. Sin embargo, contrariamente a la situación descrita con la producción de la EntP por *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01), la EntP producida por *M. extorquens* S25 no es biológicamente activa en el sobrenadante de los cultivos productores.

Figura VIII.2. Construcción del plásmido recombinante pS25 derivado del vector de expresión pCM80



oriV, *oriT*, *traJ'*, *trfA*: genes de replicación en *Methylobacterium extorquens*; *ColE1*: origen de replicación en *Escherichia coli*; *tetA*, *tetR*: genes de resistencia a la tetraciclina; *P_{lac}*, promotor de utilización de la lactosa; *P_{maxF}*, promotor de la metanol deshidrogenasa; *lacZ*, gen de la β -galactosidasa; *Bam* HI, *Kpn* I: enzimas de restricción del fragmento S25.

VIII.2.2.2. Purificación de la enterocina P producida por *M. extorquens*

Tras evaluar la producción de EntP en el sobrenadante de *M. extorquens* S25 se pasó a desarrollar un protocolo de purificación que facilitase su recuperación. El diseño de un protocolo de purificación basado en la utilización de dos columnas cromatográficas, una de adsorción hidrofóbica y la otra, de fase reversa, permitió la recuperación de 160 ng de EntP del sobrenadante de un cultivo de *M. extorquens* S25 desarrollado en el medio mínimo CHOI, lo que representa un 0,1% de la cantidad inicial de bacteriocina presente en el sobrenadante. Aunque el porcentaje de recuperación de la EntP es inferior al obtenido con la cepa de *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) (aproximadamente un 13%), este protocolo mejora los rendimientos de purificación de la EntP a partir de *E. faecium* P13 (0.01-0.02%). Consecuentemente, la capacidad de *M. extorquens* S25 de producir EntP en un medio económico y sencillo, podría facilitar la purificación de esta enterocina para su posterior utilización como aditivo antimicrobiano

natural de los alimentos. Además, el protocolo de purificación descrito permitió la recuperación de EntP biológicamente activa (Figura V.4).

La ausencia de actividad antimicrobiana de la EntP producida por *M. extorquens* S25 desarrollado en el medio mínimo CHOI se debe, probablemente, a factores como la formación de agregados proteicos y/o la presencia de compuestos en el medio de cultivo que interfieren con su actividad bacteriocinogénica modificando sus características físico-químicas o inhibiendo la formación de enlaces disulfuro. A este respecto, Zhang y col. (2000) han descrito que la presencia elevada de sales en el medio de cultivo llega a reducir la actividad antimicrobiana de la nisina A. En cuanto a la formación de agregados proteicos, experiencias de *Western blotting* con la EntP purificada de cultivos de *E. faecium* P13 y *M. extorquens* S25 mostraron que dicha bacteriocina es un péptido hidrófobo con una tendencia elevada a la formación de agregados proteicos de diverso tamaño (figura V.5), lo que podría reducir su actividad biológica.

VIII.2.2.3. Producción heteróloga de la enterocina P en bacterias Gram-negativas

De los resultados obtenidos con las cepas recombinantes de *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) y *M. extorquens* S25, puede concluirse que, aunque ambas cepas son capaces de producir y secretar EntP, presumiblemente a través de la ruta general de secreción (GSP) ó sistema *sec*-dependiente, la producción heteróloga de dicha bacteriocina en ambas bacterias Gram-negativas es muy reducida, si se compara con la determinada en *E. faecium* P13. La menor producción de EntP en hospedadores heterólogos Gram-negativos, respecto a la que se pueda encontrar en hospedadores Gram-positivos, puede deberse a factores, como: (i) que la secuencia de los péptido señal, así como los enzimas involucrados en el procesado, secreción y transporte de péptidos a través de la ruta general de secreción (GSP) ó sistema *sec*-dependiente, pueden ser homólogos, pero no idénticos, en ambos grupos bacterianos, (ii) diferencias en el reconocimiento de tripletes nucleotídicos ("*codon usage*") y en la estabilidad y eficacia de la traducción del ARNm, (iii) que, a diferencia de lo que ocurre con las bacterias Gram-positivas, las proteínas y péptidos secretadas por las Gram-negativas deben atravesar más compartimentos biológicos, debido a la diferente organización estructural de su membrana y pared celular y (iv) actividad proteolítica de proteasas asociadas a la pared celular de los hospedadores heterólogos.

Sin embargo, la capacidad de *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) y *M. extorquens* S25 para producir y liberar la EntP al medio extracelular, así como el desarrollo de métodos rápidos y sencillos de recuperación de dicha bacteriocina a partir de los sobrenadantes de los cultivos productores, permiten justificar su uso como productores heterólogos de EntP.

VIII.2.3. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA P EN *Lactococcus lactis*

Resumen: La construcción de cepas recombinantes de *L. lactis* ha permitido la producción de enterocina P (EntP) en este hospedador heterólogo. Para ello, 3 cepas de *L. lactis* [*L. lactis* subsp. *lactis* IL1403, *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 y *L. lactis* subsp. *lactis* DPC5598, ésta última productora de nisina A (NisA)] se transformaron con plásmidos que poseían el gen estructural de la EntP (*entP*), con o sin su hipotético gen de inmunidad (*entiP*), en los vectores de expresión: (i) pMG36c, bajo el control del promotor constitutivo P₃₂; (ii) pNG8048e, bajo el control del promotor inducible P_{nisa}; y (iii) pINT29, un vector de integración cromosómica. Los plásmidos recombinantes derivados de pMG36c [pJP26 (pMG36c + *entP*) y pJP214 (pMG36c + *entP* + *entiP*)] se introdujeron por transformación en las 3 cepas lactocócicas, para comparar la producción de EntP en diferentes cepas, mientras que la cepa de *L. lactis* subsp. *cremoris*

NZ9000 se transformó con los plásmidos pJP26 y pJP214, así como con los derivados de pNG8048e [pJR22 (pNG8048e + *entP*) y pJR199 (pNG8048e + *entP* + *entiP*)] y de pINT29 [pJB3 (pINT29 + *entP*) y pJB19 (pINT29 + *entP* + *entiP*)], para evaluar la eficacia de los tres sistemas de expresión utilizados. La producción de EntP en las cepas recombinantes de *L. lactis*, detectada y cuantificada mediante anticuerpos policlonales específicos anti-EntP y un inmunoensayo no competitivo indirecto (ELISA-NCI), dependió del hospedador utilizado, del vector de expresión y de la presencia en los insertos del gen *entiP*. Las cepas recombinantes de *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 fueron las que produjeron una mayor cantidad de EntP, mientras que la máxima producción de dicha bacteriocina, de hasta 5 o 6 veces superior a la de la cepa natural de *E. faecium* P13, se obtuvo de cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 y *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 transformadas con vectores de expresión que contenían los genes *entP* y *entiP* (pJP214 y pJR199, respectivamente). Además, las experiencias realizadas también permitieron la co-producción de nisina A (NisA) y EntP de las cepas recombinantes de *L. lactis* subsp. *lactis* DPC5598. Asimismo, experiencias de *Western blotting* con la EntP purificada del sobrenadante de *L. lactis* IL1403 (pJP214) confirmaron que dicha bacteriocina manifiesta una elevada tendencia a la formación de agregados proteicos. Finalmente, la evaluación por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) de la EntP purificada de *E. faecium* P13 y de *L. lactis* IL1403 (pJP214) demostró que la EntP de *L. lactis* IL1403 (pJP214) posee una masa molecular idéntica a la de *E. faecium* P13, lo que sugiere que la síntesis, procesado y secreción de la EntP se realiza apropiada y adecuadamente en cultivos recombinantes de *L. lactis*.

VIII.2.3.1. Producción y expresión funcional de la enterocina P en *L. lactis*

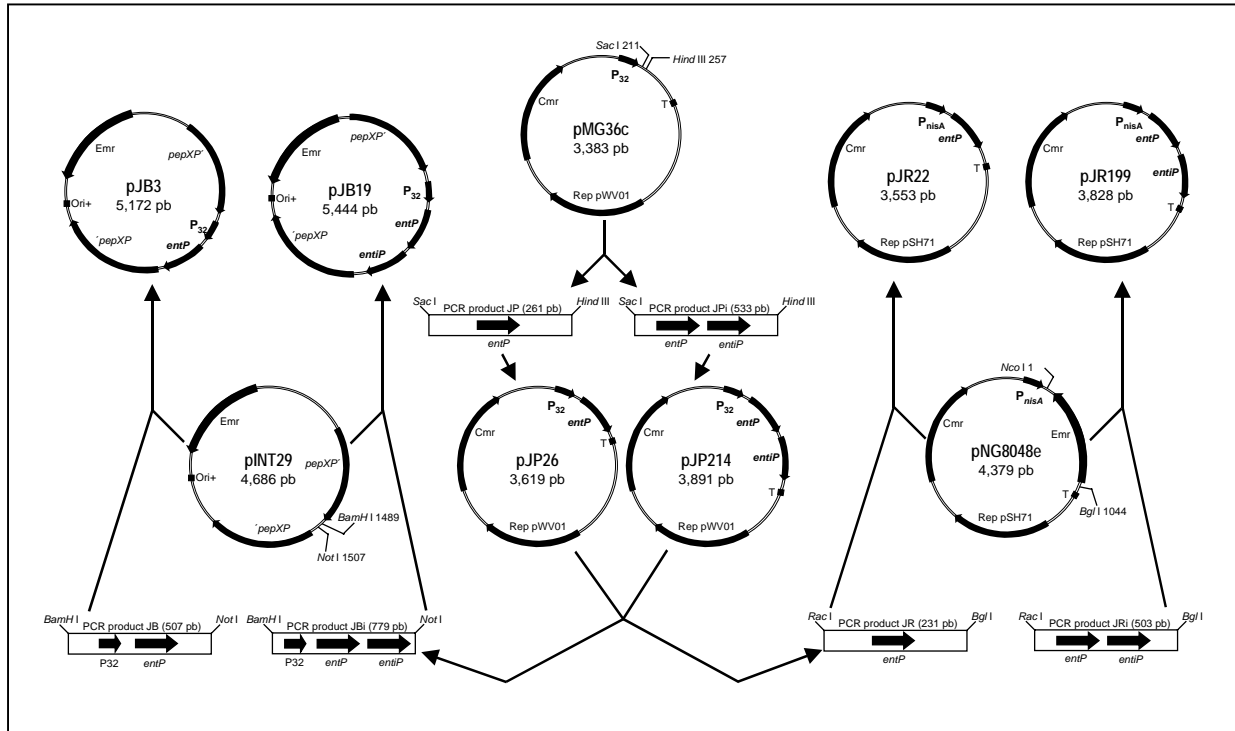
La producción y expresión funcional de la EntP en *L. lactis* ha sido posible mediante la transformación de cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403, *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 y *L. lactis* subsp. *lactis* DPC5598, con los siguientes plásmidos (Figura VIII.3):

- (a) Plásmidos derivados del vector de expresión pMG36c y que contienen el gen *entP* (pJP26) ó los genes *entP* y *entiP* (pJP214) bajo el control del promotor constitutivo P₃₂, un promotor muy potente en *L. lactis*.
- (b) Plásmidos derivados del vector de expresión pNG8048e y que contienen el gen *entP* (pJR22) ó los genes *entP* y *entiP* (pJR199) bajo el control del promotor inducible P_{nisA}, un promotor que dirige la transcripción de los genes que se encuentran bajo su control en presencia de nisina.
- (c) Plásmidos derivados del vector pINT29 y que contienen el gen *entP* (pJB3) ó los genes *entP* y *entiP* (pJB19) bajo el control del promotor P₃₂. Además, el plásmido pINT29 posee la secuencia nucleotídica del gen *PepX*, lo que permite su integración por recombinación en el genoma de *L. lactis*.

Los plásmidos recombinantes pJP26 y pJP214 se utilizaron para la transformación de las tres cepas lactocócicas, mientras que los derivados de pNG8048e y pINT29 se incorporaron únicamente en la cepa de *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000. Todas las cepas de *L. lactis* transformadas con los vectores de expresión que contenían el gen estructural de la EntP (*entP*), en presencia o ausencia de su gen putativo de inmunidad (*entiP*), manifestaron actividad antimicrobiana exocelular (Figuras VI.1 y VIII.4), lo que sugiere que el gen *entP* es el requerimiento mínimo y necesario para la síntesis, procesado y secreción de EntP biológicamente activa. Asimismo, el empleo de los anticuerpos anti-P3-KLH y de un ELISA-NCI permitió la detección y cuantificación de la EntP del sobrenadante de las cepas recombinantes de

L. lactis. La producción de EntP en cada una de ellas fue diferente y dependió de: (i) la subespecie; (ii) el sistema de expresión; (iii) el fragmento de clonación; y (iv) la producción de otras bacteriocinas (Figura VIII.5; Tabla VI.3).

Figura VIII.3. Construcción de plásmidos recombinantes para la producción y expresión funcional de la enterocina P (EntP), con o sin su hipotética proteína de inmunidad (EntiP), en *Lactococcus lactis*

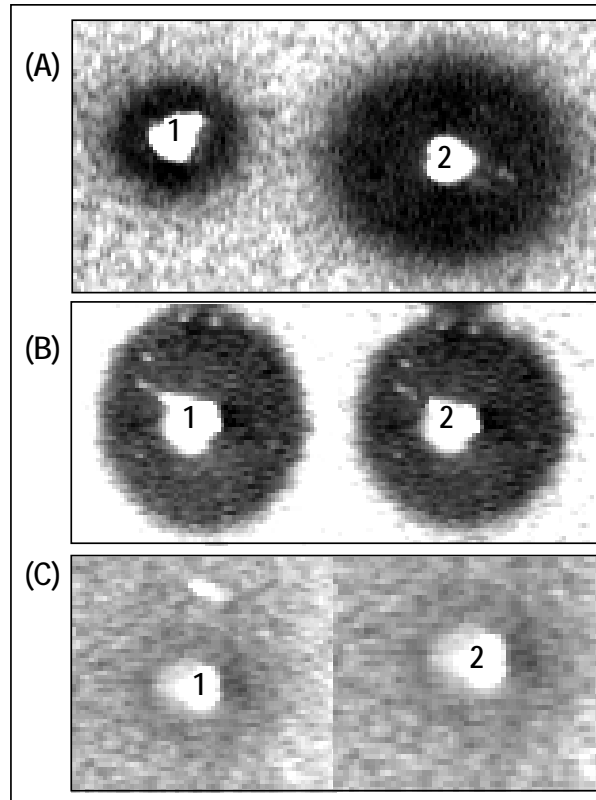


Únicamente se indican los enzimas y lugares de restricción utilizados en este trabajo. P₃₂, promotor constitutivo; P_{nisA}, promotor inducible por la nisina; T, terminador de la transcripción; Rep, repicones lactocócicos pWV01 y pSH71; Ori+, origen de replicación de pWV01; pepXP and pepXP', secuencias inicial y final del gen que codifica la peptidasa X; entP, gen estructural de la EntP; entIP, gen que codifica la EntiP; Cmr, resistencia al cloranfenicol; Emr, resistencia a la eritromicina.

VIII.2.3.1.1. Producción heteróloga de EntP en diferentes subespecies de *L. lactis*

En general la producción de EntP por las cepas recombinantes de *L. lactis* IL1403 y *L. lactis* NZ9000 fue mayor que en *E. faecium* P13. La producción de EntP en *L. lactis* IL1403 (pJP26) fue de unas 2,2 veces mayor que en *L. lactis* NZ9000 (pJP26), mientras que la producción de EntP en *L. lactis* IL1403 (pJP214) fue de unas 3,7 veces mayor que en *L. lactis* NZ9000 (pJP214) (Figura VIII.5; Tabla VI.3). Previamente, Horn y col. (1998, 1999) describieron que los cambios en la producción de bacteriocinas pueden atribuirse a diferencias metabólicas entre las cepas lactocócicas y/o a que el número de copias del vector de expresión pMG36c podría variar de un hospedador a otro. Además, es importante destacar que la actividad antimicrobiana específica de las cepas recombinantes es similar a la de *E. faecium* P13 (Figura VIII.5; Tabla VI.3), lo que sugiere que la síntesis, procesado, secreción y actividad biológica de la EntP no parecen modificarse como resultado de su producción heteróloga en las cepas recombinantes de *L. lactis*.

Figura VIII.4. Actividad antimicrobiana de colonias de *L. lactis* DPC5598, transformadas con los plásmidos pMG36c (1) y pJP26 (2), frente a los microorganismos indicadores *E. faecium* T136 (*EntP^s NisA^s*) (A), *L. lactis* MG1363 (*EntP^r NisA^s*) (B) y *L. lactis* BB24 (*EntP^r NisA^r*) (C).



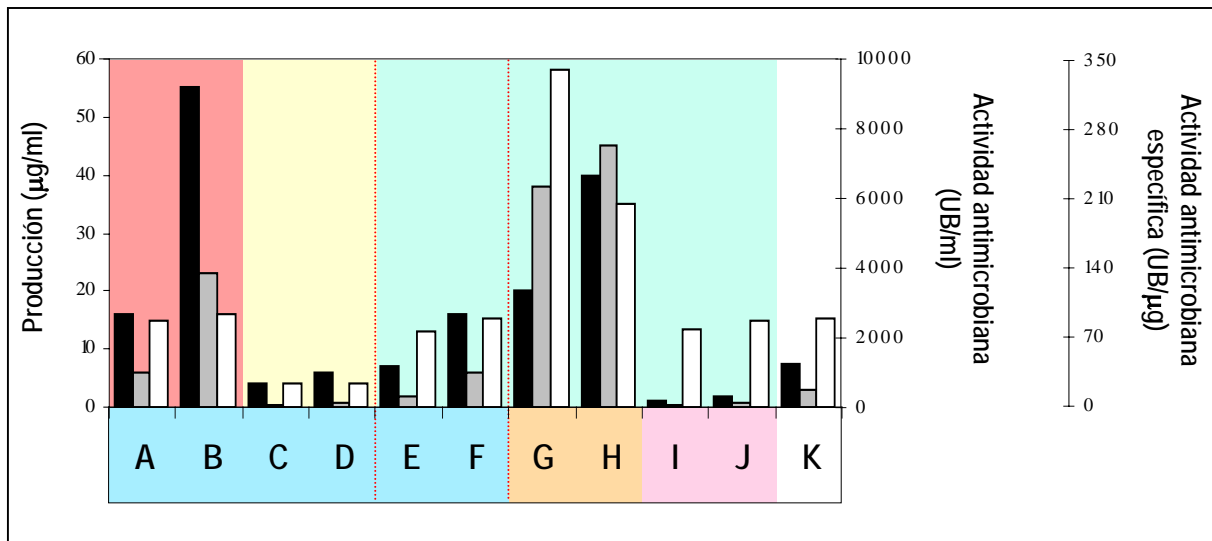
La actividad antimicrobiana se evaluó mediante la prueba de inhibición por siembra en picadura. EntP, enterocina P; NisA, nisina A; s, sensible; r, resistente.

VIII.2.3.1.2. Producción heteróloga de la EntP utilizando diferentes sistemas de expresión

La incorporación de los vectores pJP26, pJP214, pJR22, pJR199, pJB3 ó pJB19 en la cepa de *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 se tradujo en una producción de EntP activa, aunque en unas cantidades que dependieron del vector de expresión utilizado (Figura VIII.5; Tabla VI.3). La producción de EntP en las cepas de *L. lactis* NZ9000 (pJR22) y *L. lactis* NZ9000 (pJR199), tras su inducción con nisina, alcanzó unos valores de 3,1 a 5,3 veces mayores que los alcanzados en las cepas de *L. lactis* NZ9000 (pJP26) y *L. lactis* NZ9000 (pJP214), respectivamente, (Figura VIII.5; Tabla VI.3), lo que podría adscribirse a diferencias en el número de copias de los plásmidos recombinantes pMG36c y pNG8048e (Kok y col., 1984; De Vos, 1987), a la utilización de promotores distintos y/o a una actividad transcripcional diferente. Por otro lado, de gran interés es el reconocimiento de que la actividad antimicrobiana específica de la EntP producida por *L. lactis* NZ9000 (pJR22) y *L. lactis* NZ9000 (pJR199) (Figura VIII.5; Tabla VI.3) es mayor que en cualquier otro hospedador y que en *E. faecium* P13, lo que confirma el potencial de los sistemas de expresión controlados por la nisina (NICE) (De Ruyter y col., 1996; Kuipers y col., 1998) en cuanto a la sobreproducción y estabilidad de proteínas heterólogas o, como en este caso, de péptidos antimicrobianos de pequeño tamaño. Las cepas transformadas con los

plásmidos derivados del vector pMG36c producen la EntP de forma constante, es decir, a lo largo del desarrollo del hospedador en su medio de cultivo (aproximadamente 14 horas), mientras que las que contienen los vectores derivados de pNG8048e lo hacen de manera explosiva, tras su inducción durante aproximadamente 3 horas. Por tanto, el empleo de vectores derivados del pNG8048 puede incrementar la actividad de la EntP producida, ya que favorece: (i) una menor producción de otros péptidos, (ii) una menor formación de agregados proteicos, (iii) una menor adhesión de la bacteriocina a componentes celulares o del medio de cultivo y/o (iv) una menor degradación proteolítica.

Figura VIII.5. Producción y actividad antimicrobiana de la enterocina P (EntP) de los sobrenadantes de las cepas recombinantes de *Lactococcus lactis*



Cepas recombinantes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 (pJP26) (A), IL1403 (pJP214) (B), DPC5598 (pJP26) (C) y DPC5598 (pJP214) (D), de *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (pJP26) (E), NZ9000 (pJP214) (F), NZ9000 (pJR22) (G) y NZ9000 (pJR199) (H), y de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JG5 (I) y JG8 (J). K es la cepa control *E. faecium* P13. La producción de EntP se muestra con las barras negras y su actividad antimicrobiana con las grises. Las barras blancas muestran la actividad antimicrobiana específica de los sobrenadantes. Los sobrenadantes de *L. lactis* IL1403 se muestran con fondo rojo, los de *L. lactis* DPC5598 con fondo amarillo y los de *L. lactis* NZ9000 con fondo verde. Los sistemas de expresión que dirigen la producción de la EntP de los sobrenadantes de los cultivos enumerados de la A a la J son el constitutivo (fondo azul), el inducible (fondo naranja) y el de integración en el genoma (fondo rosa).

Asimismo, la producción de EntP observada en los sobrenadantes de las cepas recombinantes de *L. lactis* JG5 (pJB3) y *L. lactis* JG8 (pJB19) es de unas 10 veces menor que la de otras cepas recombinantes, lo cual puede ser razonable si se considera que el plásmido pINT129 (derivado de pINT29) permite la integración de solamente una copia del vector en el genoma de *L. lactis* MG1363 (Leenhouts y col., 1998). Concretamente la producción de EntP en los sobrenadantes de *L. lactis* JG5 y *L. lactis* JG8 fue de un 12 y un 13 %, respectivamente, de la producida por *L. lactis* NZ9000 (pJP26) y *L. lactis* NZ9000 (pJP214) (Figura VIII.5; Tabla VI.3). Además, la actividad antimicrobiana específica de la EntP producida por las cepas recombinantes fue similar a la de la EntP producida por *E. faecium* P13 (Figura VIII.5; Tabla VI.3). De esta manera, aunque *L. lactis* JG5 y *L. lactis* JG8 producen menores cantidades de EntP que otras cepas recombinantes, éstas constituyen una forma estable de producción de dicha bacteriocina sin necesidad de recurrir a la utilización de antibióticos, lo cual es apreciable como método de producción de una bacteriocina de interés en la industria alimentaria.

De los resultados obtenidos cabe destacar el potencial de los vectores de expresión empleados, tanto de los constitutivos como de los inducibles, para la sobreproducción, funcionalidad y estabilidad de la EntP. Igualmente, la utilización de vectores de expresión que se integran en el genoma bacteriano ha permitido la producción de EntP de una forma más estable y segura. Asimismo, la utilidad de los sistemas de producción heteróloga dependería de las necesidades planteadas. Por ejemplo, si la industria alimentaria demandase grandes cantidades de EntP para su uso como ingrediente o aditivo alimentario, la utilización de vectores de expresión con promotores inducibles (sistema NICE) permitiría la producción de EntP en cantidades elevadas y en un período de tiempo reducido. Si, por otro lado, fuese conveniente utilizar un cultivo protector que produjera EntP para reducir, evitar o controlar el desarrollo de microorganismos patógenos durante la elaboración de diversos tipos de alimentos, la utilización de vectores de expresión con promotores constitutivos o la de vectores de integración en el cromosoma, permitirían la obtención de hospedadores adecuados para el fin solicitado.

VIII.2.3.1.3. Producción heteróloga de EntP utilizando diferentes fragmentos de clonación

Una observación muy interesante derivada de la realización de este trabajo es la apreciación de que la co-expresión de los genes *entP* y *entiP* incrementa la producción de EntP en las cepas recombinantes de *L. lactis* (Figura VIII.5; Tabla VI.3). El incremento en la producción de EntP podría deberse a que los cultivos de *L. lactis* sean mucho más resistentes a la EntP cuando producen y expresan el producto del gen *entiP*. Se sabe que los microorganismos productores de bacteriocinas se protegen de la acción tóxica de sus bacteriocinas mediante la producción simultánea de una proteína de inmunidad (Nes y col., 2002). Dichas proteínas se encuentran localizadas intracelularmente entre el citoplasma y la membrana celular (Quadri y col., 1995) y protegen al hospedador evitando la formación de poros ó dificultando la interacción entre la bacteriocina y su receptor en la membrana celular (Venema y col., 1994; Quadri y col., 1995). Por otra parte, en un estudio acerca de la funcionalidad de diversas proteínas de inmunidad, Fimland y col., (2002) demostraron la eficacia de la EntiP de *E. faecium* P13 como proteína de inmunidad. Alternativamente, es posible que la EntiP participe en el procesado, secreción y transporte de la EntP en *L. lactis*, lo que, científicamente, sería muy interesante demostrar.

VIII.2.3.1.4. Coproducción de EntP y NisA en *L. lactis* DPC5598

La cepa de *L. lactis* DPC5598 se ha empleado como hospedador para la producción heteróloga de EntP por varios motivos, entre los que destaca el de ser un microorganismo fácilmente transformable que procede de una cepa industrial muy utilizada en Irlanda para la fabricación de quesos tipo Cheddar por su elevada capacidad acidificante y su resistencia a bacteriófagos. Además, en este trabajo se ha demostrado que dicha cepa produce nisina A (NisA), por lo que fue utilizada como hospedador para evaluar la co-producción de NisA y EntP (Figura VIII.5; Tabla VI.3). La menor producción de EntP en *L. lactis* DPC5598 (pJP26) y *L. lactis* DPC5598 (pJP214) comparada con la de las cepas de *L. lactis* IL1403 y *L. lactis* NZ9000 transformadas con los mismos plásmidos, puede deberse a que las primeras producen más de una bacteriocina, cómo ya se había descrito previamente (capítulo VIII.1.1). Igualmente, la menor actividad antimicrobiana específica de la EntP producida por las cepas recombinantes de *L. lactis* DPC5598 puede atribuirse a diferencias genómicas de dichas cepas con respecto a otras utilizadas en este trabajo, así como, posiblemente, a una mayor actividad proteolítica extracelular.

En cualquier caso, las cepas recombinantes de *L. lactis* DPC5598 produjeron y liberaron al exterior NisA y EntP biológicamente activas. Conviene resaltar que la producción de EntP en las

cepas de *L. lactis* DPC5598 (pJP26) y *L. lactis* DPC5598 (pJP214) representa de un 60 a un 80% de la producida por *E. faecium* P13 (Tabla VI.3). Además, esta producción no llegó a modificar la producción de NisA en las cepas recombinantes (Tabla VI.3). La disponibilidad de cepas de *L. lactis* productoras de dos bacteriocinas, como la NisA y la EntP, puede permitir, en un futuro próximo, el diseño y obtención de otras cepas productoras de otras bacteriocinas que potencien y amplíen aún más su actividad antimicrobiana.

VIII.2.3.2. Purificación de la EntP producida por *L. lactis*

La EntP se purificó de los sobrenadantes de *E. faecium* P13 y *L. lactis* IL1403 (pJP214) empleando uno de los protocolos multicromatográficos descritos en la sección VIII.1 de este trabajo y que, esencialmente, se basa en la precipitación con sulfato amónico de los péptidos y proteínas de los sobrenadantes de los cultivos productores y en la posterior separación de la bacteriocina del resto de péptidos y proteínas mediante la utilización de diferentes técnicas cromatográficas, entre las que se incluyen las de intercambio iónico, interacción hidrofóbica y fase reversa. En ambos casos se obtuvieron 2 fracciones con actividad antimicrobiana (fracciones A y B) (Tabla VI.4). Como ya se ha citado previamente en este trabajo, la existencia de diversas fracciones cromatográficas con actividad antimicrobiana se ha adscrito a la coexistencia, tras la purificación de las bacteriocinas por cromatografía de fase reversa (RP-FPLC), de formas oxidadas y no-oxidadas de la misma bacteriocina. De los resultados obtenidos, también se deduce que, aunque la producción de EntP en la cepa de *L. lactis* IL1403 (pJP214) es de unas seis veces mayor que la de *E. faecium* P13, la recuperación de EntP del sobrenadante de la cepa de *L. lactis* IL1403 (pJP214) es menor que la de *E. faecium* P13 (Tabla VI.4), lo que sugiere que una menor adsorción o una mayor liberación de la EntP producida por *L. lactis* a las matrices de intercambio iónico, interacción hidrofóbica y/o de fase reversa son factores limitantes en la purificación y recuperación de cantidades elevadas de EntP. Si la industria alimentaria demandase grandes cantidades de EntP para su uso como aditivo alimentario, su sobreproducción en hospedadores heterólogos no sería de utilidad sin el desarrollo y optimización de procedimientos más eficaces de purificación y recuperación de dicha bacteriocina.

Posteriormente, se realizó la caracterización bioquímica y molecular de la EntP purificada de *E. faecium* P13 y *L. lactis* IL1403 (pJP214). Para ello, se procedió a evaluar el perfil electroforético y la actividad antimicrobiana de dicha bacteriocina en geles de tricina-SDS-poliacrilamida, así como su detección inmunológica en experiencias de *Western blotting* tras su transferencia a membranas de nitrocelulosa. Los resultados obtenidos (Figura VI.3), sugieren que la EntP purificada de ambos microorganismos manifiesta una elevada tendencia a la formación de agregados con actividad antimicrobiana. No obstante, y a diferencia de lo descrito en la sección VIII.1 de esta memoria, la formación de dichos agregados proteicos no parece influir significativamente en la actividad antimicrobiana de la EntP (Figura VI.3.B). Probablemente, la utilización de *E. faecium* T136 como microorganismo indicador en lugar de *Lactobacillus sakei* 2714, pueda ser la razón de dicha diferencia. Por otro lado, la EntP purificada de *E. faecium* P13 y de *L. lactis* IL1403 (pJP214) mostró, tras su análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS), un fragmento mayoritario cuya masa molecular se corresponde con la masa molecular teórica de la EntP (Figura VI.4), lo que indica que el procesado, transporte y secreción de la EntP se realiza adecuadamente en las células recombinantes de *L. lactis*.

De los resultados obtenidos es posible especular acerca de por qué la mayoría de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son liberadas al exterior celular por un sistema de procesado, transporte y secreción dedicado (DTS), cuando podrían hacerlo mediante

la ruta general de secreción (GSP) si dispusiesen de un péptido señal eficaz. No obstante, también es cierto que, cuando Biet y col. (1998) compararon el procesado y secreción de la mesentericina Y105 de *Lc. mesenteroides* Y105 en otras bacterias lácticas mediante un sistema de transporte dedicado o bajo el control del péptido señal de la divergicina A, éstos observaron que el sistema dedicado era mucho más eficaz para liberar la mesentericina Y105 al exterior celular que el de la ruta general de secreción. Sin embargo, la producción de EntP en los sobrenadantes de la mayoría de las cepas recombinantes de *L. lactis* y, sobre todo, en el caso de *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (pJP214) y *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (pJR199) es mayor que la producción heteróloga de otras bacteriocinas que utilizan sistemas de transporte ABC-dedicados (Chikindas y col., 1995; van Belkum y col., 1997; Biet y col., 1998; Axelsson y col., 1998; Horn y col., 1998; Horn y col., 1999; Martínez y col., 2000; Kawamoto y col., 2002) ó el sistema Sec (Worobo y col., 1995; Biet y col., 1998; McCormick y col., 1998; McCormick y col., 1999), lo que refuerza el hecho de que el péptido señal de la EntP pueda ser una buena alternativa para la producción y secreción de ésta y de otras bacteriocinas en *L. lactis*. La producción elevada de EntP por células recombinantes de *L. lactis* sugiere que fusiones génicas o quimeras del péptido señal de la EntP con la secuencia nucleotídica de la parte activa de otras bacteriocinas pueden permitir su procesado, transporte y secreción en ausencia de proteínas específicas de procesado, secreción y, posiblemente, de inmunidad. Además, el péptido señal de la EntP también podría servir como modelo experimental de secreción de numerosos péptidos y proteínas de interés en *L. lactis* u otras BAL. La secreción de péptidos y proteínas al medio extracelular puede permitir la utilización de bacterias lácticas como vehículos de transporte y de producción de moléculas biológicamente activas (Dieye y col., 2003).

VIII.2.4. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA P EN *Pichia pastoris*

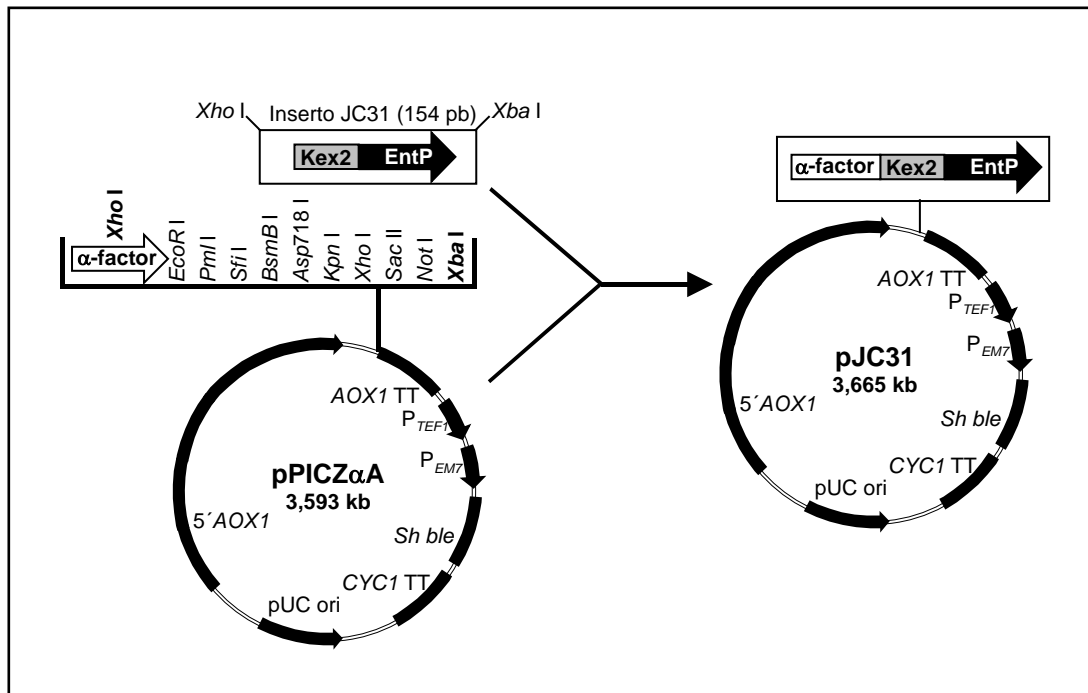
Resumen: La construcción del plásmido recombinante pJC31 ha permitido la producción y expresión funcional de la enterocina P (EntP) en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. El plásmido se obtuvo tras la clonación de la secuencia nucleotídica que codifica la parte activa o madura de la EntP (fragmento JC) en el vector de expresión pPICZ α A y bajo el control del promotor inducible del enzima alcohol oxidasa (P_{AOX1}). El lugar de clonación elegido permitió la fusión del inserto JC al péptido señal de la feromona α -MF (del inglés “*alpha Mating factor*”) de *Saccharomyces cerevisiae*. El plásmido recombinante pJC31, estabilizado en *E. coli* DH5 α , se purificó y se introdujo por transformación en células competentes de *P. pastoris* X-33 después de su linearización. La transformación de las células hospedadoras con el plásmido linearizado pJC31 permitió la identificación de un aislado, denominado *P. pastoris* X33t₁, productor de EntP biológicamente activa. La producción extracelular de la EntP y su actividad antimicrobiana fueron más elevadas que las de la EntP de *E. faecium* P13. Finalmente, la purificación de la EntP producida por *E. faecium* P13 y *P. pastoris* X33t₁ y la determinación de su masa molecular, por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS), permitió comprobar que la EntP producida por *P. pastoris* X33t₁ poseía idéntica masa molecular que la producida por *E. faecium* P13, lo que permite sugerir que la síntesis, procesado, transporte y secreción de dicha bacteriocina ocurre apropiada y eficazmente en *P. pastoris*.

VIII.2.4.1. Producción y expresión funcional de la enterocina P en *Pichia pastoris*

Inicialmente se procedió a la construcción de un vector que permitiese la producción y secreción de la EntP en *P. pastoris*. Para ello, se obtuvo un producto de PCR que contenía la secuencia nucleotídica que codifica la parte activa o madura de la EntP (fragmento JC). Dicho fragmento se incorporó en el vector de expresión pPICZ α A justo por detrás del péptido señal de la feromona α -MF de *S. cerevisiae* y bajo el control del promotor inducible del enzima alcohol

oxidasa (P_{AOX1}), originando el plásmido recombinante pJC31 (Figura VIII.6). De las células competentes de *P. pastoris* X-33 transformadas con el plásmido recombinante pJC31, previamente linearizado, solamente la de *P. pastoris* X-33t₁ mostró una elevada actividad antimicrobiana directa frente al microorganismo indicador *E. faecium* T136 (Figura VII.1).

Figura VIII.6. Construcción del plásmido recombinante pJC31 derivado del vector de expresión pPICZ α A



5' AOX1: fragmento de ADN que (i) contiene el promotor de la alcohol oxidasa (P_{AOX1}) y (ii) permite la integración del vector en el genoma de *Pichia pastoris*; pUC ori, origen de replicación del plásmido en *Escherichia coli*; AOX1 TT, terminador de la transcripción de P_{AOX1} ; P_{TEF1} y P_{EM7} , promotores que dirigen la expresión del gen *Sh ble* en *P. pastoris* y *E. coli*, respectivamente; *Sh ble*, gen de resistencia a la zeocina; *CYC1*, terminador de la transcripción de P_{TEF1} y P_{EM7} ; EntP, secuencia nucleotídica de la parte madura de la enterocina P; Kex2, señal de procesado en *P. pastoris*; α -factor, péptido señal de la feromona α -MF (del inglés "alpha Mating Factor").

Aunque diversas especies de levaduras se han utilizado como hospedadores para la producción heteróloga de proteínas y péptidos, *S. cerevisiae* no siempre ha mostrado ser un hospedador ideal, incluyendo la producción de algunas bacteriocinas (Schoeman y col., 1999; van Reenen y col., 2002). Por ello, en este trabajo se ha seleccionado la levadura metilotrófica *P. pastoris* como el hospedador para la producción heteróloga de la EntP de *E. faecium* P13. Igualmente, el plásmido pPICZ α A se seleccionó como el vector de clonación, producción y expresión de la EntP porque: (i) contiene un péptido señal de *S. cerevisiae* que dirige el procesado y secreción de los péptidos fusionados a dicha señal a través de la ruta general de secreción de *P. pastoris*; (ii) posee un promotor inducible por metanol que permite la sobreexpresión de los genes que se encuentran bajo su control; y (iii) porta la secuencia nucleotídica AOX1 que facilita la integración del vector linearizado en el genoma de *P. pastoris*. Por ello, el gen que codifica la forma madura de la EntP se clonó en el vector pPICZ α A, en línea con el péptido señal de secreción, pero sin los espaciadores Glu-Ala adyacentes al lugar de

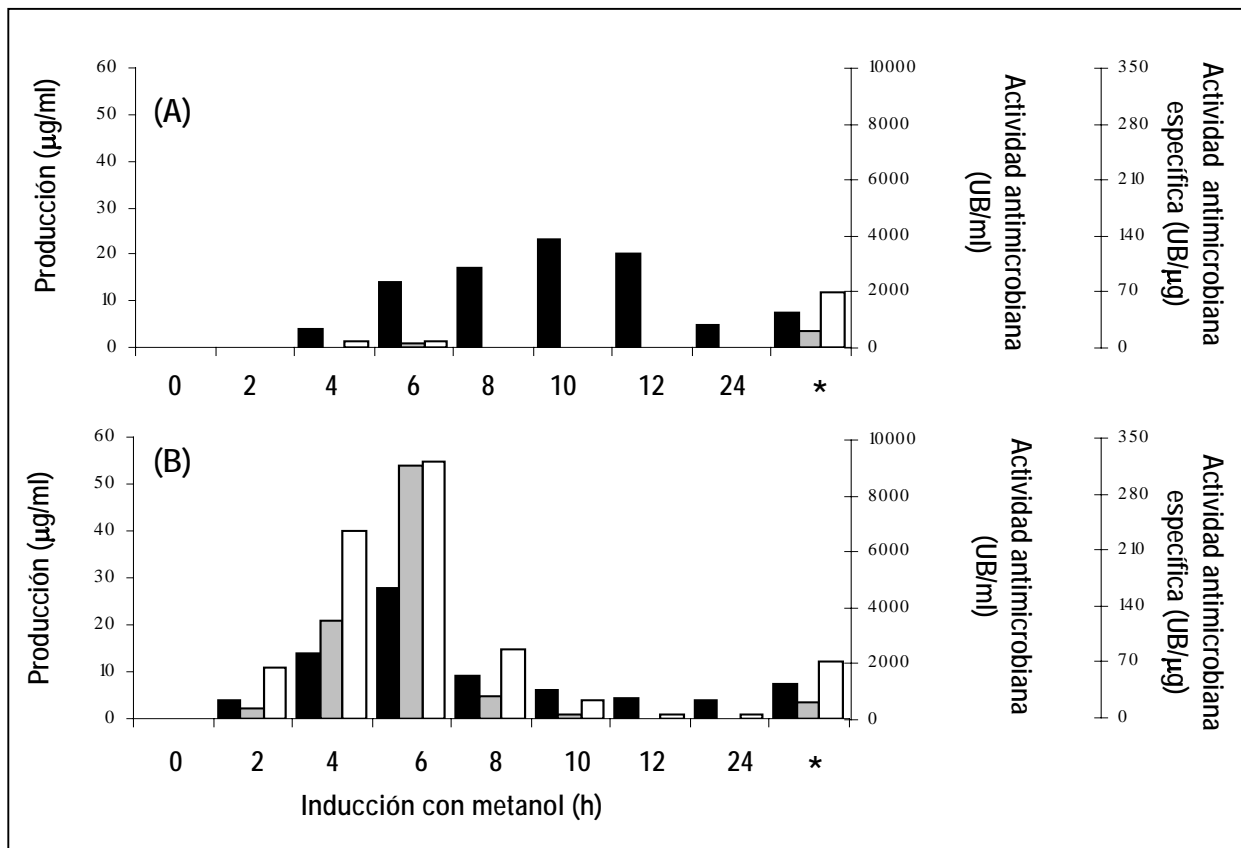
procesado de la proteasa Kex2, lo que permitió la obtención del plásmido recombinante pJC31. Ya que la cepa recombinante de *P. pastoris* X-33t₁ mostró una actividad antimicrobiana elevada, es muy probable que este clon posea múltiples copias del gen EntP integrado en su genoma.

La producción de EntP por *P. pastoris* X-33t₁ se evaluó tras su desarrollo en el medio mínimo BMM y en el medio complejo BMMY. Ambos medios contenían metanol para inducir la transcripción de los genes bajo el control del promotor P_{AOX1}. La detección y cuantificación de la EntP producida por ambos cultivos se evaluó empleando anticuerpos policlonales frente a la región N-terminal (anticuerpos anti-P2-KLH) y C-terminal (anticuerpos anti-P3-KLH) de la EntP y un ensayo de ELISA-NCI. Los resultados de la Figura VIII.7 y de la Tabla VII.1 muestran que la producción de EntP por el cultivo de *P. pastoris* X33t₁ desarrollado en el medio mínimo BMM alcanza su máximo a las 10 horas de crecimiento, mientras que en el cultivo desarrollado en el medio complejo BMMY su producción es máxima tras 6 horas de inducción. El nivel de producción de EntP en *P. pastoris* X-33t₁ desarrollado en el medio mínimo es de 2,6 veces mayor que la producción de dicha bacteriocina por *E. faecium* P13, mientras que la producción de EntP por *P. pastoris* X-33t₁ desarrollado en el medio complejo es de 3,7 veces más elevada que la producida por *E. faecium* P13.

Además, la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de los cultivos de *P. pastoris* X33t₁, desarrollados en el medio mínimo BMM y en el medio complejo BMMY se evaluó mediante una prueba de difusión en agar (ADT) y de un ensayo de inhibición en placas microtituladoras (MPA) (Figura VII.2; Tabla VII.1). De los resultados de la Figura VII.2, se observa que la actividad antimicrobiana de los cultivos desarrollados en el medio BMMY es más elevada y perdurable que la de los desarrollados en el medio BMM. Igualmente, la máxima actividad antimicrobiana del cultivo de *P. pastoris* X-33t₁ en el medio BMMY coincide con la máxima producción de EntP, mientras que en el cultivo desarrollado en el medio BMM la actividad antimicrobiana alcanza su máximo 4 horas antes de que lo haga el nivel de producción de EntP (Figura VIII.7; Tabla VII.1). De estos resultados también se deduce que aunque la máxima producción de EntP en *P. pastoris* X-33t₁ desarrollado en el medio mínimo BMM es de 2.6 veces mayor que la producción de EntP por *E. faecium* P13, su actividad antimicrobiana máxima es de sólo un 25% de la de la EntP producida por *E. faecium* P13. Sin embargo, mientras que la producción de EntP en *P. pastoris* X-33t₁ desarrollado en el medio complejo BMMY es de 3,7 veces mayor que la producción de EntP por *E. faecium* P13, su actividad antimicrobiana es 16 veces mayor que la de la EntP producida por *E. faecium* P13. La actividad antimicrobiana específica de la EntP de *P. pastoris* X-33t₁ desarrollado en el medio complejo BMMY es también de unas 4 veces mayor que la de la EntP del sobrenadante de *E. faecium* P13.

De los resultados obtenidos conviene destacar la observación de que la mayor producción y actividad de la EntP se logra durante el desarrollo de *P. pastoris* X-33t₁ en el medio complejo BMMY, respecto del medio mínimo BMM, aunque la producción y actividad de la EntP decrece rápidamente tras 6 h de desarrollo del cultivo de *P. pastoris* X-33t₁ en el medio BMMY (Tabla VII.1; Figura VIII.7). Es posible que la EntP producida por *P. pastoris* X-33t₁ en los dos medios de cultivo se adhiera a las células productoras, tienda a formar agregados o se degrade por proteasas. La presencia de sales y otros componentes del medio mínimo BMM pueden también reducir la actividad antimicrobiana de la EntP, como se ha descrito para la nisina (Zhang y col., 2000). No obstante, proteinasas neutras con actividad N-terminal y, quizás, con una mayor actividad proteolítica C-terminal (Trucksis y col., 1997), pueden también ser responsables de la reducción del reconocimiento antigénico de la EntP por sus anticuerpos, así como de la disminución de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *P. pastoris* X-33t₁ desarrollados en el medio BMMY (Tabla VII.1).

Figura VIII.7. Producción y actividad antimicrobiana de la enterocina P (EntP) de los cultivos de *Pichia pastoris* X-33t₁ desarrollados en el medio mínimo BMM (A) y en el medio complejo BMMY (B).



La producción de EntP se muestra con barras negras y su actividad antimicrobiana con las grises. Las barras blancas muestran la actividad antimicrobiana específica de la EntP. El asterisco es la cepa control *E. faecium* P13.

VIII.2.4.2. Purificación de la enterocina P producida por *Pichia pastoris*

Los resultados de la purificación de la EntP producida por *E. faecium* P13 y *P. pastoris* X33t₁ se muestran en la Tabla VII.2. Aunque, como era de esperar, la actividad antimicrobiana total era mayor en el sobrenadante de *P. pastoris* X33t₁ y que la purificación de la EntP dio lugar, en ambos casos, a dos fracciones que contenían a la EntP tras su purificación por cromatografía de fase reversa (RP-FPLC), la recuperación final de la actividad antimicrobiana de la EntP fue de un 23% de su actividad inicial en *E. faecium* P13 y de un 5% de su actividad inicial en *P. pastoris* X33t₁. De los resultados obtenidos, se deduce que los rendimientos de recuperación son menores para la EntP producida por *P. pastoris* X33t₁ que para la EntP producida por *E. faecium* P13. Una menor adsorción/desorción de la EntP a la matriz de intercambio iónico, interacción hidrofóbica y fase inversa (RP-FPLC) pueden constituir factores limitantes para la purificación de la EntP producida por *P. pastoris* X33t₁. Por ello, la sobreproducción de EntP en cepas recombinantes de *P. pastoris* X33t₁ no será útil sin el desarrollo y optimización de procedimientos más eficaces de recuperación y purificación de esta bacteriocina.

Posteriormente la EntP purificada de *E. faecium* P13 y *P. pastoris* X33t₁ se caracterizó por su perfil electroforético en geles de tricina-SDS-poliacrilamida, por su actividad antimicrobiana

directa en dichos geles y por su reconocimiento antigénico, tras su transferencia a membranas de nitrocelulosa, en experiencias de *Western blotting*. Los resultados obtenidos (Figura VII.3), sugieren que la EntP purificada de ambos microorganismos manifiesta una elevada tendencia a la formación de agregados con actividad antimicrobiana, siendo la EntP producida por *P. pastoris* X33t₁ la que mostró una mayor actividad. Igualmente, el que la masa molecular de la EntP purificada de ambos hospedadores sea idéntica a la de la masa molecular teórica de la EntP (Figura VII.4), sugiere que el vector pJC31 dirige adecuadamente el procesado, transporte y secreción de la EntP en *P. pastoris* X33t₁.

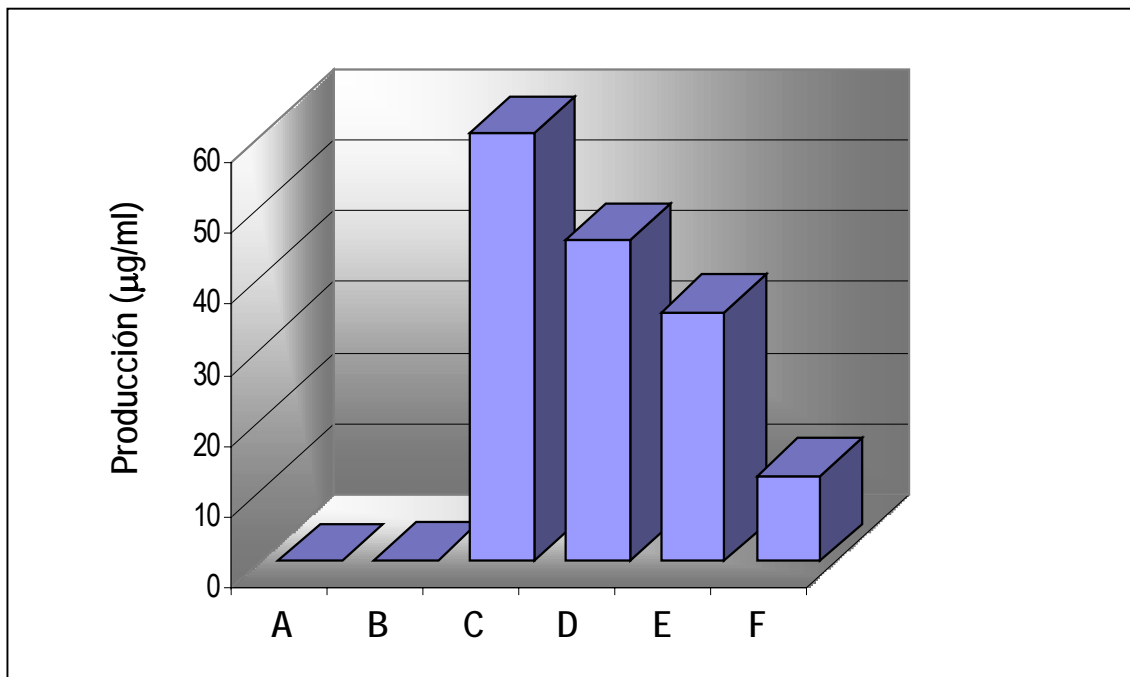
De los resultados mostrados en este trabajo no cabe duda que la producción y expresión funcional de la EntP por *P. pastoris* X33t₁ ha sido un éxito. La producción heteróloga de péptidos y proteínas por levaduras permite modificaciones proteolíticas y post-traduccionales, como por ejemplo, las glucosilaciones y la formación de enlaces disulfuro. Sin embargo, aunque la secuencia aminoacídica de la EntP posee un lugar de glucosilación potencial (Asn-Asn-Ser), la EntP purificada de *P. pastoris* X33t₁ mostró la misma masa molecular que la EntP purificada de *E. faecium* P13 (Figura VII.4) lo que sugiere que dicho lugar de glucosilación no fue identificado como tal. Por otro lado, se sabe que las bacteriocinas pediocina PA-1 (Schoeman y col., 1999) y plantaricina 423 (Van Reenen y col., 2002) ya se han clonado y producido en cepas recombinantes de *S. cerevisiae*. Sin embargo, su actividad antimicrobiana no fue detectable en los sobrenadantes de los cultivos productores, especulándose con la posibilidad de que las bacteriocinas permaneciesen asociadas a la pared celular de la levadura productora. Por ello, de los resultados presentados en esta memoria se deduce que la EntP es la primera bacteriocina biológicamente activa producida por una levadura. La elevada producción y actividad antimicrobiana de la EntP de los sobrenadantes de *P. pastoris* X33t₁ puede facilitar futuras aplicaciones de esta bacteriocina en la industria alimentaria. Muchos enzimas y productos de interés farmacológico, producidos por levaduras metilotróficas, han encontrado su utilidad y mercado o se espera que lo hagan en un futuro próximo (Hollenberg y Gellisen, 1997; Gellisen, 2000). Otras estrategias experimentales que pueden permitir una mayor producción de EntP en *P. pastoris* incluyen: (i) la utilización de hospedadores deficientes en la síntesis de proteinasas extracelulares y de medios de cultivo no tamponizados que permiten la inactivación de proteinasas neutras (Trucksis y col., 1997); (ii) su producción en fermentadores (Cereghino y col., 2002); (iii) un mayor incremento de la masa celular mediante la utilización de fuentes de carbono que no interfieran en la inducción del promotor (Sreekrishna y col., 1997); y (iv) la utilización de recipientes de cultivo con diseños novedosos (Villate y col., 2001).

VIII.2.5. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA P EN *Escherichia coli*, *Methylobacterium extorquens*, *Lactococcus lactis* y *Pichia pastoris*

Durante la exposición de este trabajo, se han evaluado las ventajas y limitaciones de los hospedadores utilizados para la producción heteróloga de la EntP de *E. faecium* P13. A pesar de las limitaciones observadas, sobre todo en las cepas recombinantes de *E. coli* y *M. extorquens*, todos los hospedadores merecen su reconocimiento como factorías celulares experimentales de clonación, producción y expresión funcional de la EntP, un péptido de interés biotecnológico. De los resultados mostrados en las secciones VIII.2.1 y VIII.2.2 de esta memoria, se ha destacado la capacidad de las bacterias recombinantes Gram-negativas de producir EntP en medios de cultivo mínimos que facilitan su recuperación mediante el empleo de técnicas de inmunopurificación en un solo paso o de técnicas cromatográficas que facilitan la purificación de la enterocina de una manera más rápida, sencilla y eficaz. En las secciones VIII.2.3 y VIII.2.4 de esta memoria, también se ha puesto de manifiesto el éxito de la utilización de *L. lactis* y *P. pastoris* como hospedadores para la producción heteróloga y expresión funcional de la EntP, ya que, en la

mayoría de los casos, las cepas recombinantes de *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*, así como de la levadura *P. pastoris*, permiten la producción y expresión funcional de dicha bacteriocina en cantidades y con una actividad antimicrobiana específica que superan con creces la producción y actividad antimicrobiana de la EntP producida por *E. faecium* P13. Finalmente, la Figura VIII.8 muestra la producción comparada de EntP por cultivos recombinantes de *E. coli*, *M. extorquens*, *L. lactis* y *P. pastoris* y de la cepa control de *E. faecium* P13.

Figura VIII.8. Producción de enterocina P (EntP) por las cepas recombinantes de *E. coli* Tuner(DE3)placI (pJG01) (A), *M. extorquens* S25 (B), *L. lactis* IL1403 (pJP214) (C), *L. lactis* NZ9000 (pJR199) (D), *P. pastoris* X33t₁ (E) y por la cepa control de *E. faecium* P13 (F).



Las cepas se desarrollaron en sus medios óptimos de producción de la EntP

IX. CONCLUSIONES

Primera. La inmunización de conejos con péptidos sintéticos deducidos de la secuencia aminoacídica de la enterocina P (EntP) y conjugados a la hemocianina portadora (KLH), permitió la obtención de anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada y de sensibilidad adecuada frente a dicha bacteriocina.

Segunda. Los anticuerpos generados y el diseño y empleo de las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) y de transferencia electroforética y reconocimiento inmunoquímico (Western blotting) apropiadas, permitieron la detección y cuantificación de la EntP de los sobrenadantes de los microorganismos productores, determinar su tendencia a la formación de agregados y monitorizar la recuperación de la EntP durante su purificación mediante procedimientos multicromatográficos distintos.

Tercera. La construcción de matrices cromatográficas que contienen inmunoglobulinas G, purificadas de conejos inmunizados con péptidos sintéticos deducidos de la EntP y conjugados a la KLH, permitieron una recuperación rápida, sencilla y eficaz de la EntP de los sobrenadantes de cultivos productores de dicha bacteriocina.

Cuarta. La transformación de células competentes de *Escherichia coli* Tuner(DE3)pLacl con los plásmidos recombinantes pJG01, que posee el gen estructural de la enterocina P (*entP*) y del plásmido pJG02, con los genes estructural (*entP*) y de inmunidad de la enterocina P (*entiP*), permitió la producción de EntP funcionalmente activa. Las células recombinantes de *E. coli* Tuner(DE3)pLacl (pJG01) merecen su reconocimiento como modelo experimental de producción y expresión funcional de la EntP ya que facilitan su recuperación de los sobrenadantes de los cultivos productores mediante el empleo de técnicas inmunológicas y cromatográficas, sencillas y rápidas.

Quinta. La clonación del gen estructural de la enterocina P (*entP*) en el vector de expresión pCM80 originó el plásmido recombinante pS25, lo que permitió la producción heteróloga de la EntP en *Methylobacterium extorquens* ATCC 55366. Sin embargo, dicha bacteriocina no mostró actividad antimicrobiana en los sobrenadantes de la cepa recombinante de *M. extorquens* S25 (pS25). No obstante, el empleo de columnas cromatográficas de adsorción hidrofóbica y de fase reversa permitió la recuperación de EntP funcionalmente activa de cultivos de *M. extorquens* S25 (pS25) y con unos rendimientos de purificación superiores a los obtenidos de la purificación de dicha bacteriocina de *Enterococcus faecium* P13.

Sexta. Las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403, *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 y *L. lactis* subsp. *lactis* DPC5598 transformadas con vectores que poseen el gen estructural de la enterocina P (*entP*), con o sin su gen hipotético de inmunidad (*entiP*), permitieron la producción y expresión funcional de la enterocina P (EntP) de los sobrenadantes de los cultivos productores utilizando diferentes sistemas de expresión: constitutivo, inducible y de integración. La producción y expresión funcional de la EntP por las cepas recombinantes de *L. lactis* dependió del hospedador utilizado, del vector de expresión y de la presencia en los vectores del gen *entiP*. La mayor producción de EntP se obtuvo de las cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (pJP214) y *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (pJR199), que produjeron de 5 a 6 veces más EntP que la cepa de *E. faecium* P13. Las cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* DPC5598 transformadas con distintos vectores de expresión también permitieron la co-producción simultánea de nisina A (NisA) y EntP. La evaluación de la EntP purificada de *E. faecium* P13 y de *L. lactis* IL1403 (pJG214) determinó que ambas poseen una masa molecular idéntica lo que sugiere que la síntesis, procesado y secreción de la EntP se realiza apropiada y adecuadamente en *L. lactis*.

Séptima. La secuencia nucleotídica que codifica la enterocina P (EntP) madura de *Enterococcus faecium* P13 se clonó en el vector de expresión pPIC α A para generar el plásmido pJC31. Cuando el plásmido pJC31 se linearizó e integró en el genoma de *P. pastoris* X33 se obtuvo un derivado, denominado *P. pastoris* X33t₁, que permitió la expresión funcional de la EntP con una mayor producción y actividad antimicrobiana que la obtenida de *E. faecium* P13.

X. TRABAJO FUTURO

El empleo de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (LAB) como péptidos antimicrobianos naturales de los alimentos, constituye una alternativa interesante a la utilización de conservadores químicos, potencialmente peligrosos para la salud de los consumidores ó de tratamientos tecnológicos que reduzcan su calidad organoléptica o nutricional. Por ello, en este trabajo se ha procedido a la caracterización inmunoquímica y a la evaluación de la clonación, producción y expresión funcional de la enterocina P (EntP), producida por *Enterococcus faecium* P13, en otros hospedadores (i) más seguros, (ii) que permitan una mayor producción de EntP, (iii) que faciliten su recuperación y purificación de los sobrenadantes de los cultivos productores y (iv) que proporcionen una mayor actividad antimicrobiana a otras bacterias lácticas utilizadas o utilizables como cultivos iniciadores, protectores o probióticos.

De los resultados generados durante el desarrollo de este trabajo se deduce que la futura aplicación de la EntP como péptido antimicrobiano natural de los alimentos debería considerar el desarrollo de protocolos de recuperación y de purificación más eficaces que los disponibles hasta ahora. Por ello, los anticuerpos policlonales generados y las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) evaluadas deberían utilizarse en la monitorización de la recuperación de la EntP de los sobrenadantes de los cultivos protectores mediante el empleo de nuevas y más eficaces técnicas de purificación, no ya basadas en la medición de la actividad antimicrobiana recuperada tras cada paso de purificación, sino en la determinación de la cantidad de bacteriocina recuperada. Igualmente, la obtención de anticuerpos monoclonales frente a la EntP permitiría la obtención de reactivos inmunológicos de especificidad y sensibilidad constantes, no solamente para detectar y cuantificar su presencia en los sobrenadantes de los cultivos productores, sino para la construcción de matrices cromatográficas más eficaces para su purificación en un solo paso por inmunocromatografía de afinidad.

Con respecto a la producción heteróloga de la EntP en *Escherichia coli* y *Methylobacterium extorquens*, conocemos que su producción y actividad biológica dependen del hospedador utilizado y que son inferiores a las de *E. faecium* P13. No obstante, ambos hospedadores producen y secretan la EntP y facilitan su recuperación de los sobrenadantes de los cultivos productores. Por ello, otro de los objetivos del trabajo futuro sería el de evaluar en dichos hospedadores otros modelos genéticos de producción y expresión funcional de la EntP más eficaces que los evaluados en este trabajo. Probablemente, ello debería considerar su producción, transporte y secreción, no ya canalizándola a través de la ruta general de secreción (GSP) del hospedador, sino mediante el empleo de vectores de expresión que contengan quimeras génicas de la secuencia nucleotídica que codifica la EntP madura fusionadas a señales génicas que permitan una mayor producción intracelular o extracelular de la EntP y su más sencilla, rápida y económica recuperación.

Otro de los objetivos deseables a corto plazo sería el de mejorar la producción, transporte y secreción de la EntP en *Lactococcus lactis*. De los resultados mostrados se deduce que la mayoría de las cepas recombinantes de *L. lactis* no solamente producen una mayor cantidad de EntP que *E. faecium* P13, sino, en ocasiones, una EntP con una mayor actividad antimicrobiana total y específica que la de la EntP producida por la cepa enterocócica. Mejorar la producción de EntP por estos hospedadores, probablemente requiera la utilización de vectores de expresión con un mayor número de copias en el hospedador o con promotores más activos. De todas maneras, el posible empleo de las cepas recombinantes por la industria alimentaria requerirá también un esfuerzo suplementario en el desarrollo y utilización de vectores de expresión de "grado alimentario" y de hospedadores reconocidos por su utilidad industrial. Igualmente, el resultado tan exitoso de la producción y expresión funcional de la EntP en *L. lactis* debería utilizarse como punto de partida para su producción y expresión en otras muchas bacterias

lácticas (LAB) adaptadas a diversos sustratos alimentarios de origen cárnico, lácteo y vegetal, así como para su posible empleo como probióticos en los piensos para animales.

No obstante, no cabe duda de que la producción, transporte y secreción de la EntP por *L. lactis* mediante un sistema de procesado y secreción dependiente de un péptido señal puede permitir la producción por este microorganismo de otras bacteriocinas y de muchos otros péptidos de interés, mediante la fusión génica de los nucleótidos que los codifican a los del péptido señal de la EntP. Muchos péptidos podrían seleccionarse para tal fin, entre los que destacan aquellos que manifiestan propiedades de interés biotecnológico. Estas propiedades incluirían: (i) su naturaleza antigénica, capaz de desarrollar una respuesta inmune protectora frente a los microorganismos que los poseen o producen; (ii) su actividad edulcorante; (iii) su actividad antimicrobiana y amplio espectro de acción frente a bacterias, virus, hongos y parásitos; (iv) su capacidad de controlar la actividad de toxinas; (v) su actividad frente a células transformadas responsables de la formación de tumores; y (vi) su participación en la modulación de la respuesta celular a procesos inflamatorios e inmunológicos.

En este contexto, la identificación de la secuencia aminoacídica de los denominados “péptidos bioactivos” abre la posibilidad de utilizarlos en el desarrollo de “alimentos funcionales”, es decir, alimentos que ejercen un efecto fisiológico beneficioso más allá del efecto derivado de su valor nutritivo. Actualmente, se conoce que durante la fermentación de la leche, proteinasas liberadas por bacterias lácticas originan péptidos bioactivos con actividades biológicas de tipo opiáceo, antitrombótico y/o antihipertensivo (Recio y col., 2004). La utilización de vectores con quimeras génicas del péptido señal de la EntP fusionado a las secuencias nucleotídicas que codifican los péptidos de interés pueden permitir su clonación, producción y expresión funcional en células recombinantes de *L. lactis* y en unas cantidades, probablemente aceptables, para su funcionalidad orgánica. También se conoce que *L. lactis* es un excelente candidato para la producción de antígenos y citoquinas (Nouaille y col., 2003). Los antígenos producidos y secretados por células recombinantes de *L. lactis* son presentados correctamente al sistema inmunitario, tanto al asociado a las mucosas como al sistémico, sin colonizar ni invadir la mucosa intestinal.

Finalmente, la producción exitosa de la EntP por células recombinantes de *Pichia pastoris* podría consituir un modelo para la clonación, producción y expresión funcional de otras bacteriocinas y péptidos de interés en esta levadura metilotrófica. Además, debido a su desarrollo en medios de cultivo que pueden permitir una rápida y eficaz recuperación y purificación de los péptidos de interés de los sobrenadantes de los cultivos productores, dichos péptidos no solamente pueden ser de interés para su utilización por la industria alimentaria, sino también por su posible utilización como agentes antimicrobianos de uso tópico o de otro uso en medicina humana y veterinaria.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abee, T. 1995. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanism of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 129, 1-10.
- Abee, T., L. Krockel y C. Hill. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 169-185.
- Aguirre, M. y M. D. Collins. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 95-107.
- Allison, G. E., C. Fremaux, C. Ahn y T. R. Klaenhammer. 1994. Expansion of the bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* 176, 2235-2241.
- Allison, G. E., C. Ahn, M. E. Stiles, y T. R. Klaenhammer. 1995a. Utilization of the leucocin A export system in *Leuconostoc gelidum* for production of a *Lactobacillus* bacteriocin. *FEMS Microbiol. Lett.* 131, 87-93.
- Allison, G. E., R.W. Worobo, M. E. Stiles, y T. R. Klaenhammer. 1995b. Heterologous expression of the lactacin F peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1371-1377.
- Allison, G.E. y T. R. Klaenhammer. 1996. Functional analysis of the gene encoding immunity to lactacin F, *lafi*, and its use as a *Lactobacillus*-specific, food-grade genetic marker. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4450-4460.
- Arqués, J. L., E. Rodríguez, J. Tomillo, P. Gaya, M. Nuñez y M. Medina. 2003. Tratamientos combinados de altas presiones y bacterias lácticas productoras de bacteriocinas en la inactivación de patógenos. En: *Bacteriocinas de bacterias lácticas en la mejora de la calidad de los alimentos*, pp. 181-192. Medina, M. y M. Nuñez. INIA, Madrid.
- Audibert, F. M. y L. D. Lise. 1993. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol. Today.* 14, 281-284.
- Avrameas, S. y S. Ternynck, 1969. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents. *Immunochem.* 6, 53-66.
- Axelsson, L. y A. Holck. 1995. The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.* 177, 2125-2137.
- Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. En "Lactic Acid Bacteria", pp. 1-72. Salminen, S. y A. Von Wright (eds.). Marcel Dekker Inc., Nueva York.
- Axelsson, L., T. Katla, M. Bjornslett, V. G. H. Eijsink y A. Holck. 1998. A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*. *FEMS Microbiol. Lett.* 168, 137-143.
- Aymerich, T., H. Holo, L. S. Håvarstein, M. Hugas, M. Garriga, I. F. Nes. 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, M. T. y M. Hugas. 1998. Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. *Eurocarne*. 72, 39-49.

Balla, E., L. M. T. Dicks, M. du Toit, M. J. van der Merwe y W. H. Holzapfel. 2000. Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE1071. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1298-1304.

Benech, R.O., E. E. Kheadr, C. Lacroix e I. Fliss. 2002a. Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced in situ by mixed culture during cheddar cheese ripening. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5607-5619.

Benech, R.O., E. E. Kheadr, R. Laridi, C. Lacroix e I. Fliss. 2002b. Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by *in situ* production in mixed culture. *Appl Environ Microbiol* 68:3683-3690.

Bermúdez-Humarán, L.G., P. Langella, A. Gruss, R. Montes de Oca-Luna e Y. Le Loir. 2002. Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 917-922.

Bessette, P.H., F. Aslund, J. Beckwith y G. Georgiou. 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96, 13703-13708.

Bhunja, A. K., M. C. Johnson, B. Ray y E. L. Belden. 1990. Antigenic property of pediocin Ach produced by *Pediococcus acidilactici* H. J. *Appl. Bacteriol.* 69, 211-215.

Bhunja, A. K. y M. G. Johnson. 1992. Monoclonal antibody-colony immunoblot method specific for isolation of *Pediococcus acidilactici* from foods and correlation with pediocin (bacteriocin) production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2315-2320.

Bhunja, A. K. 1994. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for pediocins of *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2692-2696.

Biet, F., J. M. Berjeaud, R. W. Worobo, Y. Cenatempo y C. Fremaux. 1998. Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway. *Microbiology* 144, 2845-2854.

Billman-Jacobe, H. 1996. Expression in bacteria other than *Escherichia coli*. *Curr. Opinion Biotech.* 7, 499-504.

Blom, H., T. Katla, B. F. Hagen y L. Axelsson. 1997. A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 103-109.

Bohaychuk, V. M., C. M. A. P. Franz, M. J. van Belkum, M. E. Stiles y L. M. McMullen. 1999. Heterologous expression of brochochin-C in *Carnobacterium* spp. Abstracts of the Sixth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, FEMS, Veldhoven, Holanda, C86.

- Bouksaim, M., I. Fliss, J. Meghrous, R. Simard y C. Lacroix. 1998. Immunodot detection of nisin Z in milk and whey using enhanced chemiluminescence. *J. Appl. Microbiol.* 84, 176-184.
- Bouksaim, M., C. Lacroix, R. Bazin y R. E. Simard. 1999. Production and characterization of polyclonal antibodies against nisin in an ELISA and for immuno-location of nisin in producing and sensitive bacterial strains. *J Appl Microbiol.* 87, 500-510.
- Briand, J. P., S. Muller y M. H. V. van Regenmortel. 1985. Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. *J. Immunol. Methods.* 78, 59-69.
- Broadbent, J. R., W. E. Sandine y J. K. Kondo. 1995. Characteristics of Tn5307 exchange and intergeneric transfer of genes associated with nisin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 139-146.
- Bron, P.A., M. G. Benchimol, J. Lambert, E. Palumbo, M. Deghorain, J. Delcour, W. M. de Vos, M. Kleerebezem y P. Hols. 2002. Use of the *alr* gene as a food-grade selection marker in lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5663-5670.
- Brötz, H., M. Josten, I. Wiedmann, U. Schneider, F. Gotz, G. Bierbaum y H. G. Sahl. 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol. Microbiol.* 30, 317-327.
- Bryan, E.M., T. Bae, M. Kleerebezem y G. M. Dunny. 2000. Improved vectors for nisin-controlled expression in Gram-positive bacteria. *Plasmid.* 44, 183-190.
- Bukhtiyarova, M., R. Yang y B. Ray. 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.
- Buyong, N., J. Kok y J. B. Luchansky. 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.
- Carolissen-Mackay, V., G. Arendse y J.W. Hastings. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.* 34, 1-16.
- Casaus, P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes, P. E. Hernández y H. Holo. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enteriocin A. *Microbiol.* 143, 2287-2294.
- Cao, T. B., H. Milton y Jr. Saier. 2003. The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1609, 115-125.
- Cereghino, J.L. y J.M. Cregg. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 45-66.
- Cereghino, G. P. L., J. L. Cereghino, C. Ilgen y J. M. Cregg. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 329-332.

Chatel, J.M., P. Langella, K. Adel-Patient, J. Commissaire, J. M. Wal y G. Corthier. 2001. Induction of mucosal immune response after intranasal or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine betalactoglobulin. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, 545-551.

Cheng, L. W. y Schneewind, O. 2000. Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. Trends in Microbiol. 8, 214-220.

Chikindas, M. L., M. J. García-Garcerá, A. J. M. Driessen, A. M. Ledebøer, J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, T. Abee, W. N. Konings y G. Venema. 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., K. Venema, A. M. Ledebøer, G. Venema y J. Kok. 1995. Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. Lett. Appl. Microbiol. 21, 183-189.

Choi, J. H. y S. Y. Lee. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 625-635.

Christie, P. J. y J. P. Vogel. 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. Trends in Microbiol. 8, 354-360.

Christie, P. J. 2001. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. Mol. Microbiol. 40, 294-305.

Cintas, L.M., P. Casaus, L. S. Håvarstein, P. E. Hernández e I. F. Nes. 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.M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernández, I. F. Nes y L. S. Håvarstein. 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. J. Bacteriol. 180, 1988-1994.

Cintas, L.M., P. Casaus y P.E. Hernández. 2000a. Bacterias lácticas de origen alimentario: consideraciones taxonómicas y filogenéticas. Alimentaria. Diciembre, pp. 61-70.

Cintas, L.M., P. Casaus y P.E. Hernández. 2000b. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas. Alimentación, Equipos y Tecnología (Leche y productos lácteos). Septiembre, pp. 83-119.

Cintas, L.M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P.E. Hernández e I. F. Nes. 2000c. 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.

Cintas, L. M., M. P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes y P. E. Hernández. 2001a. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Food Sci. Tech. Int. 7, 281-305.

Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes y M. L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int. J. Food Microbiol. 71, 1-20.

- Coderre, P. E. y G. A. Somkuti. 1999. Cloning and expression of the pediocin operon in *Streptococcus thermophilus* and other lactic fermentation bacteria. *Curr. Microbiol.* 39, 295-301.
- Coffey, A., M. Ryan, R. P. Ross, C. Hill, E. Arendt y G. Schwarz. 1998. Use of a broad-host-range bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* transconjugant as an alternative starter for salami manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 43, 231-235.
- Cornelis, P. 2000. Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Curr. Op. Biotechnol.* 11, 450-454.
- Cregg, J.M., T. S. Vedvick y W.C. Raschke. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technol.* 11, 905-910.
- Criado, R., J. Gutiérrez, R. Citti, M. Martín, A. Basanta, J. Sánchez, B. Gómez, C. Herranz, F. Fernández, P. E. Hernández y L. M. Cintas. 2004. Detección y diferenciación de las bacteriocinas producidas por *Enterococcus faecium* L50 mediante el empleo de anticuerpos policlonales anti-peptídicos de especificidad predeterminada. III Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Daba, H., C. Lacroix, J. Huang, R.E. Simard y L. Lemieux. 1994. Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 682-688.
- Dassa, E. y P. Bouige. 2001. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res. Microbiol.* 152, 211-229.
- Daoudi, L., C. Turcotte, C. Lacroix e I. Fliss. 2001. Production and characterization of anti-nisin Z monoclonal antibodies: suitability for distinguishing active from inactive forms through a competitive enzyme immunoassay. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56, 114-119.
- De Ruyter, P.G.G.A., O. P. Kuipers y W. M. de Vos. 1996. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* using the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3662-3667.
- De Vos, W.M. 1987. Gene cloning and expression in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 281-295.
- De Vos, W.M. 1999a. Safe and sustainable systems for food-grade fermentations by genetically modified lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 9, 3-10.
- De Vos, W.M., 1999b. Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 298-295.
- Desvaux, M., N. J. Parham e I. R. Henderson. 2004. The autotransporter secretion system. *Res. Microbiol.* 155, 53-60.
- Devlieghere, F., L. Vermeiren y J. Debevere. 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *Int. Dairy J.* 14, 273-285.

Dickely, F., D. Nilsson, E. B. Hansen y E. Johansen. 1995. Isolation of *Lactococcus lactis* nonsense suppressors and construction of a food-grade cloning vector. *Mol. Microbiol.* 15, 839-847.

Diep, D. B., e I. F. Nes. 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets.* 3, 107-122.

Dieye, Y., A. J. W. Hoekman, F. Clier, V. Juillard, H. J. Boot, and J. C. Piard. 2003. Ability of *Lactococcus lactis* to export viral capsid antigens: a crucial step for development of live vaccines. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7281-7288.

Driessen, A. J. M. 1994. How proteins cross the bacterial cytoplasmic membrane. *J. Membrane Biol.* 142, 145-159.

Drouault, S., C. Juste, P. Marteau, P. Renault y G. Corthier. 2002. Oral treatment with *Lactococcus lactis* expressing *Staphylococcus hyicus* lipase enhances lipid digestion in pigs with induced pancreatic insufficiency. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3166-3168.

Dyson, H. J. y P. E. Wright. 1995. Antigenic peptides. *FASEB J.* 9, 37-42.

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.

Economou, A. 1999. Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends in Microbiol.* 318, 315-320.

Eguchi, T., K. Kaminaka, J. Shima, S. Kawamoto, K. Mori, S-H. Choi, K. Doi, S. Ohmomo y S. Ogata. 2001. Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 247-253.

Eichenbaum, Z., M. J. Federle, D. Marra, W. M. de Vos, O. P. Kuipers, M. Kleerebezem y J. R. Scott. 1998. Use of the lactococcal *nisA* promoter to regulate gene expression in gram-positive bacteria: comparison of induction level and promoter strength. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2763-2769.

Eijsink, V. G. H., M. Skeie, M. Middelhoven, P. H. Brurberg e I. F. Nes. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3275-3281.

Eijsink, V.G.H., L. Axelsson, D. B. Diep, L. S. Håvarstein, H. Holo e I. F. Nes. 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 639-654.

Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto y A. Ishizaki. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 85-106.

Enouf, V., P. Langella, J. Commissaire, J. Cohen y G. Corthier. 2001. Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1423-1428.

- Fariás, M. E., R. N. Fariás, A. A. P. de Ruiz Holgado y F. Sesma. 1996. Purification and N-terminal amino acid sequence of enterocin CRL35, a "pediocin-like" bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CRL35. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 417-419.
- Falahee, M. B., M. R. Adams, J. W. Dale y B. A. Morris. 1990. An enzyme immunoassay for nisin. *Int. J. Food. Sci. Technol.* 25, 590-595.
- Falahee, M. B. y M. R. Adams. 1992. Cross-reactivity of bacteriocins from lactic acid bacteria and lantibiotics in a nisin bioassay and ELISA. *Lett. Appl. Microbiol.* 15, 214-216.
- Fath, M.J. y R. Kolter. 1993. ABC-transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* 57, 995-1017.
- Fekkes, P. y A. J. M. Driessen. 1999. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 161-173.
- Ferchichi, M., J. Frère, K. Mabrouk y M. Manai. 2001. Lactococcin MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from a Tunisian dairy product. *FEMS Microbiol. Lett.* 205, 49-55.
- Fernández, A. 2004. Producción inducible de la 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. A. y de Lorenzo, V. 2001. Formation of disulfide bonds during secretion of proteins through the periplasmic-independent type I pathway. *Mol. Microbiol.* 40, 332-346.
- Fimland, G., R. Jack, G. Jung, I. F. Nes y J. Nissen-Meyer. 1998. The bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a near 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center toward the C terminus. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 5057-5060.
- Fimland, G., V. G. H. Eijsink y J. Nissen-Meyer. 2002. Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiol.* 148, 3661-3670.
- Flynn, S., D. van Sinderen, G. M. Thornton, H. Holo, I. F. Nes y J. K. Collins. 2002. Characterization of the genetic locus responsible for the production of a ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiol.* 148, 973-984.
- Franke, C.M., K. J. Leenhouts, A. J. Haandrikman, J. Kok, G. Venema y K. Venema. 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, W. H. Holzapfel y M. E. Stiles. Enterococci at the crossroads of food safety?. 1999a. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 1-24.
- Franz, C.M.A.P., R. W. Worobo, L. E. N. Quadri, U. Schillinger, W. H. Holzapfel, J. C: Vederas y M. E. Stiles. 1999b. Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2170-2178.

Franz, C.M.A.P., A. B. Muscholl-Silberhorn, N. M. K. Yousif, M. Vancanneyt, J. Swings, W. M. Holzapfel. 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4385-4389.

Fremaux, C., Y. Héchard e Y. Cenatiempo. 1995. Mesentericin Y105 gene clusters in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Microbiol.* 141, 1637-1645.

Froseth, B.R. y L. L. McKay. 1991. Development and application of pFM011 as a possible food-grade cloning vector. *J. Dairy Sci.* 74, 1445-1453.

Fujimoto, S. e Y. Ike. 2001. PAM401-based shuttle vectors that enable overexpression of promoterless genes and one-step purification of tag fusion proteins directly from *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1262-1267.

Gallagher, N. L., M. Sailer, W. P. Niemczura, T. T. Nakashima, M. E. Stiles y J. C. Vederas. 1997. Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecyl phosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochem.* 36, 15062-15072.

Garneau, S., C. A. Ference, M. J. van Belkum, M. E. Stiles y J. C. Vederas. 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.

Gellisen, G. 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 741-750.

Glenting, J., S. M. Madsen, A. Vrang, A. Fomsgaard y H. Israelsen, H., 2002. A plasmid selection system in *Lactococcus lactis* and its use for gene expression in *L. lactis* and human kidney fibroblasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5051-5056.

Gibbs, G. M., B. E. Davidson y A. J. Hillier. 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.

Giraffa, G. Functionality of enterococci in dairy products. 2003. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 215-222.

Gosalbes, M.J., C. D. Esteban, J. L. Galán y G. Pérez-Martínez. 2000. Integrative food-grade expression system based on the lactose regulon of *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4822-4828.

Guder, A., I. Wiedemann y H-G. Sahl. 2000. Posttranslationally modified bacteriocins-the lantibiotics. *Biopolymers (Peptide Science)*. 55, 62-73

Gupta, R. K., E. H. Relyveld, E. B. Lindblad, B. Bizzini, S. Ben-Efraim y C. K. Gupta. 1993. Adjuvants: a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine*. 11, 293-306.

Guyonnet, D. C. Fremaux, Y. Cenatiempo y J.M. Berjeaud. 2000. Method for rapid purification of Class IIa bacteriocins and comparaison of their activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1744-1748.

- Haas, W., B. D. Shepard, M. S. Gilmore, M.S. 2002. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature*. 415, 84-87.
- Harlow, E. y D. Lane. 1988. *Immunoassays. Antibodies: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Håvarstein, L.S., H. Holo e I. F. Nes. 1994. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiol.* 140, 2383-2389.
- Håvarstein, L.S., D. B. Diep, e I. F. Nes. 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* 16, 229-240.
- Hefle, S. L. 1995. *Immunoassay fundamentals*. Food Technol. 102-107.
- Henderson, I. R. y J. P. Nataro. 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infection and Immunity*. 69, 1231-1243.
- Henderson, I. 2004. The magic is in the simplicity. *Biotechnol. News Issue*, 47.
- Herranz, C. 2000. Caracterización bioquímica y genética de enterocinas producidas por cepas de *Enterococcus faecium* de origen cárnico. Optimización de la producción y mecanismo molecular de acción de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Herranz, C., Y. Chen, L. M. Cintas, P. E. Hernández, T. J. Montville y M. L. Chikindas. 2001a. Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1689-1692.
- Herranz, C., L. M. Cintas, P. E. Hernández, G. N. Moll, A. J. M. Driessen. 2001b. Enterocin P causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136 cells. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 45, 901-904.
- Hickey, R.M., D. P. Twomey, R. P. Ross y C. Hill. 2001. Exploitation of plasmid pMRC01 to direct transfer of mobilizable plasmids into commercial lactococcal starter strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2853-2858.
- Hickey, R.M., R. P. Ross y C. Hill. 2004. Controlled autolysis and enzyme release in a recombinant lactococcal strain expressing the metalloendopeptidase enterolysin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1744-1748.
- Higgins, C. F. 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism. *Res. Microbiol.* 152, 205-210.
- Holck, A., L. Axelsson, S.-E. Birkeland, T. Aukrust y H. Blom. 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2715-2720.
- Hollenberg, C.P. y G. Gellissen. 1997. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 554-560.

Holo, H., O. Nissen e I. F. Nes. 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.

Holzapfel, W. H., R. Geisen y U. Schillinger. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. Int. J. Food Microbiol. 24, 343-362.

Horn, N., M. I. Martínez, J. M. Martínez, P. E. Hernández, M. J. Gasson, J. M. Rodríguez y 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 y 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.

Horn, N., A. Fernández, H. M. Dodd, M. J. Gasson y 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.

Hughes, B.F. y L. L. McKay. 1991. Deriving phage-insensitive lactococci using a food-grade vector encoding phage and nisin resistance. J. Dairy Sci. 75, 914-923.

Izard, J. W. y D. A. Kendall. 1994. Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. Mol. Microbiol. 13, 765-773.

Jack, R. W., J. R. Tagg y B. Ray. 1995. Bacteriocins of Gram positive bacteria. Microbiol. Rev. 59, 171-200.

Jennes, W., L. M. T. Dicks y D. J. Verwoerd. 2000. Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. J. Appl. Microbiol. 88, 349-357.

Jett, B.D., M. M. Huycke, M. S. Gilmore. 1994. Virulence of enterococci. Clin. Microbiol. Rev. 7, 462-478.

Jiménez-Díaz, R., J. L. Ruiz-Barba, D. P. Cathcart, H. Holo, I. F. Nes, K. H. Sletten y P. J. Warner. 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. y T. R. Klaenhammer. 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* laboratory strains to industrial strains. Genet. Mol. Res. 2, 112-116.

Johnsen, L., G. Fimland, V. Eijsink y J. Nissen-Meyer. 2000. Engineering increased stability in the antimicrobial peptide pediocin PA-1. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4798-4802.

- Kalchayanand, N., M. B. Hanlin y B. Ray. 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, A. Sikes, C. P. Dunne y B. Ray. 1998. Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *J. Food Prot.* 61, 425-431.
- Kanatani, K, M. Oshimura y K. Sano. 1995. Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Latobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1061-1067.
- Kawamoto, S., S. Shima, R. Sato, T. Eguchi, S. Ohmomo, J. Shibato, N. Horikoshi, K. Takeshita y T. Sameshima. 2002. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7973. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3830-3840.
- Kemperman, R., M. Jonker, A. Nauta, O. P. Kuipers y J. Kok. 2003a. Functional analysis of the gene cluster involved in production of the bacteriocin circularin A by *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5839-5848.
- Kemperman, R., A. Kuipers, H. Karsens, A. Nauta, O. P. Kuipers y J. Kok. 2003b. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1589-1597.
- Keren, T., M. Yarmus, G. Halevy y R. Shapira. 2004. Immunodetection of the bacteriocin lacticin RM: analysis of the influence of temperature and tween 80 on its expression and activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2098-2104.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 39-86.
- Kleerebezem, M., M. M. Beerthuyzen, E. E. Vaughan, W. M. de Vos y O. P. Kuipers, O. P. 1997. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4581-4584.
- Kok, J., M. B. Jos, M. van der Vossen y G. Venema. 1984. Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 726-731.
- Kok, J., H. Holo, M. van Belkum, A. J. Haandrikman e I. F. Nes. 1993. Non-nisin bacteriocins in lactococci: biochemistry, genetics and mode of action. In: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. D. G. Hoover y L. R. Steenson (Eds.), pp 121-151. Academic Press. Inc., NY.
- Kuipers, O. P., M. M. Beerthuyzen, P. G. G. A. de Ruyter, E. J. Luesink y W. M. de Vos. 1995. Autorregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.* 270, 27299-27304.
- Kuipers, O.P., P. G. G. A. de Ruyter, M. Kleerebezem y W. M. de Vos. 1997. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.* 15, 135-140.

- Kuipers, O.P., P.G.G.A de Ruyter, M. Kleerebezem y W. M. de Vos. 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64, 15-21.
- Leistner, L. y G. M. Gorris. 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.* 6, 41-46.
- Leenhouts, K., A. Bolhuis, G. Venema y J. Kok. 1998. Construction of a food-grade multicopy integration system for *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 417-423.
- Leer, J.R., J.M.B.M. van der Voosen, M. van Gieze, J. M. van Noor y P. H. Pouwels. 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* 141, 1629-1635.
- Lemcke, R. y M. Bülte. 1997. Feintypisierung Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) aus Geflügel- und Schweinefleisch, pp. 162-169. En "38. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft in Garmisch-Partenkirchen. DVG, Gießen, Alemania.
- Leung, P.P., M. Khade, T. H. Shellhammer y A. E. Yousef. 2002. Immunoassay method for quantitative determination of nisin in solution and on polymeric films. *Lett Appl Microbiol.* 34, 199-204.
- Leversee, J.A. y B. A. Glatz. 2001. Detection of bacteriocin propionicin PLG-1 with polyvalent anti-PLG-1 antiserum. *Appl Environ Microbiol.* 67, 2235-2239.
- Li, H. y D. J. O'Sullivan. 2002. Heterologous expression of the *Lactococcus lactis* bacteriocin, nisin in a dairy *Enterococcus* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3392-3400.
- Lindgren, S. E. y W. J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87, 149-164.
- Makrides, S. C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60, 512-538.
- Manting, E. H. y A. J. M. Driessen. 2000. *Escherichia coli* translocase: the unravelling of a molecular machine. *Mol. Microbiol.* 37, 226-238.
- Martín, M.C., J. C. Alonso, J. E. Suárez y M. A. Álvarez. 2000. Generation of food-grade recombinant lactic acid bacterium strains by site-specific recombination. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2599-2604.
- Martínez, B., M. Fernández, J. E. Suárez y A. Rodríguez. 1999. Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiol.* 145, 3155-3161.
- Martínez, J.M., M. I. Martínez, A. M. Suárez, C. Herranz, P. Casaus, L. M. Cintas, J. M. Rodríguez y P. E. Hernández. 1998. Generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity against pediocin PA-1. *Appl Environ Microbiol.* 64, 4536-4545.

Martínez, J.M., M. I. Martínez, C. Herranz, A. M. Suárez, M. F. Fernández, L. M. Cintas, J. M. Rodríguez y P. E. Hernández. 1999. Antibodies to a synthetic 1-9-N-terminal amino acid fragment of mature pediocin PA-1: sensitivity and specificity for pediocin PA-1 and cross-reactivity against Class IIa bacteriocins. *Microbiol.* 145, 2777-2787.

Martínez, J. M. 2000. Producción y empleos de anticuerpos de especificidad predeterminada para la detección, cuantificación y purificación de las bacteriocinas pediocina PA-1 y enterocina A y para el reconocimiento específico de su (co)expresión heteróloga en *Lactococcus lactis*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Martínez, J.M, J. Kok, J. W. Sanders y P. E. Hernández. 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, M. I., J. M. Rodríguez, A. Suárez, J. M. Martínez, J. I. Azcona y P. E. Hernández. 1997. Generation of polyclonal antibodies against a chemically synthesized N-terminal fragment of the bacteriocin pediocin PA-1. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 488-492.

Martínez, S. 2003. Los enterococos en los alimentos: interés tecnológico y sanitario. Alimentación: equipos y tecnología.

Marugg, J. D., C. F. González, B. S. Kunka, A. M. Ledebøer, M. J. Pucci, M. Y. Toonen, S. A. Walker, L. C. M. Zoetmulder y P. A. Vandenberg. 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.

McAuliffe, O., R. P. Ross y C. Hill. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 285-308.

McCormick, J.K., R. W. Worobo y M. E. Stiles. 1996. Expression of the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal-peptide dependent general secretory pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4095-4099.

McCormick, J. K., A. Poon, M. Sailer, Y. Gao, H. L. Roy, L. M. McMullen, J. C. Vederas, M. E. Stiles y M. J. van Belkum. 1998. Genetic characterization and heterologous expression of brochocin-C, and antibotulinal two-peptide bacteriocin produced by *Brochothrix campestris* ATCC 43754. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4757-4766.

McCormick, J. K., T. R. Klaenhammer y M. E. Stiles. 1999. Colicin V can be produced by lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 37-41.

Meghrous, J., C. Lacroix, M. Bouksaim, G. Lapointe y R.E. Simard. 1979. Genetic and biochemical characterization of nisin Z produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* UL719. *J. Appl. Bacteriol.* 83, 133-138.

Michiels, J., G. Dirix, J. Vanderleyden y C. Xi. 2001. Processing and export of peptide pheromones and bacteriocins in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* 9, 164-168.

Miller, K.W., P.L. Konen, J. Olson y K.M. Ratanavanich. 1993. Membrane protein topology determination by proteolysis of maltose binding protein fusions. *Anal. Biochem.* 215, 118-128.

- Miller, K.W., R. Schamber, Y. Chen y B. Ray. 1998. Production of active chimeric pediocin AcH in *Escherichia coli* in the absence of processing and secretion genes from the *Pediococcus pap* operon. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 14-20.
- Moll, G. N., W. N. Konings y A. J. M. Driessen. 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 76, 185-198.
- Moreira, W. L. 1994. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Morisset, D. y J. Frere. 2002. Heterologous expression of bacteriocins using the mesentericin Y105 dedicated transport system by *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochimie* 84, 569-576.
- Morovsky, M., P. Pristas, P. Javorsky, I. F. Nes y H. Holo. 2001. Isolation and characterization of enterocin BC25 and occurrence of the *entA* gene among ruminal gram-positive cocci. *Microbiol. Res.* 156, 133-138.
- Morrison, D., N. Woodford y B. Cookon. 1997. Enterococci as emerging pathogens in humans. *J. Appl. Microbiol. (Suppl 83)*, 89S-99S.
- Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Håvarstein, M. B. Brurberg, V. G. Eijsink y H. Holo. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 113-128.
- Nes, I.F. y H. Holo. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* 55, 50-61.
- Neu, T. y B. Henrich. 2003. New thermosensitive delivery vector and its use to enable nisin-controlled gene expression in *Lactobacillus gasseri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1377-1382.
- Nilsen, T., I. F. Nes y H. Holo. 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2975-2984.
- Nissen-Meyer, J., H. Holo, L. S. Håvarstein, K. Sletten e I. F. Nes. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174, 5686-5692.
- Nissen-Meyer, J. e I. F. Nes. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* 167, 67-77.
- Nouaille, S., L. A. Ribeiro, A. Miyoshi, D. Pontes, Y. Le Loir, S. C. Oliveira, P. Langella y V. Azevedo. 2003. Heterologous production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet. Mol. Res.* 2, 102-111.
- O'Keeffe, T.O., C. Hill y R. P. Ross. 1999. Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1506-1515.
- O'Sullivan, L., R. P. Ross y C. Hill. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84, 593-604.

- Pallen, M. J., R. R. Chaudhuri e I. R. Henderson. 2003. Genomic analysis of secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 519-527.
- Plano, G. V., J. B. Day y Ferracci, F. 2001. Type III export: new uses for and old pathway. *Mol. Microbiol.* 40, 284-293.
- Pohlschröder, M., W. A. Prinz, E. Hartmann y J. Beckwith. 1997. Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell.* 91, 563-566.
- Prioult, G., C. Turcotte, L. Labarre, C. Lacroix e I. Fliss. 2000. Rapid purification of nisin Z using specific monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Int. Dairy J.* 10, 627-633.
- Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57, 50-108.
- Quadri, L. E. N., M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles. 1994. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J. Biol. Chem.* 269, 12204-12211.
- Quadri, L. E. N., M. Sailer, M. R. Terbiznik, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles. 1995. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *J. Bacteriol.* 177:1144-1151.
- Quadri, L. E. N., L. Z. Yan, M. E. Stiles y J. C. Vederas. 1997. Effect of amino acid substitutions on the activity of carnobacteriocin B2: overproduction of the antimicrobial peptide, its engineered variants, and its precursor in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272, 3384-3388.
- Recio, I., B. Muguerza, A. Aleixandre y M. Ramos. 2004. Producción de péptidos antihipertensivos mediante fermentación con bacterias lácticas. Congreso Nacional de Biotecnología. Oviedo.
- Reviriego, C., A. Fernández, N. Horn, E. Rodríguez, M. L. Martín, L. Fernández y 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.
- Ribeiro, L.A., V. Azevedo, Y. Le Loir, S. C. Oliveira, Y. Dieye, J. C. Piard, A. Gruss y P. Langella. 2002. Production and targeting of the *Brucella abortus* antigen L7/L12 by *Lactococcus lactis*: a first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 910-916.
- Richard, C., D. Drieder, I. Fliss, S. Denery y H. Prevost. 2003. Generation and utilization of polyclonal antibodies to a synthetic C-terminal amino acid fragment of divercin V41, a class IIa bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 248-254.
- Richard, C., D. Drieder, K. Elmorjani, D. Marion y H. Prévost. 2004. Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 4276-4284.
- Riley, M. A., y J. E. Wertz. 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 117-137.

Rodríguez, J.M., M. I. Martínez, N. Horn y H. M. Dodd. 2002. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.* 80, 101-116.

Rolland, M.P., L. Bitri y P. Besancon. 1995. Monospecificity of the antibodies to bovine α_{s1} -casein fragment 140-149: application to the detection of bovine milk in caprine dairy products. *J. Dairy Res.* 62, 83-88.

Rose, N.L., P. Sporns, L. M. McMullen. 2001. Production of antibodies against enterocin B for immunological detection and purification purposes. *Food Agric. Immunol.* 13, 225-239.

Ross, R. P., M. Galvin, O. McAuliffe, S. M. Morgan, M. P. Ryan, D. P. Twomey, W. J. Meaney y C. Hill. 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 337-346.

Ryan, M.P., M. C. Rea, C. Hill y R. P. Ross. 1996. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 612-619.

Ryan, M. P., O. McAuliffe, R. P. Ross y C. Hill. 1999. Heterologous expression of lacticin 3147 in *Enterococcus faecalis*: comparison of biological activity with cytolysin. *Lett. Appl. Microbiol.* 32, 71-77.

Sablon, E., B. Contreras y E. Vandamme. 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 68.

Sánchez-Hidalgo, M., M. Maqueda, A. Gálvez, H. Abriouel, E. Valdivia y M. Martínez-Bueno. 2003. The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1633-1641.

Sandkvist, M. 2001a. Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.* 40, 271-283.

Sandkvist, M. 2001b. Type II secretion and pathogenesis. *Infection and immunity.* 69, 3523-3535.

Schillinger, U., R. Geisen y W. H. Holzapfel. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 7, 158-164.

Schleifer, K. H. y R. Kilpper-Bälz. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *S. faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecalis* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 31-34.

Schoeman, H., M.A. Vivier, M. du Toit, L. M. T. Dicks e I. S. Pretorius. 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 647-656.

Shankar, N., A. S. Baghdayan y M. S. Gilmore. 2002. Modification of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 417, 746-750.

Simon, L., C. Fremaux, Y. Cenatiempo y J. M. Berjeaud. 2002. Sakacin G, a new type of antilisterial bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6416-6420.

- Skaugen, M., V. H. Christie e I. F. Ness. 1999. Biosynthesis of the lantibiotic lactocin S: heterologous expression of a two-operon gene cluster encoding regulatory, biosynthetic, and immunity functions. Abstracts of the Sixth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, FEMS, Veldhoven, Holanda, C86.
- Skaugen, M., L. M. Cintas e I. F. Nes. 2000. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. En "Genetics of Lactic Acid Bacteria", vol. III. B. J. B. Wood y P. Warner (eds.) Aspen Publishers, Inc., EE.UU.
- Sørensen, K.I., R. Larsen, A. Kibenich, M. P. Junge y E. Johansen. 2000. A food-grade cloning system for industrial strains of *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1253-1258.
- Sreekrishna, K., R. G. Brankamp, K. E. Kropp, D. T. Blankenship, J. T. Tsay, P. L. Smith, J. D. Wierschke, A. Subramaniam y L. A. Birkenberger. 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Gene 190, 55-62.
- Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 70, 331-345.
- Stringer, S. C., C. E. R. Dodd, M. R. A. Morgan y W. M. Waites. 1995. Locating nisin-producing *Lactococcus lactis* in a fermented meat system. J. Appl. Bacteriol. 78, 341-348.
- Suárez, A.M., J. M. Rodríguez, P. E. Hernández y J. I. Azcona. 1996a. Generation of polyclonal antibodies against nisin: immunization strategies and immunoassays development. Appl Environ Microbiol. 62, 2117-2121.
- Suárez, A. M., J. M. Rodríguez, P. Morales, P. E. Hernández y J. I. Azcona. 1996b. Development of monoclonal antibodies to the lantibiotic nisin A. J. Agric. Food Chem. 44, 2936-2940.
- Suárez, A. M., J. I. Azcona, J. M. Rodríguez, B. Sanz y P. E. Hernández. 1997. One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4990-4992.
- Sybesma, W., E. van den Born, M. Starrenburg, I. Mierau, M. Kleerebezem, W. M. de Vos y J. Hugenholtz. 2003. Controlled modulation of folate polyglutamyl tail length by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 69, 7101-7107.
- Takala, T.M. y P. E. Saris. 2002. A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene *nisl*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59, 467-471.
- Tomita, H., S. Fujimoto, K. Tanimoto e Y. Ike. 1996. Cloning and characterization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-response conjugative plasmid pY117. J. Bacteriol. 178, 3585-3593.
- Trucksis, M., T. L. Conn, A. Fasano y J. B. Kaper. 1997. Production of *Vibrio cholerae* accessory cholera enterotoxin (Ace) in the yeast *Pichia pastoris*. Infection and Immunity 65, 4984-4988.
- Uteng, M., H. Hauge, I. Bronz, J. Nissen-Meyer y G. Fimland. 2002. Rapid two-step procedure for large-scale purification of pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium. Appl. Environ. Microbiol. 68, 952-956.

- Van Belkum, M. J., B. J. Hayema, R. E. Jeeninga, J. Kok y G. Venema. 1991. Organization and nucleotide sequence of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 492-498.
- Van Belkum, M.J. y M. E. Stiles. 1995. Molecular characterization of genes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3573-3579.
- Van Belkum, M. J., R. W. Worobo y M. E. Stiles. 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., J.M.B.M van der Vossen, J. Kok y G. Venema. 1989. Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 224-228.
- Van der Vossen, J.M.B.M., D. van der Lelie y G. Venema. 1987. Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2452-2457.
- Van der Vossen, J. M. B. M., M. H. M. van Herwijnen, R. J. Leer, B. ten Brink, P. H. Pouwels y J. H. J. Huis in't Veld. 1994. Production of acidocin B, a bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* M46 is a plasmid encoded trait: plasmid curing, genetic marking by in vivo plasmid integration, and gene transfer. *FEMS Microbiol. Lett.* 166, 333-340.
- Van Reenen, C.A., M. L. Chikindas, W. H. van Zyl y L.M.T. Dicks. 2002. Characterization and heterologous expression of a class lia bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 29-40.
- Van Wely, K. H. M., J. Swaving, R. Freudl y A. J. M. Driessen. 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 437-454.
- Vaughan, A., V. G. H. Eijsink y D. van Sinderen. 2003. Functional characterization of a composite bacteriocin locus from malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7194-7203.
- Venema, K., R. E. Haverkort, T. Abee, A. J. Haandrikman, K. J. Leenhouts, G. Venema y J. Kok. 1994. Mode of action of LciA, the lactococcal A immunity protein. *Mol. Microbiol.* 14, 521-533.
- Venema, K, J. Kok, J. D. Marugg, M. Y. Toonen, A. M. Ledebøer, G. Venema y M. L. Chikindas. 1995. Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC1.0: pedB is the immunity protein and pedD is the precursor processing enzyme. *Mol. Microbiol.* 17, 515-522.
- Venema, G., J. Kok y D. Sinderen. 1999. From DNA sequence to application: possibilities and complications. *Antonie van Leeuwenhoek.* 76, 3-23.
- Villate, F., A. S. Hussein, T. T. Bachmann y R. D. Schmid. 2001. Expression level of heterologous proteins in *P. pastoris* is influenced by flask design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 463-465.
- Wandersman, C. 1992. Secretion across the bacterial outer membrane. *Trends Genet.* 8, 317-332.

- Ward, B. 1999. Meeting preview: delivering the goods. *Microbiol. Today*. 26, 74-76.
- Williams, A. e I. Ibrahim. 1981. A new mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-Ethyl-3-(dimethylamino)propyl-carbodiimide (DEC). *J. A. C. S.* 103, 7090-7095.
- Worobo, R. W., T. Henkel, M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles. 1994. Characteristics and genetic determinants of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiol.* 140, 517-526.
- Worobo, R. W., M. J. van Belkum, M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles. 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.* 177, 3143-3149.
- Yamamoto, Y., Y. Togawa, M. Shimosaka y M. Okazaki. 2003. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5746-5753.
- Yoshitake, S. Y. Yamada, E. Ishikawa y R. Masseyeff. 1979. Conjugation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* and rabbit antibodies using N-hydroxysuccinimide ester of N-(carboxycyclohexylmethyl)-maleimide. *Eur. J. Biochem.* 101, 395-399.
- Young, J. y I. B. Holland. 1999. ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochim. Biophys. Acta.* 1461, 177-200.
- Zhang, L.H., M.J. Fath, H.K. Mahanty, P.C. Tai y R. Kolter. 1995. Genetic analysis of colicin V secretion pathway. *Genetics* 141, 25-32.
- Zhang, H., S. Yoshida, T. Aizawa, R. Murakami, M. Suzuki, N. Koganezawa, A. Matsuura, M. Miyazawa, K. Kawano, K. Nitta y Y. Kato. 2000. In vitro antimicrobial properties of recombinant ASABF, an antimicrobial peptide isolated from the nematode *Ascaris suum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 44, 2701-2705.