

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A LA NISINA A:  
ESTRATEGIAS DE INMUNIZACIÓN Y DESARROLLO DE  
INMUNOENSAYOS**

**TESIS DOCTORAL**

Ana María Suárez Gea.  
Madrid, 1997.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA III  
(HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS)

**PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A LA NISINA A:  
ESTRATEGIAS DE INMUNIZACIÓN Y DESARROLLO DE  
INMUNOENSAYOS**

Memoria que para optar al grado de  
Doctor en Veterinaria presenta la  
Licenciada Ana María Suárez Gea.

Madrid, septiembre de 1997



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DPTO. DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA III  
HIGIENE Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS  
CIUDAD UNIVERSITARIA  
28040 MADRID

JUAN I. AZCONA OLIVERA, BERNABÉ SANZ PÉREZ Y PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA, PROFESORES TITULAR Y EMÉRITO Y CATEDRÁTICO, RESPECTIVAMENTE, DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada: "**Producción de anticuerpos frente a la nisina A: Estrategias de inmunización y desarrollo de inmunoensayos**", de la que es autora la Licenciada en Veterinaria Ana María Suárez Gea, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos) bajo nuestra dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Madrid, 23 de septiembre de 1997

Fdo: Juan I. Azcona

Fdo: Bernabé Sanz

Fdo: Pablo E. Hernández

*A mis padres, Loly y José Luis.  
A mis hermanos, Maria y Jose.*

*-Buenos días -dijo el principito.*

*-Buenos días -dijo el mercader.*

*Era un mercader de píldoras perfeccionadas que aplacan la sed.*

*Se toma una por semana y no se siente más la necesidad de beber.*

*-¿Por qué vendes eso? -dijo el principito.*

*-Es una gran economía de tiempo -dijo el mercader-.*

*Los expertos han hecho cálculos. Se ahorran cincuenta y tres minutos por semana.*

*Y, ¿qué se hace con esos cincuenta y tres minutos?*

*- Se hace lo que se quiere...*

*"Yo, se dijo el principito, si tuviera cincuenta y tres minutos para gastar, caminaría muy suavemente hacia una fuente..."*

(A. de Saint-Exupéry)

*Quisiera agradecer, en primer lugar, al Dr. Juan A. Ordóñez, director del Departamento de Nutrición y Bromatología III, que al aceptarme dentro del Departamento, permitió que iniciara los primeros pasos en el mundo de la investigación.*

*Mi más sincero agradecimiento a los directores de esta tesis. A Juan Ignacio, sin cuyo conocimiento y ayuda inestimables en la parte experimental, este trabajo no hubiera sido posible. Gracias sobre todo por trabajar codo a codo conmigo en el laboratorio. Gracias a Pablo, por sus enseñanzas y su continuo apoyo, que ha estado presente en el principio, durante y hasta el final. A don Bernabé, que supo acogerme en el comienzo y ayudarme con sus conocimientos y consejos.*

*A todo el equipo "LAB" de las bacterias lácticas. A Pilar y Luis por iniciarme en el mundo del laboratorio y enseñarme las artes de la purificación. A Wagner por su sonrisa, siempre presente, a Odón por sus simpáticas visitas. A Juan Miguel, por su apoyo y ayuda constantes y desinteresadas, su incansable buen humor, todo su conocimiento, su disponibilidad infinita y por su ayuda en toda la parte gráfica de la tesis, especialmente fotos, diapositivas y figuras. A Fernanda por su atención y ayuda desde mis comienzos. Especialmente a los nuevos fichajes, José Mari y Carmen, que hacen de nuestro laboratorio de bacterias lácticas un lugar donde poder disfrutar, además de trabajar. A Sangs, por los buenos momentos compartidos. A Maribel, por lo que es, por su amistad y sus comeduras de cabeza, por las risas y las tristezas, por todos los momentos memorables que hemos podido compartir.*

*A todos y cada uno de los becarios del departamento (y los ya no tan becarios), porque gracias a las jornadas gastronómicas, cafés, deportes, excursiones y demás eventos menos lúdicos hemos compartido una convivencia siempre grata y alegre. A los profesores del departamento, en especial a Paloma Morales, por su ayuda en el desarrollo de los anticuerpos monoclonales.*

*Al equipo investigador del Dr. Gasson en el Food Research Institute (Norwich), en especial a Helen, Arjan y Nikki que me enseñaron tanto durante cuatro meses y con quienes conocí nuevas formas de entender la investigación. A todos los amigos que hice allí. Gracias también por la cesión de las cepas y compuestos que empleamos para la caracterización de los epítomos.*

*A todos mis amigos, especialmente a aquellos que han seguido de cerca la trayectoria de esta tesis, Alicia y Piku. A mis compañeros y amigos de Veterinarios Sin Fronteras, porque ellos realmente saben donde está el valor de la vida y de las cosas.*

*A Angel, por defender la alegría.*

*A mis padres, mis hermanos y a Enrique por vuestro cariño incondicional y vuestros ánimos en todo momento.*

*Al Instituto Danone con cuya ayuda económica al concederme una beca ha sido posible la realización de este trabajo.*

*Este trabajo también ha sido posible gracias a la financiación por parte de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (proyecto ALI94-1026) y de la Comunidad Europea (Contract BIOT-CT94-3055).*

***INDICE***

---

<b>I. INTRODUCCION</b>	
I.1. Las bacterias lácticas como conservantes de los alimentos	3
1.1. Bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas	5
1.1.1. Definición	5
1.1.2. Características generales de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas	6
1.1.3. Clasificación de las bacteriocinas	13
1.1.4. Lantibióticos	14
I.2. La nisina	21
2.1. Perspectiva histórica	21
2.2. Características físicas y químicas	24
2.3. Propiedades biológicas	28
2.4. Biosíntesis de la nisina	43
2.4.1. Localización y organización de los determinantes genéticos de la biosíntesis de la nisina	45
2.4.2. Mecanismo de maduración de la nisina	61
2.4.3. Factores que afectan la biosíntesis de la nisina	63
2.5. Ingeniería proteica de la nisina	66
2.6. Producción comercial de la nisina	67
2.7. Toxicidad de la nisina	68
2.8. Propiedades inmunológicas	68
2.9. Métodos de detección y cuantificación de la nisina	70
2.10. Aplicaciones de la nisina	75
2.10.1. Aplicaciones en la industria alimentaria	75
2.10.2. Limitaciones de su empleo en los alimentos	80
2.10.3. Empleo de tratamientos combinados	81
2.10.4. <i>Estatus</i> legal del empleo de la nisina en los alimentos	81
2.10.5. Aplicaciones en la industria farmacéutica	81
2.10.6. Otras aplicaciones	83
<b>II. OBJETIVOS DEL TRABAJO</b>	<b>85</b>

	<b><u>Pág.</u></b>
III. MATERIAL Y METODOS	91
III.1. Material general	93
1.1. Material de laboratorio	93
1.2. Productos y reactivos	95
1.3. Material biológico	96
1.3.1. Microorganismos productores de bacteriocinas	96
1.3.2. Microorganismos indicadores	98
1.3.3. Compuestos purificados empleados en la identificación y localización de los epítomos de interés	98
1.3.4. Animales de experimentación	98
1.3.5. Cultivos celulares	98
III.2. Métodos	101
2.1. Medios y condiciones de cultivo de los microorganismos empleados	101
2.1.1. Medios de cultivo empleados en el crecimiento de las bacterias lácticas	101
2.1.2. Condiciones de cultivo	102
2.1.3. Obtención de los sobrenadantes libres de células	102
2.2. Pruebas microbiológicas de determinación de la actividad bacteriocinogénica	102
2.2.1. Prueba de difusión en agar	102
2.2.2. Prueba de inhibición en placas microtituladoras	103
2.3. Purificación de la nisina A del sobrenadante del microorganismo productor <i>L lactis</i> BB24	104
2.3.1. Obtención de sobrenadante	104
2.3.2. Precipitación con sulfato amónico	104
2.3.3. Cromatografía de intercambio catiónico	106
2.3.4. Cromatografía de interacción hidrofóbica	106
2.3.5. Cromatografía de fase reversa	107
2.3.6. Determinación de la concentración de nisina A de las muestras purificadas	107

2.4. Conjugación de la nisina A con moléculas portadoras y preparación de los inmunógenos	108
2.4.1. Conjugación con la toxina colérica	109
2.4.2. Conjugación con la hemocianina KLH	110
2.5. Producción de anticuerpos policlonales frente a la nisina A, en el suero de los ratones inmunizados	111
2.5.1. Pautas de inmunización	111
2.5.2. Seguimiento de las inmunizaciones	112
2.5.3. Obtención y conservación del suero	112
2.5.4. Evaluación de la especificidad e inmunorreactividad de los anticuerpos generados	113
2.6. Producción de anticuerpos policlonales frente a la nisina A en el líquido ascítico de los ratones inmunizados	114
2.6.1. Protocolo de inmunización y seguimiento del proceso	114
2.6.2. Obtención del líquido ascítico y conservación	114
2.6.3. Purificación de los anticuerpos del líquido ascítico	115
2.6.4. Determinación de la concentración de proteína de los anticuerpos policlonales	115
2.6.5. Caracterización isotópica de los anticuerpos policlonales	115
2.6.6. Evaluación de la especificidad e inmunorreactividad de los anticuerpos generados	115
2.7. Obtención y producción de anticuerpos monoclonales	116
2.7.1. Protocolo de inmunización	118
2.7.2. Medios de cultivo y soluciones empleadas	118
2.7.3. Obtención de hibridomas	120
2.7.4. Selección y mantenimiento de los hibridomas	123
2.7.5. Clonación de los hibridomas positivos	124
2.7.6. Producción de anticuerpos monoclonales a gran escala	125
2.7.7. Determinación de la concentración de proteína de los anticuerpos monoclonales	126
2.7.8. Caracterización isotópica de los anticuerpos monoclonales	126
2.7.9. Especificidad	126

2.8. Caracterización de los determinantes antigénicos (epítomos) reconocidos por los anticuerpos policlonales y monoclonales generados	127
2.9. Técnicas inmunoenzimáticas (ELISA)	127
2.9.1. Tampones y reactivos empleados	127
2.9.2. Preparación de los reactivos	129
2.9.3. técnica del ELISA indirecto	130
2.9.4. técnica del ELISA competitivo	132
2.10. Aplicaciones de los anticuerpos antinisina A desarrollados	138
2.10.1. Evaluación del crecimiento de <i>L. lactis</i> BB24 y seguimiento de la producción de nisina, empleando los anticuerpo policlonales obtenidos del líquido ascítico	138
2.10.2. Detección y cuantificación de nisina A en los alimentos empleando anticuerpos monoclonales	138
2.10.3. Purificación de la nisina por cromatografía de inmunoafinidad	139
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>145</b>
IV.1. Purificación de la nisina A	147
IV.2. Preparación de los conjugados para las inmunizaciones y los ensayos inmunoenzimáticos	149
2.1. Conjugación de la nisina A con la toxina colérica (nisA-TC)	149
2.2. Conjugación de la nisina A con la hemocianina KLH (nisA-KLH)	149
2.3. Conjugación de la nisina A con la ovoalbúmina (nisA-OA)	149
2.4. Conjugación de la nisina A con la peroxidasa de rábano (nisA-HRP)	150
IV.3. Producción de anticuerpos policlonales frente a la nisina A en el suero de los ratones inmunizados	150
3.1. protocolo I: inmunización con el conjugado nisA-TC	150
3.1.1. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos generados	150
3.2. protocolo II: inmunización con el conjugado nisA-KLH	151
3.2.1. Evaluación de la especificidad e inmunoreactividad de los anticuerpos generados	151

IV.4. Producción de anticuerpos policlonales frente a la nisina A en el líquido ascítico de los ratones inmunizados	160
4.1. Determinación de la concentración de proteína	160
4.2. Caracterización isotópica	162
4.3. Especificidad e inmunoreactividad	162
IV.5. Obtención y producción de anticuerpos monoclonales frente a la nisina A	166
5.1. Inmunización de los ratones	166
5.2. Fusión celular y selección de los hibridomas	166
5.3. Clonación de los hibridomas de interés	168
5.4. Determinación de la concentración de proteína	168
5.5. Caracterización isotópica	169
5.6. Especificidad e inmunoreactividad	169
IV.6. Identificación de los determinantes antigénicos (epítomos) reconocidos por los anticuerpos policlonales y monoclonales obtenidos	177
IV.7. Aplicaciones de los anticuerpos antinisina A desarrollados	183
7.1. Evaluación del crecimiento de <i>L. lactis</i> BB24 y seguimiento de la producción de nisina, empleando anticuerpos policlonales obtenidos de líquido ascítico	183
7.2. Detección y cuantificación de la nisina A en un queso de untar, empleando el anticuerpo monoclonal AD10	183
7.3. Purificación de la nisina por cromatografía de inmunoafinidad	187
V. DISCUSION	193
V.1. Purificación de la nisina A	195
V.2. Preparación de los conjugados para las inmunizaciones y los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)	195
V.3. Producción de anticuerpos policlonales frente a la nisina A en el suero de los ratones inmunizados y desarrollo de los métodos inmunoenzimáticos (ELISA) adecuados	200

V.4. Producción de anticuerpos policlonales frente a la nisina A en el líquido ascítico de los ratones inmunizados	205
V.5. Obtención y producción de anticuerpos monoclonales frente a la nisina A	206
V.6. Identificación de los determinantes antigénicos reconocidos por los anticuerpos generados	211
V.7. Aplicaciones de los anticuerpos antinisina A desarrollados	
7.1. Evaluación del crecimiento de <i>L. lactis</i> BB24 y seguimiento de la producción de nisina, empleando anticuerpos policlonales obtenidos del líquido ascítico	214
7.2. Detección y cuantificación de la nisina A en los alimentos: detección en un queso de untar empleando el anticuerpo monoclonal AD10	215
7.3. Purificación de la nisina por cromatografía de inmunoafinidad	217
VI. CONCLUSIONES	221
VII. TRABAJO FUTURO	225
VIII. BIBLIOGRAFIA	229

## ***I. INTRODUCCION***

---



## I.1. LAS BACTERIAS LACTICAS COMO CONSERVANTES DE LOS ALIMENTOS

Los procesos fermentativos constituyen uno de los métodos de conservación de alimentos más antiguos que se conocen (McKay y Baldwin, 1990). Inicialmente el proceso se desarrolló empíricamente, al observar que ciertos alimentos durante su almacenamiento sufrían modificaciones que daban lugar a nuevos productos comestibles, saludables y con diferentes características organolépticas. Fue a finales del siglo XIX cuando, a raíz de las investigaciones de Pasteur (1877), se descubrió que la propiedad de modificar las características organolépticas de los alimentos y de prolongar su vida útil era debida a agentes microbianos. Poco después Metchnikoff (1907) anticipó el concepto de "probiótico" cuando sugirió que el consumo de leche fermentada con lactobacilos podía prolongar la vida de las personas al desplazar éstos a otros microorganismos productores de "toxinas", presentes habitualmente en el tracto intestinal. Rogers (1928) identificó una sustancia de naturaleza peptídica (nisina), producida por *Lactococcus lactis*, que inhibía a otros microorganismos Gram-positivos, tanto patógenos como alterantes. Debido a que esta cepa productora de nisina era utilizada como cultivo iniciador en la obtención de derivados lácteos, se planteó la posibilidad de utilizar su efecto antimicrobiano en la conservación de los alimentos.

En Europa, las bacterias y las levaduras se emplean más que los mohos en la fermentación de los alimentos (Buckenhüskes, 1993). De entre las bacterias, las denominadas bacterias lácticas son las más importantes, puesto que contribuyen a la conservación de una gran variedad de alimentos, entre los que destacan los productos lácteos, carnes, vegetales, cereales y frutas. Actualmente, se añaden cultivos de microorganismos específicos (cultivos iniciadores) a la materia prima de forma intencionada y bajo condiciones controladas, con el fin de estandarizar las características organolépticas y sanitarias del producto final (Smith y Palumbo, 1981). Estos cultivos iniciadores suelen ser de bacterias lácticas. Actualmente se estima que el 25% de la dieta europea y el 60% de la de otros países desarrollados, se basa en el consumo de productos fermentados (Holzapfel, 1995).

Si bien las bacterias lácticas poseen un origen vegetal, la manipulación de los alimentos con prácticas como la del ordeño manual de los animales, favoreció el acceso de estos microorganismos a nuevos nichos ecológicos, como la leche, donde prevalecen frente a otros microorganismos gracias a sus características fisiológicas especiales (Vandenbergh, 1993); por un lado, los alimentos proporcionan los requerimientos nutricionales que estos microorganismos necesitan para su desarrollo y, por otro, las

## *Introducción*

bacterias lácticas compiten eficientemente con otras posibles contaminaciones gracias a su efecto antimicrobiano.

La degradación de los azúcares a ácidos orgánicos (láctico, acético, etc.) con la consiguiente reducción del pH y el consumo de nutrientes, son los principales factores que determinan su actividad antimicrobiana. Además, otros compuestos como metabolitos del oxígeno (peróxido de hidrógeno y radicales libres), CO<sub>2</sub>, compuestos aromáticos (diacetilo y acetaldehído), derivados deshidratados del glicerol (reuterina), benzoato, D-isómeros de aminoácidos, enzimas bacteriolíticos, bacteriocinas, antibióticos y otras sustancias poco definidas, contribuyen a potenciar dicha actividad (Piard y Desmazeaud, 1991, 1992).

En los últimos años, la nueva demanda de productos de calidad, nutricionalmente sanos, menos procesados y más naturales (libres de conservantes artificiales) (Gould, 1992), ha potenciado el desarrollo de productos mínimamente procesados y conservados por el frío (Mossel y Struijk, 1991). En este sentido, la refrigeración y el empleo de atmósferas modificadas están constituyendo métodos cada vez más utilizados de conservación de los alimentos, con un efecto significativo en la microflora del producto, favoreciendo el desarrollo de bacterias lácticas frente al de otros microorganismos no deseados.

Por estos motivos, la conservación de los alimentos por el efecto antagonista microbiano (antibiosis) está adquiriendo una considerable importancia en comparación con la conservación química. Actualmente, el término "biopreservación" se define como la prolongación de la vida útil de los alimentos y la mejora de su salubridad mediante el empleo de una microflora determinada y/o los productos antimicrobianos producidos por ella. La metodología consistiría en (1), añadir cultivos microbianos que crecen rápidamente y/o producen sustancias antagonistas (2), añadir directamente las sustancias antagonistas (3), añadir el producto concentrado de la fermentación de un organismo antagonista o (4), añadir bacterias lácticas mesófilas protectoras ante fallos durante la refrigeración (Stiles, 1996).

Es evidente el papel primordial de las bacterias lácticas durante la biopreservación, no ya sólo de los productos fermentados, sino también de otro tipo de productos, como la carne envasada en atmósferas modificadas. En este último caso, deberían utilizarse aquellas que produjesen una acidificación leve, de modo que no alterasen las características organolépticas del producto final; sin embargo, diversos estudios indican que se requieren inóculos con un gran número de microorganismos para evitar el

desarrollo de determinados patógenos (Reddy 1970, 1975), lo que supondría una alteración del aspecto y la textura del alimento. Este problema podría solucionarse si se añadieran directamente las bacteriocinas purificadas o los cultivos inactivados, aunque en este caso deberían combinarse con algún otro "efecto barrera", que evitase el desarrollo de patógenos resistentes a las bacteriocinas empleadas (Abee, 1995).

Además de su actividad antimicrobiana, otras características favorecen el empleo de las bacterias lácticas en los alimentos, como son el de impartir características organolépticas deseables en los productos fermentados, incrementar el valor nutritivo de los mismos y tener efectos beneficiosos en la salud del consumidor (Smith y Palumbo, 1981). A este último respecto, cabe destacar que las bacterias lácticas mejoran la digestibilidad de la lactosa, contribuyen a regular el tránsito intestinal, colaboran en el restablecimiento de infecciones gastrointestinales y urogenitales y parecen tener una actividad hipocolesterolemica y un efecto inmunoestimulante (Marteau y Rambaud, 1993).

## **1.1. Bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas**

### **1.1.1. Definición**

Las bacteriocinas se definen como un grupo heterogéneo de compuestos antibacterianos de naturaleza proteica que varían en su espectro de actividad, modo de acción, peso molecular, determinantes genéticos y características bioquímicas (Klaenhammer, 1988).

Gratia (1925), describió por primera vez uno de estos compuestos en *Escherichia coli*, al observar que la cepa V (virulenta) producía en medio líquido una sustancia dializable y estable al calor (posteriormente denominada colicina V) que inhibía a otras cepas de *E. coli*. Posteriormente, Jacob (1953) definió el término "bacteriocina" y le atribuyó las características de (1) naturaleza proteica, (2) acción bactericida restringida a especies filogenéticamente próximas, (3) modo de acción a través de receptores celulares específicos, (4) codificación en plásmidos y (5) biosíntesis asociada a la muerte de las células productoras. Más tarde se descubrió que muchas bacterias Gram-positivas producían sustancias con características antimicrobianas, las cuales adquirieron una mayor relevancia que las colicinas, por su aplicación práctica potencial en la conservación de los alimentos y en la prevención o tratamiento de algunas infecciones microbianas (Tagg, 1976). Sin embargo, estos compuestos diferían en gran medida a las características previamente definidas por Jacob, siendo su naturaleza proteica y su modo de acción bactericida las únicas cualidades comunes con los compuestos producidos por las bacterias Gram-negativas (Tagg, 1976). Por este motivo, el concepto de bacteriocina se

ha redefinido varias veces y así Koninsky (1982), las definió como agentes antimicrobianos de naturaleza peptídica cuya síntesis no es letal para la célula productora y Stiles (1991), como sustancias cuyas únicas características comunes son su carácter proteico y su actividad antimicrobiana. Otros investigadores han preferido utilizar el término *Bacteriocin Like Inhibitory Substances* (BLIS) (sustancias inhibitoras similares a las bacteriocinas) para aquellos compuestos que no cumplen con la definición inicial de Jacob (Tagg, 1991).

Dentro de las bacterias Gram-positivas, la producción de bacteriocinas por las bacterias lácticas está muy extendida, habiéndose descrito en microorganismos de todos los géneros de este grupo. La nisina fue la primera bacteriocina identificada producida por una bacteria láctica (Rogers, 1928) y hasta ahora se han descrito 89 nuevas bacteriocinas producidas por este grupo (De Vuyst y Vandamme, 1994), si bien este número aumenta cada año por la intensa actividad investigadora que se está desarrollando en este campo. Hay que indicar que muchas de las bacteriocinas descritas como "nuevas", no se han sometido todavía a una caracterización bioquímica y genética rigurosa.

### **1.1.2. Características generales de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas.**

#### **1.1.2.1. Características bioquímicas**

Por definición, todas las bacteriocinas constan de un componente peptídico esencial para ejercer su función, por lo que es lógico que todas sean inactivadas por proteasas, entre ellas las digestivas. Esta sensibilidad a los enzimas proteolíticos, es interesante desde el punto de vista alimentario, ya que supone que su ingestión resultará inocua para el consumidor y no alterará la microbiota intestinal normal. Además, algunas bacteriocinas son sensibles a otros enzimas no proteolíticos, como es el caso de las lactostrepcinas, sensibles a lipasas y fosfolipasas (Dobrzanski, 1982), la plantaricina B, que se inactiva por una lipasa y por la alfa-amilasa (West y Warner, 1988) y la plantaricina S, sensible a enzimas glicolíticos, lipolíticos y fosfolipolíticos (Jiménez-Díaz, 1993). Este hecho sugiere la presencia en algunas bacteriocinas de un componente no proteico, esencial en su actividad antimicrobiana.

La tolerancia al calor es generalmente alta, pudiendo resistir tratamientos equivalentes al de pasteurización, aunque en algunos casos, como la diplococcina (Davey y Richardson, 1981) o la lactacina B (Barefoot y Klaenhammer, 1984), su resistencia se reduce significativamente tras su purificación. Esta termorresistencia sugiere una organización molecular carente de estructura terciaria (Piard y Desmazeaud, 1992),

existiendo algunas excepciones como en la helveticina J cuya estabilidad térmica es más baja, debido a una estructura proteica más compleja (Joerger y Klaenhammer 1986).

La adaptación a las condiciones medioambientales debidas a la bacteria productora, justifican su tolerancia a un pH neutro y ácido. Incluso en algunos casos, como en la nisina, su actividad antimicrobiana aumenta a un pH por debajo de la neutralidad y la termoestabilidad es mayor a pH ácido. Por otra parte, la mayoría de las bacteriocinas son estables durante su almacenamiento a temperaturas de -20°C o inferiores.

Estas propiedades físico-químicas hacen ideal el empleo de las bacteriocinas en la industria alimentaria, puesto que podrían resistir los tratamientos térmicos y los cambios de pH que sufren muchos alimentos durante su fabricación y almacenamiento y, además, su pequeño tamaño podría favorecer su difusión homogénea dentro de ellos (Piard y Desmazeaud, 1992).

El carácter hidrófobo es otra de las características de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas. Este es el resultado de la alta proporción de glicinas y de la presencia de enlaces tioéter en el caso de los lantibióticos. La hidrofobicidad es una propiedad característica de las proteínas que interaccionan con membranas (von Heijne, 1988), lo que corrobora el modo de acción descrito para estas sustancias (como se describirá más adelante).

#### 1.1.2.2. Composición y estructura

El análisis comparativo de la composición y estructura de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, muestra una amplia heterogeneidad química entre estas sustancias. La mayoría son péptidos o proteínas que pueden contener aminoácidos modificados y, a veces, un componente lipídico o glucídico (Piard y Desmazeaud, 1992). Algunas de ellas son glucoproteínas, como la lactocina 27 o la carnocina LA44A o lipoproteínas como la dextranicina 24 y la mesenterocina 52, mientras que en otros casos se trata de complejos glucolipoproteicos, como la fermenticina y la plantaricina S, si bien en algunos casos estas observaciones podrían ser debidas a purificaciones no totalmente homogéneas (Muriana y Klaenhammer 1991). La composición aminoacídica y la estructura, son dos de los factores considerados en la clasificación de las bacteriocinas.

#### 1.1.2.3. Espectro de acción

A diferencia de las colicinas, de actividad limitada a otras bacterias filogenéticamente próximas, el espectro de acción de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, es muy diverso: mientras algunas afectan sólo a cepas próximas (como es el caso de la

lactococina A), otras en cambio tienen un espectro de acción mucho más amplio (como la nisina). Ambos tipos de bacteriocinas son interesantes tecnológicamente, pues las primeras podrían utilizarse para favorecer el crecimiento de una determinada cepa en competición con la flora natural (por ejemplo para fermentaciones naturales donde no se emplean cultivos iniciadores, como es el caso de las aceitunas) y también en aquellos alimentos donde no se desea el desarrollo de bacterias lácticas (como en algunas bebidas alcohólicas y derivados cárnicos). Por su parte, las segundas son interesantes por su capacidad de inhibir el desarrollo de una flora patógena y alterante (Piard y Desmazeaud, 1992), y no sólo la de microorganismos que comparten nichos ecológicos similares.

Respecto a su actividad antimicrobiana, conviene hacer una serie de consideraciones generales (Jack, 1995):

(1). Dentro de la misma especie, algunas cepas pueden ser sensibles y otras resistentes a una bacteriocina determinada.

(2). Una cepa sensible a una bacteriocina puede tener algunas células resistentes a ella.

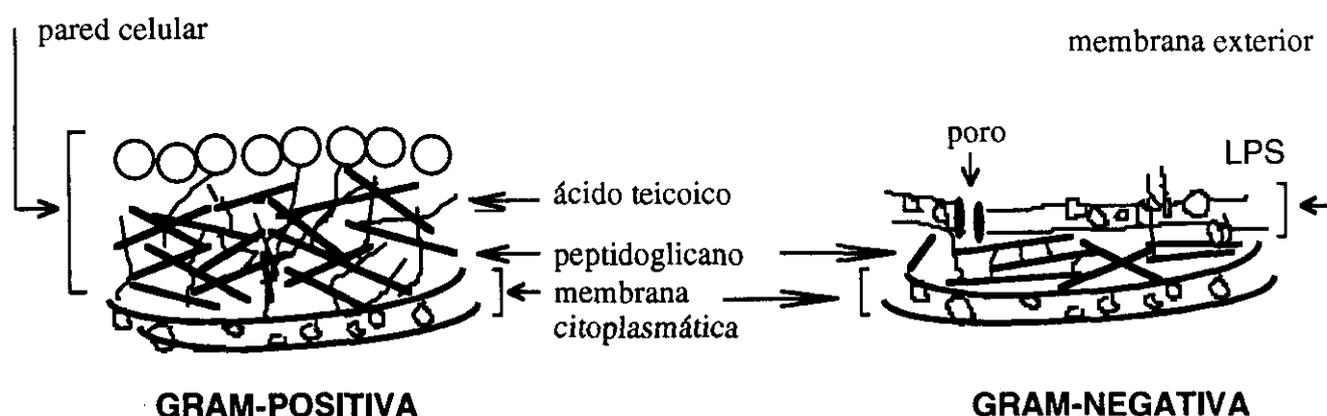
(3). Una cepa puede ser sensible a una bacteriocina y resistente a otra similar.

(4). Las cepas productoras de bacteriocinas pueden ser sensibles a otras bacteriocinas.

(5). En una cepa cuyas células son sensibles a una bacteriocina, aunque sus esporos sean resistentes, éstos se vuelven sensibles tras la germinación.

(6). En condiciones normales, las bacterias Gram-negativas no son sensibles a las bacteriocinas producidas por las Gram-positivas.

Esta última observación se explica al analizar y comparar la composición de la pared celular de las bacterias Gram-positivas y negativas, en ambos casos la membrana citoplasmática se rodea de una lámina de peptidoglicano, pero en las Gram-negativas, esta es significativamente más fina. Estas bacterias tienen una capa exterior adicional compuesta de fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos, que es impermeable a la mayoría de las moléculas, sin embargo la presencia de poros permite la difusión de moléculas de tamaño inferior a los 600 Daltons (figura I.1.). Las bacteriocinas más pequeñas producidas por las bacterias lácticas son de unos 3.000 Daltons, demasiado grandes para atravesar esta pared y alcanzar su diana, la membrana citoplasmática (Abee, 1995). Sin embargo, Stevens (1991) y Ray (1993) han demostrado que *Salmonella* spp. y otras bacterias Gram-negativas se vuelven sensibles a la nisina tras tratamientos que afectan a la permeabilidad de su pared celular.



**Figura 1.1. Representación esquemática de la cubierta celular de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. LPS, lipopolisacáridos.**  
Fuente: T. Abee (1995).

#### 1.1.2.4. Producción, biosíntesis y secreción

La biosíntesis de las bacteriocinas ocurre durante o al final de la fase exponencial de crecimiento (Piard y Desmazeaud, 1992), aunque en algunos casos, como en el de la nisina (Hurst, 1981) o la pediocina PA1 (Pucci *et al.*, 1981, Biswas *et al.*, 1991) se sintetizan también en grandes cantidades una vez iniciada la fase estacionaria. La cinética de producción corresponde a la de un metabolito primario, asociado al crecimiento celular y, por lo tanto, su producción está condicionada al incremento de biomasa.

A diferencia de los antibióticos peptídicos como la bacitracina o la gramicidina, que se sintetizan por medio de reacciones enzimáticas complejas, las bacteriocinas de las Gram-positivas se sintetizan ribosomalmente como precursores (prepeptidos), a partir del gen estructural. Estos precursores no son biológicamente activos y contienen un dominio carboxilo-terminal (propéptido) y una secuencia líder en el extremo amino-terminal que se separan durante la maduración. En el caso de los lantibióticos, antes de producirse la separación del líder, se suceden una serie de modificaciones post-traduccionales.

Aunque la función del líder no está totalmente definida, posiblemente incluye la estabilización del prepeptido durante la traducción, el mantenimiento de la molécula biológicamente inactiva frente a la membrana, mantener la conformación específica del propéptido durante el procesado y ayudar en el transporte de los prepeptidos por sistemas

específicos (De Vuyst y Vandamme, 1994, Hoover y Steenson, 1993, Ray y Daeschel, 1992).

Generalmente, una vez sintetizadas, las bacteriocinas se liberan al exterior de la célula, aunque una parte puede retenerse dentro de ella (Kozak *et al.*, 1978, Rammelsberg *et al.*, 1990). La secreción de las bacteriocinas a través de la membrana citoplasmática se produce normalmente por la actividad de transportadores específicos del tipo ABC (Stoddard *et al.*, 1992, Marugg *et al.*, 1992, Fremeux *et al.*, 1993). Estos complejos proteicos constan de un dominio de unión al ATP en el extremo carboxilo, donde se genera la energía necesaria para el transporte mediante la hidrólisis del ATP y de una región hidrofóbica, integrada en la membrana en el extremo amino, que reconoce y transporta el sustrato (Fath y Kolter, 1993).

Puesto que la producción de bacteriocinas se encuentra relacionada a la de biomasa, su producción se optimiza suplementando el medio de cultivo con factores limitantes del crecimiento microbiano como azúcares, vitaminas o fuentes de nitrógeno (Hurst, 1981), controlando el pH del medio o eligiendo el medio de cultivo más adecuado (de Vuyst y Vandamme, 1994). Así, por ejemplo, los niveles máximos de pediocina AcH/PA-1 se obtienen cuando el pH final del cultivo se ajusta a 3.6, no detectándose actividad antimicrobiana con valores de pH de 5.5 o superiores, a pesar de que la biomasa formada es mayor (Biswas *et al.*, 1991).

### 1.1.2.5. Modo de acción

Para poder ejercer su acción, las bacteriocinas deben, en primer lugar, unirse a la célula diana. Tanto los lantibióticos como los no lantibióticos se adsorben a la superficie celular de las bacterias Gram-positivas, independientemente de que sean productoras de bacteriocinas, no productoras, resistentes a ellas o sensibles. La adsorción parece ser dependiente del pH, con un máximo a pH 6 y un mínimo por debajo de 2 (Yang *et al.*, 1992). Estas observaciones corroboran la hipótesis de que la unión inicial sucede por atracción iónica entre la molécula de bacteriocina y la superficie celular (Mortvedt-Abildgaard *et al.*, 1995). Se sospecha que los componentes moleculares de la superficie celular a los que se unen las bacteriocinas incluyen los ácidos teicoico y lipoteicoico (Bhunja *et al.*, 1991; Bierbaum y Sahl, 1991; Jack *et al.*, 1994). Estos componentes, además, no existen en la pared de las bacterias Gram-negativas.

El mecanismo por el que la bacteriocina pasa a través de la pared celular hasta la membrana plasmática no se conoce con exactitud. Se ha sugerido que las alteraciones en la carga neta, provocadas por el cambio del pH, podrían facilitar el transporte de las

moléculas de bacteriocina a través de la pared celular (Ray y Daeschel, 1992; Ray *et al.*, 1993).

En el caso de la nisina y otros lantibióticos, la unión a la célula diana parece ser inespecífica, como lo demuestra el hecho de que sean también activas sobre liposomas (Kordel *et al.* 1989) y requiere un gradiente energético en la pared celular (García-Garcera *et al.*, 1993; Driesen *et al.*, 1995). En los no lantibióticos, como la pediocina PA-1 o la lactococina A, se ha determinado que la unión se realiza a través de receptores específicos, puesto que no actúan sobre liposomas de células sensibles (van Belkum *et al.*, 1991) y el tratamiento con proteasa K hace que las membranas se vuelvan insensibles a las bacteriocinas, probablemente por digestión de los receptores. Esta unión, además, no parece ser voltaje-dependiente (Venema *et al.*, 1994).

En cualquier caso, una vez unida a la célula, el órgano diana parece ser la membrana plasmática de las células vegetativas sensibles, donde la bacteriocina provoca la formación de canales o poros, alterando su permeabilidad selectiva. A diferencia del modo de acción de los detergentes, esto sucede sin que se pierda la integridad de la membrana, conduciendo a la consiguiente pérdida de iones, aminoácidos y del ATP intracelular (Jung and Sahl, 1991; Upreti and Hindsdill, 1975; Sahl and Brandis, 1983; Zajdel *et al.* 1985; Bhunia *et al.*, 1991; Abee *et al.*, 1995). La pérdida del ATP y de los iones  $K^+$  y, por lo tanto de la fuerza protón motriz, conduce a la reducción y/o disipación del potencial de membrana y al agotamiento de las reservas energéticas. Estos fenómenos determinan el descenso de la síntesis de macromoléculas (ADN, ARN y proteínas) y la imposibilidad de mantener el transporte activo de nutrientes, provocando el cese del crecimiento bacteriano y, finalmente, la muerte celular (Koninsky, 1982).

Las cepas productoras de bacteriocinas parecen disponer de un gen de la inmunidad que codifica la síntesis de proteínas de inmunidad. Estas evitarían la acción antimicrobiana por un mecanismo todavía desconocido, que podría ser protegiendo al receptor, compitiendo con la bacteriocina o bloqueando los poros (Nissen-Meyer *et al.*, 1993; Venema *et al.*, 1993).

Algunas bacteriocinas, como la Pep5 y nisina activan, además, ciertas enzimas que inducen la autólisis celular. Este proceso parece estar íntimamente relacionado con su naturaleza catiónica, de forma que podría tratarse de un proceso de intercambio iónico (Bierbaum y Sahl, 1991). En general, la lisis celular resulta también favorecida por un efecto osmótico, donde los componentes de alto peso molecular no pueden salir por los

poros creados y ocasionan un flujo osmótico de agua hacia el interior, aumentando la presión y favoreciendo, por consiguiente, la lisis celular (Bierbaum y Sahl, 1991).

El efecto sobre las células sensibles suele ser bactericida, con lisis celular (Andersson *et al.*, 1988, Pucci *et al.*, 1988; Bhunia *et al.*, 1991) o sin ella (Kozak *et al.*, 1976, Davey, 1981; Barefoot y Klaenhammer, 1983, Piard *et al.*, 1990) aunque existen excepciones, como es el caso de la lactocina 27, que parece ser bacteriostática (Upreti y Hinsdill, 1975). Asimismo, la acción es rápida y el descenso de la población viable se produce a los pocos minutos del contacto con la célula (Barefoot y Kaenhammer, 1983; Zajdel *et al.*, 1985; Piard *et al.*, 1990). El efecto letal es mayor sobre las células en crecimiento exponencial, que en las de fase estacionaria (Davey, 1981; Zajdel *et al.*, 1985).

#### **1.1.2.6. Localización y organización de los determinantes genéticos**

La producción de bacteriocinas se asocia, frecuentemente, con elementos genéticos móviles tales como plásmidos o transposones, que pueden facilitar su transferencia entre diversos géneros, especies o cepas. Los genes estructurales de la mayoría de las bacteriocinas no lantibióticas se localizan en plásmidos, aunque algunos están codificados en el cromosoma, como es el caso de la plantaricina A (Dzung *et al.*, 1993) o la sakacina 674 (Holck *et al.*, 1994). En la nisina, el gen estructural se localiza en un transposón conjugativo (Horn *et al.*, 1991; Raugh *et al.*, 1994), mientras en otros lantibióticos se encuentran en plásmidos. Los plásmidos implicados varían en tamaño, desde las 6 Kb del que codifica la pediocina SJ-1 (Schved *et al.*, 1993), hasta los 131 Kb de la lactococina A (Stoddard *et al.*, 1992). El gen estructural se acompaña de otros adyacentes que participan en la regulación, procesado, transporte e inmunidad, organizados generalmente en operones.

En algunos casos, un plásmido puede portar los determinantes genéticos de varias bacteriocinas, como el de las lactococinas A, B y M (van Belkum *et al.*, 1991, 1992). Por otro lado, diferentes plásmidos presentes en cepas o subespecies distintas, pueden codificar la misma bacteriocina; así por ejemplo, la lactococina A se ha localizado en tres plásmidos distintos en dos subespecies de *Lactococcus lactis* (Holo *et al.*, 1991; Stoddard *et al.*, 1992, van Belkum *et al.*, 1991, 1992). Finalmente, una misma cepa, puede portar varios plásmidos que codifican diversas bacteriocinas (Quadri *et al.*, 1994).

### 1.1.3 Clasificación de las bacteriocinas

Según la clasificación de Klaenhammer (1993), se distinguen cuatro clases de bacteriocinas, atendiendo a su tamaño molecular, propiedades físico-químicas, presencia de aminoácidos modificados y modo de acción. Estas son:

**Grupo I:** lantibióticos: son péptidos antimicrobianos de pequeño tamaño (menor de 5 KDa), termoestables y con aminoácidos modificados, de los que los más comunes son los deshidroaminoácidos como la deshidroalanina (DHA) y la deshidrobutirina (DHB), originados post-traduccionalmente por deshidratación de la serina y la treonina, respectivamente. Por condensación de éstos con el grupo sulfhidrilo de las cisteínas presentes en la molécula, se forman los enlaces tioéter Ala-S-Ala, o ácido aminobutírico-S-Ala, originando los aminoácidos lantionina y  $\beta$ -metil-lantionina, respectivamente (Jung, 1991; Jung y Sahl, 1991). A su vez, según la estructura del anillo formado, se consideran dos subgrupos (Jung, 1991):

- subgrupo Ia: moléculas anfipáticas de estructura terciaria tipo sacacorchos y con pesos moleculares por encima de los 2100 Da. Poseen de 2 a 7 cargas positivas y el ejemplo más característico es la nisina A, producida por *Lactococcus lactis*. Otras son la nisina Z, producida también por cepas de *L. lactis* (Mulders *et al.*, 1991), la lacticina 481, producida por *L. lactis* (Piard *et al.*, 1993), la lactocina S, producida por *Lactobacillus sake* L45 (Mortvedt y Nes, 1990), la plantaricina C, de *Lactobacillus plantarum* (González *et al.*, 1994) y la carnocina UI49, de *Carnobacterium piscicola* UI49 (Stoffels *et al.*, 1992).

- subgrupo Ib: moléculas globulares con pesos moleculares de 1956 a 2041 Da, sin carga o con carga neta negativa. Hasta ahora no se han identificado lantibióticos del tipo B dentro de las bacterias lácticas, siendo producidas por los géneros *Streptomyces* spp. y *Streptoverticillium* spp. y son, fundamentalmente, las duramicinas A, B y C, la cinamicina y la ancovenina.

**Grupo II:** son péptidos pequeños (menos de 10 KDa), termoestables y sin aminoácidos modificados en su estructura primaria. Se dividen en función de su estructura primaria, espectro de inhibición y número de péptidos componentes en:

- subgrupo IIa: péptidos activos frente a *Listeria* spp., con la secuencia consenso amino-terminal: Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-. Algunos ejemplos son la pediocina PA-1 (o Ach) de *Pediococcus acidilactici* (Nieto-Lozano *et al.*, 1992), las sakacinas A y P de

*Lactobacillus sake* (Holck *et al.*, 1992; Tichaczek *et al.*, 1992) y las carnobacteriocinas BM1 y B2 de *Carnobacterium piscicola* (Quadri *et al.*, 1994).

- subgrupo IIb: son complejos que requieren la acción complementaria de dos péptidos distintos para ejercer su acción, como es el caso de las lactococina M y G (van Belkum *et al.*, 1991; Nissen-Meyer *et al.*, 1992) de *Lactococcus lactis*, o la plantaricina S de *Lactobacillus plantarum* (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993).

- subgrupo IIc: péptidos cuya actividad biológica depende del estado reducido de un residuo de cisteína, al igual que sucede en ciertas toxinas tiol-activadas (Boulnois *et al.*, 1991). De este grupo, hasta ahora sólo se ha descrito la lactococina B de *Lactococcus lactis* (Venema *et al.*, 1993).

**Grupo III**: Proteínas de más de 30 KDa, termolábiles, con aminoácidos no modificados. Es el caso de la helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1986), la acidofilucina A (Toba *et al.*, 1991) o las lacticinas A y B (Toba *et al.*, 1991b), todas ellas producidas por especies de *Lactobacillus spp.*

**Grupo IV**: Bacteriocinas que requieren para su actividad grupos no proteicos (lipídico o glucídico), como la leucocina S de *Leuconostoc paramesenteroides* (Lewus *et al.*, 1992) y la lactostrepcinas de *Lactococcus lactis* (Kozak *et al.*, 1978).

#### 1.1.4. Lantibióticos

Como se ha descrito previamente, los lantibióticos son péptidos activos de origen bacteriano que contienen aminoácidos modificados. Se producen por síntesis ribosomal de un precursor inactivo (prelantibiótico), que se modifica enzimáticamente a continuación, para dar lugar al péptido activo. El prelantibiótico presenta una secuencia líder en su extremo N-terminal, seguida de una región (prolantibiótico) que contiene los aminoácidos sin modificar. Los aminoácidos que sufren las modificaciones enzimáticas postraduccionales son, fundamentalmente, serina, treonina y cisteína: por deshidratación, la serina y la treonina dan lugar a la deshidroalanina (DHA) y a la deshidrobutirina (DHB), respectivamente y la condensación de éstos deshidroaminoácidos con la cisteína origina los puentes disulfuro que configuran los anillos de lantionina y  $\beta$ -metil-lantionina, (figura I.2.). Finalmente, el lantibiótico maduro se separa de su secuencia líder por medio de una proteasa. Los lantibióticos maduros contienen con frecuencia residuos de DHA y/o DHB, además de 3 a 5 anillos de lantionina o  $\beta$ -metil-lantionina y algunos, además, poseen otros aminoácidos inusuales derivados de la lisina (por ej. lisinoalanina) o del ácido aspártico (ácido hidroxiaspártico) o como resultado de la descarboxilación oxidativa

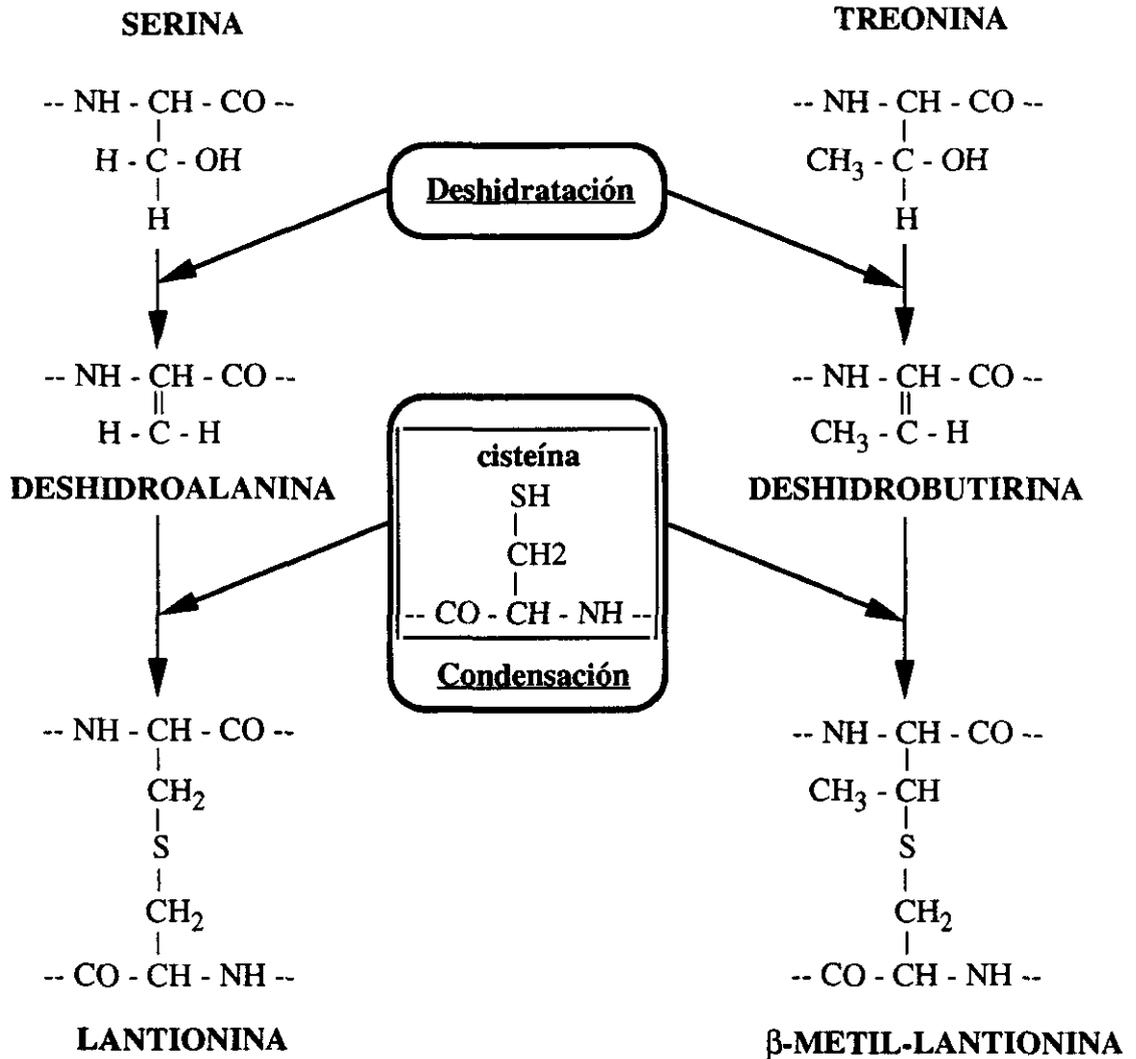


Figura I.2. Biosíntesis de los aminoácidos inusuales más frecuentes presentes en los lantibióticos. Fuente: J.M. Rodríguez (1996).

de la lantionina (S-aminovinil-cisteína). Es de destacar que todas las cisteínas de la molécula se encuentran siempre formando parte de uniones tioéter con la deshidroalanina o la deshidrobutirina.

Los lantibióticos se producen únicamente por bacterias Gram-positivas, fundamentalmente de los géneros *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Actinoplanes* y *Streptomyces*.

A su vez, según su estructura, los lantibióticos se clasifican en dos tipos (Jung, 1991):

**Los lantibióticos del tipo A** tienen como modelo representativo a la nisina A, de *Lactococcus lactis*. Pertenecen también a este grupo las bacteriocinas nisina Z, subtilina, Pep5, epidermina y gallidermina y los recientemente descubiertos estreptococina A-FF22, lacticina 481, salivaricina A, epilancina K7, lactocina S y camocina UI49. Todos son polipéptidos anfipáticos catiónicos, con 2 a 7 cargas positivas y pesos moleculares por encima de los 2.100 Da y moléculas lineales con estructura terciaria de tipo sacacorchos. A pesar de tener una longitud variable, todos ellos guardan cierta homología en cuanto a su secuencia y/o estructura. La configuración de los aminoácidos que forman los anillos tioéter, es siempre D en el extremo N-terminal y L en el C-terminal.

La nisina (figura I.3.) está producida por diversas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Se identificó por Rogers en 1928 y desde 1951 juega un papel importante en la conservación de los alimentos, empleándose en gran variedad de productos (Hurst, 1981, Delves-Broughton *et al.*, 1996).

La subtilina está producida por cepas de *Bacillus subtilis* (Feeney, 1948) y tiene una estructura similar a la de la nisina (figura I.3.); presenta el mismo armazón pentacíclico, pero con algunas diferencias en la secuencia de aminoácidos, incluyendo una delección de dos residuos cerca el extremo carboxi-terminal (Gross y Kiltz, 1973). Su empleo es similar a la de la nisina.

La epidermina, producida por *Staphylococcus epidermidis* (Allgaier *et al.*, 1985) y la gallidermina, por *Staphylococcus gallinarum*, (Kellner *et al.*, 1988) tienen también una estructura muy similar a la de la nisina y la subtilina (figura I.3.), fundamentalmente en los dos primeros anillos tioéter. Además presentan un residuo de lantionina modificado en el extremo carboxilo-terminal por oxidación y descarboxilación, dando lugar a la S-

aminovinil-cisteína (Kupke *et al.*, 1992). Su interés radica en su capacidad de inhibir microorganismos causantes de alteraciones de la piel, concretamente *Propionibacterium acnes*, por lo que podrían utilizarse en el tratamiento del acné, impétigo, foliculitis y eczemas.

*Staphylococcus epidermidis* produce el lantibiótico Pep5 (Sahl y Brandis, 1981), cuya estructura de los anillos difiere de la de los lantibióticos anteriores (figura I.3.). Es una molécula particularmente básica, con seis residuos de lisina y dos de arginina, con tendencia a formar dímeros y su interés también radica en su utilidad en la conservación de alimentos.

La epilancina K7 está producida por *Staphylococcus epidermidis* y posee también actividad bactericida (Van de Kamp *et al.*, 1994). *Carnobacterium piscicola* UI49 (aislado del pescado) produce la carnocina UI48 (Stoffels *et al.*, 1992), que es el lantibiótico de mayor tamaño de los descritos hasta la fecha. La lacticina 481, también conocida como lactococina DR, está producida por cepas de *Lactococcus lactis* (Piard *et al.*, 1993). La estreptococina A-FF22, se aisló de un enfermo en un hospital de enfermedades infecciosas en Melbourne, se denominó previamente estreptococina A y está producida por la cepa de *Streptococcus pyogenes* FF22 (Tagg *et al.*, 1971).

La salivaricina A se produce por cepas de *Streptococcus salivarius*, aisladas de la cavidad oral (Ross *et al.*, 1993). Se caracteriza por no poseer residuos de deshidroalanina ni de deshidrobutirina y sus características son muy similares a las de las bacteriocinas citolisina y lacticina 481.

La citolisina LLLS (Gilmore *et al.*, 1994), producida por ciertas cepas de *Enterococcus faecalis*, es la única bacteriocina descrita con actividad hemolítica, de hecho parece ser un factor de virulencia en las cepas de enterococos que las producen. Tiene además la particularidad de requerir la presencia de dos moléculas para ejercer su actividad.

Recientemente se ha descrito un nuevo lantibiótico, la lactocina S. Es el primer lantibiótico descrito del género *Lactobacillus* y está producido por *Lactobacillus sake* L45 (Mortvedt y Nes, 1990). Tiene la particularidad de que algunos de los residuos deshidratados de la serina se convierten, probablemente por una reacción de hidrogenación, en residuos de D-alanina (Skaugen *et al.*, 1994), amonioácido muy inusual en proteínas bacterianas sintetizadas ribosomalmente.

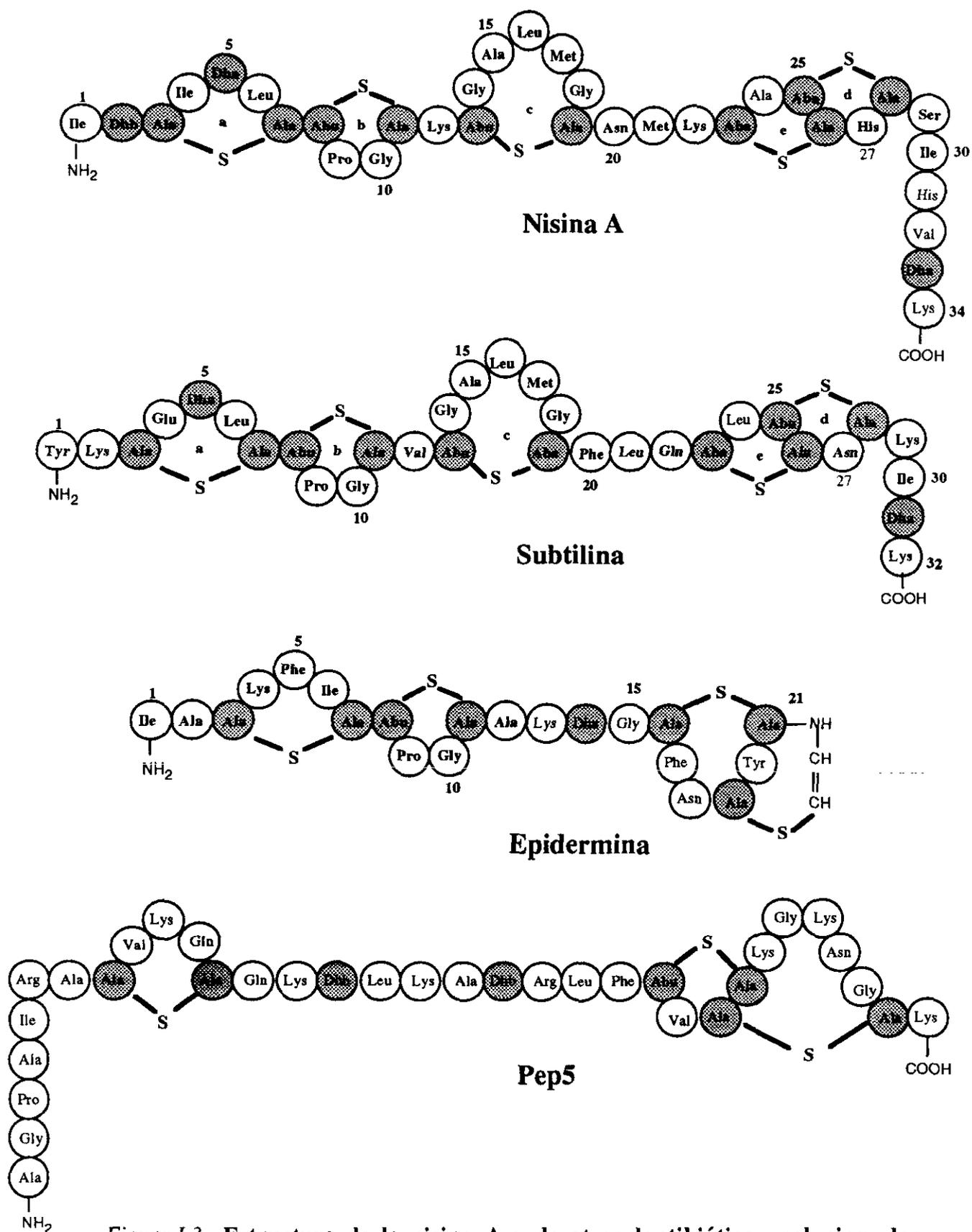


Figura 1.3. Estructura de la nisina A y de otros lantibióticos relacionados. Los aminoácidos sombreados son los que han sufrido modificaciones durante la maduración. Dha, deshidroalanina, Dhb, deshidrobutirina, Ala-S-Ala, lantionina, Aba-S-Ala, β-metil-lantionina.

**Los lantibióticos del tipo B** tienen como ejemplar característico a la duramicina y están producidos, predominantemente, por microorganismos de los géneros *Streptomyces* y *Streptoverticillium*. Pertenecen a este grupo, además de las duramicinas A, B y C la cinamicina y la ancovenina. Son de peso molecular inferior a los 2.100 Da y tienen una gran homología entre ellos. A diferencia de los lantibióticos del tipo A, presentan como mucho una carga positiva. Además de dos residuos de  $\beta$ -metil-lantionina y uno de lantionina, que están presentes siempre en la misma posición, poseen un puente de lisinoalanina que une el extremo C-terminal de la Lys<sup>19</sup> al residuo de la posición 6. En el caso de la ancovenina, este puente no se forma y en la posición 6 hay un residuo de deshidroalanina. Tanto el anillo entre las posiciones 6 y 19, como un puente disulfuro entre los residuos 1 y 18, confieren a este grupo de lantibióticos una estructura terciaria globular característica. La mayoría de estos lantibióticos no posee antimicrobiana pero tienen otras propiedades de interés, fundamentalmente terapéutico.

La ancovenina (Wakamiya *et al.*, 1985) tiene como efecto principal la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina, presentando por lo tanto una utilidad potencial en la regulación de la presión sanguínea. La cinamicina, previamente llamada lantiopeptina y Ro 09-0198 (Kaletta *et al.*, 1991a), actúa como inhibidor de la fosfolipasa A2, de la enzima convertidora de la angiotensina y del virus del herpes simplex HSV1, pudiendo utilizarse también como agente terapéutico. Las duramicinas A, B y C (Fredenhagen, 1991), inhiben también la fosfolipasa A2 y podrían utilizarse en procesos inflamatorios.

La mersadicina (Niu y Neu, 1991) y la actagardina (Kettenring *et al.*, 1990), se producen por cepas de *Bacillus* spp. y *Actinoplanes* spp., respectivamente. Si bien se incluyeron inicialmente dentro de los lantibióticos del grupo A, las últimas investigaciones sugieren que se aproximan más a los lantibióticos del tipo B (Nes y Tag, 1996). Sus estructuras son bastante particulares ya que la mersadicina, con actividad inmunosupresora, es una molécula con tres anillos que carece de carga positiva y que, a semejanza de la gallidermina y la epidermina, presenta un anillo en el extremo carboxilo terminal formando la S-amilovinil-cisteína. La actagardina es una molécula de cuatro anillos, con propiedades fuertemente acídicas e hidrofóbicas, que actúa inhibiendo la biosíntesis de peptidoglicano.

Ingram (1969, 1970) fue el primero que desarrolló un modelo para explicar la maduración de los lantibióticos. Observó que los compuestos inhibidores de la síntesis proteica influían en su producción y con aminoácidos marcados radioactivamente, determinó que la lantionina y la  $\beta$ -metil-lantionina se formaban a partir de la cisteína, serina y treonina. Una vez conocida la secuencia aminoacídica de los lantibióticos

maduros y los postulados de Ingram, se pudieron desarrollar sondas génicas para identificar los genes estructurales de la epidermina (Schnell *et al.*, 1988) y de la subtilina (Banerjee y Hansen, 1988) y, posteriormente, los de la nisina (Buchman *et al.*, 1988; Kaletta y Entian, 1989; Dodd *et al.*, 1990), gallidermina (Schnell *et al.* 1989) y Pep5 (Kaletta *et al.* 1989). La secuencia del DNA de los genes estructurales, confirmó la hipótesis de Ingram de la síntesis ribosomal de los lantibióticos y corroboró su modelo de maduración. Se observó, además, que en el producto del gen estructural existe una secuencia líder, que no aparece en el lantibiótico maduro y este producto se denominó prelantibiótico.

Existe una gran analogía en la secuencia aminoacídica del líder de los lantibióticos conocidos hasta la fecha. Comparando las secuencias de los líderes de los lantibióticos del grupo A (Jung, 1991), se observa que todas ellas son hidrofílicas y con carga eléctrica, no contienen cisteína y, probablemente, adoptan una estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice anfifílica en un medio lipofílico. Por el contrario, la zona del prolantibiótico es más hidrofóbica, en ella predomina la estructura secundaria de tipo  $\beta$  y contiene gran cantidad de cisteínas.

Las zonas de procesado se encuentran también muy conservadas en los lantibióticos del tipo A (Jung, 1991) y se localizan en las zonas hidrofílicas para permitir el acceso de la peptidasa que hidroliza el prelantibiótico. Como norma general, esta zona de rotura presenta en las posiciones +2 y +1 residuos hidrofílicos, mientras el residuo -1 del líder es polar o está cargado positivamente. El residuo del líder de la posición -2 es prolina, el -3 es polar o está cargado negativamente y el -4 es hidrofóbico. Los lantibióticos lacticina 481, streptococina A-FF22, salivaricina A, lactocina S y citolisina (Hynes *et al.*, 1993, Ross *et al.*, 1993) no siguen esta regla, y carecen de prolina en el residuo -2, mientras por el contrario, la secuencia líder de estos lantibióticos, así como su lugar de corte, son mucho más parecidas a aquellas presentes en las bacteriocinas no-lantibióticos como la pediocina PA-1, la lacticina F o la lactococina A (Jack *et al.*, 1995; Klaenhammer, 1993; de Vos *et al.*, 1995).

La secuencia líder, además de proteger a la célula productora manteniendo el péptido inactivo (Weil *et al.*, 1990, Jung y Sahl, 1991), juega un papel importante en la formación de los anillos tioéter del prelantibiótico, si bien este papel todavía no ha sido completamente elucidado. Algunas hipótesis son que: (1) mantiene una conformación particular del prolantibiótico durante la maduración, (2) juega un papel activo en la modificación enzimática de los aminoácidos implicados y (3) sirve como lugar de reconocimiento para los enzimas de maduración y transporte (Jung, 1991). Por otro lado,

también podría actuar como péptido señal en el transporte del lantibiótico (Jack *et al.*, 1995). Actualmente se asume que durante la biosíntesis, el producto del gen estructural (prelantibiótico) sufre, en primer lugar, la modificación enzimática del prolantibiótico y, luego, el corte de la secuencia líder (figura I.4.); de hecho, en la maduración de Pep5 (Sahl *et al.*, 1991) se han detectado productos intermedios que corroboran esta secuencia de acontecimientos. En la maduración del propéptido, primero se produce la deshidratación de la serina y/o treonina (Weil *et al.*, 1990) y, después, se añaden por ataque nucleofílico los grupos tiol de los residuos de cisteína, dando lugar a la formación de los anillos tioéter. Teniendo en cuenta que no se conocen enzimas capaces de llevar a cabo la deshidratación de los aminoácidos y la formación de los anillos tiéter, parece que este proceso de maduración se lleva a cabo por un nuevo sistema biosintético, no descrito previamente (Jack *et al.*, 1995; Kupke y Götz, 1996). El corte de la secuencia líder se produce después de la excreción del lantibiótico, como en la epidermina, o antes, como ocurre en Pep5 (Bierbaum *et al.*, 1996).

Además del gen estructural, se han descrito otros genes que participan en la maduración, secreción, regulación e inmunidad de los lantibióticos y que se organizan en operones (Jack *et al.*, 1995). Los operones pueden localizarse en plásmidos, como en el caso de la epidermina (Schnell *et al.*, 1992) o en el cromosoma, como en la subtilina (Banerjee y Hansen, 1988) y la nisina (Dodd *et al.* 1990, Horn *et al.* , 1991).

## I.2. LA NISINA

### 2.1. Perspectiva histórica

Rogers y Whittier (1928) y Rogers (1928), fueron los primeros investigadores que observaron que durante la maduración de unos quesos, determinadas cepas de *L. lactis* inhibían el crecimiento de otras bacterias lácticas. Este efecto volvió a observarse posteriormente por Whitehead y colaboradores (Whitehead 1933; Whitehead y Riddet, 1933) y por Meanwell (1943). Whitehead (1933) aisló el compuesto inhibidor y determinó su naturaleza proteica y Shattock y Mattick (1943) identificaron las cepas inhibidoras como estreptococos lácticos del grupo serológico N de Lancefield a los que, posteriormente, se les modificó su nombre por el de lactococos (Shleifer *et al.*, 1985).

Debido a la necesidad de nuevos compuestos antimicrobianos surgidas durante la Segunda Guerra Mundial, y a la conveniencia de un método eficaz para controlar las mastitis en los animales, aumentó el interés en las propiedades antimicrobianas de estos estreptococos por su posible potencial terapéutico y así, Mattick y Hirsch (1944), concentraron el compuesto antimicrobiano aislado por Meanwell (1943) y comprobaron

Introducción

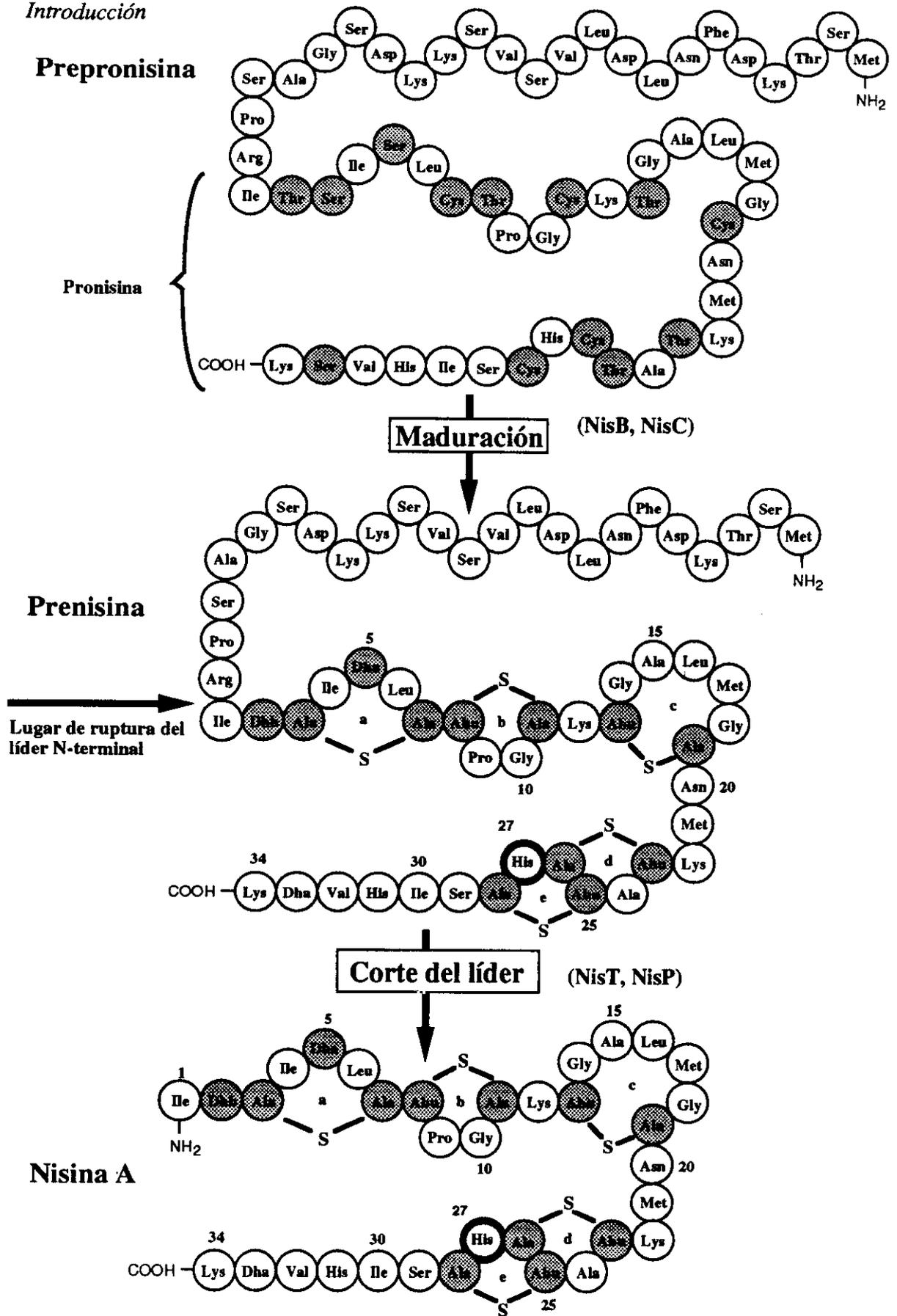


Figura 1.4. Maduración del lantibiótico nisina A. Fuente: J.M. Rodríguez (1996).

su actividad, observando que inhibía a ciertas bacterias patógenas. Por ello le dieron el nombre de "nisina" como un acrónimo derivado de "Group N Inhibitory Substance" (Mattick y Hirsch, 1947), describiéndolo como un antibiótico producido por los estreptococos del grupo N de Lancefield.

Sin embargo, su interés como agente terapéutico sistémico en medicina humana y veterinaria, se redujo drásticamente al observar su escasa solubilidad en los fluidos corporales, su inestabilidad a pH fisiológico y su inactivación por las proteasas digestivas (Hurst, 1981), así como por la existencia de reacciones adversas en los ensayos en el tratamiento de mastitis, probablemente debido a la presencia de impurezas en las preparaciones. Fueron Hirsch *et al.* (1951) y McClintok *et al.* (1952), los que sugirieron por primera vez su aplicación en la conservación de los alimentos, inicialmente para prevenir la proliferación de clostridios formadores de gas en los quesos.

En los años 50 comenzó el interés por este compuesto y ello condujo a la determinación de su secuencia aminoacídica (Gross y Morell, 1971), síntesis química (Fukase y col., 1988), determinación de su conformación (Jung, 1991) y la localización y secuenciación del gen estructural y de los adyacentes involucrados en su producción (Buchman *et al.*, 1988, Kaletta y Entian, 1989, Dodd *et al.*, 1990, Steen y col., 1991), así como la determinación de su ausencia de toxicidad en los animales (Frazer *et al.*, 1962).

La ausencia de toxicidad de la nisina, su inactivación por la  $\alpha$ -quimotripsina (Jarvis y Mahoney, 1969), su termoestabilidad a pH ácido (Liu y Hansen, 1990) y su presencia natural en algunos sustratos alimenticios como la leche y los productos lácteos (Chevalier *et al.*, 1957), vegetales (Harris *et al.*, 1992, Uhlman *et al.*, 1992) y productos cárnicos (Rodríguez *et al.*, 1995), ha propiciado la generalización de su uso como agente antimicrobiano en la industria alimentaria. La primera preparación comercial de la nisina se obtuvo en Inglaterra en 1953 y en 1968 una comisión conjunta de la FAO/WHO aceptó su empleo como conservante alimentario, indicando que la dosis aceptable podría ser superior a los 0.825 mg/Kg (FAO/WHO, 1969). En 1983 se añadió a la lista positiva de aditivos de la CEE con el número E234 (CEE, 1983) y la FDA le confirió el estatus de sustancia GRAS (*Generally Regarded As Safe*), para su empleo en la elaboración de quesos fundidos pasteurizados (Registro Federal, 1988). Actualmente se emplea en más de 50 países, aunque con distintos criterios en cuanto a los límites máximos de utilización permitidos y de alimentos donde se puede emplear (Vandenbergh, 1993). La utilización de la nisina como conservante alimentario comenzó en los quesos para evitar la germinación de los esporos de *Clostridium botulinum* y de otros esporulados alterantes,

posteriormente, su empleo se ha extendido para prolongar la vida útil de diversos productos lácteos pasteurizados, evitar la alteración de las conservas por microorganismos termófilos, en productos de panadería, productos de humedad elevada, huevo líquido pasteurizado, control de la alteración de bebidas alcohólicas fermentadas por bacterias lácticas y en la conservación de alimentos de pH ácido.

Actualmente se pretende potenciar su actividad con agentes quelantes o con otras bacteriocinas y emplearlo como adyuvante en las nuevas técnicas de procesado y conservación de los alimentos, como el empleo de presiones elevadas (*Ultrahigh Hydrostatic Pressure*, o UHP) o de campos eléctricos pulsantes (*Pulsed Electrical Field*, o PEF). Además, la obtención de preparaciones muy purificadas de la nisina y la potenciación de su actividad con quelantes, ha abierto nuevas perspectivas en cuanto a su utilización como agente terapéutico en la prevención y el tratamiento de la úlcera péptica en el hombre y en el control de mastitis en los animales (Delves-Broughton *et al.*, 1996). Actualmente, también se estudia su posible utilización como antiséptico en pastas dentífricas y en cremas cutáneas.

## **2.2. Características físicas y químicas**

### **2.2.1. Estructura**

#### **2.2.1.1. Estructura primaria**

Aunque Gross y Morell (1971) determinaron inicialmente la secuencia aminoacídica de la nisina A por degradación química, sus resultados se han confirmado recientemente por espectroscopía de masas (Barber *et al.*, 1988), resonancia magnética nuclear protónica y bidimensional (Chan *et al.*, 1989, Slijper *et al.*, 1989, Lian *et al.*, 1992) y síntesis química (Fukase *et al.*, 1988).

La nisina es un lantibiótico de 34 aminoácidos de los cuales varios están modificados post-traduccionalmente, originando la deshidroalanina (residuos 5 y 33), la  $\beta$ -metil-dideshidroalanina o deshidrobutirina (residuo 2) (Gross y Morell, 1967, 1968), y los anillos tioéter de lantionina (entre los residuos 3 y 7, anillo A) y  $\beta$ -metil-lantionina (entre los residuos 8 y 11, 13 y 19, 23 y 26, y 25 y 28, anillos B, C, D, y E, respectivamente) (Berridge *et al.*, 1952, Newton, *et al.*, 1953, Gross y Morell, 1970), por lo que presenta la estructura de un pentaciclo (figura I.3.). Como en todos los lantibióticos del tipo A, la configuración de los aminoácidos de los anillos tioéter es siempre D en el extremo N-terminal y L en el C-terminal (Morell y Gross, 1973, Knox y Keck, 1973, 1975). Estos aminoácidos modificados confieren a la molécula sus características especiales de tolerancia al ácido y termoestabilidad y parecen jugar un papel

importante en su mecanismo de acción bactericida, pues presentan enlaces dobles muy reactivos. Por otro lado, la deshidroalanina y deshidrobutirina son susceptibles a sufrir ataques nucleofílicos (por ejemplo, por grupos hidroxilo) presentes a pH alcalino, lo que explicaría su inestabilidad y descenso de solubilidad en condiciones básicas (Liu y Hansen, 1990). La razón por la cual existen anillos de lantionina en esta molécula en lugar de los puentes disulfuro, más comunes, no se conoce, aunque suponen una ventaja adaptativa, puesto que los anillos de lantionina y  $\beta$ -metil-lantionina son mucho más estables a las condiciones ambientales extremas.

Se ha descrito además una variante natural de la nisina A, que contiene asparragina en lugar de histidina en el residuo 27, la nisina Z (Mulders *et al.*, 1991). La sola sustitución de un aminoácido por otro en su estructura, confiere a esta molécula una mayor capacidad de difusión (de Vos, *et al.*, 1993). En la secuencia aminoacídica de la nisina no existen aminoácidos aromáticos, por lo que este compuesto no absorbe la luz a 280 nm (Bailey y Hurst, 1971). Por ello, la estimación de su concentración se realiza mediante su absorbancia específica a 220 nm ( $21 \text{ mg ml}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), determinada mediante resonancia magnética nuclear protónica (De Vos *et al.*, 1993).

#### 2.2.1.2. Estructura espacial

Los resultados de la resonancia magnética nuclear protónica (RMN) muestran que la nisina carece de estructura secundaria regular, pero se mantiene en una estructura tridimensional bien definida por las limitaciones que imponen los cinco anillos de lantionina (Chan *et al.*, 1989, Slijper *et al.*, 1989, Goodman *et al.*, 1991, Lian *et al.*, 1991, 1992, Van de Ven *et al.*, 1991a y b). Los diferentes estudios realizados en medio acuoso, concuerdan al describir los anillos B, D y E en forma de hélices  $\beta$  determinadas por los anillos tioéter que unen los residuos primero y cuarto. El anillo C no ha sido todavía completamente caracterizado en los estudios de RMN y parecen existir discrepancias entre los autores en cuanto a la estructura del anillo A. Se ha estudiado también la estructura tridimensional de la nisina en micelas de SDS (dodecil sulfato sódico) o DPC (dodecil fosfocolina) que mimetizan a la membrana plasmática (Van den Hooven *et al.*, 1993) y en ambos casos, parecen inducir un cambio conformacional en la estructura del anillo A, concretamente en los enlaces peptídicos que flanquean la DHA de la posición 5.

El carácter anfipático de esta molécula se debe a dos factores. Por un lado, cuatro de los cinco residuos cargados se encuentran en la zona carboxilo-terminal, proporcionándole su carácter hidrofílico, mientras que el extremo amino-terminal es predominantemente hidrofóbico. Por otro lado, existen dos dominios anfipáticos a lo

largo de la molécula: el primero, entre los residuos 3 a 19, incluye los tres primeros anillos, con las zonas hidrofóbicas de Ile<sup>4</sup>, Pro<sup>9</sup> y Leu<sup>16</sup> por un lado y Lys<sup>12</sup> en el lado contrario. El segundo está formado por los residuos 23 a 28 y se corresponde con el anillo doble D y E, donde la zona hidrofóbica se conforma por el grupo metilo de Ala<sup>24</sup> y Abu<sup>25</sup>, mientras que el His<sup>27</sup> lo configura en el lado opuesto. Este carácter anfipático puede ser relevante en su modo de acción y actividad biológica.

La nisina no es una molécula rígida, puesto que presenta una región flexible alrededor de la Met<sup>21</sup> que conecta los dos dominios anfipáticos y los extremos amino y carboxilo, que son también bastante flexibles (van de Ven *et al.*, 1991a). Se ha observado que existen hasta 5 variantes de la nisina, que se designaron como nisina A, B, C, D (Berridge *et al.*, 1952) y E (Jarvis 1967, Jarvis *et al.*, 1968). Su proporción relativa varía según la edad de la muestra y las condiciones de almacenamiento y parecen ser productos de degradación de la nisina A (Chan *et al.*, 1989a) que aparecen transcurrido un tiempo de almacenamiento. Las variedades C a E parecen ser mucho menos activas que la A o la B.

### 2.2.2. Masa molecular

La masa molecular del monómero de nisina es de 3353 (Jung, 1991), aunque se estimó inicialmente como de 3500 por Gross y Morell (1967) y Jarvis *et al.* (1968). La nisina suele presentarse en forma de dímeros, de 7000 de masa molecular o tetrámeros de 14000 (Cheesman y Berridge, 1957, 1959; Ingram *et al.*, 1967; Jarvis *et al.*, 1968), que son el resultado de interacciones intermoleculares por ataque nucleofílico del grupo amino de uno de los residuos y los enlaces dobles altamente reactivos de los residuos insaturados (Gross y Morell, 1968, 1971a).

### 2.2.3. Solubilidad y estabilidad

La nisina tiene una carga neta positiva de +3 (+2 en el caso de la nisina Z), debido a su elevada proporción de aminoácidos básicos (Harris *et al.*, 1992b), de ahí que su punto isoeléctrico sea alcalino (Jung 1991). Además, esta molécula es insoluble en solventes apolares y soluble en medios acuosos, su solubilidad es altamente dependiente del pH de la solución y, así, se reduce considerable y constantemente al aumentar el pH (Hirsch, 1951; Liu y Hansen, 1990). La solubilidad disminuye de 57 mg/ml a pH 2 a 1,5 mg/ml a pH 6 y 0,25mg/ml a pH 8,5 (Liu y Hansen, 1990). A pH alto, llega incluso a inactivarse y a pH 11 la actividad se destruye completamente a 63 °C en 30 minutos. Este efecto parece ser el resultado de modificaciones químicas tanto intra- como intermoleculares, ya que los residuos de DHA y DHB son fácilmente atacados por radicales nucleofílicos presentes en los medios a pH alcalino. Al haber tres residuos de este tipo por molécula, las reacciones intermoleculares pueden dar lugar a agregados insolubles de gran tamaño.

Sin embargo, en la práctica no suelen existir problemas de solubilidad, dado que las concentraciones empleadas en la conservación de los alimentos no suelen exceder de 0,025 mg/ml (Delves-Broughton y Williams, 1993). La nisina Z parece tener mejor solubilidad a pH alcalino, debido al mayor carácter hidrofílico de la Asp<sup>27</sup> en comparación con la His<sup>27</sup> de la nisina A (De Vos *et al.*, 1993).

La solubilidad también se ve afectada por la concentración del tampón de disolución, de forma que es inversamente proporcional a ésta, siendo un 42% menor a pH 7 en fosfato sódico 0,2M que en 0,05M (Liu y Hansen, 1990). Su estabilidad está muy relacionada con su solubilidad y el pH, de manera que las soluciones de nisina pueden someterse a ebullición en HCl a pH 2,5 sin que exista pérdida en su actividad. La nisina también permanece estable a pH 2 tras un tratamiento en autoclave, pero pierde su actividad (40%) si el pH es de 5 o más del 90% si el pH es de 6,8 (Tramer, 1966).

La estabilidad también depende de la composición química de la solución, del tratamiento térmico aplicado, de la presencia de otros componentes del alimento, etc. Se ha determinado que la presencia de proteínas de gran tamaño en los alimentos incrementa su estabilidad a los tratamientos térmicos (Hall, 1966, Delves-Broughton y Williams, 1993). Los preparados comerciales de nisina, no muestran pérdidas de actividad durante un periodo de dos años siempre que se mantengan almacenados en lugares secos, oscuros y a una temperatura inferior a los 25 °C. Aunque la nisina pura puede mantenerse estable por mucho tiempo, cuando se añade a los alimentos su estabilidad disminuye y así se ha observado que en el queso fundido pasteurizado se reduce un 15% a 85-95 °C en 15 minutos, o un 55-70% durante 6 meses a 30 °C (Delves-Broughton, 1990).

La nisina puede ser desactivada por muchas proteasas inespecíficas y por enzimas proteolíticas que rompen el enlace His<sup>31</sup>-Val<sup>32</sup> o el DHA<sup>33</sup>-Lys<sup>34</sup> como la  $\alpha$ -quimotripsina, subtilisina, ficina, papaína o bromelaína (Delves-Broughton y Williams, 1993). Sin embargo, las pepsina, erepsina, elastasa y carboxipeptidasa A no ejercen ningún efecto en su actividad (Hurst, 1983).

Existe además un enzima (nisinasa), producido por diversos microorganismos que inactiva específicamente la nisina. Algunas de las bacterias productoras son *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus* y *Bacillus cereus*. Las nisinases de *S. thermophilus* y *B. cereus* han sido parcialmente purificadas (Alifax y Chevalier, 1962) y se ha observado que son inducibles y específicas, actuando sobre la deshidroalanina (Gross *et al.*, 1969) como una deshidroalanina reductasa (Jarvis, 1970, Jarvis y Farr,

1971), activa tanto frente a la nisina como frente a la subtilina, puesto que ambas presentan una misma estructura C-terminal (Gross *et al.*, 1969).

### 2.2.4. Purificación de la nisina

Se han realizado muchos intentos de purificación de la nisina a partir de los cultivos productores. Las experiencias iniciales se basaron en la diferente solubilidad de la nisina en solventes orgánicos, Mattick y Hirsch (1944) emplearon una combinación de acidificación del medio a pH 1,9 seguido de eliminación de las células y extracción y precipitación con solventes. Falconer (1952), mantuvo el pH de la fermentación en 6 para mantener asociada la nisina a la superficie de las células productoras y a continuación, extrajo la nisina mediante solventes. Cheesman y Berridge (1957), extrajeron la nisina de las células y del sobrenadante con n-propanol seguido de varias precipitaciones fraccionadas con acetona.

Siguiendo otra línea diferente, Bailey y Hurst (1971) realizaron una extracción ácida en frío de las células rotas tras crecer el cultivo a pH 6,7, seguido de una cromatografía de intercambio aniónico, precipitación con acetona y cromatografía en carboximetilcelulosa frente a un gradiente de pH. Un método más simple de purificación de las bacteriocinas, entre ellas la nisina, se ha descrito por Yang *et al.* (1992) basado en la adsorción de las bacteriocinas a las células a un pH de 6, centrifugación de las células y liberación de la bacteriocina a un pH más bajo (de 1,5 a 2). Recientemente Coventry y colaboradores (1996) han descrito también un método de purificación consistente en la adsorción de la nisina a Micro-Cel, un silicato cálcico de diatomita y su liberación con SDS al 1%.

Finalmente, el método de Rodríguez y colaboradores (1995) de purificación de la nisina producida por una cepa de *Lactococcus lactis* de origen cárnico, sigue una pauta exitosa de purificación de muchas bacteriocinas, basada en la precipitación de los sobrenadantes con sulfato amónico y en la aplicación sucesiva de cromatografías de intercambio catiónico, interacción hidrofóbica y de fase reversa, esta última adaptada a un sistema de FPLC.

## 2.3. Propiedades biológicas

### 2.3.1. Actividad antimicrobiana

#### 2.3.1.1. Unidades de actividad

Con el fin de estandarizar las preparaciones y comparar la sensibilidad relativa de las distintas especies a la nisina, así como los métodos de análisis empleados en los distintos laboratorios, se hizo necesario consensuar una unidad de medida de su actividad. El

primer intento con este fin dio lugar a la Unidad Reading, desarrollada en la Universidad de dicho nombre (Reino Unido). Esta unidad se definió como la cantidad de nisina necesaria para inhibir un cultivo de *Streptococcus agalactiae* en un ml de medio (Tramer y Fowler, 1964). En 1968, el WHO Expert Committee in Biological Standardization (WHO, 1969) estableció la unidad internacional de nisina (UI) que se definió como la actividad de 1 µg de una Preparación Internacional de Referencia, que es idéntica a la única preparación comercial existente hasta la fecha y denominada Nisaplin<sup>®</sup>, comercializada por Aplin & Barret (Trowbridge, Wiltshire, UK). Nisaplin<sup>®</sup> se comercializa con una actividad estandarizada de  $1 \times 10^6$  UI/g, 1 gr de Nisaplin<sup>®</sup> tiene una actividad de  $10^6$  UI, mientras que 1 gr de nisina pura contiene  $40 \times 10^6$  UI. Actualmente se emplean otras unidades como UI/gr, mg/Kg, ppm o % nisina. La Tabla I.1., muestra las relaciones entre las distintas unidades en uso.

### 2.3.1.2. Espectro antimicrobiano

A diferencia de la mayoría de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, la nisina posee un espectro de inhibición muy amplio, aunque más restringido que el de la mayor parte de los antibióticos. La Tabla I.2. muestra el espectro antimicrobiano de la nisina.

En condiciones normales, la nisina no es activa frente a mohos, levaduras y bacterias Gram-negativas, pero es efectiva frente a un amplio rango de bacterias Gram-positivas. Sin embargo, las concentraciones inhibitorias mínimas para las células vegetativas y esporos sensibles, varían considerablemente incluso entre cepas de la misma especie. Hasta el momento se ha prestado mayor atención a su actividad frente a los esporos microbianos, puesto que se emplea en alimentos que han sido sometidos a tratamientos térmicos y en los que, por lo tanto, las células vegetativas no deberían constituir un problema *a priori* (Hurst, 1972; Delves-Broughton y Williams, 1993).

#### 2.3.1.2.1. Actividad frente a las bacterias Gram-positivas y esporuladas

La nisina inhibe a la mayoría de las bacterias Gram-positivas, muchas de ellas alterantes de los alimentos o responsables de intoxicaciones o toxiinfecciones alimentarias (Ray, 1992), aunque la sensibilidad es muy variable entre especies y cepas. En el caso de los microorganismos formadores de esporos, la nisina inhibe tanto a la célula vegetativa como al esporo. Dentro del mismo género, algunas de las especies o de las cepas pueden ser resistentes, si bien la frecuencia de aparición de resistencias es también variable. Asimismo, dentro de los microorganismos sensibles, la sensibilidad relativa varía mucho dependiendo de la especie y cepa. Así por ejemplo, en el caso de *Staphylococcus aureus*, algunas cepas fueron sensibles a 4 UI/ml de nisina, mientras que otras requirieron 128

---

**Tabla I.1. Relación entre las unidades de nisina más frecuentemente empleadas**

---

**(a). Nisina pura: 1 g = 40 x 10<sup>6</sup> UI o 1 x 10<sup>6</sup> UR**

1 mg de nisina por kg de alimento, son	= 40 UI/g de alimento = 1 ppm en el alimento = 0,0001%
500 UI de nisina por gramo de alimento, son	= 12,5 mg/Kg de alimento = 12,5 ppm en el alimento = 0,00125% en el alimento (o 1,25 mg%)

**(b). Nisaplin<sup>®</sup> (preparación comercial): 1 g = 1 x 10<sup>6</sup> UI**

1 mg de nisaplin por Kg de alimento, son	= 1 UI/g de alimento = 1 ppm de nisaplin o 0,025 ppm de nisina
	= 0,00125% (o 1,25 mg%) de Nisaplin o 0,0000312% de nisina (o 0,0312 mg%)
500 UI de nisaplin por Kg de alimento, son	= 500 mg/Kg de alimento = 500 ppm de nisaplin o 12,5 ppm de nisina
0,00125%	= 0,05% (o 50 mg%) de nisaplin o (0 1,25 mg%) de nisina

**(c). Preparación de nisina en caldo de cultivo: 1 UI = 100 unidades de actividad (UA)**

---

*Fuente: B. Ray (1992).*

**Tabla I.2. Espectro antimicrobiano de la nisina<sup>1</sup>**

<b>Bacterias Gram-positivas</b>		<b>Bacterias Gram negativas<sup>2</sup></b>
<b>Células vegetativas</b>	<b>Células vegetativas y esporos</b>	
<i>Lactococcus lactis</i> <sup>3</sup>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Neisseria spp.</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Hafnia spp.</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Flavobacterium spp.</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacteroides spp.</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Actinobacillus spp.</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Klebsiella spp.</i>
<i>Leuconococ mesenteroides</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Aeromonas spp.</i>
<i>Leuconostoc oenos</i>	<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Clostridium bifermentum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Pediococcus damnosus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Clostridium pasteurianum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Streptococcus agalactia</i>	<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Micrococcus luteus</i>		
<i>Listeria monocytogenes</i>		
<i>Listeria ivanovii</i>		

<sup>1</sup>Algunas cepas de las especies citadas pueden ser resistentes.

<sup>2</sup>Tras ser sometidas a tratamientos subletales.

<sup>3</sup>Cepas no productoras de nisina.

Fuente: J.M. Rodríguez (1996)

## Introducción

UI/ml, mientras *Staphylococcus aureus* 196, una cepa enterotoxigénica es incluso más resistente y requiere  $7,2 \times 10^3$  UI/ml para reducir las unidades formadoras de colonias (UFC) en cinco unidades logarítmicas (Jones, 1974).

La efectividad de la nisina en las células vegetativas y los esporos es variable dependiendo de la edad y el tamaño del inóculo, la composición del medio, el pH de la solución donde la nisina se ha diluido previamente, etc. (Ramseier, 1960; Scott y Taylor, 1981b, Somers y Taylor, 1981). En el caso del medio utilizado en el bioensayo (Benkerroum y Sandine, 1988), se ha determinado que para inhibir  $10^4$  células de *Listeria monocytogenes* 35132 son necesarias  $1.5 \times 10^4$  UI/ml al emplear agar tripticasa-soja (TSA), pero sólo 3,7 UI/ml en MRS (Man, Rogosa, Sharpe) agar, lo que se debe, probablemente, a la presencia de Tween 80 en este último medio, que facilitaría la difusión de la bacteriocina en el agar.

Los esporos también manifiestan una sensibilidad variable frente a la nisina. En el caso de *Clostridium botulinum*, se ha visto que los esporos del tipo A son más resistentes que los de los tipos B y E, siendo estos últimos los más sensibles (Scott y Taylor, 1981a). Los niveles de inhibición fueron de 500 a 2.500 UI/ml para los esporos del tipo A y B y de 50 a 1.000 UI/ml para los del tipo E (Scott y Taylor, 1981a). Estudios posteriores de estos mismos autores, indicaron que la actividad frente a los esporos se ve favorecida al disminuir el pH del medio o la carga inicial y al aumentar la duración y/o temperatura de los tratamientos térmicos (Scott y Taylor, 1981b, Somers y Taylor, 1981).

En el caso del género *Bacillus*, la sensibilidad de los esporos parece estar relacionado con el mecanismo que emplean para romper su cubierta tras la germinación, de manera que aquellos esporos con mecanismo lítico (L) son más resistentes (incluso a 100 UI/ml) que los que rompen su envoltura por acción mecánica (M) (que son sensibles a cantidades de 2 a 10 UI/ml). Los esporos del tipo L parecen producir la enzima nisinasa que no se detecta en los esporos del tipo M. Además, en los organismos L existen pocas diferencias en cuanto a la resistencia de los esporos y sus células vegetativas, mientras que en los M las formas vegetativas son frecuentemente 20 veces más resistentes que los esporos correspondientes.

Aquellos esporos que han sufrido un tratamiento térmico previo son más sensibles a la inhibición por la nisina y en el caso de *Clostridium botulinum* A y B, si no existe un tratamiento térmico los esporos resistentes germinan y crecen profusamente a pesar de la presencia de altas concentraciones de nisina. Sin embargo, si los esporos sufren un tratamiento térmico previo, se vuelven sensibles (de Vuyst y Vandame, 1994). Se ha

sugerido que el tratamiento térmico de los esporos causa un daño subletal que favorece la acción de la nisina, pero el mecanismo por el cual el daño ocurre es todavía desconocido. El efecto sobre los esporos puede ser esporicida, como es el caso de *Clostridium butyricum* (Hirsch y Grinsted, 1954) o esporostático, como en *Bacillus stearothermophilus* (Thorpe, 1960).

#### 2.3.1.2.2. Actividad frente a las bacterias Gram-negativas

La nisina es ineficaz frente a las bacterias Gram-negativas, a excepción de algunas cepas de *Neisseria* (Mattick y Hirsch, 1947). Sin embargo, se ha observado que puede tener un efecto antimicrobiano en estos microorganismos bajo determinadas condiciones como la congelación, el calentamiento o el descenso del pH. Parece que este efecto se debe a las lesiones subletales provocadas en la pared celular, concretamente en los lipopolisacáridos (Ray, 1992), permitiendo el contacto de la nisina con la membrana citoplasmática, sobre la que ejerce su mecanismo de acción (Gao *et al.*, 1991). También se ha observado este efecto en presencia de la nisina con agentes quelantes como el EDTA (Kordel y Sahl, 1986; Stevens *et al.*, 1991, Stevens *et al.*, 1992, Ray, 1992). En este caso, el efecto se debe a que estas sustancias eliminan los iones  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, lo que a su vez permite la liberación de fosfolípidos y lipoproteínas. La pérdida de estas sustancias incrementa la permeabilidad de la pared celular, favoreciendo la acción de la nisina en la membrana citoplasmática (Delves-Broughton, 1996).

Stevens *et al.* (1992) estudiaron *in vitro* este efecto de la combinación de agentes quelantes con la nisina para inhibir el desarrollo de las bacterias Gram-negativas. Los parámetros evaluados fueron el agente quelante, la concentración de nisina, la temperatura de incubación y la interferencia de las proteínas. Los agentes quelantes evaluados fueron el EDTA, el ácido etilen-bis tetracético, el ácido cítrico monohidratado y el fosfato dibásico de sodio. El tratamiento más eficaz fue el de 50 a 100  $\mu\text{g/ml}$  de nisina en combinación con EDTA 20 mM o ácido cítrico monohidratado a temperaturas de 30 a 42 °C. La adición de seroalbúmina bovina a dichas mezclas no originó un descenso significativo de la actividad inhibidora.

Sin embargo, Cutter y Siragusa (1995) estudiaron el efecto combinado de la nisina con agentes quelantes (citrato, lactato, hexametáfosfato sódico y EDTA) al aplicarlos *in situ* en la carne y su efecto sobre *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella typhimurium*. La carne se mantuvo a 5 °C durante tres días, al final de los cuales se observó sólo una reducción muy pequeña de la carga microbiana de la carne, no mayor de 0,42 UFC/cm<sup>2</sup>. Estos resultados se deben a varios factores propios del sistema cárnico que pueden

interferir en el efecto antimicrobiano, como son el que la nisina puede degradarse por las proteasas de la carne o unirse al tejido adiposo y que la abundancia de iones en la carne puede interferir en la capacidad de los agentes quelantes para secuestrar el  $Mg^{2+}$  de la pared celular bacteriana. Además, los microorganismos adheridos a la carne no son tan fácilmente accesibles como los que están en suspensión. La tabla I.2. recopila los microorganismos Gram-negativos que hasta la fecha han resultado sensibles a la nisina tras alguno de los tratamientos sensibilizantes.

### **2.3.2. Modo de acción**

La nisina manifiesta, al menos, cuatro tipos de actividad antimicrobiana (Moll *et al.*, 1996), siendo las dos primeras las de mayor relevancia:

- 1). Actividad bactericida en las células vegetativas, mediante la formación de poros en la membrana plasmática;
- 2). Actividad en los esporos bacterianos sensibles, inhibiendo su germinación;
- 3). Actividad inhibidora de la síntesis de la pared celular;
- 4). Actividad frente a enzimas autolíticos de las células sensibles.

#### **2.3.2.1. Actividad frente a las células vegetativas**

Como ocurre en general en todas las bacteriocinas, la acción de la nisina en las células vegetativas se ejerce a nivel de la membrana plasmática. Su carácter catiónico y su naturaleza hidrofóbica favorecen esta interacción. Inicialmente la nisina se adsorbe a la superficie celular, no sólo de las células sensibles, sino también de las resistentes y de las células productoras. Esta adsorción es reversible durante los 10-15 minutos iniciales y después se torna irreversible. La adsorción es pH dependiente, siendo del 100% a pH 6,5 y reduciéndose al 43% a pH 4,5 (Ray, 1992). Esta observación hace sospechar que la unión inicial se produce por una atracción iónica entre la bacteriocina y la superficie celular.

La causa primaria de la muerte celular radica en la desestabilización de la membrana plasmática, debida a la formación de poros o canales iónicos (Henning *et al.*, 1986a, 1986b; Sahl *et al.*, 1987; Kordel *et al.*, 1989). La formación de estos poros facilita la pérdida de componentes, fundamentalmente iones, ATP y aminoácidos, lo que conduce a la disipación del potencial de membrana de las células y a la pérdida de la fuerza motriz protónica, lo que origina el cese de la actividad biosintética celular. La despolarización total de la membrana ocurre al minuto del tratamiento con la nisina (Ruhr y Sahl, 1985).

Este efecto se ha observado no sólo en células vegetativas, sino también en membranas artificiales o liposomas (Sahl *et al.*, 1987; Kordel *et al.*, 1989), de lo que se deduce que no se requiere un receptor proteico específico de unión con la célula para ejercer su acción, sino que la interacción se realiza a través de los constituyentes negativamente cargados de la membrana de la pared celular de las bacterias Gram-positivas, como son los ácidos teicoico y lipoteicoico o los fosfolípidos, probablemente como resultado de una interacción electrostática o hidrofóbica (de Vuyst y Vandamme, 1994).

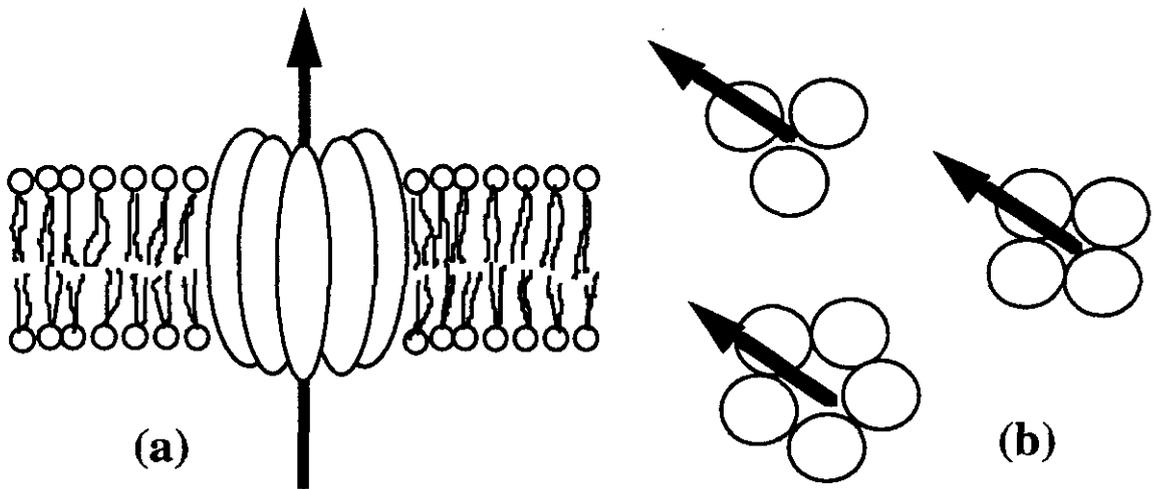
Los fosfolípidos de la membrana liposomal parecen influir notablemente en la actividad de la nisina (Gao *et al.*, 1991) y, así, el potencial de membrana necesario para ejercer su acción varía de -30 a -100 mV, dependiendo de los fosfolípidos empleados (Sahl *et al.*, 1987; Gao *et al.*, 1991). Esta observación podría explicar las variaciones de sensibilidad a la nisina entre diferentes microorganismos. En aquellos liposomas que carecen de fosfolípidos aniónicos, la nisina actúa como un transportador de aniones, lo que significa que se une a la superficie del liposoma y atraviesa su membrana estimulada por el potencial de membrana (negativo en el interior). Una vez dentro, se une al anión y atraviesa de nuevo la membrana unida a él, liberándolo en el exterior; a continuación, la nisina se recicla para realizar de nuevo esta actividad. En el caso de que existan fosfolípidos negativos en la membrana, la nisina interacciona electrostáticamente con ellos en la superficie del liposoma, formando un complejo parcialmente neutralizado. Las zonas de la nisina que podrían unirse con los aniones quedan de este modo bloqueadas por los lípidos aniónicos, impidiendo su acción transportadora. Teniendo en cuenta que las membranas bacterianas son ricas en fosfolípidos aniónicos, la actividad transportadora de aniones debe ser mínima *in vivo* (Moll *et al.*, 1996), dichos compuestos actuarían por tanto como "receptores de la nisina" siendo la unión con éstos necesaria para la formación de los poros (Moll *et al.*, 1996).

Para orientarse en la membrana plasmática y formar los poros, la nisina requiere un potencial de membrana (negativo en el interior) o un gradiente de pH (alcalino en el interior) (Gao *et al.*, 1991). La actividad antimicrobiana de la nisina es menor en células en fase estacionaria que en las de crecimiento exponencial, puesto que tanto el potencial de membrana como el gradiente de pH, son menores en las primeras que en las segundas.

La actividad de la nisina resulta influida también por la presencia de cationes di- y trivalentes, que neutralizan las cargas negativas de los fosfolípidos de la membrana, provocando su condensación y haciendo que la membrana se vuelva más rígida. De este modo, la eficacia de la nisina para insertarse y formar los poros resulta disminuía

(Venema *et al.*, 1995). La nisina tiene también menor actividad a temperaturas por debajo de 7 °C, probablemente porque la reordenación de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos impide la inserción de la nisina en la membrana (Abee, 1994).

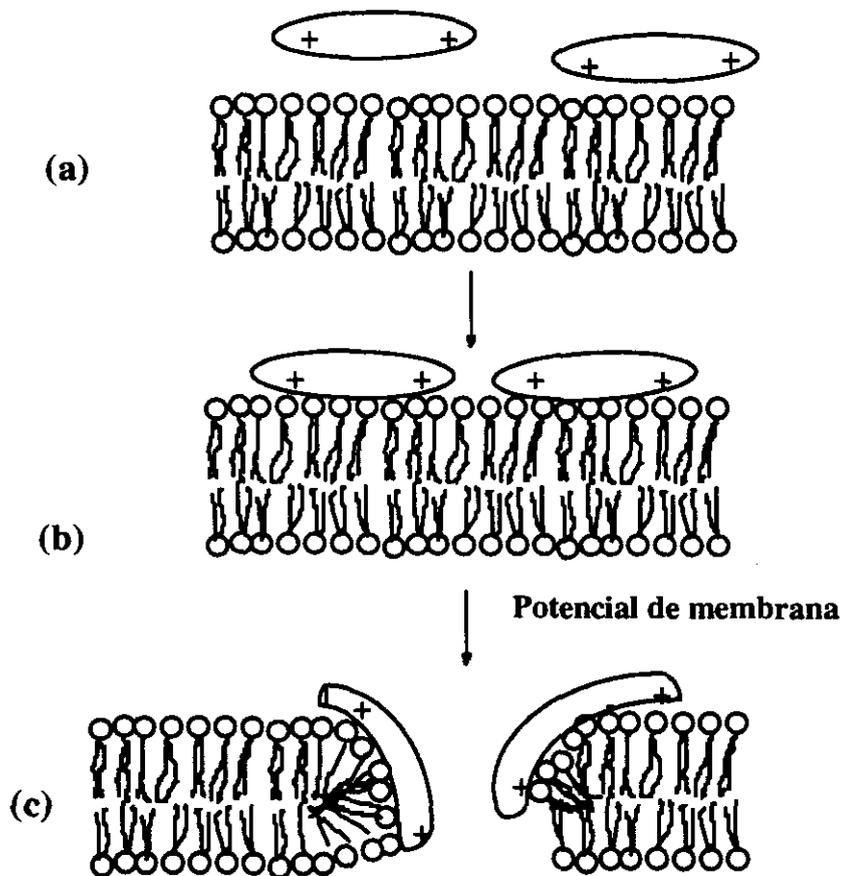
El tamaño y el carácter anfifílico de la nisina, hacen sospechar que los poros están constituidos por agregados de nisina. Existen dos modelos que explican cómo la nisina da lugar a la formación de poros en la membrana (Abee, 1995; Moll *et al.*, 1996). Por un lado, según el mecanismo de "barril", la nisina se uniría a la superficie de la membrana y la presencia de un gradiente de potencial la dirigiría hacia su interior, donde se insertarían varias moléculas orientándose alrededor de un poro central. La orientación se produciría de manera que las zonas hidrofóbicas encararían el interior de la membrana y las zonas hidrofílicas formarían el interior del poro. Probablemente, primero se produce la inserción y a continuación la agregación de las moléculas (figura I.5.).



**Figura I.5. Formación de poros por la nisina según el modelo de "barril". (a) Vista lateral del poro. (b) Corte transversal del poro, su tamaño dependerá de la cantidad de moléculas de nisina agrupadas. Las flechas indican la pérdida de moléculas a través de la membrana.**

Por otro lado, según el modelo de "cuña", las moléculas de nisina adheridas a la superficie celular provocarían la desestabilización de la bicapa lipídica favoreciendo la formación de los poros. El potencial de membrana cambia la orientación relativa de la molécula de nisina respecto de la membrana, adoptando la forma de cuña, por lo que al arrastrar a los fosfolípidos unidos a la nisina, se induce una curvatura local de la

superficie de la membrana, dando lugar a los poros rellenos de agua cuando suficientes moléculas de nisina colaboran para doblar y alterar localmente la bicapa lipídica. Como se sugiere por los estudios de RMN, la nisina expondría su zona cargada hacia la fase acuosa. Según este modelo, la ordenación de las moléculas de nisina provocarían una alteración de la bicapa lipídica al forzar a los lípidos a adoptar una conformación termodinámicamente desfavorable. Los poros formados son por tanto intrínsecamente inestables y por ello intentarán reordenarse de nuevo en la estructura de bicapa.(figura I.6.)



**Figura I.6. Formación de poros por la nisina según el modelo de "cuña".**

(a). La nisina está en solución en el exterior de la célula. (b). A continuación, se une a la superficie de la membrana cargada negativamente, dando lugar a una elevada concentración local y alteración de la dinámica lipídica. (c). En presencia de un potencial de membrana por encima del umbral, la nisina se inserta en la membrana, arrastrando consigo a los fosfolípidos negativos a los que se encuentra unida, dando lugar a la formación de un poro en forma de cuña. *Fuente: G.N. Moll y col. (1996).*

El tamaño de los poros varía de 0,2 a 1 nm, probablemente el tamaño de los agregados determina el tamaño de los poros y el de las moléculas que pueden atravesar la membrana (Piard y Desmazeaud, 1992). Los compuestos de 500 Da pueden atravesar poros de 1 nm de diámetro.

#### 2.3.2.2. Actividad frente a los esporos bacterianos sensibles

---

Este efecto se produce tras la germinación del espora, pero antes de su desarrollo, la nisina modifica covalentemente los grupos sulfidrido de los componentes de la membrana del espora, originando la inhibición de su crecimiento (Morris *et al.*, 1984). Las cadenas laterales insaturadas de los deshidroaminoácidos son las responsables de este efecto, al actuar como aceptores de electrones (Liu y Hansen, 1992). La reactividad de estos residuos con mercaptanos y la completa pérdida de la actividad de los mutantes a los que se les ha sustituido el residuo DHA<sup>5</sup> por Ala, apoyan esta hipótesis (Chan *et al.*, 1989; Liu y Hansen, 1990). En este caso, el compuesto formado mantiene su capacidad bactericida pero pierde su efecto de inhibición de la germinación de los esporos, por lo que el mecanismo de acción de estos dos efectos antimicrobianos es distinto.

Como ya se ha indicado previamente, el tratamiento térmico favorece la acción inhibitoria de la nisina en los esporos microbianos. La adición de tripsina (que no destruye a la nisina), elimina el efecto letal de la nisina en los esporos tratados térmicamente, probablemente porque comparten los mismos receptores, de manera que en presencia de la tripsina, se inhibe la unión de la nisina al espora (Hurst, 1981; Tramer y Fowler, 1964).

#### 2.3.2.3. Actividad inhibitoria de la síntesis de la pared celular

---

Este efecto se produce porque la nisina interacciona con los lípidos intermediarios de la biosíntesis de la mureína, inhibiendo su síntesis. Sin embargo, se necesitan grandes concentraciones de nisina para ejercer esta acción, unas 1600 UI/ml, cantidad 1000 veces superior a la concentración inhibitoria mínima para *Bacillus stearothermophilus*, por lo que no se puede considerar que se trate de un efecto primario (Reisinger *et al.*, 1980). Además, el complejo nisina-mureína podría estar implicado en la interacción inicial de la nisina con la célula y/o en su transporte hacia la membrana (Harris *et al.*, 1992b).

#### 2.3.2.4. Actividad frente a las enzimas autolíticas de las células sensibles

---

La nisina es capaz de inducir dos sistemas autolíticos en *Staphylococcus cohnii*, uno mediado por un enzima de tipo muramidasa y otro de tipo glucosamidasa (Bierbaum y Sahl, 1985). Dichos enzimas normalmente se mantienen inactivos al estar unidos a los ácidos teicoico, lipoteicoico y teicurónico de la pared celular. La nisina, al igual que otros

péptidos sintéticos de características similares, como la polilisina, posee también una afinidad elevada por estos sustratos, compitiendo con los enzimas por su unión. La liberación de estos enzimas origina su activación (Bierbaum y Sahl, 1987). Teniendo en cuenta que la actividad autolítica depende de la cationicidad del péptido que interacciona con la célula, parece que la liberación enzimática se realiza mediante un proceso de intercambio iónico. Por microscopía electrónica se ha observado que la activación de estos enzimas parece ser predominante en la zona del septo entre las paredes bacterianas de dos células contiguas.

### 2.3.3. Relación estructura-actividad

La región flexible existente entre los anillos ABC y DE determinada por RMN (Van den Hooven *et al.*, 1993), podría actuar como una "bisagra" que permitiría, según el modelo de "cuña", que la molécula se doblase y arrastrase los lípidos de la superficie para formar el poro (Driessen *et al.*, 1995). Los intentos realizados para inmovilizar estos anillos mediante la eliminación de los residuos 20 y 21, o su sustitución por residuos de prolina, han resultado en una pérdida considerable de la actividad antimicrobiana (Moll *et al.*, 1996).

Desde siempre se ha considerado que los residuos de deshidroaminoácidos constituirían un papel importante en la actividad de esta molécula. Para determinar el papel de los residuos de DHA en las posiciones 5 y 33, se han estudiado los dos principales productos de la degradación de la nisina, la nisina 1-32 (que ha perdido los dos últimos aminoácidos, DHA<sup>33</sup> y Lys<sup>34</sup>) y la (des-Ala<sup>5</sup>)nisina 1-32 (donde la ruptura en la posición 5 destruye el anillo de lantionina). Estos compuestos se forman tras un almacenamiento prolongado o a consecuencia de un calentamiento de la nisina en medio ácido.

La eliminación del residuo DHA<sup>33</sup>, dando lugar a la molécula de nisina 1-32, no supone una pérdida en la actividad antimicrobiana. Además, otro producto de degradación que presenta la DHA<sup>33</sup> sustituida por Ser, es tan activo como la molécula de nisina (Rollema *et al.*, 1991). Estas observaciones sugieren que el residuo DHA<sup>33</sup> no es esencial en la actividad antimicrobiana de esta molécula. Por el contrario, el residuo DHA<sup>5</sup> sí parece ejercer un papel importante, puesto que la pérdida de este residuo en el producto de degradación (des-Ala<sup>5</sup>)nisina 1-32, da lugar a una sustancial pérdida de actividad (Chan *et al.*, 1989). Inicialmente, no se conocía bien si este efecto se debía a la pérdida del residuo de DHA *per se*, o al cambio de conformación consecuente a la apertura del anillo A (Lian *et al.*, 1991; 1992). Esto ha sido estudiado recientemente por Chan *et al.* (1996), al obtener un derivado de la nisina que mantiene la estructura del anillo A, pero que tiene la DHA<sup>5</sup> sustituida por Ala (al cambiar la Ser<sup>5</sup> por Ala en el péptido precursor). Este

derivado de la nisina tiene una actividad similar frente a las células vegetativas pero, sin embargo, su actividad frente a los esporos bacterianos es mucho más reducida que la de la molécula nativa; resultados similares se obtuvieron previamente con la subtilina (Liu y Hansen, 1993). Los resultados obtenidos sugieren que tanto la nisina como la subtilina tienen dos efectos biológicos distintos que, probablemente, se producen por dos mecanismos moleculares diferentes: por un lado inhiben el crecimiento bacteriano y, por otro, inhiben la germinación de los esporos. Asimismo, en el caso del derivado (des-Ala<sup>5</sup>)nisina 1-32, es la pérdida de la estructura del anillo la que determina la pérdida de la actividad microbiana, ya que si se mantiene la estructura del anillo, sustituyendo la DHA por Ala, no se reduce la inhibición de las células vegetativas. El anillo A, por lo tanto, es esencial para ejercer el efecto sobre las células vegetativas, mientras que la DHA en posición 5 es necesaria para la inactivación de los esporos. También se ha determinado que la distorsión de este anillo producida por la sustitución de D-Ala por D-Abu en la posición 3 (al sustituir el codón que codifica Ser por Thr en el gen estructural y que da lugar a la formación de un anillo de βmetil-lantionina en lugar del anillo de lantionina en la molécula madura), ocasiona la pérdida casi completa de su actividad antimicrobiana (Kuipers *et al.*, 1996).

El anillo C es asimismo esencial para la actividad antimicrobiana, ya que la rotura proteolítica entre Ala<sup>15</sup>-Leu<sup>16</sup> (Chan *et al.*, 1993, 1995b), conduce a la pérdida total de actividad. El estudio de otros fragmentos derivados de la proteólisis de la nisina, ha permitido identificar otros residuos importantes en su actividad. Por ejemplo, mientras que la nisina 1-32 tiene actividad completa, el derivado nisina 1-29 (sin los residuos Ile<sup>30</sup>-His<sup>31</sup>-Val<sup>32</sup>) conduce a una disminución de su actividad en unas 30 veces (Chan *et al.*, 1993, 1995b). El fragmento de nisina 1-12 es de particular interés, puesto que siendo de por sí inactivo, antagoniza el efecto antibacteriano de la molécula de nisina completa (Chan *et al.*, 1995). Esto sugiere que los anillos A, B y C se requieren para la unión con la célula, pero que otras partes del extremo carboxilo-terminal de la molécula se requieren además para la formación de los poros. Queda por establecer si los anillos A, B y C están implicados en la oligomerización de la nisina y/o en su unión a los fosfolípidos de la membrana.

Según el modelo de "cuña", la unión de la nisina se produciría por interacción electrostática entre la zona catiónica de la molécula y las cargas negativas de los fosfolípidos de la membrana (Moll *et al.*, 1996). Otros estudios han demostrado que la carga positiva de la posición 12 no es esencial para la actividad antimicrobiana. Por el contrario, para que la actividad sea óptima los grupos imidazol de las His 27 y 31 deben

estar protonados. La sustitución de la His 27 por Asp (como ocurre en la nisina Z) o por Lys, no altera la actividad antimicrobiana, aunque mejora su capacidad de difusión.

En resumen, puede considerarse que los anillos A, B y C están implicados en la unión de la nisina a las células y en la oligomerización de la molécula, mientras que las cargas positivas del extremo carboxilo-terminal son las responsables de su inserción en la membrana para dar lugar a la formación de poros (Moll *et al.*, 1996).

#### 2.3.4. Resistencia e inmunidad

Existen tres tipos diferentes de resistencia a la nisina: la resistencia transferible, la espontánea y la inmunidad. La resistencia transferible a la nisina, observada en algunos microorganismos, es un factor independiente no ligado genéticamente a la producción de nisina. En algunos casos, los determinantes de la resistencia a la nisina se han encontrado asociados a plásmidos, como en *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (plásmido pNP40, McKay y Baldwin, 1984) y en *L. lactis* subsp. *lactis* (plásmido pTR1040, Klaenhammer y Sanozky, 1985; plásmido pSF01, von Wright *et al.*, 1990). Los determinantes de la resistencia a la nisina de los plásmidos pNP40 y pSF01 se han clonado y expresado en cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*. El análisis de la secuencia del gen de interés de pN40 reveló un marco abierto de lectura que codifica una proteína de 319 aminoácidos (Froseth y McKay, 1991). De la secuencia de aminoácidos se ha sugerido una ubicación en la membrana, sin embargo, la función de esta proteína es, hasta la fecha, desconocida. Una sonda de oligonucleótidos diseñada a partir de el gen de resistencia del pNP40 no hibridó con fragmentos digeridos del ADN de la cepa productora de nisina *L. lactis* ATCC 11454, lo que indica que este gen es distinto al que confiere la inmunidad en la cepa productora (Froseth y McKay, 1991). La resistencia de este tipo está generalmente asociada a otras ventajas competitivas como la de la resistencia a bacteriófagos (Dykes, 1995).

En otros organismos, la resistencia a la nisina está mediada por la producción de un enzima reductasa que destruye a la nisina (nisinasa). La inactivación de la nisina se produce a consecuencia de la modificación de uno o varios de sus residuos de deshidroaminoácidos (Jarvis, 1970, Jarvis y Farr, 1971). Este enzima se ha descrito en *Lactobacillus plantarum*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus* y varias especies del género *Bacillus* (Harris *et al.*, 1992b).

Por otro lado, existe también una resistencia espontánea que se observa cuando se cultivan cepas sensibles a la nisina en presencia de cantidades subletales de ésta, lo que

origina la aparición de mutantes resistentes. En estos casos, la aparición de resistencias podría estar asociada a la alteración de ciertos componentes de la membrana o de la pared celular, lo que evitaría la adhesión o el funcionamiento de la bacteriocina (Dykes, 1995).

La inmunidad propiamente dicha a la nisina, es aquella que posee la cepa productora para protegerse a sí misma (Venema *et al.*, 1995). La proteína de inmunidad está codificada en el operón de la nisina por el gen *nisI*. NisI es una lipoproteína anclada en el exterior de la membrana citoplasmática (Kuipers *et al.*, 1993a). La clonación y la expresión del gen *nisI* en cepas de *E. coli* y de *L. lactis* determina la inmunidad de los transformantes a la nisina, aunque el mecanismo exacto de su actividad todavía no se conoce con exactitud (Kuipers *et al.*, 1993a; Engelke *et al.*, 1994).

Recientemente, se han descrito otros tres genes relacionados con la inmunidad a la nisina : *nisF*, E y G. El gen *nisG* codifica por una proteína hidrofóbica que podría actuar de una manera similar a como actúan las proteínas de inmunidad frente a las colicinas, que interaccionan directamente con las moléculas de colicina cerrando los poros creados por estas bacteriocinas. Las proteínas NisE y NisF poseen una secuencia similar a la de los transportadores tipo ABC, por lo que podrían transportar al lantibiótico al exterior de la célula (Siegers y Entian, 1995), aunque dicho mecanismo no ha sido todavía bien evaluado.

Otros mecanismos de inmunidad, que incluyen la inhibición de la adsorción a la membrana o del ensamblaje de los poros, podrían también contribuir al nivel total de inmunidad. Potencialmente, todas las proteínas de la maquinaria biosintética tienen afinidad por la nisina y podrían, por tanto, interaccionar con ella. Estas proteínas forman en su mayor parte un complejo localizado en la membrana de la célula productora. Se ha observado que para conseguir un nivel de inmunidad equivalente al de la cepa salvaje, se requiere la presencia de todos los componentes de la maquinaria biosintética. (Saris *et al.*, 1996).

### 2.3.5. Papel fisiológico de la nisina en las cepas productoras

Aunque gran cantidad de microorganismos poseen actividad bacteriocinogénica, el papel concreto de las bacteriocinas en las poblaciones mixtas no está todavía claro. La ventaja competitiva que supone la producción de bacteriocinas, se ha demostrado al observar la predominancia de las cepas productoras de bacteriocinas en poblaciones bacterianas modelo (*in vivo* e *in vitro*). Asimismo, el papel específico de las cepas productoras de nisina en los ecosistemas naturales está todavía sin determinar. Existen

varias teorías en cuanto al papel de la nisina en las cepas productoras (Hurst, 1981; de Vuyst y Vandamme, 1994):

#### **2.3.5.1. Papel como factor competitivo**

Es evidente que la capacidad de producir compuestos antimicrobianos, que puedan inhibir a otras bacterias que compitan por los mismos recursos, supone una ventaja dentro de la población bacteriana. La nisina asegura la dominancia del microorganismo productor cuando compete con otros organismos. El hábitat natural de los microorganismos productores de nisina no se conoce con exactitud, aunque se sabe que forman parte de la flora presente de forma natural en la leche cruda, junto con con otros lactococos lácticos. Según Hirsch (1952), este nicho ecológico es nuevo para estos microorganismos y surgió a partir de la domesticación de los animales productores de leche. Actualmente se cree que el hábitat original de los lactococos lácticos productores de nisina eran las plantas (Harris *et al.*, 1992a). Al coincidir varias especies en este nuevo sustrato, desarrollaron mecanismos de competición, de modo que *L. lactis* produce nisina y *L. cremoris*, también presente en la leche, es el microorganismo más sensible a esta y, paralelamente, *L. cremoris* produce diplococina y *L. lactis* es el microorganismo más sensible a ella (Hirsch y Grinsted, 1951; Hirsch, 1952). Además, el hecho de que las características necesarias para crecer en sustratos lácteos, como son la fermentación de la lactosa, la actividad proteásica y la resistencia a los fagos están codificadas en plásmidos corrobora este argumento (McKay, 1983).

#### **2.3.5.2. Papel como regulador del crecimiento celular**

Estudios realizados por Hurst (1981), sugieren que la nisina tiene una acción reguladora del crecimiento del microorganismo productor, participando activamente en el comienzo y en el final del crecimiento. En las cepas no productoras de nisina, esta función se supliría por otros péptidos (nisinoides) con características similares a la nisina pero biológicamente inactivos (Hurst, 1978).

#### **2.4. Biosíntesis de la nisina**

Monitorizando mediante marcadores radiactivos la actividad bioquímica de las células de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* productoras de nisina, Hurst (1966a, b) observó que la biosíntesis de la nisina en un medio químico definido no se inhibía por la mitomicina C, un inhibidor de la replicación del ADN, pero sí por la actinomicina D, un inhibidor de la síntesis de ARN, sugiriendo que la biosíntesis de la nisina no dependía del ADN recién formado, pero sí del ARNm. Además, los inhibidores de la biosíntesis de proteínas como el cloranfenicol, la puromicina o la terramicina (Hurst, 1966b; Ingram, 1970) y la clortetraciclina (Ingram, 1970), inhibían la biosíntesis de la nisina, tanto antes

como después de su iniciación. Estos resultados hicieron sospechar que la biosíntesis de la nisina no se realizaba mediante complejos multienzimáticos, como en el caso de los antibióticos peptídicos, sino que se trataba de un mecanismo de síntesis ribosomal. Esta hipótesis se confirmó con los estudios realizados por Ingram (1969, 1970), que siguió la incorporación de los aminoácidos serina, treonina y cisteína marcados radioactivamente en la biosíntesis de la nisina, observando que aunque estos aminoácidos no están presentes en la molécula madura de nisina, se incorporaban a la cadena polipeptídica durante su biosíntesis. El producto final era además sensible a los inhibidores de la biosíntesis de proteínas. Ingram concluyó que los aminoácidos serina y cisteína, por un lado, y treonina y cisteína por otro, eran los precursores en la formación de lantionina y b-metil-lantionina, respectivamente. Postuló que la serina, treonina y cisteína se incorporaban inicialmente en un péptido precursor y, a continuación, la deshidratación de las serinas en las posiciones 3, 5 y 33 y de la treonina en las posiciones 2, 8, 13, 23 y 25 daban lugar a la formación de los aminoácidos  $\alpha,\beta$ -insaturados deshidroalanina y deshidrobutirina respectivamente. Por otro lado, la adición de la cisteína en la posición 7 y las de las posiciones 11, 19, 26 y 28 al doble enlace de la deshidroalanina en la posición 3 y a la deshidrobutirina en las posiciones 8, 13, 23 y 25, daba lugar a la formación de los anillos de lantionina y 3-metil-lantionina, respectivamente. Continuando con esta hipótesis, postuló un mecanismo de biosíntesis de la nisina en dos pasos: en primer lugar, la síntesis ribosomal de un precursor polipeptídico biológicamente inactivo de mayor peso molecular, que contendría los aminoácidos normales, incluyendo las serina, treonina y cisteína; a continuación, este péptido precursor se convertiría en la molécula madura biológicamente activa, por acción de uno o varios enzimas, que serían responsables de la deshidratación de la serina y la treonina y de la formación de los anillos tioéter (aunque esta última reacción también se podría dar espontáneamente (Weil *et al.*, 1990).

En la actualidad, los avances en biología molecular han permitido demostrar la síntesis ribosomal de la nisina y la de otros lantibióticos a partir de moléculas precursoras denominadas prepéptidos (Jung, 1991; Jung y Sahl, 1991), que posteriormente sufren modificaciones post-traduccionales. Estas incluyen la modificación de los aminoácidos y la eliminación de las secuencias líder (Kaletta y Entian, 1989). El precursor de la nisina A (prenisina), es una molécula de 57 aminoácidos compuesta por una secuencia líder de 23 residuos, seguido de una secuencia de 34 aminoácidos que se corresponde con la nisina madura, excepto que contiene serina, treonina y cisteína en lugar de los aminoácidos modificados correspondientes (Buchman *et al.*, 1988; Kaletta y Entian, 1989; Dodd *et al.*, 1990). Los mecanismos de modificación postraduccional hipotetizados por Ingram se han confirmado a nivel molecular. Actualmente se considera que el primer paso en la biosíntesis de la nisina sería la deshidratación de serina y treonina en el prepéptido para

formar DHA y DHB y, a continuación, la formación de los anillos de lantionina y  $\beta$ -metil-lantionina por la adición de los grupos sulfhidrilo de las cisteínas vecinas a los dobles enlaces de DHA o DHB, seguido de la escisión de la secuencia líder.

#### 2.4.1. Localización y organización de los determinantes genéticos de la biosíntesis de la nisina.

El mecanismo molecular de la biosíntesis de la nisina, es un fenómeno complejo en el que no sólo participa el gen estructural, sino que también requiere de la presencia de otros genes encargados de la modificación de los aminoácidos, la eliminación del péptido líder, el transporte a través de la membrana citoplasmática y el desarrollo de la inmunidad o autoprotección de la bacteria productora. En los últimos años se han descubierto y secuenciado los genes responsables, observando que se encuentran próximos al gen estructural, relacionados con éste y organizados, al menos en parte, en operones. También se han identificado los productos de estos genes y sus funciones, en muchos casos deduciéndolas por comparación de su secuencia con la de otras proteínas conocidas. A la organización de estos genes se le ha denominado en inglés *gene cluster*, este término indica un grupo de genes relacionados, con varios promotores y terminadores, localizados en varios operones. No obstante, para simplificar la terminología a partir de este momento hablaremos del operón de la nisina, teniendo en cuenta que esta denominación supone una simplificación de este concepto y que no es totalmente correcta.

El operón de la nisina tiene un tamaño aproximado de 11 kpb y comprende los genes *nisABTCIPRKFE*G (Entian y de Vos, 1996). Estos genes, junto con al menos los genes para el metabolismo de la sacarosa, se encuentran en transposones o elementos genéticos transponibles de, aproximadamente, 70 kpb como el *Tn5301* (Dodd *et al.*, 1990; Horn *et al.*, 1991) o el *Tn5276* (Rauch y de Vos, 1992a). El gen estructural (*nisA*), que codifica el péptido precursor se sitúa en el extremo 5' del transposón, justo a 800 pb de la secuencia de inserción, mientras el resto de los genes se localizan a continuación y se transcriben en la misma dirección (Jack *et al.*, 1995) (figura 1.7.).

Inicialmente se contempló una localización plasmídica de los determinantes genéticos de la nisina (Kozak *et al.*, 1973; 1974), puesto que las técnicas de curado de plásmidos aumentaban la frecuencia con la que diversas cepas de *Lactococcus lactis* perdían la capacidad de producir la nisina. Sin embargo, el aislamiento de cepas productoras de nisina carentes de plásmidos (Davey y Pearce, 1982, Fuchs *et al.*, 1975), permitió que Steen *et al.*, (1991) postulasen que el gen *nisA* debía estar localizado en el

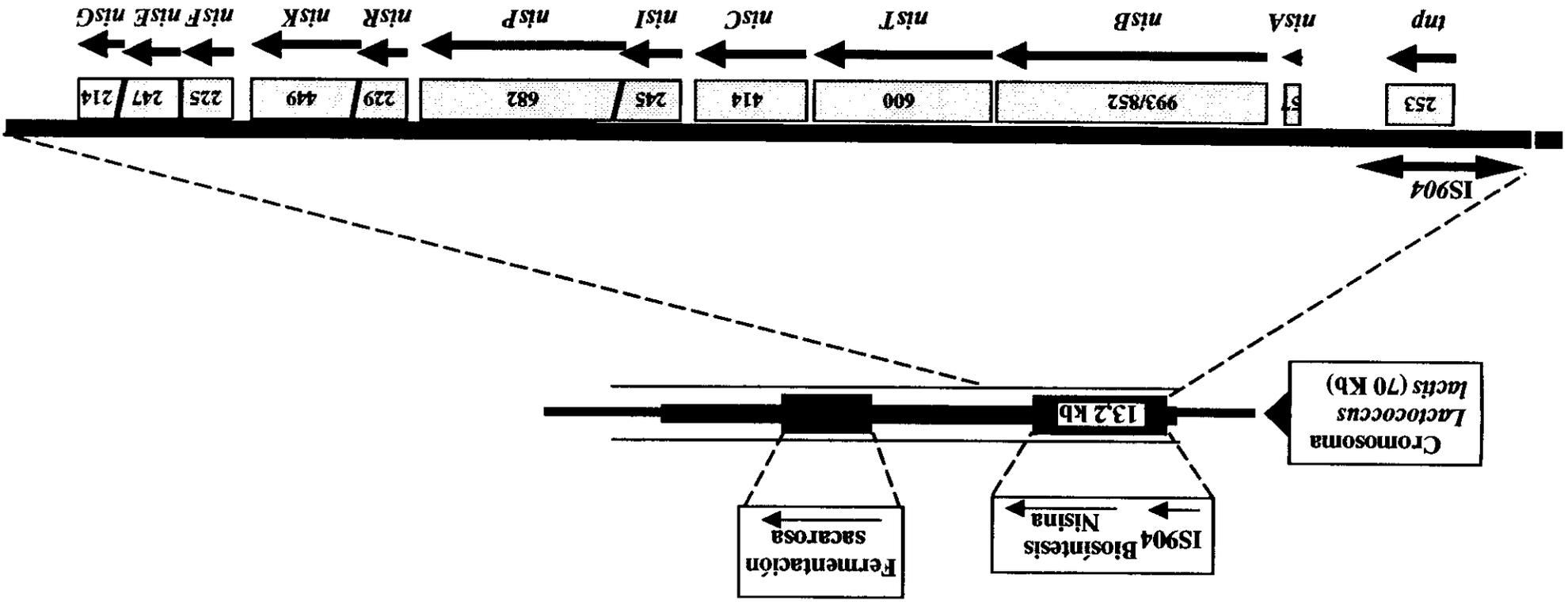


Figura 1. 7. Organización de los genes de la biosíntesis de la nisina en el cromosoma de *Lactococcus lactis*. Los números de los cuadros puntuados se refieren al número de aminoácidos de cada proteína.  
Fuente: J.M. Rodríguez (1996).

cromosoma de *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC11454, ya que dicho gen hibridaba con fragmentos de restricción demasiado grandes como para encontrarse en un plásmido.

La evidencia definitiva de que dichos genes se localizan en el cromosoma se obtuvo tras clonar y caracterizar el gen estructural (*nisA*). El conocimiento de este gen y de las secuencias de ADN adyacentes, facilitó el diseño de sondas génicas. Fueron Dodd *et al.* (1990), los que demostraron definitivamente la ubicación cromosómica de estos genes al conseguir, a partir de una cepa de *L. lactis* no productora de nisina y carente de plásmidos (*L. lactis* MG1614), un transconjugante productor de nisina por conjugación con una cepa productora de nisina (*L. lactis* NCFB894). Mediante experiencias de hibridación se demostró que el cromosoma de la cepa receptora carente de plásmidos, *L. lactis* MG1614, había adquirido un segmento de ADN que contenía el gen *nisA*. La secuenciación de este gen, reveló la presencia de una secuencia de inserción IS904 cerca del final del fragmento de ADN incorporado, 850 pares de bases (pb) antes del gen *nisA*. El análisis detallado de la relación genómica entre esta copia del IS904 y el gen *nisA* en diferentes transconjugantes productores de nisina, proporcionó la primera prueba formal de la localización física de los determinantes genéticos en el cromosoma de *L. lactis*. La secuenciación del fragmento de ADN localizado antes del IS904 identificó una repetición directa terminal de 6 pb (5'-TTTTTG-3') que definía el extremo de un transposón conjugativo de 70 kb denominado *Tn5301*. La electroforesis de campo pulsado (PFGE) del ADN cromosómico digerido con *Sma* I, estableció con precisión el tamaño y la localización cromosómica del *Tn5301* en los transconjugantes productores de nisina (Horn *et al.*, 1991). Un análisis de 10 transconjugantes distintos, derivados de una cepa receptora a partir de varias donantes, mostraron la preferencia de dos zonas diana del ADN cromosómico, donde se integraría el transposón de la nisina.

Posteriormente, otros investigadores obtuvieron las mismas conclusiones con otras cepas de *L. lactis* productoras de nisina. De esta manera, Rauch y de Vos (1992a,b), encontraron en la misma localización, un elemento prácticamente idéntico al IS904 en *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO R5, al que denominaron iso-IS904 o IS1068 y demostraron la existencia de otro transposón conjugativo, *Tn5276*, con una organización genética y unas repeticiones directas terminales idénticas a las del *Tn5301*. Ambos transposones se ajustan a la definición de transposones conjugativos (Rauch y de Vos, 1992a), es decir, son fragmentos de ADN que se insertan en diferentes lugares del cromosoma, codifican funciones adicionales a las estrictamente requeridas para su transposición y son autotransmisibles.

Existen dos circunstancias que claramente indican la unión genética existente entre la producción de nisina y la capacidad de fermentar la sacarosa. En primer lugar, en las experiencias de curado siempre se pierden la capacidad de fermentar la sacarosa y la de producir nisina conjuntamente (Leblanc *et al.*, 1980; Gasson, 1984; González y Kunka, 1985; Steele y McKay, 1986; Tsai y Sandine, 1987). En segundo lugar, ambos fenotipos se transfieren conjuntamente por conjugación desde diferentes cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* productoras de nisina a otras receptoras de la misma especie, incluyendo la variedad *diacetylactis* (Gasson, 1984; González y Kunka, 1985; Steele y McKay, 1986; Broadbent y Kondo, 1991; Rauch y De Vos, 1992a) y a otras cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* (Steele y McKay, 1986; Broadbent y Kondo, 1991). Las experiencias de curado y conjugación han demostrado también la presencia de otra información genética asociada a dichos caracteres, como es la resistencia a bacteriófagos (Broadbent y Kondo, 1991; Gireesh *et al.*, 1992; González y Kunka, 1985) y la producción de la N5-(carboxietil)ornitina sintetasa (Donkersloot y Thompson, 1990), aunque este último carácter no parece estar presente en todas las ocasiones (Thompson *et al.*, 1991).

### 2.4.1.1. Gen estructural *nisA* y su producto (prepronisina)

Tres grupos de investigación independientes secuenciaron y clonaron, casi simultáneamente, el gen estructural de la nisina (*nisA*), a partir de tres cepas distintas de *Lactococcus lactis* (Buchman *et al.*, 1988; Dodd *et al.*, 1990; Kaletta y Entian, 1989). La estrategia de los tres grupos fue similar, basándose en el empleo de sondas de oligonucleótidos degenerados, diseñadas a partir de la secuencia aminoacídica de la nisina propuesta por Ingram (1970). En los tres casos la secuencia del gen *nisA* era idéntica aunque se observaron ciertas diferencias en las secuencias adyacentes. Como ya hemos indicado, el gen estructural (*nisA*) que codifica el péptido precursor se sitúa en el extremo 5' del transposón, justo a 800 pb de la secuencia de inserción.

El gen estructural da lugar al prepéptido de 57 aminoácidos denominado prenisina, que consiste en una secuencia líder de 23 residuos en el extremo N-terminal seguida de la pronisina, de 34 residuos. La pronisina coincide totalmente con el modelo postulado por Ingram (1970), mientras las modificaciones post-traduccionales ocurren exclusivamente en la zona del propéptido (Jack *et al.*, 1995).

Mediante mutaciones de determinados residuos de la secuencia del líder se ha observado que algunos de ellos son esenciales en la biosíntesis de la nisina. De este modo, modificaciones en la zona de corte (especialmente a nivel -1 y -4) afectan al procesado de la molécula, e impiden que se produzca la separación del propéptido, originando la acumulación extracelular del péptido precursor inactivo, que puede ser

activado por rotura enzimática con tripsina, liberando la nisina activa (van der Meer *et al.*, 1994). Dichos resultados sugieren que la separación de la secuencia líder es el último paso en la maduración de la nisina, y que es necesaria para liberar el péptido activo. Por otro lado, mutaciones en los residuos de las posiciones -15, -16 o -18 impiden que se detecte la secreción o acumulación intracelular de la nisina o de sus precursores, lo que sugiere que participan en la biosíntesis de la nisina y podrían interaccionar con los enzimas de la maduración y/o con el sistema de transporte (van der Meer, 1994). Dichos residuos parecen, por lo tanto, esenciales para que actúe la maquinaria biosintética. Se han obtenido también quimeras constituidas por el líder de la subtilina con el propéptido de la nisina. En este caso, la maquinaria biosintética, con la excepción de la proteasa, reconoce el péptido híbrido y origina moléculas de nisina madura, aunque con el péptido líder unido a ellas (Kuipers *et al.*, 1993b). Sin embargo, al intentar el efecto contrario (unir el líder de la nisina con el propéptido de la subtilina) no se obtuvieron moléculas maduras de subtilina (Rintala *et al.*, 1993).

#### **2.4.1.2. Genes relacionados con la maduración (*nisB* y *nisC*) y sus productos**

A 108 pb de la terminación del gen *nisA* se encuentra el inicio de otro marco abierto de lectura que corresponde al gen *nisB* (Buchman *et al.*, 1988; ; Dodd *et al.*, 1990; Kaletta y Entian, 1989). Este gen codifica una proteína de 993 aminoácidos y 117,5 KDa en *L. lactis* 6F3 (Engelke *et al.*, 1992) o de 852 aminoácidos y 100,5 KDa en *L. lactis* ATCC11454 (Steen *et al.*, 1991). A pesar de la diferencia de tamaño, no existen diferencias significativas en la producción de nisina en las dos cepas, lo que sugiere que el extremo C-terminal de la proteína NisB no juega un papel fundamental en la biosíntesis. En ambos casos, antes del codón de iniciación ATG siempre se encuentra, a una distancia adecuada, una secuencia de Shine-Dalgarno 5'-GAGAGG, que actuaría como promotor. La proteína NisB comparte notables homologías con las proteínas de lantibióticos similares, como la SpaB (Chung y Hansen, 1992; Klein *et al.*, 1992) y EpiB (Schnell *et al.*, 1992).

A continuación del gen *nisB* se encuentra el *nisT* y solapado con su extremo 3' se encuentra el *nisC*. Este último codifica una proteína (NisC) de 414 aminoácidos con un peso molecular de 47,3 KDa. Este gen posee homologías significativas con los genes *spaC* (Klein *et al.*, 1992) y *epiC* (Augustin *et al.*, 1992; Schnell *et al.*, 1992), de los operones de la subtilina y epidermina, respectivamente.

Las proteínas NisB y NisC no muestran homologías con otras proteínas presentes en las bases de datos, salvo con los productos de genes similares en microorganismos productores de otras bacteriocinas, lo que sugiere que participan en procesos

biocatalíticos no descritos anteriormente, por esto se pensó que estos genes podrían ser los responsables de las modificaciones post-traduccionales de la nisina. De hecho, estudios realizados con mutantes demostraron que alteraciones del gen *nisB* o del *nisC* eliminan totalmente la producción de nisina (de Vos *et al.*, 1995; Kuipers *et al.*, 1993; 1995; Siegers *et al.*, 1996). Este efecto podría ser el resultado del fallo en el sistema de autorregulación de la nisina, que, como veremos posteriormente, requiere la presencia de nisina madura en el medio para inducir la expresión de todos los genes del operón. La existencia de alteraciones de los genes citados origina el cese temporal de la producción de nisina madura y como cesa el efecto inductor, cesa también la transcripción de los genes, como lo demuestra la ausencia de ARNm *nisA* y no se produce la nisina madura (Kuipers *et al.*, 1995). Sin embargo, dicho efecto se elimina si se añade nisina madura en el medio para inducir la expresión del gen *nisA*. No obstante, al hacer esto en este caso, tampoco se observa la producción de nisina madura en los mutantes, lo que sugiere que dichos genes parecen ser esenciales en la maduración .

El mecanismo por el que las proteínas NisB y NisC catalizarían las reacciones de deshidratación y formación de las uniones tioéter, todavía no se ha determinado completamente, si bien estudios similares con el lantibiótico Pep5 sugieren que la proteína PepB es responsable de la deshidratación de los aminoácidos, mientras que la PepC se encargaría de catalizar la formación de los anillos tioéter a partir de los residuos deshidratados y la cisteína (Meyer *et al.*, 1995). La homología de estas proteínas con las NisB y NisC permiten sospechar que el proceso de maduración de la nisina sea similar. También existe una cierta similitud entre la proteína NisB y la IivA de *E. coli*, una treína deshidratasa, lo que confirmaría la hipótesis de una función deshidratasa de la proteína NisB (Gutowski-Eckel *et al.*, 1994).

Empleando vesículas de *L. lactis* y mediante estudios de co-sedimentación, se observó que la proteína NisB cosedimenta con la fracción vesicular y únicamente puede separarse de ésta tras un tratamiento con dodecil sulfato sódico (SDS). Además los análisis por transferencia de proteínas (Western blot) mostraron que la proteína NisB se encuentra estrechamente unida a la fracción vesicular de *L. lactis* (Engelke *et al.*, 1992). Dichos resultados sugieren que esta proteína se encuentra asociada a la membrana citoplasmática, como indica su naturaleza hidrofóbica, por lo que la biosíntesis de la nisina podría localizarse en este lugar, al igual que sucede con otros lantibióticos (Schnell *et al.* 1988). El anclaje de la proteína NisB se localiza en el lado citoplasmático de la membrana celular.

Recientemente, la coimmunoprecipitación del prepeptido con las proteínas NisB y NisC sugiere que ambas proteínas se encuentran asociadas en la membrana celular, formando un complejo multimérico denominado lantionina-sintetasa, que catalizaría la maduración de la nisina (Sieggers *et al.*, 1996). Además, también se ha evidenciado la interacción física de NisC con el transportador NisT. El complejo lantionina-sintetasa, estaría por lo tanto formado por la proteína NisB, al menos dos unidades de NisC y, además, otras dos unidades del transportador NisT (Sieggers *et al.*, 1995). En los estudios de co-inmunoprecipitación, se ha observado que al interaccionar NisA con NisB, la región del líder queda enmascarada al estar probablemente envuelta en la interacción con NisB. Posiblemente, el líder es necesario para el reconocimiento de NisA por la proteína NisB, mientras que la unión de NisA con NisC se realiza en la región del propéptido.

#### **2.4.1.3. Gen responsable del sistema de transporte: nisT**

La nisina ejerce su mecanismo de acción fuera del microorganismo productor, por lo que es necesario que, una vez sintetizada, sea expulsada al exterior a través de la membrana citoplasmática, este papel lo realiza la proteína NisT. El gen *nisT* se localiza a continuación del codón de terminación del *nisB*. El marco abierto de lectura comienza con un codón de iniciación ATG precedido por una secuencia 5'-TGAGGA, que podría actuar como lugar de unión al ribosoma. Además, en las posiciones -10 y -35 que preceden a este gen existen regiones que podrían actuar potencialmente como promotores (Engelke *et al.*, 1992).

El gen *nisT* codifica una proteína de 600 aminoácidos y 69 KDa, denominada nisT. Esta proteína tiene una homología del 43,8% con la proteína SpaT, involucrada en la biosíntesis de la subtilina (Engelke *et al.*, 1992; Kaletta *et al.*, 1991b; Klein *et al.*, 1992). La inactivación del gen *spaT* ha proporcionado evidencias acerca de su papel en el transporte de la subtilina, ya que los mutantes resultantes producen subtilina pero su crecimiento cesa mucho antes y sufren fenómenos de agregación, formando estructuras micelares, debido a la acumulación intracelular de la subtilina por defectos en el sistema de transporte (Klein *et al.*, 1992). En esta misma línea, se ha observado que la expresión de NisT en *E. coli* resulta muy tóxica para éste, lo que sugiere que esta proteína interfiere notablemente con el metabolismo celular (Engelke *et al.*, 1992). Por otro lado, una delección en este gen elimina la producción de nisina, aunque se detectó actividad en los lisados celulares (de Vos *et al.*, 1995, Qiao y Saris, 1996). Al complementar la cepa mutante con un plásmido portador del gen *nisT*, se recuperó la capacidad de producir nisina. Todo ello sugiere que NisT es la proteína encargada del transporte, y que la maduración del lantibiótico es independiente de este sistema.

La proteína NisT, al igual que la SpaT pertenece a la familia de los transportadores del tipo ABC, ATP-dependientes (Engelke *et al.*, 1992; Kuipers *et al.*, 1993a). Este tipo de proteínas transportadoras presentan dos dominios: una zona N-terminal, que se expande a través de la membrana y un dominio citoplásmico en el extremo C-terminal donde se produce la unión con el ATP, que proporciona la energía necesaria para el transporte (Higgins, 1992; Fath y Kolter, 1993) y que contiene la secuencia consenso Gly-Xaa-Gly-Lys-Ser-Thr. El dominio responsable de la unión con el sustrato todavía no se ha identificado.

#### **2.4.1.4. Gen responsable de la separación de la secuencia líder: nisP**

El gen *nisP* se encuentra a un par de bases del final del *nisI* (Engelke *et al.*, 1994; Van der Meer *et al.*, 1993). Comienza con un codón GTG, inusual en *L. lactis*, precedido a 6 pb por un lugar de unión al ribosoma AGGA y codifica una proteína (NisP) de 682 aminoácidos y 74 KDa. NisP posee una homología del 42% con la proteína EpiP, que participa en la maduración de la epidermina. La secuencia aminoacídica de NisP en *L. lactis* NIZO R5 y *L. lactis* 6F3 muestra una pequeña diferencia de un aminoácido (Van der Meer *et al.*, 1993; Engelke *et al.*, 1994), aunque esta diferencia no es importante para su actividad.

La búsqueda de proteínas homólogas en las bases de datos, ha mostrado que NisP posee características típicas de las serina-proteasas, especialmente de las del grupo de la subtilisina (Van der Meer *et al.*, 1993; Engelke *et al.*, 1994). Los aminoácidos característicos de los lugares activos y catalíticos de dicho grupo, también están fuertemente conservados en NisP. El extremo C-terminal podría actuar como anclaje en la membrana celular, sugiriendo que NisP se localiza en el exterior de la célula y unida a ella (Van der Meer, 1993). La secuencia primaria de NisP tiene las características típicas de una preproteína (Van der Meer *et al.*, 1993), lo que implica que NisP se sintetiza como una proteína precursora y, a continuación, se exporta a través de las envolturas celulares. La pro-NisP tendría que sufrir una maduración posterior para convertirse en una proteasa activa.

El sobrenadante de una cepa de *L. lactis* defectiva en el gen *nisP* no contenía nisina (Van der Meer *et al.*, 1993), pero presentó un péptido de mayor tamaño molecular, que al ser analizado resultó ser la nisina madura unida a la secuencia líder. Además, al incubar este péptido con membranas celulares que contenían la proteína NisP activa, se liberó la nisina madura, que conservaba su actividad antimicrobiana correspondiente. Por otro lado, la expresión de NisP en *E. coli* hidrolizó la prenisina, cuando ésta se añadió al sobrenadante. Estos resultados indican que la activación proteolítica extracelular de la

prenisina por la proteína NisP es el último paso en la biosíntesis de la nisina, y que uno de los papeles de la secuencia líder es la de mantener el prepéptido inactivo en el interior de la célula.

La estructura tridimensional del dominio catalítico de las serina-proteasas del tipo de la subtilisina está muy conservada (Siezen *et al.*, 1991), esto ha permitido realizar estudios de modelado molecular basados en la homología de las estructuras tridimensionales de la NisP con otras serina-proteasas. De este modo, se ha observado que la secuencia de aminoácidos del lugar de procesamiento de la prenisina, encaja específicamente en la región de unión al sustrato de la proteína NisP, siendo las zonas más importantes para la interacción la carga positiva de la posición Arg<sup>1</sup> (que interacciona iónicamente con uno o dos residuos de Asp del centro activo del enzima) y el residuo hidrofóbico de Ala<sup>4</sup> (que interacciona hidrofóticamente) (Siezen *et al.*, 1995). Esto se ha podido comprobar porque las mutaciones en los residuos Arg<sup>1</sup> y Ala<sup>4</sup> impiden la separación del líder de la nisina madura (Van der Meer *et al.*, 1994). Por otro lado, también se ha observado que cerca de la zona de unión con el sustrato existe una zona muy rica en aminoácidos aromáticos, que podría estar implicada en la unión a la membrana celular o a otras proteínas de membrana, como la NisT, formando parte de un complejo biosintético. Otra posibilidad es que esta zona podría servir como región de reconocimiento y unión al extremo hidrofóbico C-terminal del precursor de la nisina, que se corresponde con el péptido modificado.

Por otro lado, al sustituir la secuencia líder de la nisina por la de la subtilina, esta quimera se transportó eficientemente al exterior de la célula pero NisP no fue capaz de reconocer a la molécula y romperla, probablemente por la presencia de una Gln en la posición -1 (Kuipers *et al.*, 1993b). Curiosamente, la proteína NisP actúa como receptor para otro antibiótico, la carnocina UI49, de tal modo que, en comparación con otras bacterias lácticas, las cepas de *L. lactis* productoras de nisina son aproximadamente 10 veces más sensibles a esta bacteriocina (Stoffels *et al.*, 1993; 1994).

#### 2.4.1.5. Genes responsables de la inmunidad: *nisI*, *nisE*, *nisF* y *nisG*

El primer gen descrito implicado en la inmunidad de la nisina fue el *nisI*. Este gen se sitúa a continuación del *nisC* y su inicio se solapa con el codón de terminación de este último (Engelke *et al.* 1994; Kuipers *et al.*, 1993a). El inicio del gen *nisI* está precedido de un lugar de unión al ribosoma TGAAAGGAGG que coincide con el lugar consenso de unión del ribosoma para *L. lactis* (Van de Guchte *et al.*, 1992). Este gen codifica una lipoproteína (Kuipers *et al.*, 1993a; Qiao *et al.*, 1995) de 245 aminoácidos y 27,8 KDa, incluyendo en su extremo N-terminal lo que parece ser una secuencia señal de 19

aminoácidos, análoga a la presente en otras lipoproteínas. Las lipoproteínas bacterianas constituyen un grupo de proteínas que se anclan a la membrana citoplasmática o a la pared celular mediante su fracción lipídica, mientras los lípidos están unidos covalentemente al residuo de cisteína situado en el extremo N-terminal de la proteína excretada (Wu y Hayashi, 1986). El extremo N-terminal de NisI posee la estructura tripartita típica de los péptidos señal, con un radical  $-NH_2$  cargado positivamente, un núcleo hidrofóbico y un lugar de ruptura (Von Heijne, 1988). Esta proteína es muy similar a la SpaI, que regula la inmunidad de la subtilina, ambas presentan un extremo hidrofóbico N-terminal con una secuencia señal y una Cys en la posición +1 en la zona de rotura para la peptidasa II, típica de las lipoproteínas bacterianas (Kuipers *et al.*, 1993a; Klein y Entian, 1994). El extremo C-terminal es más hidrofílico y parece que sobresale hacia el exterior de la membrana citoplasmática. Dicha proteína se modifica a lipoproteína y se ancla en la membrana de la célula hacia el exterior, una vez que se ha eliminado la secuencia señal (Saris *et al.*, 1996). No se ha encontrado homología de esta proteína con las presentes hasta la fecha en las bases de datos, excepto por la secuencia señal para la peptidasa II, altamente conservada.

Existen evidencias de que esta proteína está relacionada con la inmunidad de la cepa productora, ya que la transformación del gen responsable de su producción en una cepa sensible no productora de nisina (*L. lactis* MG1614), incrementa notablemente su inmunidad (Engelke *et al.*, 1994), aunque ésta nunca llega a ser del nivel de las cepas productoras. La expresión del gen responsable en *E.coli*, también produce cierta resistencia en las células sensibilizadas previamente con EDTA (Kuipers *et al.*, 1993a). Además, las mutaciones del gen *nisI* en las cepas productoras de nisina, no afectan a su producción, pero incrementan considerablemente la sensibilidad de éstas a la nisina (Sieggers y Entian, 1995). En una cepa productora, modificada en el gen *nisA* (cepa NZ9800) y deficiente en la producción de nisina, se observó una resistencia diez veces menor a la nisina A que en la cepa salvaje. Sólo se obtuvo un nivel de inmunidad equivalente al de la cepa salvaje cuando dicha cepa se complementó con un plásmido portador del gen estructural *nisA* o del *nisZ* (Kuipers *et al.*, 1993a). Se ha observado también, que mutantes de las cepas productoras que producen nisina en menor cantidad o no la producen, muestran también diferentes niveles de inmunidad, coincidiendo el mayor nivel de inmunidad con la mayor producción (Rauch *et al.*, 1991). Estos resultados sugieren que la producción de nisina es un requisito necesario para alcanzar un nivel adecuado de inmunidad, probablemente porque la propia nisina participa en la regulación de su expresión y su presencia estimula la expresión de otros genes del mismo operón, incluido el de la inmunidad.

El mecanismo por el que la proteína NisI ejerce su acción protectora, todavía no se conoce con exactitud. Considerando su naturaleza lipoproteica, probablemente se adsorbe al exterior de la membrana celular y confiere la resistencia al interaccionar directamente con el antibiótico o al impedir la asociación de las moléculas de nisina para formar los poros que alteran la membrana plasmática (Entian y de Vos, 1996).

Sin embargo, se ha observado que en cepas inicialmente sensibles a la nisina, aun produciendo niveles de proteína NisI equivalentes a los de la cepa salvaje, el nivel de inmunidad no es equiparable entre ellas, lo que sugiere que deben existir otras proteínas adicionales que también participan en la inmunidad (Saris *et al.*, 1996). Recientemente, se han descrito otros genes que podrían estar relacionados con la inmunidad, denominados *nisF*, *nisE* y *nisG* (Siegiers y Entian, 1995). Dichos genes son muy similares a los descritos *spaF* y *spaG*, que parecen participar en la inmunidad de las cepas de *Bacillus subtilis* productoras de subtilina (Klein y Entian, 1994; Entian y de Vos, 1996) y se localizan al final del operón de la nisina, aproximadamente a 12 kb del gen estructural, donde parece que constituyen un operón separado del resto de los genes de la maquinaria biosintética (Saris *et al.*, 1996).

El gen *nisF* codifica una proteína de 225 aminoácidos y un peso molecular de 24,7 KDa. El marco de lectura del *nisF* comienza a 102 pb del final del *nisK* y se inicia con un codón ATG; antes de este gen se localizan regiones promotoras similares a otras previamente descritas en *L. lactis* (Van de Guchte *et al.*, 1992), lo que sugiere que dicho gen posee su propio promotor. Además, la región no codificante entre los genes *nisK* y *nisF* contiene una repetición inversa de 16 pb, que puede formar un bucle y servir, por lo tanto, como finalizador de la transcripción del *nisK* (Siegiers y Entian, 1995). Por tanto, los genes *nisFEG* parecen formar un operón aparte de los *nisABTCIPRK*, aunque no es independiente de ellos.

Inmediatamente después del gen *nisF* se encuentra el gen *nisE*, que codifica una proteína de 247 o 242 aminoácidos, según cuál de los codones AGT de la secuencia se considere como codón de iniciación. Las secuencias de NisF y NisE son muy similares a los extremos amino y carboxilo de la SpaF, respectivamente y parecen funcionar, al igual que esta, como transportadores de tipo ABC.

El gen *nisG* se superpone al extremo 3' del *nisF* y codifica una proteína de 241 aminoácidos y 24,2 KDa, que es muy hidrofóbica y similar a las proteínas implicadas en la inmunidad a las colicinas. Estas proteínas son también muy hidrofóbicas y presentan tres o cuatro dominios que interaccionan con la membrana. Parece ser que dichas

proteínas participan en la inmunidad porque actúan interaccionando con los dominios formadores de canales (Pugsley, 1988; Song y Cramer, 1991), la semejanza de estas proteínas con la NisG hace pensar que ésta posee una función similar.

Las mutaciones en los genes *nisFEG* ocasionan un incremento en la sensibilidad a la nisina (Siegers y Entian, 1995), aunque dichos mutantes son capaces de sobrevivir a los niveles relativamente altos de nisina que producen, lo que significa que estas cepas son, por definición, inmunes. Sin embargo, algunos mutantes son más sensibles que la cepa salvaje a la nisina añadida exógenamente, lo que sugiere que el grado de inmunidad de estos microorganismos se adapta a la cantidad de nisina que producen. Existe de nuevo una clara correlación entre el nivel de nisina producido y el grado de inmunidad alcanzado, lo que probablemente se debe a un efecto del sistema de autorregulación. De ahí que las cepas mutantes que producen menor cantidad de nisina presenten a su vez una menor transcripción de todos los genes del operón y, por lo tanto, una menor inmunidad cuando se comparan con otras cepas productoras de cantidades elevadas de nisina, como es el caso de las cepas salvajes. Estos resultados hacen difícil extraer conclusiones acerca de si una proteína participa en la inmunidad, en el caso de las cepas que presentan niveles inferiores de inmunidad pero que también producen menores cantidades de nisina, puesto que los niveles de las otras proteínas implicadas en la biosíntesis van a ser menores (Saris *et al.*, 1996).

Algunas experiencias realizadas recientemente, contradicen el papel de las proteínas NisFEG en la inmunidad. Así por ejemplo, la cepa mutante FI7332 (Dodd *et al.*, 1992) no productora de nisina tiene un nivel de inmunidad equivalente al de la cepa salvaje, probablemente debido a la transcripción de los genes *nisBTCIPRK* por acción del promotor IS905. Considerando la necesidad de la producción de nisina para la transcripción del operón *nisFEG* (Saris *et al.*, 1996), esta cepa no debería transcribir dichos genes, sin embargo, es totalmente inmune a la nisina (Dodd *et al.*, 1992).

Duan *et al.*, (1996) han descrito en la cepa no productora de nisina *L. lactis* M189, la coexistencia de dos mecanismos diferentes que determinan su resistencia a esta bacteriocina. Por un lado, posee un plásmido no conjugativo (pND301), con el gen de la resistencia a la nisina presente en otros microorganismos y ya descrito por Froseth y McKay (1991) y, por otro lado, posee otro plásmido conjugativo (pND300), que confiere resistencia a esta bacteriocina por un mecanismo distinto, puesto que su secuencia carece del gen responsable de la resistencia presente en el plásmido pND301, y del gen *nisI*, que confiere la inmunidad. Un análisis de dicha secuencia ha revelado la presencia de los genes *nisF*, *nisE* y *nisG*, lo que hace suponer su implicación en la resistencia de esta

cepa. Esta es la primera vez que se describe la presencia de estos genes aisladamente de los del operón de la nisina. Por lo tanto el papel de estos genes en la inmunidad todavía no está totalmente determinado, puesto que algunas experiencias sugieren la implicación de estos genes en la inmunidad (Siegers y Entian, 1995; Duan *et al.*, 1996), pero otros la contradicen (Dodd *et al.*, 1992; Saris, 1996).

A pesar de la similitud entre las proteínas que confieren la inmunidad a la nisina y a la subtilina, tanto en su secuencia aminoacídica como en sus propiedades generales, no existe inmunidad cruzada entre ellas, de forma que las cepas productoras de nisina son sensibles a la subtilina y viceversa (Sahl *et al.*, 1995), lo que demuestra la especificidad del mecanismo inmune. La inmunidad cruzada sólo se ha observado en el caso de las variantes naturales, como la nisina A y la nisina Z (de Vos *et al.*, 1993).

En resumen, la localización de la proteína NisI sugiere como mecanismo de inmunidad la inhibición en la formación de poros por interacción proteica en la superficie de la célula, aunque la actividad de la proteína NisI parece requerir la asistencia de otras proteínas. El empleo de transportadores, tanto hacia dentro como hacia el exterior de la célula, podría ser un mecanismo adicional de inmunidad para la nisina, reduciendo lo suficiente el nivel de nisina en la membrana como para inhibir la formación de los poros. Como se ha propuesto para la subtilina, este transportador podría transportar la bacteriocina que interacciona con la membrana al interior de la célula, donde sufriría una degradación intracelular (Klein y Entian, 1994). Queda por dilucidar si este transportador actuaría también de modo similar al NisT, transportando los precursores al exterior de la célula. De ser así, ello explicaría el fenotipo productor de subtilina en un mutante con un gen *spaT* afuncional (Klein *et al.*, 1992).

Otros mecanismos de inmunidad, como la inhibición de la adsorción en la membrana o del ensamblaje de las moléculas para formar los poros, podrían contribuir al nivel total de inmunidad. Potencialmente, todas las proteínas de la maquinaria biosintética tienen afinidad con el lantibiótico y podrían interaccionar directamente con él, ya que forman mayoritariamente un complejo localizado en la membrana. Un nivel de inmunidad equivalente al de las cepas salvajes, requiere un complejo biosintético completamente funcional. No se excluye, por tanto, la posibilidad de que existan otras proteínas, aún no descritas, implicadas en la inmunidad (Saris *et al.*, 1996).

#### **2.4.1.6. Regulación de la biosíntesis y genes implicados: *nisR* y *nisK***

La regulación de la biosíntesis de la nisina se realiza por las proteínas NisR y NisK. Estas dos proteínas forman el llamado sistema regulador de dos componentes, que

pertenece a una familia de reguladores de respuestas ambientales que participan en procesos tales como la regulación de la esporulación, la osmoregulación o la anaerobiosis y se encuentran tanto en bacterias Gram-positivas como en las Gram-negativas. Estos sistemas constan de una histidina kinasa unida a la membrana celular, que responde a un estímulo exterior mediante la autofosforilación de un residuo de His en el dominio C-terminal. El grupo fosfato se transfiere a continuación a un residuo de ácido aspártico del correspondiente regulador de respuesta, que generalmente actúa a nivel del ADN, activando la transcripción (Msadek *et al.*, 1993). En este caso, la diana para este regulador sería el promotor del gen *nisA* y, recientemente, se ha demostrado que la señal que activa este sistema es la propia nisina madura (Kuipers *et al.*, 1995; Qiao *et al.*, 1996).

El gen *nisR* se encuentra a 49 pb del codón de terminación del *nisP* (Van der Meer *et al.*, 1993) y se inicia con una secuencia donde se observan tres posibles codones de iniciación. La opinión generalizada es que la NisP se compone de 229 aminoácidos, ya que uno de los codones, el AGT, es el normalmente empleado por *L. lactis* como codón de iniciación (Van der Meer *et al.*, 1993). La NisR posee una gran homología con el regulador de respuesta SpaR del operón de la subtilina (Klein *et al.*, 1993) y el mayor grado de identidad con otros componentes reguladores de sistemas de traducción sensorial ocurre en los 110 residuos del extremo N-terminal. Los aminoácidos activos se encuentran conservados en todos los miembros de esta familia y en el caso de la NisR, por comparación de secuencias, corresponderían a los residuos Asp<sup>10</sup>, Asp<sup>53</sup> y Lys<sup>102</sup>. La Asp<sup>53</sup> sería el lugar de fosforilación para la correspondiente histidina kinasa (Sanders y Koshlands, 1988).

Solapando al gen *nisR* se encuentra el *nisK*, que se inicia con un codón ATG y codifica una proteína (NisK) de 447 aminoácidos y 51,3 KDa (Engelke *et al.*, 1994; Van der Meer *et al.*, 1993). La proteína NisK muestra una gran similitud con las histidina kinasas de los sistemas reguladores de dos componentes. Las homologías se presentan en la región C-terminal. Dichos segmentos mantienen conservado un residuo His, en el que se produce la autofosforilación (His<sup>238</sup> en NisK), un residuo Asp (Asp<sup>349</sup> en NisK) y un fragmento rico en glicina en el extremo C-terminal (del aminoácido 380 al extremo C-terminal de la NisK). La proteína NisK posee también homología con la SpaK de *B. subtilis*, de función similar, con la que muestra gran similitud en su perfil de hidrofobicidad (Engelke *et al.*, 1994): ambas moléculas presentan en sus regiones N-terminales dos fragmentos hidrofóbicos separados por un fragmento hidrofílico, siendo sus extremos C-terminales hidrofílicos. Los dos fragmentos hidrofóbicos son posibles dominios situados en el interior de la membrana citoplasmática, mientras que la región

hidrofílica intercalada se correspondería con el dominio sensor extracelular. La región hidrofílica C-terminal, podría ser el dominio de traducción de señal con actividad kinasa (Engelke *et al.*, 1994).

Cuando los genes *nisABTCIR* se encuentran en un plásmido multicopia en una cepa receptora no productora de nisina, se observa la producción del precursor de la nisina, lo que indica que la sobreexpresión del gen *nisR* por sí sola es suficiente para activar la transcripción de *nisA* y de los genes subsiguientes (van der Meer *et al.*, 1993). Sin embargo, cuando en un plásmido multicopia sólo se encuentran los genes *nisABTCI*, no se observa la transcripción del gen *nisA* (Kuipers *et al.*, 1993a).

Kuipers *et al.* (1995) han demostrado que es la propia nisina madura la que induce la transcripción de su propio gen estructural y de los genes subsiguientes, mediante un mecanismo de traducción de la señal, al actuar sobre el sensor histidina kinasa NisK. Para demostrarlo, Kuipers contruyó un mutante con una delección de 4 pb en el gen estructural *nisA* ( $\Delta nisA$ ), lo que anuló la transcripción de este gen y la producción de nisina y redujo la inmunidad de la cepa a niveles basales. Sin embargo, al añadir pequeñas cantidades de nisina al medio extracelular, se consiguió la transcripción del gen *nisA*. La cantidad del transcrito dependió de la concentración de nisina añadida. Otros péptidos también fueron capaces de inducir la transcripción, como la nisina Z y varios mutantes de la nisina Z, así como la nisina Z madura unida a la secuencia líder de la subtilina. Estos experimentos sugieren que la parte modificada del lantibiótico juega un papel fundamental en el proceso de inducción, especialmente los residuos modificados del extremo N-terminal de la molécula. Otros péptidos relacionados como el precursor de la nisina de 57 aminoácidos, la subtilina, la lacticina 481, el Pep5 y la lactococina A no indujeron la síntesis de nisina.

Un análisis de los requerimientos estructurales de la señal externa, empleando fragmentos de nisina procedentes de digestión enzimática y variantes genéticas, ha revelado que se necesitan al menos los 12 residuos del extremo N-terminal para producir la inducción, siendo esencial que el anillo A esté intacto. Las modificaciones en la molécula también influyen a su capacidad de inducción (Dodd *et al.*, 1996a). Asimismo, la inactivación insercional del gen *nisK* elimina la inducibilidad y la transcripción de *nisA*, lo que indica que NisK es esencial en el mecanismo de traducción de señal, al interactuar probablemente con la propia nisina (Kuipers *et al.*, 1995; Qiao *et al.*, 1996).

El mecanismo de autoregulación previamente descrito podría interpretarse de varias maneras: (1) en primer lugar, para ahorrar energía, ya que al controlar la expresión de la totalidad de los genes, cualquier disfunción en uno de ellos anularía la síntesis del

inductor y, por lo tanto, la expresión de todos los genes biosintéticos, (2) para alcanzar los niveles de inmunidad en respuesta a los altos niveles de nisina producidos por las células vecinas, es decir, para amplificar la respuesta a las señales ambientales o (3) para promover la comunicación célula a célula, lo que permite la producción de altas cantidades del péptido antimicrobiano en una acción concertada, disminuyendo por consiguiente la aparición de resistencias en los microorganismos diana (Kuipers *et al.*, 1995).

Los resultados obtenidos han permitido desarrollar sistemas de sobreexpresión de proteínas en las bacterias lácticas, empleando el promotor de la nisina y sus elementos reguladores (de Ruyter *et al.*, 1996; Kuipers *et al.*, 1997), estos sistemas podrían emplearse incluso en los alimentos, puesto que la nisina está permitida como aditivo alimentario.

### 2.4.1.7. Organización de los genes del operón de la nisina

---

Como ya se ha indicado, el grupo de genes responsable de la biosíntesis, regulación e inmunidad de la nisina, se localiza en un transposón conjugativo de 70 kb. Se han descrito transposones de estas características en varias cepas de *L. lactis* productoras de nisina A, tales como *L. lactis* NIZO R5 (transposón *Tn5276*, Rauch y de Vos, 1992a) *L. lactis* NCFB894 (transposón *Tn5301*, Horn *et al.*, 1991) y en el productor de nisina Z, *L. lactis* NIZO 22186 (transposón *Tn5278*, Rauch *et al.*, 1994). En todos los casos se ha determinado su secuencia y organización, siendo ambas prácticamente iguales en todos ellos.

El sistema comienza con el gen estructural *nisA*, que se localiza en el extremo 5' del transposón y, a continuación, se suceden los demás marcos abiertos de lectura que se transcriben en la misma dirección relativa y en el orden BTCIPRKFE (figura I.7.). Si bien por análisis de la secuencia de ADN se han postulado diversas regiones que podrían actuar como posibles promotores, localizados delante de los genes *nisA*, *nisB*, *nisT*, *nisC*, *nisR* y *nisF*, así como terminadores tras los genes *nisB*, *nisK* y *nisG* (Engelke *et al.*, 1992; Dodd y Gasson, 1994; Siegers y Entian, 1995; Immonen *et al.*, 1995), Ra *et al.* (1996) han demostrado recientemente la existencia de dos promotores funcionales que controlarían a lo grupos de genes *nisABTCIPRK* y *nisEFG*, respectivamente. Los promotores de estos dos operones presentan una homología del 73%. Ambos operones están coordinados y autoregulados por la propia nisina madura extracelular, formando un regulón.

### 2.4.2. Mecanismo de maduración de la nisina

De los resultados descritos previamente, es posible sugerir el siguiente esquema de biosíntesis y maduración de la nisina (de Vos *et al.*, 1995). En primer lugar (figura 1.8.), la señal inductora, que sería la propia nisina madura, activaría, mediante el sistema regulador de dos componentes NisR/NisK, el promotor del operón *nis*ABTCIPRK y el del *nis*FEG, lo que origina la transcripción del producto del gen *nis*A, la prepronisina, que contiene los aminoácidos sin modificar y las cisteínas libres y que podría adoptar una estructura en  $\alpha$ -hélice. La prepronisina se dirige, presumiblemente por acción del péptido líder, a un complejo localizado en la membrana que contiene los enzimas NisB (responsable de la deshidratación de los aminoácidos) y NisC (responsable de la formación de los anillos). En este momento, la secuencia líder colaboraría en mantener el péptido en su forma inactiva (van der Meer *et al.*, 1993). Tras la modificación de los aminoácidos y la formación de los anillos, la prenisina madura se transporta al exterior por medio del transportador NisT, con la subsiguiente hidrólisis del ATP. Finalmente, el precursor de la nisina se activa por la ruptura proteolítica por la proteasa extracelular NisP, anclada en la envuelta celular. El destino de la secuencia líder liberada todavía no se ha determinado y no se sabe si, simplemente, se degrada o si tiene alguna otra función.

Respecto a la inmunidad, existen dos mecanismos que podrían participar en la protección de la célula frente a su propio producto. El primero de ellos, estaría mediado por la lipoproteína NisI, unida en el exterior a la membrana celular a través de su anclaje lipídico, posiblemente interacciona con las moléculas de nisina extracelulares o con las que forman los poros, alterando su formación o sellándolos. Por otro lado, un sistema transportador del tipo ABC, consituído por las proteínas NisE, NisF y NisG, podría participar también en el desarrollo de la inmunidad. Estas proteínas actuarían transportando la nisina madura al interior de la célula, donde sufriría a continuación la degradación enzimática correspondiente.

El papel de la secuencia líder, aparte de su función de mantener al péptido como un precursor inactivo, no se conoce con exactitud. En particular, todavía no se conoce cómo actúa dirigiendo al preantibiótico hacia los sistemas de maduración y de excreción, cuál es su destino tras su liberación y en qué medida podría participar, una vez liberado, en otros procesos tales como el de la inmunidad.

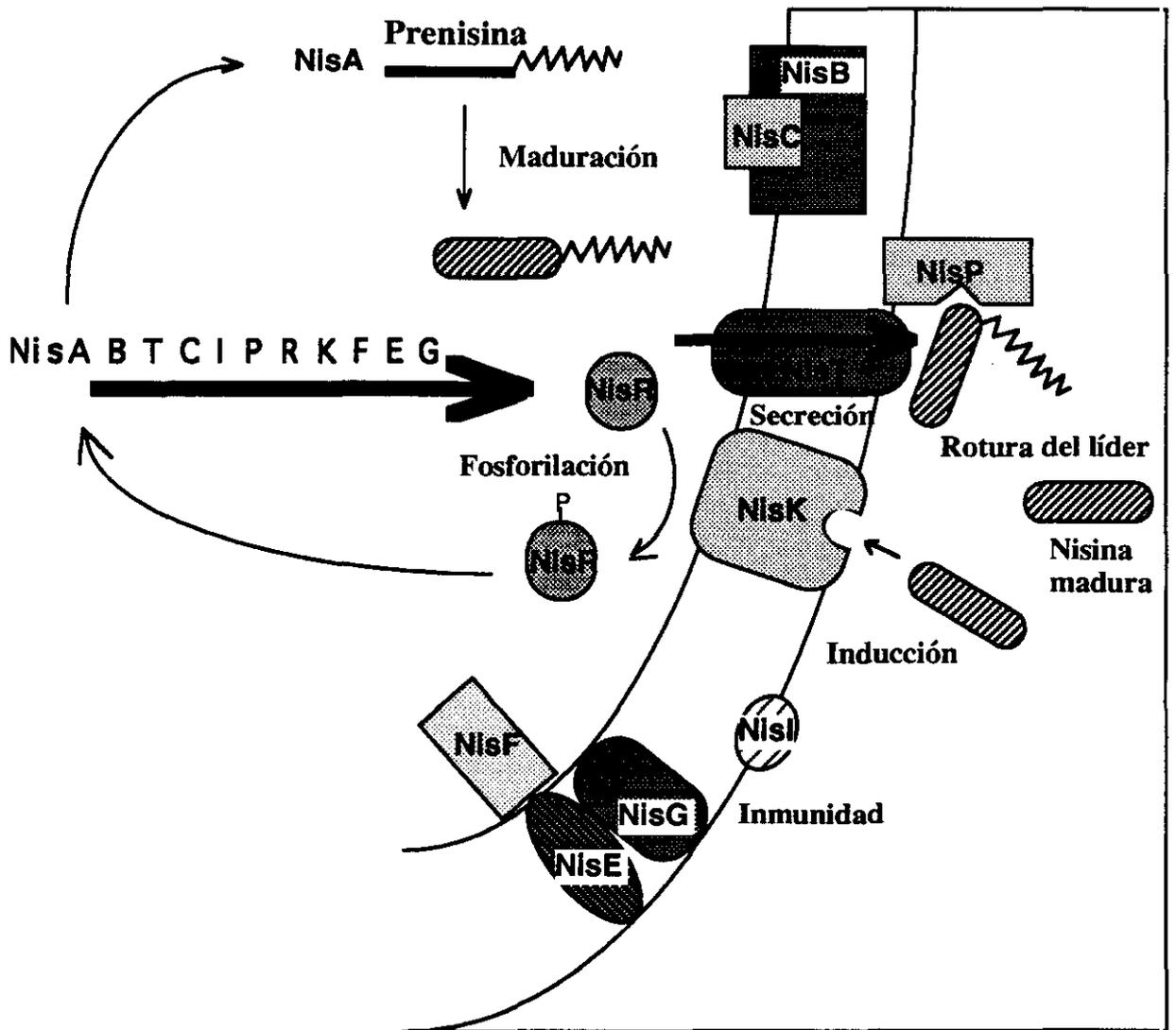


Figura I.8. Biosíntesis del lantibiótico nisina A. Fuente: H. Dodd (1996).

### 2.4.3. Factores que afectan a la biosíntesis de la nisina

#### 2.4.3.1. Cepa bacteriana

De Vuyst (1994), determinó la producción de nisina entre distintas cepas de *L. lactis* subspp. *lactis*, observando una gran variabilidad en cuanto a los niveles de producción entre ellas. Estas diferencias no se supieron justificar y sólo se plantearon diversas hipótesis, indicando que el grado de expresión de los enzimas implicados en la maduración y en la degradación de la nisina, podrían determinar las diferencias en la producción, así como en el grado de inmunidad.

Optimizando los nutrientes y las condiciones de crecimiento de las cepas salvajes de *L. lactis*, no se ha conseguido incrementar la producción de nisina por encima de 3000 UI/ml. Por ello, solamente mediante el empleo de técnicas de manipulación genética, podría mejorarse la capacidad y los niveles de producción de nisina de dichas cepas. Gasson (1984), ha sugerido que esto podría conseguirse incrementando en cada célula el número de copias de los genes que participan en la síntesis de la nisina, sin embargo se ha observado que cepas transconjugantes que presentan más de una copia de los genes de interés, no producen necesariamente más nisina que las cepas salvajes originales.

#### 2.4.3.2. Condiciones de cultivo

El medio en el que se desarrolla el microorganismo, incluyendo la disponibilidad de nutrientes, la temperatura y pH de crecimiento, el nivel de oxígeno y la presencia de metabolitos inhibidores, influyen en gran medida en la producción de nisina. Este efecto se debe, en parte, a su influencia en la multiplicación celular y en la masa celular producida por mililitro de medio de cultivo.

Hirsch (1951) estudió el efecto de la composición del medio en la producción de nisina, observando que determinados componentes tienen un efecto positivo en la producción. Así, por ejemplo, al suplementar el medio con un 2,5% de glucosa se incrementa tanto el crecimiento total (masa celular total) como la cantidad de nisina producida. Otros suplementos como el pantotenato cálcico o el sulfito sódico, incrementan notablemente la producción de nisina, probablemente debido a su influencia sobre el coenzima A, necesario para el metabolismo de la glucosa y a su aportación de azufre a la cisteína, aminoácido presente en la molécula de nisina.

De Vuyst (1995), desarrolló un medio sintético mínimo (SM8) con el fin de simplificar la purificación posterior de esta bacteriocina. Este medio está compuesto por ocho aminoácidos (ácido glutámico, metionina, valina, leucina, treonina, arginina, isoleucina e histidina), cinco vitaminas (biotina, pantotenato cálcico, ácido nicotínico,

piridoxina y riboflavina) y las sales minerales fosfato dihidrogenado, fosfato monoácido de sodio, cloruro sódico, sulfato magnésico y citrato trisódico. Con este medio, también se pudo evaluar el impacto de cada uno de los componentes en la producción de la nisina, observándose que la biosíntesis de nisina depende, en gran medida, de la presencia de una fuente de azufre como una sal inorgánica (sulfato de magnesio o tiosulfato sódico) o los aminoácidos metionina, cisteína o cistationina. Los aminoácidos serina, treonina y cisteína, estimulan altamente la producción de nisina sin afectar el rendimiento celular final, lo que indica su papel precursor durante la biosíntesis de este compuesto.

El pH tiene un efecto pronunciado en la producción de nisina, ya que los niveles máximos de producción se alcanzan cuando el pH se mantiene por encima de 6 (Egorov *et al.*, 1971). Un ajuste continuo del pH, es mejor que un ajuste intermitente o que el empleo de sustancias tamponantes (Ray, 1992). La temperatura de incubación también es un factor relevante, según Hirsch (1951), la producción de nisina es máxima cuando el cultivo se incuba entre 25 y 30 °C, aunque a 37°C el crecimiento inicial sea más rápido.

La aireación también reduce el crecimiento celular y, consiguientemente, la producción de nisina. Jin-Young *et al.* (1989) determinaron las condiciones óptimas de producción de nisina por *L. lactis* IFO12007 en un fermentador, observando que la concentración óptima de glucosa fue de 60g/l y el pH y la temperatura óptimos fueron de 6,5 y 37 °C, respectivamente; la máxima concentración de nisina alcanzada fue de 2000 UI/ml.

### 2.4.3.3. Síntesis durante el crecimiento

Como ocurre en otras bacteriocinas, la tasa máxima de producción de nisina se alcanza al final de la fase de crecimiento exponencial, mostrando la cinética propia de un metabolito primario asociado al crecimiento celular y, por lo tanto, relacionada con la masa celular total (De Vuyst y Vandamme, 1993). A diferencia de publicaciones anteriores (Hurst, 1966a), Ra *et al.* (1996) indican que la nisina se secreta ya desde los estadios iniciales de crecimiento a un nivel similar al de fases subsiguientes. Sin embargo, su presencia en el sobrenadante no se detecta en las fases iniciales, ya que la nisina secretada se adsorbe a la superficie celular y se libera al medio hacia la mitad de la fase exponencial, cuando el pH del medio desciende por debajo de 5,5.

Como se ha citado previamente, la biosíntesis de la nisina y su inmunidad se encuentran autorreguladas por la nisina madura del exterior de las células. Las células en fase de crecimiento estacionario todavía mantienen algo de nisina adsorbida a su superficie, de manera que si se transfieren a un medio de cultivo fresco, la nisina

adsorbida inmediatamente induce una nueva cascada de amplificación, puesto que se necesitan muy pequeñas cantidades de nisina para el proceso inductivo. Esto explicaría el que estas células desarrollen la inmunidad ya en las fases iniciales de su crecimiento (Ra *et al.*, 1996). Desde las primeras fases del crecimiento hasta la fase estacionaria, sólo se observan pequeñas variaciones en el nivel de inmunidad y producción. En la fase estacionaria, el nivel de nisina comienza a decrecer, aunque el nivel de inmunidad y transcripción es todavía alto (Ra *et al.*, 1996), lo que podría deberse a la liberación de enzimas proteolíticas inespecíficos a causa de la lisis celular (de Vuyst y Vandamme, 1992).

Engelke *et al.* (1994) monitorizaron la expresión de la prenisina y de la proteína NisB, observando que se incrementan significativamente cuando las células alcanzan la mitad de la fase logarítmica de crecimiento, alcanzando un máximo al inicio de la fase estacionaria. En esta fase, la expresión de la prenisina disminuye lentamente, con un 60% de actividad residual tras 26 horas en la fase estacionaria. NisB se expresa débilmente en las primeras cuatro horas tras la inoculación y luego aumenta notablemente al final de la fase logarítmica, alcanzando el máximo en la fase estacionaria y disminuyendo al 50% tras la incubación durante toda la noche. En cuanto a la actividad de la nisina, durante las primeras cinco horas tras la inoculación, no se observa actividad inhibidora. Luego la actividad se incrementa notablemente, y alcanza su máximo en la fase estacionaria. Tras incubar durante una noche, la actividad disminuyó a un 30% del máximo valor alcanzado.

Comparando la cinética de NisA y NisB con el desarrollo de la actividad inhibidora, se observa que la expresión de la prenisina precede a la de NisB y al desarrollo de la actividad, que está coordinada con la expresión de NisB. Por lo tanto, la primera proteína expresada es la prenisina y, a continuación le sigue, a los 30 minutos, la de NisB. La expresión de NisB coincide con la aparición de la actividad antimicrobiana, lo que fundamenta el hecho de que NisB participa en la maduración del prepéptido. Sorprendentemente, incluso en la fase estacionaria, tras una incubación de toda la noche, la prenisina y NisB están presentes en un nivel de aproximadamente un 60%. La expresión de la proteína NisB en la fase estacionaria, indica que todavía se está produciendo la maduración y que la nisina se sigue sintetizando en la fase estacionaria. Esta observación podría suscitar nuevas posibilidades de producción, mediante la utilización de células inmovilizadas productoras de nisina (Engelke *et al.*, 1994).

#### **2.4.3.4. Localización en la célula productora**

Una vez modificada la prenisina, ésta rápidamente se transporta al exterior de la célula a través de la proteína NisT, que formaría parte del complejo lantionina sintetasa.

Cuando las células crecen a un pH constante de 6,8, más del 80% de la nisina permanece unida a la célula, mientras que a un pH por debajo de 6, el 80% se excreta al medio de cultivo. Estudios posteriores han revelado que a pH 6,8 la nisina unida a las células es siete veces mayor por unidad de peso seco que a pH 4,2 (White y Hurst, 1968). Tras romper las células y examinar diferentes fracciones, aproximadamente el 60% de la nisina se localizó en la fracción de la pared celular. La fracción total soluble en etanol (que contiene la fracción lipídica de la membrana y otras partes y las proteínas solubles en etanol) contenía aproximadamente el 57%, mientras que la fracción etanólica de la membrana celular contenía sólo el 9% de la nisina total.

### **2.5. Ingeniería proteica de la nisina**

Las experiencias de ingeniería proteica en la molécula de nisina tienen como finalidad mejorar sus propiedades con el fin de ampliar su aplicación comercial como conservante de los alimentos. Con ello se pretende construir variantes de la nisina que posean propiedades superiores a las de la molécula original, como un espectro de inhibición más amplio o una mayor actividad específica frente a un determinado microorganismo de interés como *Listeria* spp. o *Clostridium* spp. Además, se pretende mejorar la eficacia de la nisina incrementando su solubilidad y estabilidad. La molécula de nisina tiene en su estructura zonas especialmente débiles, como las debidas a los residuos DHA y DHB, con la ingeniería proteica se pretende también producir variantes más resistentes. Estas variantes genéticas, además de su potencial aplicación práctica, son una herramienta muy útil en los estudios sobre la relación estructura-actividad o del modo de acción de la molécula de nisina. También se han empleado técnicas de mutación dirigida para introducir modificaciones en la secuencia líder con el fin de estudiar el papel y la relevancia de cada uno de sus residuos (van der Meer *et al.*, 1994).

Las experiencias de ingeniería genética son especialmente difíciles en los antibióticos, puesto que para conseguir expresar correctamente estas moléculas se requieren la presencia de otros genes implicados en su biosíntesis, de manera que se permita que las modificaciones post-traduccionales, el transporte, la rotura del péptido líder y el desarrollo de la inmunidad, puedan realizarse adecuadamente.

En la obtención de variantes genéticas se han empleado dos tipos de estrategias. La primera de ellas se denomina de complementación, en la que se emplea una cepa receptora con una deficiencia en el gen estructural y a la que se transforma con un plásmido que contiene este mismo gen con la modificación de interés (Dodd *et al.*, 1992; Kuipers *et al.*, 1993a); una variante de este método, aprovecha la existencia del variante natural de la nisina A, la nisina Z: empleando un microorganismo libre de plásmidos productor de

nisina A, se transformó con un plásmido que poseía el gen estructural de la nisina Z con diversas modificaciones. El gen estructural modificado fue transformado y su producto exportado eficazmente, gracias a la maquinaria biosintética de la nisina A. Posteriormente, la nisina A se separó de las variantes genéticas de nisina Z, mediante cromatografía de HPLC (Kuipers *et al.*, 1992).

Por otro lado, el segundo método empleado para conseguir variantes genéticas consiste en la utilización de la técnica denominada de reemplazamiento génico (Kuipers *et al.*, 1993a; Dodd *et al.*, 1996b), en la que el gen de la cepa salvaje se sustituye por una copia mutada del mismo gen. El grupo investigador del Dr. Gasson (Norwich, U.K.) ha diseñado y evaluado diversas variantes de la nisina mediante sistemas de expresión lactocócicos en los que el gen de interés (normalmente el gen estructural, *nisA*), se sustituye por otros genes que han sido sometidos a técnicas de mutagénesis dirigida. Esta segunda aproximación, posee las ventajas de mantener el balance entre la expresión del gen estructural y los demás genes biosintéticos, de no correr el riesgo de perder las funciones codificadas por plásmidos y de producir mayores rendimientos. El efecto que las mutaciones en el gen estructural o en la secuencia del péptido líder tienen en la actividad de la nisina ya se han comentado previamente.

## **2.6. Producción comercial de la nisina**

La nisina se obtiene comercialmente desde 1950, mediante fermentación microbiana con el pH controlado, a partir de leche completa, desnatada, reconstituída (Hawley y Hall, 1957) o de leche tratada con papaína, pepsina o tripsina para hidrolizar parte de sus proteínas (Hall, 1963). Para evitar la contaminación por levaduras, clostridios o bacteriófagos, debe utilizarse un medio estéril y la producción y liofilización deben realizarse en una planta estéril.

Actualmente la nisina disponible en el mercado adopta el nombre comercial de Nisaplin<sup>®</sup>, y se produce y comercializa por Aplin & Barret Ltd. (U.K.). Nisaplin es esencialmente el producto desecado y estabilizado de un cultivo de *L. lactis* subsp. *lactis* productor de nisina, que contiene proteínas desnaturalizadas de la leche, cloruro sódico y una actividad estandarizada de  $1 \times 10^6$  UI/g (Hawley y Hall, 1957). La nisina también se ha producido comercialmente en Polonia (Nizpol) y en la antigua Rusia (Niros) (Gudkov *et al.*, 1973b). En la patente de Aplin & Barret Ltd. (Hawley y Hall, 1957) la nisina se recupera por la técnica descrita por Hirsch (1951) y la concentración requerida se consigue precipitándola con sales, redisolviéndola y volviéndola a precipitar y desecando el concentrado final. En el producto ruso, la nisina se recupera mediante extracción con

ácido acético (Egerov *et al.*, 1979) y el empleo de adsorbentes (Baranova y Egorov, 1981).

## **2.7. Toxicidad de la nisina**

El hecho de que los microorganismos productores y seguramente la nisina se encuentren de forma natural en diversos sustratos alimenticios como la leche y productos lácteos (Chevalier *et al.*, 1957), vegetales (Harris *et al.*, 1992a; Uhlman *et al.*, 1992) y productos cárnicos (Rodríguez *et al.*, 1995) y que, por lo tanto, se haya ingerido por animales y personas durante décadas sin ningún efecto adverso aparente, es al menos indicativo de la poca o nula toxicidad de la nisina (Frazer *et al.*, 1962). Además, la inactivación de la nisina por los enzimas del tracto gastrointestinal (Heinemann y Williams, 1966; Jarvis y Mahoney, 1969), garantiza un efecto inocuo en la flora intestinal (Barber *et al.*, 1952).

Por otro lado, la nisina no se detectó en la saliva de las personas que ingirieron chocolate con 200 UI/ml de nisina a los 10 minutos de haberlo consumido (Claypool *et al.*, 1966) por lo que no se cree tenga efecto en la flora de la cavidad oral. También se ha avaluado su toxicidad en la dieta de cerdos (Barber *et al.*, 1952) y aves (Coates *et al.*, 1952) en los que no se observaron efectos negativos.

Además, la nisina no manifiesta resistencia cruzada con los antibióticos que se emplean en terapia humana (Hirsch, 1951, 1954; Lipinska, 1977) y tampoco se han observado efectos de sensibilización en seres humanos (Lipinska, 1977). La dosis letal 50 (LD<sub>50</sub>) es similar a la de la sal común, es decir, unos 7 g por Kg de peso corporal (Hara *et al.*, 1962).

En 1969 el Comité de Expertos sobre Aditivos en los Alimentos de la FAO/WHO (Food Agriculture Organization/ World Health Organization), revisando los estudios realizados sobre la toxicidad de la nisina, recomendó su aceptación como aditivo (WHO, 1969), con una dosis diaria aceptable (ADI) de 0,825 mg por Kg de peso y día. Actualmente, su utilización está permitida en más de 50 países y adopta el número E234 en la lista positiva de aditivos de la Unión Europea.

## **2.8. Propiedades inmunológicas**

A nivel toxicológico, la nisina empleada en los alimentos no manifiesta actividad biológica en los seres humanos (Lipinska, 1977) y, debido a su pequeño tamaño molecular, puede considerarse como un hapteno, es decir una molécula que por sí misma es incapaz de originar una respuesta inmune. Para obtener este efecto, es necesario

conjugarla a otra molécula que le confiera el tamaño adecuado, denominada molécula vehiculadora o portadora. No obstante, experimentalmente es conveniente generar anticuerpos frente a la nisina con el fin de desarrollar métodos inmunológicos de detección rápida de la misma en los sobrenadantes de los microorganismos productores o en los alimentos, así como de fijar los anticuerpos en columnas que permitan su purificación en un sólo paso por cromatografía de inmunoafinidad.

Hasta la realización de esta trabajo, solamente Falahee *et al.* (1990) y Stringer *et al.* (1995) han publicado resultados referentes a la obtención de anticuerpos policlonales frente a la nisina. Falahee *et al.* (1990), conjugaron la nisina (1 mg, equivalente a  $37 \times 10^3$  UI) a la albúmina de huevo mediante el método del glutaraldehído (Reichin *et al.*, 1968), emulsificaron el conjugado con adyuvante de Freund y lo inyectaron intramuscularmente en ovejas de raza Suffolk. El suero obtenido a los 9 meses de la primera inoculación, poseía anticuerpos específicos frente a la nisina A, con los que una vez purificados por inmunoafinidad, se desarrolló un método de detección ELISA tipo sandwich con un límite de detección de  $1,9 \times 10^{-2}$  UI/ml (unos 0,51 ng/ml). La validez del método para detectar la nisina en los alimentos se comprobó analizando muestras de queso con distintas concentraciones de nisina, la recuperación de nisina en estas muestras fue del 85%. La nisina inactivada por el método de Fowler *et al.* (1975) no se detectó en el ELISA, lo que sugiere que los epítomos reconocidos por los anticuerpos se encuentran asociados a su actividad antimicrobiana. El ELISA sandwich desarrolladomanifestó una correlación de  $r=0,995$  al compararlo con el método de detección de Fowler *et al.* (1975). Al analizar la reactividad cruzada de estos anticuerpos con otros lantibióticos del tipo A (subtilina, Pep5 y gallidermina), un lantibiótico del tipo B (RO 09-0198) y otras bacteriocinas (lactacinas F y B, pediocina A, sakacina A y otras no bien definidas) (Falahee y Adams, 1992), no se observó reactividad cruzada con ninguno de ellos salvo con la subtilina, que fue significativamente reconocida por dichos anticuerpos.

Stringer *et al.* (1995), también desarrollaron anticuerpos policlonales frente a la nisina A con el fin de estudiar *in situ* la producción, distribución y difusión de la nisina en productos cárnicos con *Lactococcus lactis*. Los anticuerpos se obtuvieron de conejos a los que se inmunizó con nisina purificada por HPLC a partir del preparado comercial de Nisaplin®. Los animales se inmunizaron vía intravenosa, intramuscular y subcutánea, sin embargo, los anticuerpos generados no fueron capaces de detectar la nisina libre o la unida a las células vegetativas o a los esporos del microorganismo sensible *B. subtilis* en el alimento fermentado, lo que indica que el método no es eficaz en el estudio de la distribución y/o la estabilidad de la nisina en los alimentos. Los anticuerpos sí reconocieron a las células productoras de nisina durante cualquiera de sus fases de

crecimiento, lo que permitió determinar la distribución de estos microorganismos en el alimento fermentado.

Tampoco se conoce la obtención anticuerpos monoclonales frente a la nisina A, aunque sí se han obtenido frente a otra bacteriocina, la pediocina RS2 (Bhunja, 1994). Bhunja obtuvo anticuerpos monoclonales al gelificar un preparado de la bacteriocina parcialmente purificada en un gel de poliacrilamida e inmunizar intraperitonealmente los ratones con este preparado, adyuvante incompleto de Freund y el compuesto poli(A)-poly(U). Dichos anticuerpos reconocieron la pediocina RS2 y la pediocina AcH en una electroforesis de SDS-PAGE de un cultivo productor crecido durante 27 horas, sin ninguna reacción inespecífica aparente. Sin embargo, cuando se ensayó un cultivo crecido durante 20 horas, los anticuerpos no sólo reaccionaron con la banda de la bacteriocina (de 3 KDa) sino también con otras bandas de mayor tamaño (de 6 a 8 KDa.), lo que se justificó indicando que estas bandas se correspondían con moléculas de prepediocina, ya que al no poseer actividad antimicrobiana se excluyó la posibilidad de que se trataran de agregados de la bacteriocina. La electroforesis de SDS-PAGE con cultivos de microorganismos productores de otras bacteriocinas, como sakacina A, (*Lactobacillus sake* Lb 706), leuconocina LCM1 (*Leuconostoc carnosum* LM2), nisina (*Lactococcus lactis* ATCC11454) y pediocina A (*Pediococcus pentosaceus* FBB61), no manifestaron reactividad cruzada. Los anticuerpos monoclonales también reconocieron a la pediocina AcH parcialmente purificada diluída hasta 160 veces por transferencia y eteción inmunológica (dot-immunoblotting).

### **2.9. Métodos de detección y cuantificación de la nisina**

El primer método de detección de la nisina se desarrolló por Cox en 1934, con el fin de determinar la presencia de nisina o de los microorganismos productores en la leche. Para ello empleó un test de reducción de azul de metileno, en el que los microorganismos de la leche rápidamente reducen este compuesto a su forma no coloreada. Si la leche contenía lactococos productores de nisina, éstos inhibían el desarrollo de otras bacterias lácticas y, por lo tanto, el tiempo necesario para reducir el colorante se incrementaba significativamente. Chevalier *et al.* (1957) también describieron un test para detectar lactococos inhibidores, de los que la mayoría serían productores de nisina en la leche cruda. Para ello, un medio enriquecido con agar se inoculó, simultáneamente, con la muestra de leche y con una cepa termofílica de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* sensible a la nisina. Las placas se mantenían inicialmente durante un día a 20 °C, permitiendo así el crecimiento del productor de nisina pero no el del indicador, que era termofílico. A continuación, se incrementaba la temperatura a 30 °C, lo que permitía el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii*, excepto en la proximidad de las colonias

productoras de nisina, en cuyo alrededor se observaban zonas claras de inhibición del crecimiento.

Este método no resultó ser totalmente satisfactorio, puesto que la nisina no difunde bien a través del agar a pH 7, debido a su baja solubilidad a pH neutro y a su posible oligomerización. Mattick y Hirsch (1947), desarrollaron un método de dilución por extinción en el que a una serie de tubos inoculados con cepas hemolíticas de *Streptococcus agalactiae*, se añadieron diluciones de la muestra a analizar y se mantuvieron a 37 °C durante 16-20 horas. A continuación, se determinó el desarrollo del microorganismo indicador en los tubos y el título se calculó como la recíproca de la dilución añadida al último tubo en donde no se produjo el crecimiento.

Por otro lado, Hirsch (1950) describió una variante cuantitativa del método de reducción del azul de metileno empleando también diluciones límite. Para ello, empleó una cepa de crecimiento rápido de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (1P5) como el organismo indicador y la reducción del azul de metileno como control de su crecimiento. Sin embargo, el empleo de un microorganismo que crecía tan rápido pero que también era muy sensible a la nisina, hacía difícil obtener un punto de equilibrio final estable.

Friedmann y Epstein (1951), desarrollaron un método más reproducible, preciso y rápido con la misma cepa de *L. lactis* subsp. *cremoris* de crecimiento rápido, pero en lugar de determinar la reducción del azul de metileno se utilizó la resazurina, consiguiéndose un límite de detección de 0,5 UI/ml con un error estándar del 10% (Friedmann y Beach, 1950). El método de la resazurina también se utilizó por Gudkov *et al.*, (1973a), mientras Kalra *et al.*, (1973) desarrollaron un método basado en la inhibición de la reducción del cloruro de trifeniltetrazolio por *Enterococcus faecalis* en presencia de nisina, encontrando una relación lineal para concentraciones de nisina inferiores a 2,5 UI/ml.

Basándose en sus propiedades bactericidas, Hirsch (1950) describió un procedimiento de recuento en placas basado en el número de supervivientes de *Streptococcus agalactiae*, sin embargo, este método carecía de reproducibilidad. No obstante, Hirsch (1950), describió un tercer método en el que la cuantificación se basó en la prolongación de la fase de latencia de *S. agalactiae* al desarrollarse en presencia de concentraciones subletales de nisina, observando que la duración de la fase de latencia estaba relacionada linealmente con la concentración de nisina en el rango de 5 a 10 UI/ml.

Berridge y Barret (1952), desarrollaron un método turbidométrico basado en la relación inversa entre las concentraciones de nisina y la densidad óptica a 600 nm de un cultivo en crecimiento exponencial de *L. lactis* subsp. *cremoris*. El organismo indicador se inoculaba en tubos que contenían varias diluciones de nisina y tras 2,5 a 3 horas de crecimiento del organismo indicador se frenaba su crecimiento con tiomersal y se obtenía una curva estándar relacionando la densidad óptica a 600 nm con el logaritmo de la concentración de nisina. El método era rápido y útil en las concentraciones de 0,04 a 0,4 UI/ml, aunque tenía el inconveniente de no poder utilizarse con sustancias que interfieren con la determinación de la densidad óptica, como ocurre con muchos alimentos.

Beach (1952), propuso un método de difusión vertical en agar. La difusión de la nisina se favorecía añadiendo Crill 20 al 0,1% y se realizaba durante toda la noche en refrigeración antes de permitir el crecimiento del microorganismo indicador (*S. agalactiae*), observándose una relación lineal entre el logaritmo de la concentración de nisina y la profundidad de la inhibición en el rango de 100 a 5000 UI/ml. El error estándar fue de 15 al 20% (Friedmann y Beach, 1950). Stumbo *et al.*, (1964) también desarrollaron un método en agar para la detección de la nisina en productos enlatados. El ensayo se basaba en la disminución de la recuperación de los esporos de *B. estearotherophilus* dañados térmicamente por la acción de la nisina. Los investigadores indicaron una sensibilidad de hasta 0,3 UI de nisina por gramo de producto, sin embargo es un método demasiado complicado y largo para realizarlo rutinariamente.

Mocquot y Lefebvre (1956), desarrollaron un método horizontal de difusión en agar para la detección de la nisina en quesos. Para facilitar la difusión de la nisina en el agar, añadieron a éste un 0,3% de Tween 80 y mantuvieron las placas durante la noche en refrigeración, permitiendo, a continuación, el crecimiento del microorganismo indicador (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* o *L. lactis* subsp. *cremoris*) al incubar las placas a la temperatura adecuada y observar a continuación las zonas de inhibición. Con este método se consiguió una sensibilidad incluso inferior a las 10 UI por gramo de queso.

Tramer y Fowler (1964) mejoraron el método al añadir Tween 20 al 1% en el agar sembrado con el microorganismo indicador (*Micrococcus flavus*) y depositando las muestras en pocillos. Después de la incubación de las placas a 30 °C durante toda la noche se mide el tamaño de los halos de inhibición, que está directamente relacionado con el logaritmo de la concentración de nisina en un rango de 0,5 a 10 UI/ml. El método citado resultó ser especialmente útil para estimar la nisina en extractos de alimentos, sin embargo, éstos suelen presentar sustancias que interfieren en el ensayo y no permiten una lectura adecuada de los resultados. El tratamiento previo de los extractos, liberando la

nisina de las proteínas a las que pueda estar unida, mediante ebullición a pH 2 y la realización de controles adecuados en los que la nisina se inactiva por un tratamiento alcalino a 63 °C durante 30 minutos, permitieron superar estos problemas. Además, la dilución de las soluciones estándar y problema se realizan en el mismo solvente (por ejemplo, un extracto ácido del alimento libre de nisina).

Este último método se ha adoptado como método estándar para determinar de forma rutinaria la presencia de nisina en los alimentos (Fowler *et al.*, 1975). El British Standard (1974) describe, no sólo este método para determinar la nisina en muestras de queso, sino también otros métodos que permiten la diferenciación de la nisina de otras sustancias antimicrobianas que puedan estar presentes en los alimentos, como es la determinación del efecto del calor y del pH, la comparación con un microorganismo productor de nisina y, más específicamente la inactivación de la nisina por el enzima nisinasa, producido por algunas cepas de *Bacillus cereus* (Jarvis, 1967; Jarvis y Farr, 1971).

Sin embargo, algunos factores influyen en la determinación de la nisina en los alimentos por este método. Así, por ejemplo, Briz (1972) demostró la presencia de inhibidores naturales en el queso, que influían en la determinación de la concentración residual de nisina en los quesos de pasta dura. En el caso de la carne picada o de emulsiones cárnicas, el contenido en grasa de la muestra puede interferir notablemente durante su extracción (Bell y De Lacy, 1986). La nisina puede unirse también a los ingredientes del queso fundido, afectando a su extractabilidad (Somers y Taylor, 1987). Por otro lado, el ensayo tiene un sensibilidad limitada y pueden formarse halos de inhibición debidos al pH ácido de las muestras. Por estos motivos, se han desarrollado varias modificaciones del método de Tramer y Fowler para determinar la nisina residual en muestras cárnicas (Calderon *et al.*, 1985) y para determinar el título de nisina en los cultivos (De Vuyst y Vandamme, 1992) y se han desarrollado otros métodos de difusión en agar (Ogden y Tubb, 1985; Rogers y Montville, 1991). No obstante, Wolf y Gibbons (1996) estudiaron los distintos factores que participan en la técnica de Tramer y Fowler con el fin de incrementar su sensibilidad y precisión, indicando que *Micrococcus luteus* es el microorganismo más sensible, que una concentración de agar inferior (0,75% en lugar de 1,5%) incrementa la sensibilidad del ensayo y que la incorporación de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 1% en el agar, evita la posible presencia de falsas zonas de inhibición debidas al bajo pH de las muestras.

Otro método semicuantitativo, descrito por Tramer y Fowler (1964), consiste en suspender los esporos de *Bacillus stearothermophilus* en un agar no nutritivo; la germinación y crecimiento de los esporos no tendrá lugar hasta que unos discos que

contienen los nutrientes adecuados se sumergen en el extracto del alimento y se depositan en la superficie del agar. La difusión de los nutrientes estimula la germinación y el desarrollo de las formas vegetativas en las condiciones adecuadas de incubación, dando lugar a zonas de crecimiento alrededor de los discos. Cuando el extracto de alimento contiene nisina, el disco se rodea de una zona de inhibición que, a su vez, se rodea de una zona de crecimiento. Una ventaja de este método es que las placas pueden prepararse en tandas y los esporos se mantienen viables durante semanas, siempre que las placas se conserven cerradas y en refrigeración. Este método tiene una sensibilidad de 0,5 a 1 UI/ml.

La determinación de la liberación de ATP por *Lactobacillus brevis* empleando técnicas de bioluminiscencia (Waites y Ogden, 1987), se ha empleado para estimar la concentración de nisina en la cerveza. Los mismos investigadores (Ogden y Waites, 1986) mostraron previamente que al añadir la nisina a cultivos de *Lactobacillus* o *Pediococcus* se origina la liberación de ATP y que tanto la reducción del ATP intracelular como el incremento del ATP extracelular, dependen de la concentración de nisina. El método es rápido y puede emplearse para cuantificar la nisina en el rango de 0 a 120 UI/ml, con un porcentaje de error de menos del 5%.

Recientemente, otro método desarrollado inicialmente para estimar la concentración de la pediocina PA1/AcH de *Pediococcus acidilactici* en caldos de cultivo, se ha empleado también para determinar la concentración de la nisina. Este método consiste en hacer diluciones decimales de la muestra a analizar en agua destilada estéril y depositar 5  $\mu$ l de cada dilución en una placa de agar con Tween 80 al 0,2% e inoculada con unas  $10^6$  células de *Lactobacillus plantarum* NCDO955. Tras una incubación de las placas durante la noche a 30 °C, la máxima dilución que origina una zona de inhibición de al menos 1 mm se multiplica por 200 para obtener las unidades de actividad (UA) del cultivo original. La comparación entre una preparación de nisina comercial (Nisaplin) con este método, indica que una unidad internacional (UI) equivale a 100 unidades de actividad (UA).

Rodríguez *et al.* (1995) han empleado una modificación del ensayo en placas microtituladoras descrito por Geis *et al.* (1983) para cuantificar la actividad de la nisina durante su purificación. Este método utiliza placas microtituladoras de 96 pocillos y las muestras en medio líquido se diluyen seriadamente en los distintos pocillos. A continuación, se añade en los pocillos un inóculo del microorganismo indicador y las placas se mantienen durante 14 horas a 32 °C. Finalizada la incubación, el desarrollo microbiano de los pocillos se determina mediante la lectura de su absorbancia a 620 nm. Una unidad de bacteriocina (UB/ml), se define como el valor recíproco de la máxima

dilución que produce el 50% de inhibición en el crecimiento del microorganismo indicador, en este caso de *Pediococcus acidilactici* 347.

Los métodos inmunológicos desarrollados hasta la fecha para identificar y cuantificar la nisina, se han descrito previamente en el apartado propiedades inmunológicas. Falahee *et al.* (1990), desarrollaron con anticuerpos policlonales de oveja un ensayo de ELISA sandwich con una sensibilidad de  $1,9 \times 10^{-2}$  UI/ml, detectando también la nisina en muestras de queso. Los anticuerpos desarrollados por Stringer *et al.* (1995) para detectar la nisina *in situ*, sólo detectaron a las cepas productoras, por lo que no son eficaces ni en la detección ni en la cuantificación de la nisina.

Los métodos inmunológicos tienen la ventaja, frente a los microbiológicos, de su especificidad, sencillez, sensibilidad y escasa preparación previa de las muestras, por lo que supondrían, probablemente, una mejora frente a los métodos microbiológicos utilizados actualmente en la identificación y cuantificación de la nisina.

## **2.10. Aplicaciones de la nisina**

### **2.10.1. Aplicaciones en la industria alimentaria**

A la hora de emplear la nisina en los alimentos, hay que tener en cuenta una serie de consideraciones técnicas (De Vuyst y Vandamme, 1994): (a). Cuando la nisina se añade a un alimento, debería hacerse preferiblemente en solución, para garantizar su distribución y debería depositarse en la parte líquida del alimento, (b). El pH del alimento debe ser inferior a 7 para asegurar su solubilidad y estabilidad durante el procesado y almacenamiento, (c). Los microorganismos que se pretende controlar deben ser Gram-positivos, de no ser así, la nisina debería emplearse combinada con otros medios de conservación, (d). Debe añadirse una concentración suficiente de nisina al alimento como para alcanzar el nivel residual apropiado y eficaz tras el curado, procesado o almacenamiento del producto.

En los productos lácteos, la solubilidad de la nisina no es un problema debido a su pH ácido y a que contienen suficientes proteínas que facilitan su solubilidad. Al emplearla en las carnes, la nisina se une fácilmente a las proteínas y a otros compuestos, lo que dificulta una distribución uniforme de la nisina (Scott y Taylor, 1981b; Taylor *et al.*, 1984; Henning *et al.*, 1986a); asimismo, la carne y los derivados cárnicos deberían tener un bajo contenido de grasa (Jones, 1974) y deberían estar libres de emulsionantes que, a las concentraciones empleadas en la práctica, disminuyen el efecto inhibitorio de la nisina (Henning *et al.*, 1986b); además, la carne y los derivados cárnicos deberían tener un

contenido bajo de sal, ya que esta puede reducir el efecto inhibitor de la nisina en los esporos bacterianos (Bell y De Lacy, 1985).

#### 2.10.1.1. Aplicaciones en la industria láctea

---

La primera utilización práctica de la nisina en los alimentos, fue como conservante en algunos tipos de quesos y esta aplicación continúa siendo hoy en día una de las más relevantes (McClintock *et al.*, 1952; Delves-Broughton, 1990). En los ingredientes que se emplean en la fabricación del queso fundido, es fácil encontrar esporos de especies de *Clostridium* que resisten el tratamiento térmico de 85-105 °C durante 6-10 minutos, que se utiliza durante el procesado para fundir los ingredientes. Las condiciones del queso procesado, especialmente su elevado pH y humedad, junto con el bajo potencial de oxido-reducción (condiciones anaerobias) favorecen la germinación de los esporos y el crecimiento de las células vegetativas, ocasionando la alteración del producto mediante la producción de gas, olores desagradables y licuefacción del queso. Las especies generalmente implicadas son *Clostridium butyricum*, *Clostridium tirobutyricum* y *Clostridium sporogenes*. No obstante, dicho crecimiento puede evitarse añadiendo nisina en la mezcla de componentes, puesto que ésta inhibiría la germinación de los esporos. Se ha determinado que 6,25 µg de nisina por gramo de mezcla inhiben una carga de hasta 200 esporos por gramo (Delves-Broughton *et al.*, 1996).

En los quesos fundidos también es preocupante la posible producción de toxinas por las cepas de *Clostridium botulinum*, potencialmente presentes en estos productos. La nisina retarda o evita el desarrollo de los esporos y la formación de toxinas botulínicas, como se ha determinado en muestras de queso fundido inoculadas con *C. botulinum* de los tipos A y B (Somers y Taylor, 1987). La cantidad de nisina necesaria para conseguir el efecto deseado depende de factores como la carga inicial de esporos en la muestra, el contenido en humedad, el pH, el contenido de sal, el empleo de otros aditivos, el tratamiento térmico, la temperatura de almacenamiento y su vida útil (Delves-Broughton *et al.*, 1996). Las concentraciones empleadas para evitar la alteración varían de 5 a 20 µg/g, mientras que los niveles necesarios para proteger frente a *C. botulinum* son de 12,5 µg/g o mayores.

La nisina utilizada procede del preparado comercial de Nisaplin® (que contiene un 2% de nisina pura), añadiéndolo directamente en polvo a la mezcla de queso o en suspensión acuosa si el agua forma parte de la formulación. La adición de nisina permite reducir la cantidad de sal e incrementa ligeramente la humedad de la mezcla, lo que mejora su untabilidad (Somers y Taylor, 1987).

Aunque Hirsch *et al.* (1951), demostraron la capacidad de la nisina para inhibir el desarrollo de los clostridios alterantes del queso de Gruyere, su utilización práctica se ve limitada al inhibir también a los cultivos iniciadores que producen las características propias del queso. No obstante, esto podría evitarse empleando cultivos iniciadores resistentes a la nisina o transformados con la información genética de protección e inmunidad frente a este antibiótico. Esto último se ha realizado en la obtención del queso Gouda, empleando una cepa proteolítica de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y otra cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, fermentadora del citrato. En la cepa proteolítica se incorporó el gen de la resistencia a la nisina y en la cepa fermentadora del citrato se incorporó por conjugación el transposón de la nisina. En el queso producido por estas cepas, no se detectó la presencia de *Clostridium tyrobutyricum* y *Staphylococcus aureus* durante su maduración (Delves-Broughton, 1996).

En aquellos países tropicales y sub-tropicales donde la temperatura ambiental es elevada y los sistemas de transporte y refrigeración inadecuados, la nisina puede emplearse en la leche pasteurizada a niveles de entre 0,625 y 1,25  $\mu\text{g/ml}$  para prolongar su vida útil. También se utiliza en la conservación de leches pasteurizadas con sabores (en las chocolateadas, el cacao puede ser otra fuente de esporos), leche evaporada, leche esterilizada y en los postres lácteos a concentraciones de 2,5 a 3,75  $\mu\text{g/ml}$ .

#### **2.10.1.2. Aplicaciones en la industria conservera**

Los alimentos enlatados de baja acidez, con un pH por debajo de 4,5, deben recibir un tratamiento térmico mínimo de  $F_0=3$  (siendo  $F_0$  el número de minutos que el centro de la lata se mantiene a 121 °C) para asegurar la destrucción de los esporos de *C. botulinum*. Sin embargo, este tratamiento no destruye otros microorganismos alterantes con esporos más termorresistentes, como los de *B. stearothermophilus* y *C. thermosaccharolyticum* (De Vuyst y Vandamme, 1994). Estos dos microorganismos se encuentran frecuentemente contaminando la harina, el azúcar y las especias de los componentes de las conservas. De ahí que la adición de nisina en estos productos, prolongue su almacenamiento al impedir la esporulación de estos microorganismos. Su empleo puede incluso reducir el tratamiento térmico e incrementar el valor nutritivo de los productos conservados, mejorar la apariencia y la textura y reducir el gasto energético durante el procesado. Asimismo, el tratamiento térmico incrementa la sensibilidad de los esporos a la nisina y, por consiguiente, reduce la dosis efectiva necesaria.

Por su parte, los microorganismos alterantes capaces de desarrollarse en los alimentos enlatados de acidez elevada, se caracterizan por ser termorresistentes, acidúricos y esporulados. Entre ellos se incluyen microorganismos como *Clostridium*

*pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Bacillus thermoacidurans*, *Bacillus macerans* y *Bacillus coagulans* (Heinemann *et al.*, 1965). En algunos de estos productos, como en la salsas de tomate y frutas enlatadas también puede desarrollarse *Clostridium botulinum*. No obstante, todos los microorganismos citados se controlan fácilmente con el empleo de nisina, puesto que además el pH ácido incrementa su estabilidad y potencia su actividad.

#### **2.10.1.3. Aplicaciones en la industria cárnica**

El empleo de la nisina en los productos cárnicos tiene como limitaciones la escasa solubilidad de la nisina, distribución irregular, sensibilidad al calor a pH neutro, posible unión a proteínas de la carne, interferencia de su modo de acción por los fosfolípidos y falta de estabilidad. Su empleo tiene como principal interés el reducir el empleo de nitratos y nitritos en los productos cárnicos curados (Rayman *et al.*, 1981, 1983) puesto que se conoce que dichos compuestos originan nitrosaminas potencialmente cancerígenas. No obstante, los estudios realizados hasta la fecha todavía no son concluyentes en cuanto a la capacidad de la nisina de sustituir en parte a los nitritos. Mejores resultados se han obtenido en productos curados envasados al vacío, donde el factor limitante de la vida útil es el desarrollo de una flora láctica alterante.

#### **2.10.1.4. Aplicaciones en productos vegetales**

El empleo de aderezos de ensalada con menor acidez de la tradicional, mejora el sabor y favorece la detección de los sabores de los diferentes ingredientes de la ensalada. No obstante, una elevación del pH de 3,8 a 4,2 facilita la alteración de los aderezos por bacterias lácticas si se mantienen a temperatura ambiente. Dicho crecimiento se controla eficazmente con la nisina a niveles de 2,5 a 5 mg/l.

Por otro lado, Harris *et al.* (1992a) desarrollaron un cultivo iniciador para la obtención de col fermentada (sauerkraut), consistente en una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* productora de nisina y otra de *Leuconostoc mesenteroides* resistente a este antibiótico. Las cepas heterofermentativas de *Leuconostoc mesenteroides* dominan los primeros estadios de la fermentación de este alimento, mientras que los niveles de nisina producidos retrasan el desarrollo de *Lactobacillus plantarum* el cual juega un papel importante en los estadios finales de la fermentación, de esta manera se obtiene un producto con las características adecuadas.

#### **2.10.1.5. Aplicaciones en la industria pesquera**

Se han realizado pocos estudios respecto a la posibilidad de emplear la nisina en los pescados y otros productos de la pesca, probablemente debido a que la alteración de estos productos se debe fundamentalmente a bacterias Gram- negativas. No obstante, la

tendencia actual de conservar el pescado en atmósferas modificadas puede favorecer el desarrollo de *Clostridium botulinum* del tipo E. Estudios realizados añadiendo nisina a filetes de pescado envasados en atmósferas de 100% de dióxido de carbono, han permitido observar una inhibición notable del desarrollo de los microorganismos alterantes (Taylor *et al.*, 1990).

#### **2.10.1.6. Aplicaciones en la industria panadera**

La nisina se utiliza en bollitos blandos (*crumpets*), un producto panadero típico del Reino Unido y Australia, para eliminar el posible riesgo de toxinfeción alimentaria por *Bacillus cereus*, puesto que los esporos de este microorganismo suelen ser contaminantes habituales de la harina y los tratamientos térmicos empleados en su fabricación pueden no ser suficientes para inactivarlos.

#### **2.10.1.7. Aplicaciones en las bebidas alcohólicas**

La nisina inhibe a las bacterias lácticas alterantes de la cerveza (fundamentalmente pediococos y lactobacilos) (Ogden *et al.*, 1988) y del vino (Radler 1990 a y b). El hecho de que las levaduras sean resistentes a la nisina, permite el empleo de esta sustancia durante la fermentación, de manera que sus aplicaciones en la industria cervecera serían: añadirla a los fermentadores para evitar o controlar la contaminación, utilizarla en el lavado de las levaduras para eliminar las bacterias contaminantes (en lugar de emplear el lavado ácido que afecta a la viabilidad de las levaduras), reducir el tratamiento térmico de pasteurización e incrementar la vida útil de cervezas no pasteurizadas. En la industria vinatera las aplicaciones son similares, aunque no se puede emplear en la fermentación de los vinos donde la fermentación maloláctica es deseable.

La nisina también puede emplearse en productos de destilería, tanto para bebidas como para otros productos de aplicación industrial, incrementando la producción alcohólica al reducir la competición por los sustratos entre las levaduras y las bacterias lácticas, que son eliminadas con la nisina. (Henning *et al.*, 1986).

#### **2.10.1.8. Aplicaciones en otros productos**

El huevo líquido pasteurizado recibe el tratamiento térmico necesario para garantizar la eliminación de *Salmonella*, generalmente 62-65 °C durante 2 a 3 minutos. Sin embargo, este tratamiento no es suficiente para eliminar ciertos microorganismos esporulados u otras células vegetativas más termorresistentes, algunos de los cuales se desarrollan a temperaturas de refrigeración, por lo que este producto posee una vida útil limitada. El empleo de la nisina a concentraciones de 2,5 a 5 mg/l incrementa la vida útil de estos productos y evita el crecimiento de *B. cereus* psicrótrofos. Esta aplicación tiene

un interés especial en ovoproductos modificados con un contenido reducido de colesterol. Parece que la nisina es más eficaz en la clara que en la yema del huevo, lo que podría deberse a la gran cantidad de fosfolípidos de la yema que interfieren el modo de acción de la nisina. La lisozima de la clara del huevo parece tener un efecto sinérgico con la nisina, en cuanto a que incrementa su actividad bacteriostática y amplía el espectro antimicrobiano de acción (Monticello, 1989).

### **2.10.2. Limitaciones de su empleo en los alimentos**

Existen factores que pueden entorpecer la acción de la nisina como agente conservante de los alimentos. Así, en los alimentos con un tratamiento térmico leve, los enzimas proteolíticos de origen bacteriano, vegetal o animal pueden degradar la nisina, sin olvidar que la vida útil de este compuesto depende también de la temperatura, el tiempo de almacenamiento y el pH. Estos factores conviene considerarlos al calcular la dosis inicial de nisina necesaria en los alimentos, especialmente cuando se emplea para controlar la germinación de los esporos.

La hidrofobicidad de la nisina contribuye a que los componentes grasos de los alimentos interfieran en su distribución uniforme dentro del alimento y reducen su actividad frente a los microorganismos sensibles (Jung *et al.*, 1992). Los fosfolípidos de la carne pueden unirse a la nisina y, por consiguiente, reducir su acción. Algunos aditivos alimentarios también reducen la actividad de la nisina y se conoce, por ejemplo, que la nisina se degrada en presencia de metabisulfito sódico (un agente antioxidante, blanqueante y antimicrobiano) y dióxido de titanio, que se emplean frecuentemente en los alimentos.

Richard (1993) ha observado que cuando la nisina se añade a la leche que sufre un tratamiento de esterilización HTST (alta temperatura-corto tiempo, es decir, unos segundos a 72 °C), se reduce su actividad listericida en comparación con el tratamiento de calentamiento de 10 minutos a 100 °C, este investigador atribuyó este fenómeno a los posibles cambios proteicos que ocurren durante el calentamiento, de manera que cuanto menos drástico es el tratamiento, más nisina se mantiene unida a las proteínas.

No obstante, algunos de los factores que limitan el empleo de la nisina como conservante de los alimentos, como su escasa solubilidad y estabilidad a pH neutro, su hidrofobicidad y su espectro de acción, podrían mejorarse significativamente mediante el empleo de variantes de la nisina obtenidas por técnicas de ingeniería genética (Dodd *et al.*, 1992).

### 2.10.3. Empleo de tratamientos combinados

Existe actualmente un considerable interés en el empleo de la nisina en combinación con los nuevos métodos de conservación de los alimentos, como los de la utilización de presiones elevadas (*Ultrahigh Hydrostatic Pressure*, o UHP) y campos eléctricos pulsantes (*Pulsed Electric Field* o PEF). En este contexto, Kalchayanand *et al.* (1994) describieron que las células de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* dañadas como consecuencia de estos tratamientos eran sensibles a la nisina y que la combinación de la nisina con estas técnicas producía una acción antibacteriana más eficaz que el empleo de aquellas técnicas solamente.

También se ha evaluado la combinación de nisina con agentes quelantes, ter Steeg (1993) y ter Steeg *et al.* (1994) combinando la nisina con lisozima y citrato, han observado un efecto sinérgico frente a *Listeria monocytogenes*, previniendo su desarrollo en paté de hígado y quesos fundidos. El empleo sólo de citrato, de lisozima con citrato o de nisina con citrato, no evitó el desarrollo de estas bacterias en los alimentos.

### 2.10.4. Estatus legal del empleo de la nisina en los alimentos

El Comité de Expertos de la FAO/OMS sobre Aditivos en los Alimentos consideraron en 1969 que la nisina no tenía efectos adversos para el consumidor a dosis de hasta  $3,3 \times 10^6$  UI/kg y, en consecuencia, la reconocieron como un aditivo seguro y legal en los alimentos. Asimismo, el Comité Científico en materia de alimentos de la Comunidad Europea decidió en 1992 añadir la nisina a la lista positiva de aditivos con el número E234. Como ya se ha citado previamente, la nisina está admitida como conservante en más de 50 países, fundamentalmente para su empleo en quesos procesados y de untar (en la mayoría de los países), vegetales y frutas enlatados (en países del este de Europa) y en la leche esterilizada y bebidas lácteas (países cálidos). Las regulaciones respecto al etiquetado y concentraciones permitidas varían ampliamente en cada país.

### 2.10.5. Aplicaciones en la industria farmacéutica

La utilización de la nisina purificada a homogeneidad, junto con la posible potenciación de su actividad y espectro de acción por agentes quelantes (Blackburn *et al.*, 1989), han abierto nuevas posibilidades para el empleo de la nisina en la industria farmacéutica.

Una de las aplicaciones potenciales de la nisina es como agente terapéutico en el tratamiento de la úlcera péptica, una enfermedad inflamatoria crónica del estómago y duodeno, que afecta entre el 3 y el 10% de la población humana. El tratamiento

convencional incluye el empleo de agentes que reducen la secreción gástrica, sin embargo, a pesar de las aparentes tasas de recuperación, existen recaídas en muchos casos. Recientemente, se ha encontrado una relación causal entre el desarrollo de la úlcera péptica y la colonización del estómago y duodeno por la bacteria Gram-negativa *Helicobacter pylori*. Este microorganismo se inactiva con antibióticos, pero éstos frecuentemente originan trastornos secundarios en los pacientes al afectar a la flora habitual gastrointestinal e inducir el desarrollo de resistencias.

Los estudios *in vitro* han demostrado la sensibilidad de *Helicobacter pylori* a la nisina y más aún si su acción se potencia con agentes quelantes. La nisina se adaptaría fácilmente como agente terapéutico para el estómago y duodeno, dado que su actividad se favorece con el pH ácido y es resistente a la pepsina del estómago. Además, la nisina se degradaría rápidamente por las proteasas pancreáticas, por lo que se evitarían otros efectos secundarios. Su empleo durante mucho tiempo como aditivo en los alimentos, su escasa toxicidad y su rápida actividad bactericida avalan su empleo como un agente terapéutico seguro. Su acción bactericida y la escasa posibilidad de que alcance a la flora intestinal reducen el desarrollo de resistencias, lo que favorece su empleo frente a otros agentes antibacterianos. La nisina podría utilizarse no sólo como agente terapéutico, sino también como profiláctico, para evitar la colonización del estómago por *Helicobacter pylori* (Blackburn y Projan, 1994).

La nisina también podría emplearse como agente terapéutico en el tratamiento de las mastitis bovinas. Actualmente, este problema se soluciona mediante el empleo de antibióticos, pero la tasa de recuperación es pequeña y es necesario mantener un periodo de supresión prolongado para reducir la aparición de residuos en la leche. La nisina posee un potente efecto bactericida frente a la flora implicada normalmente en las mastitis (especies de *Staphylococcus* y *Streptococcus*). Las experiencias de campo han demostrado que la nisina puede ser un agente eficaz en el tratamiento de esta enfermedad y, además, a diferencia de los antibióticos, su presencia en la leche no ocasionaría problemas debido a su inactivación por los enzimas pancreáticas y su escasa toxicidad, contrastada por su empleo como aditivo en los alimentos. En la actualidad, la nisina ya se emplea como agente profiláctico aplicándose con aplicaciones tópicas antes y después del ordeño.

La nisina también podría utilizarse en el tratamiento de la malaria, dado que los deshidroaminoácidos podrían interaccionar con enzimas con grupos sulfhidrilos como el coenzima A y los *Plasmodium* son sensibles a la deficiencia en este coenzima. Esta posible actividad se confirmó experimentalmente en ratones infectados con *Plasmodium*

*berghei* (Gross y Morell, 1967), aunque hasta la fecha, no se han vuelto a publicar experimentos al respecto. Actualmente también se está investigando el posible empleo de la nisina en el campo de la higiene bucal. Estudios en perros *Beagle* han demostrado que reduce la placa dental y previene la gingivitis (Howell *et al.*, 1993).

La gran sensibilidad de las especies de *Streptococcus* y *Staphylococcus* a la nisina, le confiere grandes posibilidades para su empleo en los tratamientos tópicos dermatológicos y el tratamiento de infecciones sistémicas resistentes a otros agentes terapéuticos. También se está evaluando su posible utilidad en el campo de la cosmética, para incrementar la vida útil de estos productos de tan alto valor añadido.

#### **2.10.6 Otras aplicaciones**

También se ha sugerido el empleo del gen de la resistencia a la nisina como posible marcador en vectores de clonación, que puedan emplearse en la expresión de productos de interés en los alimentos (Von Wright *et al.*, 1990; Froseth y McKay, 1991).



## ***II. OBJETIVOS DEL TRABAJO***

---



## II. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Las bacteriocinas que producen las bacterias lácticas constituyen una alternativa real como conservantes de los alimentos, dado que podrían reemplazar o sustituir a otras sustancias químicas menos recomendables por sus posibles efectos nocivos secundarios en la salud de los consumidores. No obstante, hasta ahora la nisina es la única bacteriocina cuyo empleo está permitido en los alimentos, pero en el futuro es muy probable que la caracterización bioquímica, inmunológica, genética y toxicológica de otras bacteriocinas facilite y permita su utilización en la industria alimentaria.

Asimismo, habrá que mejorar los métodos analíticos empleados en la detección y cuantificación de las bacteriocinas de los sobrenadantes de los cultivos productores y de los alimentos, que se basan en la estimación de su actividad inhibidora frente a un microorganismo indicador. Aunque estas técnicas son de gran utilidad, presentan inconvenientes como su inespecificidad, su baja sensibilidad y la subjetividad de su interpretación.

Desde el inicio de la década de los años 70 las técnicas inmunológicas (y dentro de ellas, principalmente, las inmunoenzimáticas), han experimentado un gran auge como herramientas analíticas, constituyendo actualmente, la metodología de elección en numerosos campos de la ciencia. Cuando se dispone de anticuerpos de calidad, los métodos inmunológicos son específicos y muy sensibles. Además, son fáciles de ejecutar, permiten el análisis de numerosas muestras en un breve espacio de tiempo y pueden automatizarse reduciendo la subjetividad. Sorprendentemente, el impacto de las técnicas inmunológicas en la detección y cuantificación de las bacteriocinas ha sido hasta ahora escaso. También es escasa la bibliografía relacionada con este tema y los resultados obtenidos poco satisfactorios (Falahee *et al.*, 1990; Bhunia, 1994; Stringer *et al.*, 1995). Las razones de ello pueden ser múltiples, destacando entre ellas el pequeño tamaño molecular de estos compuestos (lo que les convierte en pobres inmunógenos), su peculiar estructura y su limitada disponibilidad.

Como objetivos de este trabajo se ha propuesto el desarrollo de métodos eficaces de obtención de anticuerpos frente a la nisina A y la utilización de los anticuerpos generados en la evaluación y puesta a punto de métodos inmunoenzimáticos (ELISA) que permitan: (1) la detección rápida de microorganismos productores de nisina, tanto de cepas salvajes como genéticamente modificadas y (2) el descubrimiento y la cuantificación de la nisina en los sobrenadantes de los microorganismos productores y en los alimentos. Además, con los anticuerpos generados podrían construirse columnas que permitiesen la

## Objetivos

purificación de la nisina en un sólo paso por cromatografía de inmunoafinidad.

No obstante, para alcanzar los objetivos propuestos, se necesita conseguir primero los siguientes objetivos parciales:

### 1. Obtención de anticuerpos policlonales frente a la nisina A:

- 1.1 Preparación de los inmunorreactivos idóneos mediante la conjugación de la nisina A a moléculas vehiculadoras o portadoras constituidas por la toxina colérica (CT) y la hemocianina de *Megathura crenulata* (KLH),
- 1.2. Diseñar pautas de inmunización adecuadas que permitan obtener en los ratones los anticuerpos policlonales de interés,
- 1.3. Conseguir una mayor cantidad de anticuerpos policlonales mediante la inducción de ascitis en los ratones inmunizados,
- 1.4. Desarrollar los métodos inmunoenzimáticos (ELISA) apropiados, para determinar la especificidad de los anticuerpos obtenidos frente a la nisina y su reactividad cruzada con otras bacteriocinas.

### 2. Una vez evaluada la inmunogenicidad de los conjugados anteriores, se procederá a la obtención de anticuerpos monoclonales, mediante:

- 2.1. La fusión, en presencia de polietilenglicol, de los linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con las células de mieloma de ratón de la línea celular P3X63-Ag.653,
- 2.2. Identificación de los hibridomas productores de anticuerpos específicos y clonación de los mismos por dilución límite,
- 2.3. Estabilización de los clones positivos y producción de anticuerpos a gran escala, mediante su propagación *in vitro* e *in vivo*,
- 2.4. Purificación de los anticuerpos monoclonales de interés por precipitación con sulfato amónico,
- 2.5. Evaluación de la especificidad y la reactividad cruzada de los anticuerpos obtenidos y desarrollo de métodos inmunoenzimáticos (ELISA), que permitan la identificación y cuantificación de la nisina en los sobrenadantes de los microorganismos productores y en los alimentos.

### 3. Utilización de los anticuerpos policlonales y monoclonales obtenidos para:

- 3.1. El estudio de la cinética de la producción de nisina A por cultivos de *Lactococcus lactis* productores de nisina,
- 3.2. La identificación y cuantificación de la nisina en los alimentos,
- 3.3. El desarrollo de una columna de cromatografía de inmunoafinidad y la

evaluación de su eficacia en la purificación de la nisina de los sobrenadantes de los microorganismos productores,

- 3.4.** El estudio de la especificidad y sensibilidad de los métodos inmunoenzimáticos (ELISA) desarrollados para la cuantificación de la nisina, frente a otros métodos tradicionales de detección.



### ***III. MATERIAL Y METODOS***

---



### **III. 1. MATERIAL GENERAL**

#### **1.1. Material de laboratorio**

En la preparación de los medios de cultivo y de las diversas disoluciones acuosas, empleamos agua destilada obtenida en un destilador "Pobel" mod. 706 y desmineralizada en un intercambiador iónico "Seta" mod. R-600. Para las experiencias cromatográficas se empleó agua desionizada ultrapura, libre de pirógenos obtenida en un aparato "Barnstead" mod. Nanopure.

Las pesadas ordinarias se hicieron en balanzas monoplato "AD" mod. FX-3000 y las de precisión en balanzas analíticas "AD" mod. ER-120A. Para equilibrar las muestras a centrifugar, se utilizó una balanza biplato "Cobos" mod. 201.

Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas refrigeradas "Sorvall" RC-SB, equipadas con rotores SS-34 y GSA. Las microcentrifugaciones se efectuaron en una centrífuga Biofuge A de "Heraeus" mod. Christ. Las centrifugaciones instantáneas se realizaron en una centrífuga "Stratagene" mod. Picofuge HF-120.

Las determinaciones y ajustes de pH se realizaron en un PHímetro "Crison" mod. micropH 2001.

Las esterilizaciones de los medios de cultivo y del material plástico se realizaron en autoclaves "Selecta" mod. Autotester G y 43-G. La esterilización del material de vidrio se efectuó por calor seco en una estufa de aire forzado "Heraeus" mod. KFTU-K. Los sobrenadantes y algunas de las soluciones empleadas se esterilizaron por filtración, empleando filtros "Millipore" de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en espectrofotómetros "Kontron" mod. Uvikon 820 e "Hitachi" mod. U-2000 de doble haz, registrándose los resultados en una impresora térmica Uvikon LS-4B y en un registrador Uvikon 21. Las determinaciones espectrofotométricas relacionadas con la purificación y determinación de la concentración inhibitoria mínima de las bacteriocinas, se efectuaron en placas microtituladoras estériles de 96 pocillos "Costar" mod. 3590 y las lecturas en un lector de placas "Labsystems" iEMS Reader MF.

## *Material y Métodos*

Las liofilizaciones se realizaron en un aparato Teruzzi-Mevilsa mod. TP-3 con superficie útil de carga de 0,3 m<sup>2</sup>, dotado de equipo de registro, dispositivo de termovacío y programador.

Algunas muestras se filtraron en diversos modelos de filtro "Whatman". Las diálisis se realizaron en membranas de diálisis de "Medicell" tamaño 3.

Las muestras y reactivos se conservaron en arcones de congelación "Kelvinator" mod. AC-550 y "Liebherr" mod. GT6102, así como en frigoríficos "Kelvinator" mod. AKR20 y "Liebherr" mod. 38.

En las incubaciones se utilizaron estufas "Heraeus" mod. KB-500, BK-600 y B6200 y "Selecta" mod. Termotronic 338, termostatadas a la temperatura deseada. El baño de agua termostatado fue de "Selecta" mod. Unitronic 6320100.

Para las cromatografías de filtración en gel, se emplearon columnas de "Pharmacia" mod. PD-10. Las de intercambio catiónico e interacción hidrofóbica se realizaron en columnas convencionales de "Bio-Rad" mod. Econo Column. La cromatografía de fase reversa se efectuó en una columna de "Pharmacia-LKB" mod. PepRPC HR5/5, integrada en un sistema de Cromatografía Líquida Rápida de P9roteínas (FPLC) de la misma firma comercial. El sistema de FPLC consta de dos bombas de alta presión mod. P-500, un controlador mod. LCC-500 Plus, una bomba peristáltica mod. P-1, un dispositivo de válvulas mod. MV-7, un monitor de luz ultravioleta mod. UV-M-II y una impresora registradora mod. REC-2. Los tampones empleados en la cromatografía FPLC se filtraron por filtros "Millipore" mod. GS de 0,22 µm de diámetro de poro, empleando una bomba de vacío "Eyela" mod. A-3S.

La desecación a vacío de las muestras purificadas se efectuó en un rotavapor "Howe" mod. GV1, acoplado a un refrigerador "FTS" mod. Titan y a una bomba de vacío "Edwards" mod. ED100.

La obtención de los anticuerpos monoclonales se realizó en una sala estéril provista de antesala, lámparas de luz ultravioleta en los techos, una unidad de aire acondicionado "Interclinet" y un filtro de aire positivo "Telstar". Además, en su interior se encuentran una campana de flujo laminar "Telstar" mod. AV-100, un incubador "Heraeus" mod. 6000 con controlador de temperatura y CO<sub>2</sub>, un microscopio "Nikon" mod. TMS, una centrífuga "Heraeus" Megafuge 1.0 y un baño termostatado "Grant" mod. W 14. El gas utilizado en el incubador fue CO<sub>2</sub> de calidad N-40, de alto grado de pureza y

comercializado por la SEO. Las células de mieloma y los hibridomas se conservaron en un arcón congelador "Sanyo" Ultralow mod. MDF-392 y en bombonas de nitrógeno líquido mod. CDB 35 y CDB 18.

Las placas de ELISA utilizadas en los ensayos inmunoenzimáticos fueron de la marca "Nunc", del mod. Maxisorp de 96 pocillos. Su agitación se realizó en un agitador de placas de ELISA marca "Wallac", mod. 1296.001 Plateshake y para su lectura se utilizó un lector de placas "Labsystems" iEMS Reader MF con un paquete informático de tratamiento de datos incorporado. Las placas tapizadas que así lo requirieron, se secaron en una estufa de aire forzado "Heraeus" mod. UT6.

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

El material de vidrio empleado fue del tipo "Pyrex" y el de plástico el suministrado por "Nunc", "Falcon", "Sterilin" y "Eppendorf".

## **1.2. Productos y reactivos**

Los productos químicos de uso general fueron suministrados por "Merck", "Sigma", "Fluka" y "Panreac". Los medios de cultivo para las experiencias microbiológicas fueron de las marcas "Oxoid" y "Difco".

En las técnicas cromatográficas de purificación de bacteriocinas y en la columna de inmunoafinidad, se emplearon productos de "Pharmacia-LKB". El gel de intercambio catiónico fue el SP-Sepharose Fast Flow y el de interacción hidrofóbica de Octyl-Sepharose CL-4B. Las columnas empleadas en la cromatografía de inmunoafinidad fueron las de HiTrap NHS-Activated.

La nisina A utilizada en las experiencias de inmunización y como estándar en los ELISA fue de "NBS Biologicals". El preparado comercial de nisina, Nisaplin® se obtuvo de "Applin & Barret". Los reactivos empleados en las conjugaciones, técnicas

inmunoenzimáticas y como adyuvantes en las inmunizaciones fueron de "Sigma" y "Pierce". Los inmunosueros comerciales fueron de "Cappel".

Los medios de cultivo utilizados en la obtención y producción de los anticuerpos monoclonales, fueron de las marcas "Gibco" y "Boehringer".

### 1.3 Material biológico

#### 1.3.1. Microorganismos productores de bacteriocinas

Los microorganismos productores de nisina y de otras bacteriocinas empleados en este trabajo, así como su origen se muestran en la tabla III.1. Dichos microorganismos se utilizaron como fuente de bacteriocinas, en la evaluación de la especificidad y la reactividad cruzada de los anticuerpos generados y en la localización de los epítomos reconocidos por los anticuerpos generados. También se emplearon microorganismos modificados genéticamente, productores de variantes de la nisina, con el objeto de identificar y localizar los epítomos de interés, los cuales se muestran en la tabla III.2. Todos ellos se mantuvieron en congelación a -20 °C y -85 °C en caldo nutritivo con un 15% (v/v) de glicerol como agente crioprotector. Los cultivos mantenidos a -20 °C se revitalizaron cada dos meses, mediante dos o tres pases en caldo nutritivo, para garantizar su conservación.

**Tabla III.1. Microorganismos productores de bacteriocinas**

Microorganismo productor	Cepa	Bacteriocina	Origen <sup>a</sup>
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	BB24	Nisina A	NBIII
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	G18	Nisina A	NBIII
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	FI5876	Nisina A	IFR
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	ATCC11454	Nisina A	ATCC
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	CNRZ150	Nisina Z	INRA
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	MG1614	No productor	IFR
<i>Lactobacillus sake</i>	148	Lactocina S	NBIII
<i>Pediococcus acidilactici</i>	347	Pediocina PA-1	NBIII
<i>Pediococcus acidilactici</i>	L50	Pediocina L50	NBIII

<sup>a</sup> Abreviaturas: ATCC, American Type Culture Collection (Rockville, EE.UU.); IFR, Institute of Food Research (Norwich, Reino Unido); INRA, Station of Researches Laitieres (Jou-en-Josas, Cedex, Francia); NBIII, Departamento de Nutrición y Bromatología III, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense (Madrid).

**Tabla III.2. Microorganismos obtenidos por ingeniería genética, empleados en la identificación y localización de los epítomos de interés**

Microorganismo productor	Cepa	Modificación genética	Variante	Origen <sup>a</sup>
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	FI7847	$\Delta nisA^b$	No productor	IFR
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	FI7990	$\Delta nisA^c$	No productor	IFR
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	FI8070	<i>nisA</i> <sup>d</sup>	Nisina A S5A	IFR
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	FI8198	<i>nisA</i> <sup>e</sup>	Nisina A S33A	IFR
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	FI8199	<i>nisA</i> <sup>f</sup>	Nisina A S5A, S33A	IFR
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	FI8438	$\Delta nisP^g$	No productor	IFR
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	FI8532	$\Delta nisP,$ $\Delta nisC^h$	No productor	IFR

<sup>a</sup> Abreviaturas: IFR, Institute of Food Research (Norwich, Reino Unido).

<sup>b</sup>FI7847 procede del FI5876, con la pérdida de una base en el gen estructural de la nisina A, lo que determina que se altere el marco de lectura y que no se produzca la bacteriocina.

<sup>c</sup>FI7990, procede del FI5876, con una delección de 300 pb en el gen estructural de la nisina A y pérdida del promotor.

<sup>d</sup>FI8070 procede del FI5876, con una mutación que sustituye el codón que codifica por la Ser en la posición 5 por otro que codifica la Ala (no se forma DHA en el péptido maduro).

<sup>e</sup>FI8198 procede del FI5876, con una mutación que sustituye el codón que codifica por la Ser en la posición 33 por otro que codifica la Ala (no se forma DHA en el péptido maduro).

<sup>f</sup>FI8199 procede del FI5876, con dos mutaciones que sustituyen los codones que codifican por Ser en las posición 5 y 33 por otros que codifican la Ala (no se forman DHAs en el péptido maduro).

<sup>g</sup>FI8438 procede del FI5876, con una delección en el gen *nisP*, por lo que no produce nisina madura.

<sup>h</sup>FI8532 procede del FI8438, con una delección en el gen *nisC*, por lo que no produce nisina madura.

<sup>i</sup>FI8484 produce la nisina 1-31, con una cola añadida de 5 His.

<sup>j</sup>FI8256 procede del FI5876, con una mutación que sustituye el codón que codifica la Lys en la posición 12 por otro que codifica la Leu.

<sup>k</sup>FI8542 procede del FI5876, con una mutación que sustituye el codón que codifica por la Ser en la posición 3 por otro que codifica la Val (no se forma el anillo A).

### 1.3.2. Microorganismos indicadores

Los microorganismos indicadores empleados en la detección de la nisina mediante pruebas microbiológicas, se muestran en la tabla III.3. Los microorganismos se conservaron de la manera citada previamente para los productores de bacteriocinas.

**Tabla III.3. Microorganismos indicadores empleados para detectar la nisina, mediante pruebas microbiológicas**

Microorganismo indicador	Cepa	Origen <sup>a</sup>
<i>Pediococcus acidilactici</i>	347	NBIII
<i>Lactobacillus helveticus</i>	CH1	CHL

<sup>a</sup> Abreviaturas: CHL, Christian Hansen's Laboratories (Copenhague, Dinamarca); NBIII, Departamento de Nutrición y Bromatología III, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense (Madrid).

### 1.3.3. Compuestos purificados empleados en la identificación y localización de los epítomos de interés

En el estudio de los epítomos reconocidos por los anticuerpos generados, también se emplearon fragmentos y variantes de la nisina A obtenidos por técnicas de ingeniería genética o por degradación o rotura enzimática, así como algunos lantibióticos análogos. Todos los compuestos, mostrados en la tabla III.4. y figura III.1., se obtuvieron purificados a homogeneidad.

### 1.3.4. Animales de experimentación

Para la obtención de los anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, se emplearon ratones hembras Balb/c de seis a ocho semanas de edad, alimentados con dieta de mantenimiento rata-ratón y agua potable *ad libitum*. Los ratones fueron donados por el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

### 1.3.5. Cultivos celulares

Para la obtención de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales se utilizó la línea celular P3X63-Ag 8.653, cedida por el Departamento de I+D del Instituto Llorente (Madrid).

**Tabla III.4. Fragmentos, variantes genéticas y análogos de la nisina A, empleados en la identificación y localización de los epítomos de interés<sup>a</sup>.**

Compuesto	Características
Nisina 1-12 <sup>b</sup>	Péptido constituido por los 12 primeros aminoácidos de la nisina A
Nisina 1-20 <sup>b</sup>	Péptido constituido por los 20 primeros aminoácidos de la nisina A
Nisina 1-31 <sup>c</sup>	Péptido constituido por los 31 primeros aminoácidos de la nisina A
Nisina 1-32 <sup>d</sup>	Péptido constituido por los 32 primeros aminoácidos de la nisina A
Nisina DHA5A <sup>c</sup>	Molécula de nisina A con Ala en la posición 5 en lugar de DHA
Nisina DHA33A <sup>c</sup>	Molécula de nisina A con Ala en la posición 33 en lugar de DHA
Nisina DHA5,33A <sup>c</sup>	Molécula de nisina A con Ala en las posiciones 5 y 33 en lugar de DHA
Nisina K12L <sup>c</sup>	Molécula de nisina A con Leu en la posición 27 en lugar de Lys
Nisina H27K <sup>c</sup>	Molécula de nisina con Lys en la posición 27 en lugar de His
Nisina 1-32 Des5Ala <sup>d</sup>	Péptido constituido por los 32 primeros aminoácidos de la nisina A sin la DHA de la posición 5 (se rompe el anillo A)
Secuencia líder <sup>e</sup>	Secuencia líder de la nisina A, de 23 aminoácidos
Nisina Z	Bacteriocina purificada
Subtilina	Bacteriocina purificada

<sup>a</sup> Todos los compuestos fueron obtenidos, purificados y cedidos por el grupo investigador de M. J. Gasson y col., del Institute of Food Research (Norwich, Reino Unido), excepto la nisina Z que fue purificada y cedida por el equipo de W. M. de Vos y col., del Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek (Holanda).

<sup>b</sup> Obtenidos por rotura enzimática.

<sup>c</sup> Obtenidos por ingeniería genética.

<sup>d</sup> Obtenidos por degradación debida a un almacenamiento prolongado o a un tratamiento ácido.

<sup>e</sup> Obtenido por síntesis química.

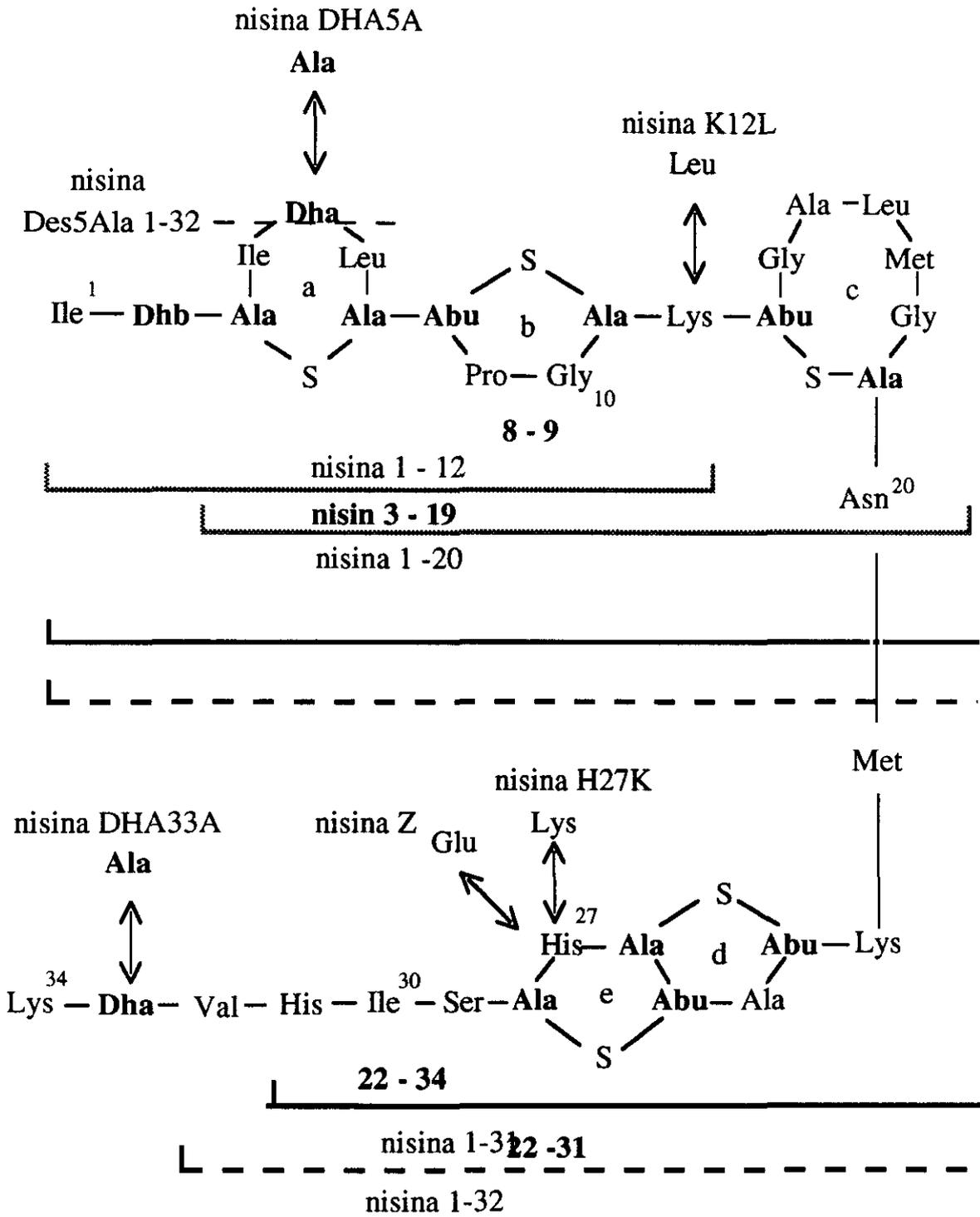


Figura III. 1. Fragmentos y variantes de la nisina A empleados en la identificación y localización de los epítomos de interés.

## III.2. METODOS

### 2.1. Medios y condiciones de cultivo de los microorganismos empleados

#### 2.1.1. Medios de cultivo empleados en el crecimiento de las bacterias lácticas

##### 2.1.1.1. Caldo nutritivo de Man. Rogosa y Sharpe (MRS. Oxoid)

<i>Composición:</i>	g/l
Peptona	10,0
Extracto de carne	8,0
Extracto de levadura	4,0
Dextrosa	20,0
Acetato sódico ( $\cdot 3H_2O$ )	5,0
Fosfato dipotásico	2,0
Citrato triamónico	2,0
Sulfato magnésico( $\cdot 7H_2O$ )	0,2
Sulfato de manganeso ( $\cdot 4H_2O$ )	0,05
Tween 80	1,0 ml
pH 6,2	

##### *Preparación:*

Para rehidratar el medio se suspenden 52 g del medio de MRS en 1 L de agua destilada, calentándose hasta su completa disolución. La esterilización se efectúa en autoclave a 121°C durante 15 min.

##### 2.1.1.2. Medio sólido de Man. Rogosa y Sharpe (agar sólido MRS)

<i>Composición:</i>	g/l
Medio MRS	55,0
Agar bacteriológico (Difco)	15,0

##### *Preparación:*

Se suspenden los componentes en 1 L de agua destilada, calentándose la solución hasta su ebullición para asegurar la homogeneización del agar y se procede como en la sección anterior.

### **2.1.1.3. Medio semisólido de Man, Rogosa y Sharpe (agar semisólido MRS)**

<i>Composición:</i>	g/l
Medio MRS	55,0
Agar bacteriológico (Difco)	7,5

#### *Preparación:*

Se suspenden los componentes en 1 L de agua destilada, calentándose la solución hasta su ebullición para asegurar la homogeneización del agar y se procede como en la sección 2.1.1.1.

### **2.1.2. Condiciones de cultivo**

Las bacterias lácticas se crecieron sin agitación a 32 °C hasta la fase de crecimiento estacionario, excepto *L. helveticus* que se incubó a 42 °C. Para la purificación de la nisina, el microorganismo productor se cultivó en estas condiciones durante 16 h.

### **2.1.3. Obtención de los sobrenadantes libres de células**

Tras su revitalización, los microorganismos de interés se inocularon en el medio adecuado (MRS en el caso de las bacterias lácticas) y se incubaron a la temperatura apropiada durante 16 horas. A continuación, se obtuvo el sobrenadante libre de células por centrifugación del cultivo a 10.000 rpm y 4 °C durante 10 min. Posteriormente, el pH del sobrenadante se ajustó a 6,2 con NaOH 1 N y 10 N y se esterilizó por filtración, con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro. El sobrenadante se repartió en alícuotas de 250 µl, que se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta su utilización.

Los sobrenadantes obtenidos de la manera descrita, se emplearon en pruebas microbiológicas (test de difusión en agar, apartado 2.2.1.) para determinar su actividad inhibidora y en las inmunoenzimáticas (ELISA competitivo directo, apartado 2.8.4.) para evaluar la especificidad y la reactividad cruzada de los anticuerpos policlonales y monoclonales de interés.

## **2.2. Pruebas microbiológicas de determinación de la actividad bacteriocinogénica**

### **2.2.1. Prueba de difusión en agar**

El método fue descrito por primera vez por Tramer y Fowler (1964), y modificado por Rodríguez *et al.* (1995) y se realiza de la siguiente manera:

### **2.2.1.1. Preparación de las muestras a analizar**

#### ***2.2.1.1.1. Obtención de los sobrenadantes libres de células***

Los sobrenadantes de los microorganismos productores de las bacteriocinas a analizar, se obtuvieron de la manera descrita en el apartado 2.1.4.

#### ***2.2.1.1.2. Preparación de las soluciones de nisina estándar***

Las concentraciones de interés se prepararon diluyendo la nisina pura en PBS (pH 7,4) y en MRS (pH 6,2).

### **2.2.1.2. Preparación de las placas de agar con el microorganismo indicador**

Para ello, se emplearon placas de Petri de 140 mm de diámetro que contenían 60 ml de agar semisólido MRS con, aproximadamente,  $10^5$  UFC/ml del microorganismo indicador (*L. helveticus* para la nisina) y un 1% de Tween 20, este último para favorecer la difusión de la bacteriocina e incrementar la sensibilidad del ensayo. A continuación, una vez solidificadas las placas, se secaron en una estufa a 37 °C durante 1h.

### **2.2.1.3. Detección y cuantificación de la actividad antimicrobiana de las muestras**

En las placas preparadas como se cita en la sección 2.2.1.2., se practicaron, con ayuda de un "sacabocados", pocillos de 6 mm de diámetro, en los que se depositaron 50 µl de la dilución de nisina estándar o de los sobrenadantes libres de células del microorganismo productor. Todas las muestras se ensayaron por duplicado. Las placas se mantuvieron a 4 °C durante 2 h para favorecer la difusión de la bacteriocina y, posteriormente, se incubaron durante 24 h a la temperatura adecuada para el desarrollo del microorganismo indicador. Finalizada la incubación, el diámetro de los halos de inhibición se midió con un calibre y la actividad antimicrobiana se expresó en mm<sup>2</sup> según la fórmula:

$$\text{Actividad} = [(D-d)/2]^2$$

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

### **2.2.2. Prueba de inhibición en placas microtituladoras**

Esta prueba se empleó para detectar y cuantificar la actividad inhibidora durante la purificación de la nisina tanto por el método tradicional como por inmunoafinidad. Este

ensayo fue descrito por primera vez por Geis *et al.* (1983), y modificado por Cintas *et al.* (1995) y Rodríguez *et al.* (1995).

El microorganismo empleado como indicador fue *P. acidilactici* 347, sembrado en caldo MRS e incubado a 32 °C hasta su fase estacionaria. En los primeros pocillos de las placas microtituladoras se depositaron 100 µl de las muestras a analizar, realizándose a partir de ellas diluciones seriadas (1/2, 1/4, 1/8, etc.) en caldo MRS y, posteriormente se añadieron a cada pocillo 150 µl del microorganismo indicador, manteniendo las placas a 32°C durante 14 h. Finalizada la incubación, el crecimiento del microorganismo indicador en los pocillos se determinó mediante la lectura espectrofotométrica de las placas a 620 nm. Una unidad de bacteriocina (UB), se define como la concentración de muestra que inhibe en un 50% el desarrollo del microorganismo indicador (50% de la turbidez de un cultivo control del microorganismo indicador, al que no se le añadió muestra).

### **2.3. Purificación de la nisina A del sobrenadante del microorganismo productor *L. lactis* BB24**

Con el objeto de obtener una concentración adecuada de nisina A para proceder a la inmunización de los ratones y elaborar otros conjugados necesarios en la realización de los inmunoensayos, inicialmente se purificó la nisina según el método descrito por Rodríguez *et al.* (1995) y Cintas *et al.* (1995), consistente (figura III.2.) en:

#### **2.3.1. Obtención de sobrenadante**

*L. lactis* BB24, microorganismo productor de la nisina A se revitalizó y desarrolló en caldo MRS durante 16 horas a 32 °C; a partir del mismo y con un asa de platino se inoculó un frasco con 1 L de caldo MRS, que se incubó a 32 °C durante 16 h. El sobrenadante libre de células se obtuvo por centrifugación del cultivo a 10.000 rpm durante 10 min a 4 °C.

#### **2.3.2. Precipitación con sulfato amónico**

Las proteínas en disolución se encuentran solvatadas por moléculas de agua, exponiendo hacia la fase acuosa sus porciones hidrófilas y manteniendo los grupos hidrófobos hacia el interior. El sulfato amónico, en concentraciones elevadas, compite exitosamente con las moléculas de agua para unirse a las proteínas, disminuyendo por tanto la solvatación (hidratación) de las proteínas y provocando que expongan sus grupos hidrófobos, que interaccionan entre sí por fuerzas de Van der Waals, produciendo la precipitación de las proteínas.

*Lactococcus lactis* BB24  
(Cultivo, 1 L)

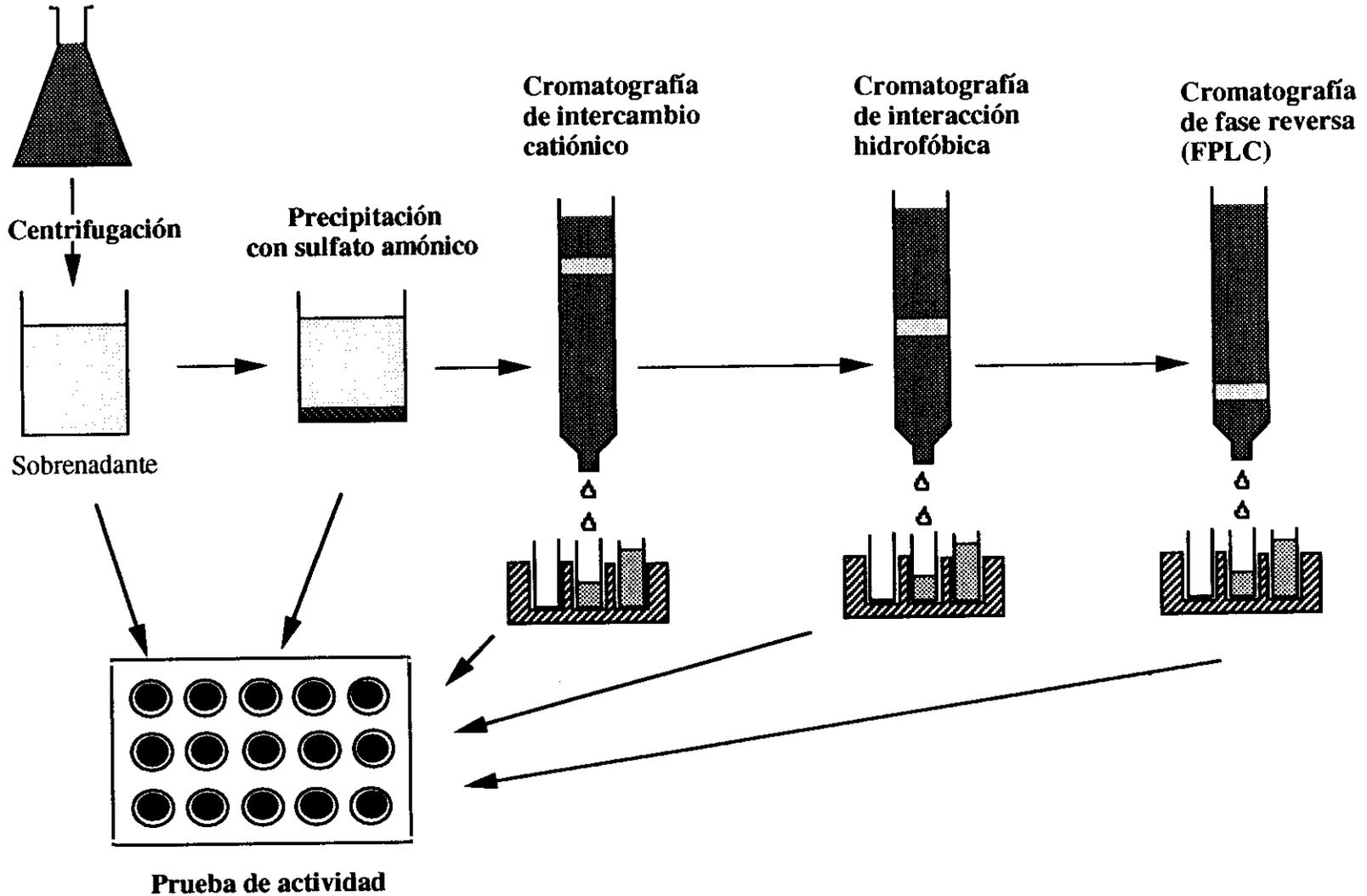


Figura III.2. Purificación de la nisina A según Rodríguez y col., 1995.

Al sobrenadante libre de células obtenido de la manera descrita en la sección anterior, se le añadieron, lentamente y en agitación 500 g de sulfato amónico. A continuación, la muestra se mantuvo 30 min en agitación a 4 °C y se centrifugó a 10.000 rpm y 4 °C durante 20 min. Los precipitados y la película flotante resultante de la centrifugación se resuspendieron en 200 ml del tampón  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20mM, pH 5,8 (tampón A).

### **2.3.3. Cromatografía de intercambio catiónico**

Este método de separación se basa en la adsorción, selectiva y reversible de las moléculas con carga neta positiva a una matriz cromatográfica de carga eléctrica neta negativa. Los grupos negativos de la resina se encuentran inicialmente asociados a cationes móviles ( $\text{Na}^+$ ) suministrados por el tampón de equilibrado, que serán reversiblemente reemplazados por las cargas positivas de las proteínas, sin alterar la conformación de la matriz cromatográfica. A continuación, las proteínas adsorbidas se desplazan del lecho cromatográfico al añadir un tampón con mayor fuerza iónica o al variar el pH del sistema hacia o sobre el pI de la proteína. El gel empleado fue el SP-Sepharose Fast Flow, que es un intercambiador catiónico fuerte con un soporte de agarosa con los grupos funcionales  $-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$ .

Se emplearon columnas convencionales de 2,5 x 30 cm en las que se depositaron aproximadamente 30 ml del gel; tras equilibrarlo con 100 ml del tampón A, se depositó lentamente la fracción resultante de la precipitación con sulfato amónico. A continuación, el gel se lavó con 75 ml de tampón A y se procedió a la elución de la bacteriocina con 100 ml de  $\text{NaCl}$  1 M en el tampón A.

### **2.3.4. Cromatografía de interacción hidrofóbica**

La separación por interacción hidrofóbica permite separar los componentes no polares de una solución polar, basándose en el establecimiento de fuerzas de Van der Waals entre los ligandos de la matriz cromatográfica y las proteínas en disolución. Las proteínas hidrófobas quedan retenidas en el gel al interaccionar sus grupos hidrófobos con los ligandos inmovilizados del gel. La elución se produce al añadir concentraciones bajas de alcoholes miscibles en agua o detergentes, cuyos grupos apolares compiten por los sitios de adsorción del gel, lo que conduce a la separación de las proteínas ligadas inicialmente.

En la realización de esta técnica, se emplearon columnas convencionales de 1,5 x 20 cm en las que se depositaron, aproximadamente, 5 ml del gel de Octyl-Sepharose CL-4B. El gel se equilibró con 30 ml de una solución de sulfato amónico al 10% (p/v) en el tampón A. A la muestra a cromatografiar (la eluida de la columna de intercambio

cationico) se le añadió también sulfato amónico hasta una concentración final del 10% (p/v) y se depositó lentamente en la columna equilibrada. Posteriormente, la columna se lavó con 20 ml del mismo tampón de equilibrado y la elución de la bacteriocina se realizó con 18 ml de una solución de etanol al 70% en el tampón A.

### **2.3.5. Cromatografía de fase reversa**

El fundamento de la separación en este tipo de cromatografía es el mismo que en la cromatografía anterior, si bien este sistema la columna empleada (PepRPC HR5/5) se integra en un equipo de Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas (FPLC), que permite controlar de forma muy precisa los gradientes de los tampones y lograr así un gran poder de resolución, permitiendo la separación de fracciones hidrofóbicamente muy similares. Además, el sistema está integrado a un detector de ultravioleta con un registrador que permite monitorizar el perfil de elución de la muestra aplicada a la columna.

Para realizar esta técnica, la muestra procedente de la cromatografía de interacción hidrofóbica se preparó previamente diluyéndola en 50 ml del tampón A y añadiendo ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración final del 0,1% (v/v). A continuación, se inyectó a la columna previamente equilibrada con TFA al 0,1% en el tampón A, a un flujo de 1ml/min. La columna se lavó con el mismo tampón de equilibrado hasta que la A<sub>254</sub> alcanzó de nuevo la línea basal y entonces se procedió a la elución de la muestra, empleando un gradiente lineal de 0 a 100 de TFA al 0,1% en 2-propanol y un flujo de 0,5 ml/min, registrándose la A<sub>254</sub> de las fracciones eluidas.

A continuación, se determinó la actividad antimicrobiana de las fracciones eluidas, y las positivas se mezclaron y diluyeron con 10 ml del tampón A con un 0,1% de TFA, recromatografiándose en condiciones similares a las descritas, hasta obtener un único pico de absorbancia con actividad antimicrobiana. La fracción cromatográfica final, se conservó desecándola al vacío.

Todo el proceso de purificación descrito se realizó a temperatura ambiente y su seguimiento se llevó a cabo determinando la actividad antimicrobiana en las fracciones resultantes de cada cromatografía, mediante el ensayo de inhibición en placas microtituladoras descrito en la sección 2.2.2. de este capítulo.

### **2.3.6. Determinación de la concentración de nisina A de las muestras purificadas**

La concentración de nisina A de la muestra purificada se determinó conociendo su coeficiente de extinción molar a 220 nm. Para la nisina A, este coeficiente es de 21,2, es

decir, una solución de 1 mg/ml de nisina A pura en una cubeta estándar de 1 cm posee una  $A_{220}$  de 21,2 (de Vos *et al.*, 1993).

#### **2.4. Coniugación de la nisina A con moléculas portadoras y preparación de los inmunógenos**

Cuando un inmunógeno entra por primera vez en contacto con el organismo, es captado por las células presentadoras del antígeno (APC) que lo procesan en su interior y lo muestran en su superficie, unido a las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad del tipo II (HMC II). Dicha unión es reconocida por las células  $T_H$  (*T helper*) que se unen a este complejo a través de unos receptores denominados T. La unión física entre los dos tipos de células desencadena la liberación de citoquinas, originando, entre otras acciones, la diferenciación de los linfocitos en células plasmáticas, productoras de anticuerpos.

Por otro lado, para que los compuestos inmunógenos inicien la reacción inmune, deben contener un epítipo que sea capaz de unirse al anticuerpo de superficie de un linfocito B virgen y de promover la comunicación entre los linfocitos B y los linfocitos  $T_H$  de manera similar a lo descrito para las células APC. Una vez que el inmunógeno contacta con la célula B a través del anticuerpo de superficie, penetra en su interior donde se procesa en fragmentos que migran a la superficie, donde se unen a las proteínas del HMC II. El complejo formado por los fragmentos del inmunógeno y dichas proteínas, se une al receptor de superficie de las células  $T_H$ . La unión física entre las dos células desencadena la liberación de citoquinas, que promueven la diferenciación de las células B a células plasmáticas, productoras de anticuerpos. La unión del inmunógeno al anticuerpo de superficie de la célula B virgen, determina la especificidad de los anticuerpos resultantes, puesto que la zona de unión del antígeno al anticuerpo de superficie es idéntica al lugar de unión de los anticuerpos secretados.

El tamaño molecular de la nisina A determina que, a pesar de ser antigénica, probablemente no sea inmunógena, es decir, no sea capaz de iniciar por sí misma una respuesta inmune. A este tipo de moléculas se les denomina haptenos. Esto se debe a que por su pequeño tamaño no pueden unirse simultáneamente a las proteínas del HMC II presentes en la superficie de las células APC y de los linfocitos B y a los receptores de las células T. Por ello, para inducir una respuesta inmune, deben conjugarse a otras moléculas (portadoras, vehiculadoras o transportadoras) que facilitan su unión con los receptores de las células T. El hapteno, por su parte, provee el epítipo que se une al

anticuerpo de superficie y a los anticuerpos secretados posteriormente por las células plasmáticas.

En este estudio, la nisina A se conjugó a dos moléculas portadoras distintas, para evaluar la eficacia de cada una en la inducción de la producción de anticuerpos específicos. Estos compuestos fueron la toxina colérica (CT) y la hemocianina de *Megathura crenulata*, conocida con la denominación del inglés de *keyhole limpet haemocianin* o, abreviadamente, como KLH.

#### **2.4.1. Conjugación con la toxina colérica (CT)**

La toxina colérica como molécula transportadora se ha empleado con éxito como molécula portadora en la obtención de anticuerpos frente a diversos haptenos (Azcona-Olivera *et al.*, 1992a; Abouzied *et al.*, 1993; Chu *et al.*, 1995).

Este compuesto presenta como ventajas: (1) su propiedad de actuar también como adyuvante; (2) el procedimiento de inmunización es rápido; (3) genera gran cantidad de anticuerpos; (4) como adyuvante, es menos dañino que el de Freund; (5) es ideal cuando existe poco antígeno disponible, puesto que con bajas concentraciones de toxina colérica y pocas inoculaciones del inmunógeno, se consigue una respuesta rápida y eficaz y (6) su toxicidad se elimina con el glutaraldehído, sin que disminuyan sus propiedades adyuvantes.

##### **2.4.1.1. Conjugación por el método del glutaraldehído**

El procedimiento empleado para conjugar la nisina A con la toxina colérica fue el del glutaraldehído (Avrameas y Ternynck, 1969; Briand *et al.*, 1985), según el procedimiento descrito por Azcona-Olivera *et al.* (1992a). Este método genera una unión muy estable a través de los grupos amino. Para ello, el hapteno se mezcla con la molécula portadora en las proporciones adecuadas y se añade, a continuación, una cantidad limitante de glutaraldehído, el acoplamiento se limita por la cantidad de glutaraldehído añadida. Finalmente, la reacción de acoplamiento se detiene con borohidruro sódico. Los grupos amino reaccionantes de la molécula de nisina proceden de los  $\epsilon$ -amino de los tres residuos de lisina y del grupo amino-terminal.

La conjugación se realizó en la proporción molar 50:1 (nisina A:toxina colérica), a 4 °C y en un tampón fosfato 0,01 M, de pH 7,4 (PBS). Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- (a). Preparar la solución de toxina colérica en agua desionizada estéril a una concentración de 1 mg/ml y de la de nisina A en agua desionizada a una concentración de 2 mg/ml.
- (b). Depositar 0,5 mg de la toxina colérica (0,5 ml) en un vial de vidrio con 1 mg de nisina (0,5 ml) y completar el volumen hasta 2 ml con tampón salino PBS. Agitar la mezcla con una uña magnética y añadir, gota a gota, con agitación permanente, un volumen equivalente (2 ml) de glutaraldehído al 2% (v/v) en PBS, continuando la reacción durante 1 h. A continuación, parar la reacción con borohidruro sódico a una concentración final de 10 mg/ml (40 mg en total) y continuar el proceso durante 1h.
- (c). Finalmente, dializar la mezcla resultante para eliminar la nisina libre, frente a PBS 0,01 M durante 48 h. a 4 °C, realizando dos cambios del tampón PBS durante la diálisis. La membrana de diálisis tenía un tamaño de corte de 12.000. Tras determinar el volumen final y, por lo tanto, la concentración tras la diálisis, el conjugado se diluye hasta conseguir la concentración deseada para la inmunización, se esteriliza por filtración y se reparte en viales de vidrio estériles, que se conservan a 4°C.

#### **2.4.2. Conjugación con la hemocianina KLH**

La KLH es la hemocianina aislada del molusco *Megathura crenulata* y es una de las moléculas más utilizadas como moléculas portadoras, por su gran tamaño (su peso molecular varía de  $4,5 \times 10^5$  a  $1,3 \times 10^7$ ), fuerte inmunogenicidad y gran cantidad de lisinas disponibles, que proveen los grupos amino necesarios para la conjugación. Su tamaño, sin embargo, hace que precipite con facilidad. Este compuesto no tiene propiedades adyuvantes, por lo que para mejorar la respuesta inmune, el conjugado debe administrarse mezclado con algún compuesto con esta propiedad.

##### **2.4.2.1. Conjugación por el método del glutaraldehído**

En la conjugación de la nisina A con la KLH, se empleó el mismo método descrito para la conjugación de la nisina A con la toxina colérica. No obstante, en este caso la conjugación se realizó en una proporción en peso de 1/2 (nisina A:KLH) a 4 °C y en un tampón fosfato 0,01 M, de pH 7,4 (PBS). Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- (a). Depositar la nisina A (2 mg en 1 ml de PBS) en un vial de vidrio que contiene una solución de KLH (4 mg en 3 ml), de manera que la concentración final de ésta sea de 1mg/ml. Agitar la mezcla con una uña magnética y añadir, gota a gota, con agitación permanente, un volumen equivalente (4 ml) de glutaraldehído al 2% (v/v) en PBS, continuando la reacción durante 1 h. A continuación, parar la reacción con

borohidruro sódico a una concentración final de 10 mg/ml (80 mg en total), y continuar el proceso durante 1h.

- (b). Finalmente, dializar la mezcla resultante para eliminar la nisina libre frente a PBS 0,01 M durante 48 h. a 4°C, realizando dos cambios del tampón PBS durante la diálisis. La membrana de diálisis debe tener un tamaño de corte de 12.000. Tras determinar el volumen final y, por lo tanto, la concentración tras la diálisis, el conjugado se diluyó hasta conseguir la concentración deseada para la inmunización, se distribuyó en viales de vidrio estériles y las alícuotas resultantes se conservaron en congelación a -20 °C.

## **2.5. Producción de anticuerpos policlonales frente a la nisina A, en el suero de los ratones inmunizados**

Con el fin de evaluar la eficacia de los inmunógenos desarrollados para inducir la producción de anticuerpos específicos frente a la nisina A, los ratones se inmunizaron con los conjugados descritos, analizando posteriormente los inmunosueros generados.

En la inmunización de los ratones, se emplearon hembras de la estirpe Balb/c de seis a ocho semanas de edad, dispuestos en tres lotes de cuatro animales. El primer lote se inmunizó con la nisina A conjugada a la toxina colérica y el segundo y el tercero, con la nisina A conjugada a la KLH, empleando distintas vías de inmunización.

### **2.5.1. Pautas de inmunización**

#### **2.5.1.1. Protocolo I: Conjugado con la toxina colérica**

Los cuatro ratones se inmunizaron con el conjugado de nisina A con la toxina colérica (nisA-TC), según el procedimiento descrito por Azcona-Olivera *et al.* (1992a). Cada animal recibió 10 µg por dosis en 200 µl de PBS 0,01 M. La vía empleada fue la intraperitoneal y las inmunizaciones se realizaron los días 0, 10, 16 y 38. No fue necesario emplear adyuvante en las inmunizaciones, puesto que la propia toxina colérica actúa como tal.

#### **2.5.1.2. Protocolo II: Conjugado con la KLH**

En este caso, el conjugado se emulsionó con el Adyuvante de Freund, compuesto que favorece el desarrollo de la reacción inflamatoria, produce un incremento de la respuesta inmune y retarda el catabolismo del antígeno. El Adyuvante Completo de Freund se compone de células de *Mycobacterium tuberculosis* inactivadas por el calor y

vehiculadas en aceite de parafina y monooleato. El aceite mineral impide la dispersión y retarda el catabolismo del antígeno, proporcionando una fuente de estimulación antigénica prolongada. Por otro lado, los componentes de la pared de *M. tuberculosis*, como el muramil-dipéptido, estimulan la respuesta inmune inespecífica induciendo la secreción de citoquinas, estimulando la actividad de las células procesadoras del antígeno y originando una reacción inflamatoria local en el lugar de inyección. El Adyuvante Incompleto de Freund carece de las células de *M. tuberculosis*.

En este protocolo, un grupo de cuatro ratones se inmunizó por vía intraperitoneal con 25 µg/dosis del conjugado de la nisina A con KLH (nisA-KLH), emulsionados en una mezcla a partes iguales (v/v, 300 µl totales) del Adyuvante Completo de Freund y de PBS estéril. Otros cuatro ratones, recibieron la misma dosis del conjugado con el adyuvante (25 µg/dosis) por vía intradérmica. Las inoculaciones se realizaron a intervalos de 14 días, con un total de tres inmunizaciones; a partir de la segunda inyección, el Adyuvante Completo de Freund se sustituyó por el Incompleto.

### **2.5.2. Seguimiento de las inmunizaciones**

Antes de la primera inoculación, se realizó una sangría inicial de los ratones, para determinar la ausencia de reactividad de los animales frente al antígeno utilizado. Después de la segunda y sucesivas inyecciones, se realizaron sangrías parciales para evaluar el proceso de inmunización.

En los animales inmunizados con el conjugado nisA-TC, se realizaron tres sangrías, a los 5 días de cada inmunización, desde la segunda vez que fueron inmunizados. En los inmunizados con el conjugado nisA-KLH, se realizaron cuatro sangrías parciales, dos a los 7 días tras la segunda y tercera inmunizaciones y otras dos a los dos y tres meses de la tercera inmunización.

Todas las muestras de sangre se tomaron del plexo retroorbital, con capilares heparinizados y previa anestesia de los ratones con éter dietílico.

### **2.5.3. Obtención y conservación del suero**

La sangre extraída se conservó en refrigeración durante 24 h para favorecer la coagulación y, a continuación, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min para obtener el suero correspondiente. El suero de los animales se distribuyó en alícuotas y se conservó en congelación a -20 °C hasta su evaluación.

#### 2.5.4. Evaluación de la especificidad e inmunoreactividad de los anticuerpos generados

Inicialmente se comprobó el título del suero de todos los animales y su evolución tras las sucesivas inmunizaciones, mediante el ELISA indirecto descrito en la sección 2.9.3. A continuación, se evaluó en los inmunosueros de interés la presencia de anticuerpos específicos frente a la nisina A utilizando para ello las técnicas del ELISA competitivo directo e indirecto descritas en la sección 2.9.4., empleando curvas patrón de la nisina A en PBS y en el caldo MRS y se determinó la posible interferencia de este último en los inmunoensayos.

Con los sueros específicos obtenidos de la inmunización de los ratones con el conjugado nisA-KLH, también se determinó su capacidad de reconocer a la nisina A presente en sobrenadantes de cepas productoras, así como su inmunoreactividad frente a sobrenadantes de microorganismos productores de otras bacteriocinas, utilizando para ello la técnica del ELISA competitivo directo adecuada. Los microorganismos empleados se citan en la tabla III. 1. y los sobrenadantes se obtuvieron como se indica en la sección 2.1.4. de esta memoria.

Con los inmunosueros citados, también se determinó la presencia de la nisina A en el preparado comercial de Nisaplin® (Applin & Barret Ltd.), estimándose la concentración de bacteriocina pura en el preparado comercial en función de los datos indicados por el fabricante. Si un gramo de Nisaplin posee  $1 \times 10^6$  U.I. de actividad y un gramo de nisina A pura  $40 \times 10^6$  U.I., en un gramo de Nisaplin® existen 25 mg de nisina A pura. Con estos datos, el preparado de Nisaplin® se diluyó en PBS de manera que se obtuviesen las siguientes concentraciones de nisina A pura (ng/ml): 25.000, 12.500, 5.000, 2.500, 1.250, 625, 312,5 y 156,25. La detección de la nisina A se realizó empleando un ELISA competitivo directo I, con los sueros obtenidos por inmunización subcutánea de los ratones con el conjugado nisA-KLH.

Finalmente, se comparó la sensibilidad de las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) optimizadas con la de los métodos microbiológicos tradicionales (ADT) de detección y cuantificación de nisina, para lo que la nisina A se diluyó en el caldo MRS a las siguientes concentraciones en ng/ml: 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500. La detección y cuantificación de la nisina se realizó con un ELISA competitivo directo I con los sueros obtenidos por inmunización subcutánea de los ratones con el conjugado nisA-KLH y por la técnica del ADT, empleando como microorganismo indicador a *Lactobacillus helveticus* (sección 2.2.1.).

## **2.6. Producción de anticuerpos policlonales frente a la nisina A en el líquido ascítico de los ratones inmunizados**

Para obtener una mayor cantidad de los anticuerpos policlonales de interés, éstos se obtuvieron del líquido ascítico de ratones nuevamente inmunizados, según el procedimiento de Kurpisz *et al.* (1988), modificado por Azcona-Olivera *et al.* (1992a).

### **2.6.1. Protocolo de inmunización y seguimiento del proceso**

Un grupo de cuatro ratones se inmunizó con el conjugado nisA-KLH, con los Adyuvantes Completo e Incompleto de Freund (grupo I) y otro grupo de cuatro animales se inmunizó con el mismo conjugado sin Adyuvantes (grupo II). Los animales recibieron tres dosis de 25 µg del conjugado en 300 µl de vehículo, por vía intraperitoneal. La pauta de inmunización fue la siguiente:

- (1). En los días 0 y 14, los ratones recibieron las dosis previamente citadas de inmunógeno.
- (2). En los días 3 y 17, se les administró, por vía intraperitoneal, 300 µl de "Pristane" (2,6,10,14-tetrametil pentadecano).
- (3). El día 21 se realizó una sangría parcial, para evaluar el curso de la inmunización (título y especificidad de los anticuerpos del suero), mediante un ELISA indirecto y competitivo directo, respectivamente y el día 28 se administró a los animales una última dosis de inmunógeno.
- (4). El día 31 los ratones recibieron por vía intraperitoneal  $6 \times 10^6$  células de mieloma de la línea celular P3X63-Ag.653 (línea no secretora).
- (5). A los 14, 17 y 21 días de la inoculación de la línea celular (42, 45 y 49 días del inicio de la inmunización), se obtuvo líquido ascítico de los animales con ascitis y el último día de su obtención, los animales se sacrificaron y se tomaron muestras de sangre para evaluar los anticuerpos del suero de la manera descrita previamente.

### **2.6.2. Obtención del líquido ascítico y conservación**

El líquido ascítico se obtuvo mediante punción intraperitoneal de los ratones con ascitis con una aguja de 0,8 x 25, dejando caer el líquido por gravedad sobre un tubo estéril. El líquido ascítico se mantuvo en congelación a -20 °C hasta la última extracción, momento en el que se procedió a su purificación.

### **2.6.3. Purificación de los anticuerpos del líquido ascítico**

Los anticuerpos del líquido ascítico de los animales inmunizados, se purificaron por precipitación con sulfato amónico al 50%, según el procedimiento de Hebert *et al.*, 1973, que consiste, básicamente, en:

- (1). Centrifugar el líquido ascítico a 1.500 rpm durante 5 min a 4 °C, para eliminar lípidos, células y otros compuestos presentes en el sedimento.
- (2). Medir el volumen del sobrenadante y precipitar los anticuerpos con un volumen equivalente de sulfato amónico saturado, manteniendo la mezcla en agitación a 4 °C durante 20 min.
- (3). Centrifugar la mezcla resultante a 3.500 rpm durante 20 min a 4 °C y resuspender el sedimento en un volumen equivalente al inicial de NaCl al 0,85% (p/v).
- (4). Repetir los pasos (2) y (3), realizando tantas precipitaciones como sean necesarias y tras la última centrifugación, resuspender el sedimento en un tampón fosfato PBS, pH 7,2.
- (5). Eliminar las sales del sedimento mediante su diálisis durante 48 h a 4 °C frente a PBS 0,01 M, realizando cuatro cambios del tampón. El producto de la diálisis se reparte en viales, se liofiliza y se mantiene a -20 °C hasta su utilización.

### **2.6.4. Determinación de la concentración de proteína de los anticuerpos policlonales**

La concentración de proteína de los anticuerpos purificados, se estimó empleando un kit comercial de "Pierce-Chemicals", que contenía azul brillante de Coomassie G-25 como reactivo colorimétrico específico de las proteínas y seroalbúmina bovina fracción 5 como patrón interno. La técnica deriva del método de Bradford (1976), basado en que la unión del colorante con las proteínas en disolución provoca en aquél un cambio de color de rojo-marrón a azul; este cambio es proporcional a la cantidad de proteína y se cuantifica espectrofotométricamente.

### **2.6.5. Caracterización isotípica de los anticuerpos policlonales**

La clase y subclase de los anticuerpos generados, se determinó por un ELISA indirecto utilizando un kit comercial de "Sigma", que contiene inmunoseros de conejo frente a las inmunoglobulinas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA de ratón.

### **2.6.6. Evaluación de la especificidad e inmunoreactividad de los anticuerpos generados**

La presencia de anticuerpos específicos frente a la nisina A, en el suero y en el líquido ascítico de los ratones inmunizados, se evaluó mediante un ELISA competitivo directo

(sección 2.9.4.), utilizando la nisina A tanto en PBS como en el caldo MRS, así como su reactividad con la nisina Z, también en ambos vehículos.

La capacidad de los anticuerpos específicos de reconocer a la nisina presente en sobrenadantes de cepas productoras, así como su inmunoreactividad frente a sobrenadantes que contenían otras bacteriocinas, se evaluó mediante un inmunoensayo de tipo ELISA competitivo directo tipo I. Los microorganismos empleados se muestran en la tabla III. 1. Los sobrenadantes se obtuvieron como se indica en la sección 2.1.4. de esta memoria.

## **2.7. Obtención y producción de anticuerpos monoclonales**

La obtención de anticuerpos monoclonales se describió por primera vez en 1975 por Köhler y Milstein. El procedimiento consiste en fusionar los linfocitos productores de anticuerpos, procedentes del bazo de ratones inmunizados, con células de mieloma de ratón. El producto de la fusión (hibridoma) poseerá la propiedad de los primeros de producir anticuerpos y la de las segundas de multiplicarse indefinidamente al cultivarlas *in vitro*. Los hibridomas producen hasta  $10^3$  moléculas de anticuerpo por minuto, cada hibridoma procede de un sólo linfocito, perteneciente a un clon y sólo reconoce la parte de la molécula que éste reconocía (determinante antigénico), por ello a los anticuerpos generados se les denomina monoclonales. Como no es posible el aislamiento de los linfocitos de interés del bazo del ratón, la fusión se realiza con todas las células del bazo, por lo que es necesario analizar todos los hibridomas producidos y seleccionar aquellos que producen los anticuerpos de interés.

Este procedimiento ha permitido superar muchos de los problemas y limitaciones de las técnicas inmunológicas convencionales. Actualmente, gracias a esta técnica es posible obtener y producir cantidades ilimitadas de anticuerpos específicos y homogéneos frente a casi cualquier molécula, independientemente de la pureza del antígeno empleado durante la inmunización. La especificidad, reactividad cruzada, afinidad y propiedades físicas de los anticuerpos se seleccionan según la necesidad de cada caso. El diagrama básico de obtención de los anticuerpos monoclonales, se resume en la figura III.3.

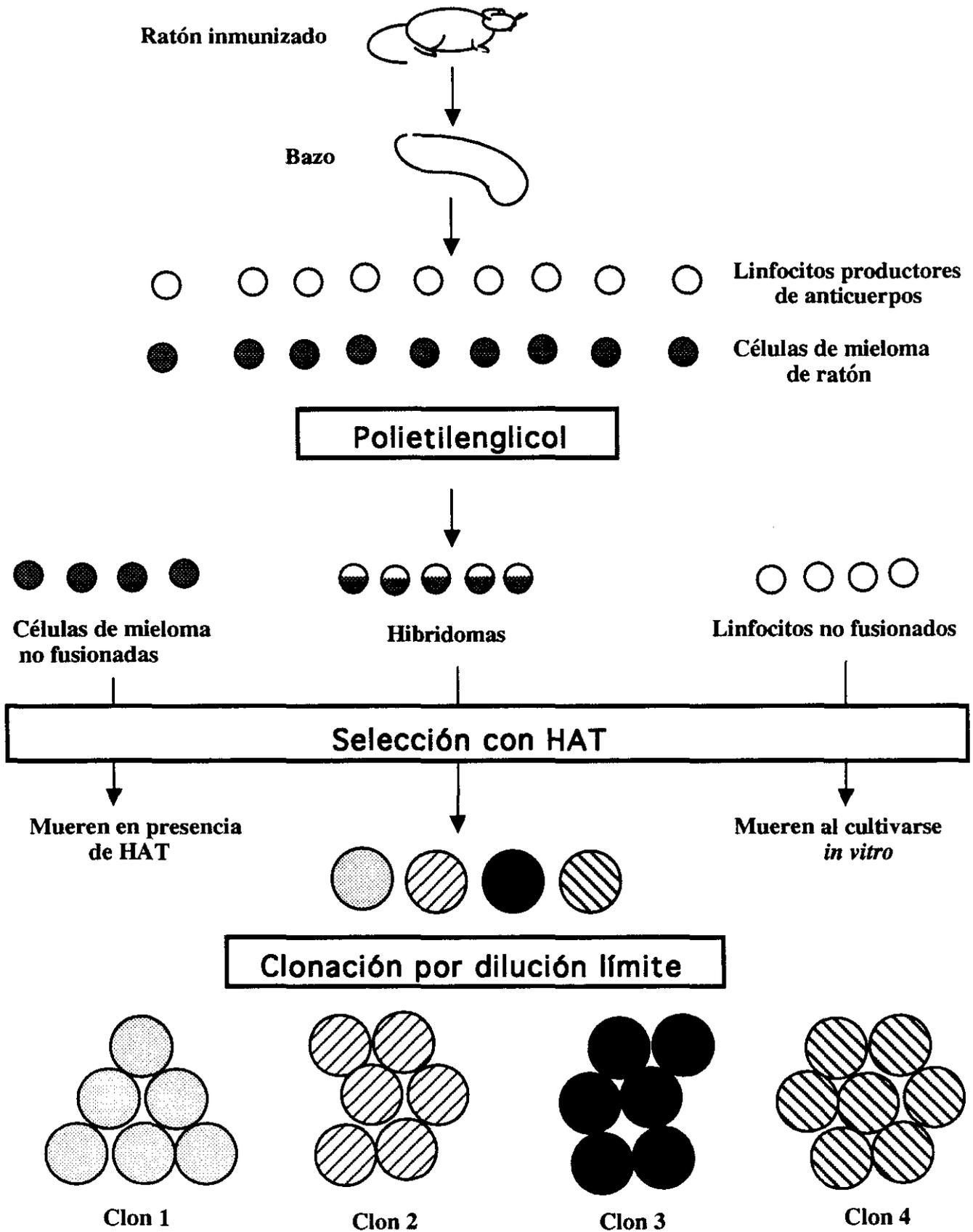


Figura III.3. Diagrama básico de obtención de anticuerpos monoclonales.

Fuente: J. W. Goding (1993).

### **2.7.1. Protocolo de inmunización**

En la obtención de anticuerpos monoclonales frente a la nisina A, se emplearon ratones hembras de 6-8 semanas de edad de la estirpe BALB/c. La inmunización se realizó administrando por vía subcutánea cuatro dosis de 25 µg de nisA-KLH en intervalos de 2 semanas. La primera inyección consistió en 0,3 ml de nisA-KLH en solución salina (0.85%):Adyuvante Completo de Freund (1:1; v:v), mientras en las inoculaciones sucesivas el Adyuvante Completo se sustituyó por el Incompleto. Cuatro días antes de la fusión, los ratones con la mejor respuesta inmunológica, recibieron la última dosis del inmunógeno sin Adyuvante, por vía intraperitoneal.

#### **2.7.1.1. Seguimiento de la inmunización**

---

Para evaluar el proceso de inmunización, se realizaron sangrías parciales a partir del plexo retroorbital de los ratones inmunizados, anestesiados previamente con éter dietílico. El suero se obtuvo de la sangre mantenida a 4 °C durante 16 h y de su centrifugación posterior a 10.000 rpm durante 10 minutos. El título de los inmunosueros y la presencia de anticuerpos específicos frente a la nisina A, se determinaron mediante ELISA indirecto y competitivo directo, respectivamente. El suero del animal seleccionado para la fusión, también se empleó como control positivo durante la selección de los hibrodomas productores de anticuerpos específicos.

### **2.7.2. Medios de cultivo y soluciones empleadas**

#### **2.7.2.1. Medio de cultivo completo (CRPMD)**

---

*Composición:*

RPMI-1640, sin glutamina (Gibco)	100 ml
L-Glutamina (100x) (Gibco)	1 ml
Solución de Penicilina-Estreptomicina (Gibco)	1 ml
Suero Fetal Bovino (Gibco)	15 ml

Previamente a su utilización, las botellas con el suero fetal bovino se mantuvieron a 56 °C durante 30 min para inactivar el complemento.

#### **2.7.2.2. Medio de cultivo sin suero**

Sus componentes son los mismos que los del medio anterior, a excepción del suero fetal bovino.

**2.7.2.3. Medio de cultivo con penicilina-estreptomicina (PEST-RPMI)**

*Composición:*

RPMI-1640, sin glutamina (Gibco)	100 ml
Solución de Penicilina-Estreptomicina (Gibco)	1 ml

**2.7.2.4. Medio de cultivo completo suplementado con hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT-CRPMI)**

Contiene el medio de cultivo completo (CRPMI), suplementado con un 4% del medio HAT (50x, Sigma).

**2.7.2.5. Medio de cultivo completo suplementado con hipoxantina y timidina (HT-CRPMI)**

Contiene medio de cultivo completo (CRPMI), suplementado con un 2% del medio HT (50x, Gibco).

**2.7.2.6. BM-Condimed® H1 (Böehringer Mannheim Biochemica)**

Este medio consta de una mezcla compleja de factores de crecimiento y citoquinas, que estimulan el crecimiento de los hibridomas después de la fusión y durante el clonaje. Utilizado como suplemento, evita la necesidad de utilizar células acondicionadoras de los medios de cultivo empleados. Se añade al 10% a los medio de cultivo CRPMI, HAT-CRPMI y HT-CRPMI.

**2.7.2.7. Tampón de lisado**

<i>Composición:</i>	g/l
CINH <sub>4</sub>	8,29
KHCO <sub>3</sub>	1
EDTA	0,037

Una vez disueltos los componentes en 1 L de agua destilada, el tampón se esteriliza por filtración y se mantiene a temperatura ambiente.

#### **2.7.2.8. Soluciones de tinción**

Para teñir las células se empleó el tripán azul. Este es un colorante que tiñe las células no viables, que no deben contarse, de azul oscuro. Las células de mieloma se tiñen con una solución de tripán azul al 10% en agua destilada. y los linfocitos con una solución de tripán azul al 0,2% en agua destilada.

#### **2.7.2.9. Mezcla de congelación**

Consiste en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) al 10% en el suero fetal bovino descomplementado.

#### **2.7.3. Obtención de hibridomas**

Para la obtención de hibridomas, se procedió a la fusión de los linfocitos esplénicos de los ratones inmunizados con las células de mieloma de ratón.

##### **2.7.3.1. Mantenimiento, propagación y preparación de las células de mieloma para la fusión**

La línea celular empleada para la fusión fue la P3X63-Ag 8.653 (Kearney *et al.*, 1979), constituida por células de mieloma de ratones Balb/c, con el enzima hipoxantina-guanina-fosforibosoltransferasa inactivado por mutación (HGPRT<sup>-</sup>) y que se caracterizan por: (1) crecimiento continuo *in vitro*, dividiéndose en las condiciones óptimas de cultivo cada 24 horas, (2) alta eficacia de clonación, (3) alta eficacia de fusión con los linfocitos de ratón y (4) ser una línea no secretora, que no produce inmunoglobulinas.

Las células de la línea celular empleada, se descongelaron 15 días antes de la fusión para aclimatarlas y comprobar su viabilidad. Para ello, se partió de dos viales de células de mieloma congeladas en nitrógeno líquido, con una densidad celular de  $5 \times 10^6$  células/ml. Cada vial se descongeló en un baño a 37 °C y su contenido se traspasó a un frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, al que se añadieron 20 ml del medio de cultivo completo. Los frascos se incubaron en posición horizontal a 37 °C en una atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se subcultivaron cada 48 horas.

En el momento de la fusión es esencial que las células de mieloma se encuentren en la fase de crecimiento exponencial y que la concentración celular no exceda de  $10^5$  células/ml. Por ello, las células de mieloma se subcultivaron el día anterior a la fusión.

El día de la fusión, se centrifugaron las células de mieloma a 1.500 rpm durante 5 min y el sedimento se resuspendió en el medio de cultivo sin suero para lavarlas dos veces por centrifugación a 1.500 rpm durante 5 min. Tras su lavado, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 10 ml del medio de cultivo sin suero, para determinar su concentración celular.

#### **2.7.3.2. Obtención de los linfocitos esplénicos**

El día de la fusión se extrajo el bazo del ratón seleccionado. Para ello, el animal se sacrificó por exsanguinación a través del plexo retroorbital y, a continuación, se desinfectó sumergiéndolo en un baño de etanol al 70%. Seguidamente y en condiciones de esterilidad, el animal se colocó en decúbito supino, se escindió la piel y el peritoneo y se extrajo el bazo, que se depositó en una placa de Petri con 20 ml del medio de cultivo sin suero. Con unas pinzas de diente de ratón se eliminó la grasa existente y se troceó el bazo en pequeños fragmentos. La mezcla se homogeneizó con una pipeta Pasteur estéril de plástico. Los linfocitos suspendidos en el medio se transfirieron a un tubo de centrifuga estéril, dejando sedimentar los productos de deshecho (cápsula del bazo, etc.) durante 5 min a 4 °C (sobre hielo), transfiriendo el sobrenadante a otro tubo de centrifuga estéril que se centrifugó a 1.600 rpm durante 8 min. Tras ello, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 5 ml del tampón de lisado, que tiene como finalidad destruir los glóbulos rojos, dispersando el sedimento al agitar suavemente durante 2 min. Seguidamente, se depositaron 10 ml de medio de cultivo sin suero fetal y la mezcla se centrifugó de nuevo a 1.600 rpm durante 8 min, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en 10 ml del medio de cultivo sin suero. La concentración celular de la preparación se determinó mediante su tinción con tripán azul y recuento en el hemocitómetro de Neubauer .

#### **2.7.3.3. Agente fusionante**

Como agente fusionante se empleó el polietilenglicol (PEG) de Pm 1.500 (Pontecorvo, 1975). Este compuesto fusiona las membranas plasmáticas de las células de mieloma y de los linfocitos adyacentes, formando una única célula con 2 o más núcleos. Esta nueva célula retiene los núcleos hasta que las membranas nucleares se disuelven previamente a la mitosis. Durante la primera mitosis y sucesivas divisiones celulares, los cromosomas se reparten entre las células hijas. No obstante, debido al anormal número de cromosomas de los hibridomas, no siempre se transmiten todos ellos a las células hijas, sino que algunos se pueden perder. El PEG es el agente fusinante más empleado en la obtención de hibridomas, ya que permite una frecuencia de fusión elevada y una gran reproducibilidad. En la actualidad, el mecanismo de la fusión no se conoce con exactitud

y parece que es necesaria la presencia de un contaminante no identificado en el PEG, para que se induzca la fusión celular (Wojcieszyn *et al.*, 1983).

Previamente a su empleo, el PEG (Böehringer Mannheim GmbH) se calentó durante 1 min en un baño a 37 °C.

#### **2.7.3.4. Fusión celular**

El procedimiento seguido durante la fusión celular fue el siguiente:

- (1). Tras determinar la concentración de las células de mieloma y de los linfocitos extraídos del bazo, se ajustaron las concentraciones de modo que la proporción final de linfocitos esplénicos y de células de mieloma durante la fusión fue de 7,5:1.
- (2). La mezcla celular se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 min y el sedimento se resuspendió en 10 ml del medio de cultivo sin suero. El lavado de las células se realizó dos veces más. Tras eliminar completamente el sobrenadante para evitar la dilución del PEG, el sedimento celular se liberó de la pared del tubo con pequeños golpecitos, tras lo cual se procedió a realizar la fusión celular añadiendo 1 ml de PEG, gota gota y en agitación durante 1 min. Una vez añadido el PEG, la mezcla se agitó levemente durante 30 seg más.
- (3). Transcurrido este tiempo, el PEG se diluyó lentamente y en agitación con medio de cultivo sin suero, añadiendo sucesivamente: (a) 1 ml de medio de cultivo sin suero durante 1 min, (b) 3 ml de medio de cultivo sin suero durante 3 min y (c) 16 ml de medio de cultivo sin suero durante 6 min. A continuación, las células se incubaron durante 15 min a 37 °C y un 5% de CO<sub>2</sub> y se sedimentaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 5 min.
- (4). Una vez eliminado el sobrenadante, las células se resuspendieron en 75 ml del medio HT-CRPMI suplementado con un 10% de BM-condimed y la suspensión celular se distribuyó en placas de 96 pocillos (150 µl/ pocillo), excepto en los pocillos circundantes exteriores en donde se depositó medio con penicilina-estreptomicina, para prevenir la evaporación y evitar la contaminación de las células. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C, en una atmósfera saturada de humedad con un 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 2.7.4. Selección y mantenimiento de los hibridomas

Una vez realizada la fusión, en los pocillos existe una mezcla de linfocitos, células de mieloma e hibridomas. Generalmente, sólo un 1% de las células iniciales se fusionan y sólo 1 de cada  $10^5$  origina hibridomas viables. Esto indica, que en el cultivo permanecen todavía muchas células que no se han fusionado. Por otro lado, conviene conocer que durante la fusión celular se pueden producir tres tipos de uniones: fusiones mieloma-miloma, linfocito-linfocito y mieloma-linfocito, siendo esta última la única de interés. Además, de los hibridomas formados no todos serán secretores de anticuerpos y de éstos últimos, muchos no producirán los anticuerpos específicos. Es, por lo tanto, necesario establecer una primera selección de los hibridomas y una identificación de aquellos productores de los anticuerpos de interés.

Para efectuar la selección, se emplea el medio HAT, que contiene aminopterina. Esta sustancia es un análogo del ácido fólico que bloquea la síntesis *de novo* del nucleótido guanosina, por lo que las células se ven forzadas a emplear una vía alternativa de síntesis de este compuesto. Esta vía consiste en emplear los compuestos hipoxantina y guanina y transformarlos en guanosina con el enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT). En el caso de las células de mieloma no fusionadas y de los híbridos resultantes de la unión de células de mieloma, la ruta alternativa no es posible, por inactivación del enzima HPGRT, por lo que morirán en presencia de aminopterina. Por otro lado, aunque los linfocitos no fusionados y los híbridos linfocito-linfocito emplean la ruta alternativa y, por lo tanto, mantienen la síntesis de nucleótidos, estas células no se desarrollan *in vitro* y mueren naturalmente a los 7-10 días de cultivo.

Los híbridos mieloma-linfocito sobreviven en el medio selectivo HAT, puesto que de la célula de mieloma poseen la capacidad de reproducirse de forma ilimitada, mientras que el linfocito aporta el enzima necesario (HGPRT) para la síntesis de nucleótidos, utilizando la ruta alternativa. Además, el medio de cultivo incorpora hipoxantina y timidina de refuerzo.

Así pues, a las 24 horas de la fusión comenzó la selección de los hibridomas, añadiendo 150  $\mu$ l/pocillo del medio HAT-CRPMI e incubando las placas durante 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo citado, se retiró aproximadamente la mitad del volumen del sobrenadante de cada pocillo y se sustituyó por una cantidad equivalente del medio HAT. Esta operación se repitió cada 48 h durante diez días, tras lo cual el medio HAT se fue sustituyendo gradualmente por medio HT. Una vez transcurridos 6 días, en los cambios posteriores se empleó medio completo CRPMI suplementado con un 10% de BM-Condimed.

#### **2.7.4.1. Identificación de los hibridomas productores de los anticuerpos de interés**

Una vez seleccionados y establecidos los hibridomas, se puede producir una reordenación cromosómica en las generaciones posteriores, que conlleva la pérdida de cromosomas. En algunos casos esta pérdida implica a los cromosomas relacionados con la síntesis de inmunoglobulinas, dando lugar a células no secretoras. Estas poblaciones celulares crecen más rápidamente que las células secretoras, por lo que su presencia en los pocillos con los hibridomas secretores, pueden impedir el desarrollo de éstos. Es necesario, por lo tanto, detectar lo más pronto posible los hibridomas productores de anticuerpos específicos, con el fin de proceder a su clonación.

Para realizar esta segunda selección, se analizó el sobrenadante de los pocillos con un crecimiento positivo. Dada la cantidad de pocillos a analizar, es necesario emplear un método de detección sencillo, rápido y económico. En este trabajo, la presencia de anticuerpos anti-nisina A en los sobrenadantes de los hibridomas se evaluó mediante el ELISA competitivo directo tipo II, descrito en la sección 2.9.3.2. de esta memoria.

#### **2.7.5. Clonación de los hibridomas positivos**

Como se ha descrito previamente, la clonación es necesaria para evitar el sobrecrecimiento de las células no secretoras y para garantizar que los anticuerpos producidos son realmente monoclonales.

En este trabajo, los hibridomas productores de anticuerpos, se clonaron por el método de la dilución límite a una concentración de 0,5 a 1 célula/pocillo (Goding, 1980). Para ello se tomó una alícuota del contenido del pocillo positivo, se determinó su concentración celular y se realizaron diversas diluciones del contenido celular, hasta tener una densidad de 5 células / $\mu$ l. De esta dilución se tomó el volumen adecuado para rellenar cuatro placas de 96 pocillos con 0,5 células /pocillo, se le añadió el volumen correspondiente de medio completo suplementado con BM y la mezcla se repartió en 4 placas de 96 pocillos con 250  $\mu$ l/pocillo. En las placas se rellenaron sólo los 60 pocillos interiores, mientras en los pocillos circundantes exteriores se añadió medio con penicilina-estreptomicina, para prevenir la evaporación y evitar la contaminación celular.

Transcurridos diez días, se analizó el sobrenadante de los pocillos con un crecimiento celular positivo, para seleccionar los clones que seguían produciendo anticuerpos específicos.

#### **2.7.5.1. Expansión de los clones**

Tras la clonación de los hibridomas positivos, se procedió a la expansión de los clones seleccionados mediante subcultivos graduales de las placas de 96 pocillos a placas de 48 pocillos, 24 pocillos, 6 pocillos y, finalmente, a frascos de cultivo de 25 y 75 cm<sup>2</sup>, evaluando durante la expansión la producción de anticuerpos específicos por los cultivos seleccionados.

#### **2.7.5.2. Conservación de los clones**

Una vez que los clones alcanzaron una concentración celular de, al menos,  $1 \times 10^7$  células, se procedió a su conservación. Para ello, se determinó la concentración de las células de los frascos de cultivo mediante tinción con tripán azul y recuento en el hemocitómetro de Neubauer, centrifugando posteriormente los cultivos a 1.500 rpm durante 5 min. A continuación, las células del sedimento se distribuyeron en criotubos a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml, en una mezcla de congelación compuesta por un 90% de suero fetal bovino y un 10% de DMSO. Los clones se conservaron por duplicado en congelación a -80 °C y en nitrógeno líquido.

#### **2.7.6. Producción de anticuerpos monoclonales a gran escala**

La producción masiva de anticuerpos monoclonales, se realizó *in vitro*, por expansión de los clones productores seleccionados en el medio de cultivo completo e *in vivo*, en el líquido ascítico de ratones BALB/c.

##### **2.7.6.1. Cultivo de los hibridomas**

Se emplearon frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, donde los hibridomas se desarrollaron en el medio completo suplementado con un 10% de BM-condimed. El sobrenadante de los frascos se recogió cada 48 h, sustituyéndolo por medio fresco y se comprobó que los clones seguían produciendo anticuerpos específicos evaluando los sobrenadantes resultantes con un ELISA CD tipo II. Los sobrenadantes obtenidos se mantuvieron a -20 °C hasta su purificación.

##### **2.7.6.2. Producción de anticuerpos monoclonales en el líquido ascítico**

Para inducir la ascitis, se siguió básicamente el procedimiento descrito por Harlow y Lane (1988). Previamente, los ratones Balb/c se sensibilizaron con 0,5 ml de pristane (2,6,10,14-tetrametil pentadecano) por vía intraperitoneal. Transcurridas tres semanas, se inocularon a cada ratón, también por vía intraperitoneal,  $1 \times 10^7$  células productoras de anticuerpos monoclonales en fase de crecimiento exponencial, en 0,5 ml de medio RPMI con un 15% de suero fetal bovino. La recolección del líquido ascítico de los ratones en los que se desarrollaron los tumores, se realizó a los 10 días de la inoculación, por punción

intraperitoneal. El líquido ascítico recogido se conservó a -80 °C hasta su purificación posterior.

#### **2.7.6.3. Purificación de los anticuerpos monoclonales**

Los anticuerpos monoclonales de los sobrenadantes de los cultivos celulares y del líquido ascítico de los ratones, se purificaron por precipitación con sulfato amónico, siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.6.3. Los anticuerpos obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos celulares se concentraron cinco veces, mientras que los de las ascitis no se concentraron.

#### **2.7.7. Determinación de la concentración de proteína de los anticuerpos monoclonales**

La concentración de proteína de los anticuerpos monoclonales purificados, se estimó empleando el kit comercial de "Pierce-Chemicals" previamente descrito en la sección 2.6.4. de esta memoria.

#### **2.7.8. Caracterización isotípica de los anticuerpos monoclonales**

La clase y subclase de los anticuerpos generados, se determinó por un ELISA indirecto utilizando el mismo kit comercial de "Sigma" descrito en la sección 2.6.5. de esta memoria.

#### **2.7.9. Especificidad**

La especificidad de los anticuerpos monoclonales generados para reconocer a las nisinas A y Z puras y las producidas en el sobrenadante de los microorganismos productores, se realizó mediante un ELISA competitivo directo tipo II, descrito en la sección 2.9.4.2. de esta memoria. También se evaluó la reactividad de los anticuerpos monoclonales frente a los sobrenadantes de los microorganismos productores de otras bacteriocinas, como la lactocina S, pediocina PA-1 y pediocina L50. Los microorganismos empleados se citan en la tabla III.1. Para ello, aproximadamente  $1 \times 10^5$  microorganismos de un cultivo revitalizado se sembraron en 5 ml de medio MRS y se incubaron durante 16 h a 37 °C. El sobrenadante de los cultivos se obtuvo por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Después, el pH de los cultivos se ajustó a 6,1 con NaOH 1 N y se esterilizaron por filtración en filtros de 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore). Por último, se distribuyeron en alícuotas de 250 µl y se conservaron a -20 °C hasta su uso. La especificidad se determinó empleando el ELISA-CD tipo II ya descrito.

## **2.8. Caracterización de los determinantes antigénicos reconocidos por los anticuerpos policlonales y monoclonales generados**

Para determinar la(s) region(es) de la molécula de nisina (epítipo) reconocida por los anticuerpos policlonales del líquido ascítico del ratón I.B. y por los anticuerpos monoclonales del hibridoma 5G8 y del clon AD10, se emplearon microorganismos modificados genéticamente productores de variantes de la nisina (tabla III.2.), así como diversos fragmentos y variantes de la nisina A obtenidos por técnicas de ingeniería genética o por degradación o rotura enzimática y algunos lantibióticos análogos (tabla III.4.). Las muestras se analizaron empleando un ELISA-CD del tipo I para los policlonales y del tipo II para los monoclonales, (sección 2.9.4).

## **2.9. Técnicas inmunoenzimáticas (ELISA)**

### **2.9.1. Tampones y reactivos empleados**

#### **2.9.1.1. Tampón PBS 0.01 M, pH 7.4**

<i>Composición</i>	<i>g/l</i>
NaCl	8,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,42
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,46
Agua destilada	1 L

#### ***Preparación:***

Se mezclan los componentes y se ajusta el pH hasta 7,4 con NaOH 10 N, enrasando con agua destilada hasta completar el volumen deseado.

#### **2.9.1.2. Tampón de lavado**

Denominado tampón PBST, se prepara con el tampón PBS, añadiéndole un 0,05% de Tween 20.

#### **2.9.1.3. Tampón de tapizado**

Es un tampón de carbonato/bicarbonato sódico 0,1M, pH 9,6.

## Material y Métodos

<i>Composición:</i>	<i>g/l</i>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59
NaHCO <sub>3</sub>	2,93
Agua destilada	1 L

Una vez preparada la solución y disueltos los componentes, esta se mantiene a 4 °C.

### 2.9.1.4. Solución de bloqueo

Se prepara disolviendo un 1% de ovoalbúmina grado III en el tampón PBS.

### 2.9.1.5. Solución patrón del sustrato

Se prepara disolviendo 135 mg del ABTS (2,2´Azinobis(3-etilbenztiazolin-ácido sulfónico) en 45 ml de agua destilada, que se distribuyen en alícuotas de 1 ml y se mantienen en la oscuridad a -20 °C.

### 2.9.1.6. Tampón citrato, pH 4,0

<i>Composición:</i>	<i>g/l</i>
Acido cítrico monohidratado	9,6
Agua destilada	1 L

#### *Preparación:*

Se añaden los 9,6 g de ácido cítrico monohidrato a 500 ml de agua destilada, se ajusta el pH de la solución a 4 con NaOH 1 N y se completa el volumen hasta 1 litro, comprobando que no haya variado el pH. Se reparte la solución en dos botellas de 500 ml que se esterilizan en el autoclave y se mantienen a temperatura ambiente.

### 2.9.1.7. Sustrato del enzima

<i>Composición:</i>	<i>ml</i>
Tampón citrato, pH 4,0	11
Solución patrón del sustrato	1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8 x 10 <sup>-3</sup>

Esta solución se prepara inmediatamente antes de su empleo.

**2.9.1.8. Solución de frenado**

<i>Composición:</i>	<i>g/l</i>
Acido cítrico monohidrato	63
Azida de sodio	1
Agua destilada	1 L

Una vez preparada la solución y disueltos los componentes, esta se mantiene a temperatura ambiente.

**2.9.2. Preparación de los reactivos****2.9.2.1.. Conjugación de la nisina A con la ovoalbúmina (nisA-OA)**

Este reactivo se empleó para tapizar las placas en las técnicas del ELISA indirecto e indirecto competitivo. En estos inmunoensayos, las placas se tapizan inicialmente con el antígeno y en el caso de los haptenos, para garantizar su adsorción a los pocillos, deben conjugarse previamente a una molécula que posibilite dicha adsorción. En este trabajo, la nisina A se conjugó a la ovoalbúmina (grado VII) por el método del glutaraldehído, de una manera similar a la descrita para los conjugados nisA-TC y nisA-KLH (sección 2.4.).

La conjugación se realizó en una proporción molar de 8,5:1 (nisina A:ovoalbúmina) a 4 °C y en un tampón fosfato 0,01 M, de pH 7,4 (PBS). Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- (a). Disolver la nisina A en agua desionizada a una concentración de 2 mg/ml, y añadirla (5 mg en 2,5 ml) a un vial de vidrio con la solución de ovoalbúmina (7,5 mg en 5 ml de PBS), de forma que la concentración final de ésta sea de 1 mg/ml en PBS.
- (b). Agitar la mezcla con una uña magnética y añadir, gota a gota, con agitación permanente, un volumen equivalente (7,5 ml) de glutaraldehído al 2% (v/v) en PBS, continuando la reacción durante 1 h. A continuación, detener la reacción añadiendo borohidruro sódico a una concentración final de 10 mg/ml (150 mg en total) y continuar el proceso durante 1h.
- (c). Finalmente, para eliminar la nisina libre, dializar la mezcla resultante frente a PBS 0,01 M, durante 48 h. a 4 °C, realizando dos cambios del tampón PBS durante la diálisis. La membrana de diálisis debe tener un tamaño de corte de 12.000. Tras

determinar el volumen final y, por lo tanto, la concentración tras la diálisis, la mezcla se distribuye en viales a la concentración de 1 mg/vial, que se liofilizan y se mantienen en congelación a -20°C hasta su utilización.

#### **2.9.2.2. Conjugación de la nisina A con la peroxidasa de rábano**

La nisina A también se conjugó a la peroxidasa de rábano (Pierce) (nisA-HRP) por el método del periodato (Nakane y Kawoi, 1974). La conjugación se realizó en una proporción en peso de 1:3 (nisina A:peroxidasa) y el procedimiento fue el siguiente:

- (a). Primero se disuelve la peroxidasa (10 mg) en 1,25 ml de agua desionizada y se activa añadiéndole, gota a gota, 250 µl de periodato sódico 0,1 M, observando un cambio de color de la solución de verde a grisácea. Mantener la mezcla durante 20 min a temperatura ambiente, en un agitador orbital a 180 rpm. Seguidamente, dializarla durante una noche a 4 °C frente a 6 litros de acetato sódico 1 mM, pH 4,4, en una membrana de tamaño de corte de 12.000.
- (b). A continuación, añadir a la peroxidasa activada 3 mg de nisina A en 2 ml de NaCl 0,85% y añadir, para catalizar la reacción, 10 µl de carbonato sódico 1 M a la mezcla, gota a gota, manteniéndola en agitación (180 rpm) a temperatura ambiente, durante 2 horas. Detener la reacción añadiendo 100 µl de borohidruro sódico (4 mg/ml), gota a gota y en agitación y mantener a continuación durante 2 horas a 4 °C sin agitar.
- (c). Para eliminar de la mezcla la nisina y la peroxidasa no conjugadas, dializar el conjugado frente a 6 litros de NaCl 0,85% a 4 °C durante 72 h, realizando dos cambios de la solución salina. Por último, determinar la concentración final del conjugado dializado, y repartir en alícuotas de 1mg/ ml, que se liofilizan y se conservan a -20°C hasta su utilización.

#### **2.9.3. Técnica del ELISA indirecto**

La técnica del ELISA indirecto (figura III.4.) se basa en que los antígenos fijados a una superficie inerte son reconocidos por los correspondientes anticuerpos específicos y el complejo formado se detecta por un segundo anticuerpo marcado con un enzima, que reconoce como antígenos a los anticuerpos específicos. La reacción se pone de manifiesto al actuar el enzima sobre el sustrato, dando lugar a un compuesto coloreado.

Este inmunoensayo se empleó en la determinación del título de los sueros de los ratones inmunizados. La metodología fue la siguiente:

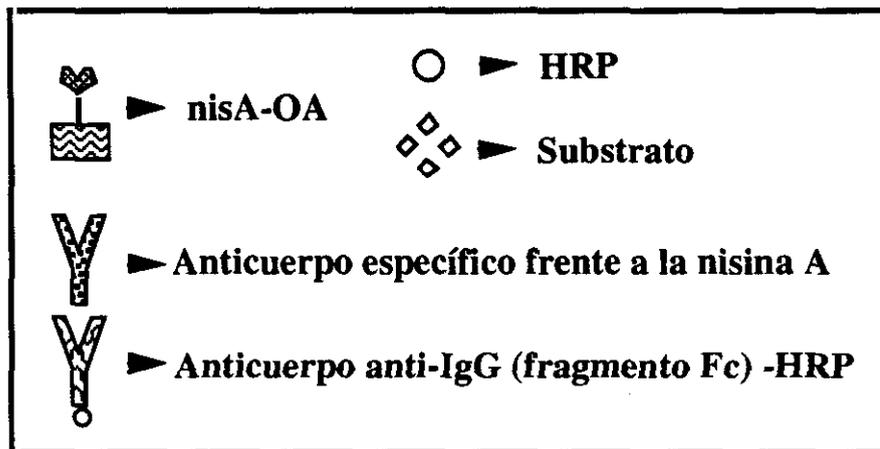
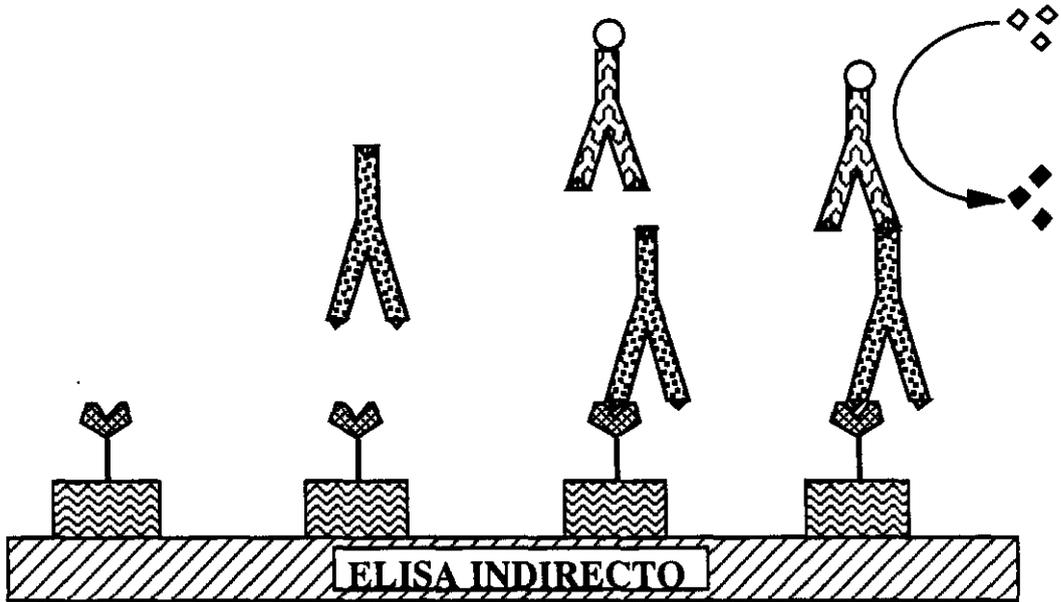


Figura III.4. Representación esquemática de la técnica del ELISA indirecto.

- (1). Las placas Maxisorp (Nunc) de poliestireno de 96 pocillos, se tapizaron durante 16 h a 4 °C, con 100 µl/pocillo de nisA-OA (5 µg/ml) en el tampón de tapizado y, a continuación, se lavaron 5 veces con tampón PBST. Seguidamente, para minimizar la adsorción inespecífica, se añadieron a cada pocillo 300 µl de la solución de bloqueo (ovoalbúmina al 1% en PBS) y las placas se mantuvieron a 37°C durante 30 min. A continuación, las placas se lavaron de nuevo 5 veces con PBST.
- (2). Seguidamente, en los pocillos de las placas se depositaron por duplicado, 50 µl de las diluciones (en PBS) seriadas (desde la dilución 1:100 hasta la 1:25.600) de los inmunosueros, tras lo que las placas se mantuvieron a 37 °C durante 1 h. El exceso de anticuerpos no adsorbidos en los pocillos, se eliminó al lavar de nuevo las placas 5 veces con PBST.
- (3). A continuación, se depositaron en cada pocillo 100 µl de un anticuerpo antiespecie conjugado a la peroxidasa de rábano (cabra-antirratón IgG-HRP, 2 mg/ml; dilución 1/500 en la solución de bloqueo) incubando las placas durante 30 min a 37 °C y se lavaron por última vez 8 veces con PBST.
- (4). La peroxidasa adsorbida en los pocillos se determinó coloriméricamente al adicionar el sustrato del enzima. El color producido se estimó midiendo la absorbancia de los pocillos a 405 nm con un lector acoplado a un sistema informático de análisis de datos. El título de los inmunosueros se determinó como la máxima dilución que producía, al menos, el doble de la absorbancia de esa misma dilución de suero de un ratón preinmune.

#### **2.9.4. Técnica del ELISA competitivo**

Para determinar la especificidad de los anticuerpos de los inmunosueros y de los producidos en el líquido ascítico, se emplearon dos inmunoensayos del tipo competitivo, uno indirecto (ELISA-CI) y otro directo (ELISA-CD).

##### **2.9.4.1. ELISA competitivo indirecto (ELISA-CI)**

En esta técnica, una concentración conocida del antígeno se fija a una superficie inerte y, a continuación, se añaden simultáneamente el anticuerpo específico y la muestra problema (de concentración antigénica desconocida), que competirá con el antígeno inmovilizado por la unión al anticuerpo. Posteriormente, se añade un anticuerpo antiespecie comercial marcado con un enzima. El ensayo se cuantifica por la concentración de conjugado comercial que se une al complejo anticuerpo-antígeno adsorbido (figura III.5.). Como control, se utilizan pocillos con concentraciones crecientes conocidas del antígeno, con cuyas absorbancias se elabora una curva patrón. Cuanto mayor sea la concentración del antígeno de la muestra, menor será el anticuerpo

retenido en los pocillos y, por lo tanto, menor será el color resultante. Los resultados se expresan en función del porcentaje de inhibición, calculado a partir de los valores de la absorbancia a 405 nm, de la siguiente manera:

% Inhibición = 100 - % A<sub>405</sub>; siendo,

$$\% A_{405} = \frac{A_{405} \text{ determinada en la muestra problema o en el punto de la curva patrón}}{A_{405} \text{ obtenida en ausencia del antígeno}}$$

#### Metodología:

- (1). Este paso fue igual al descrito en el ELISA indirecto empleado para la titulación de los sueros.
- (2). Seguidamente, en los pocillos de las placas se depositaron simultáneamente y por triplicado, 50 µl del estándar de nisina A o la muestra (en PBS, MRS o agua destilada) y 50 µl del inmunosuero (diluído apropiadamente en PBS) y las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C, tras lo que se lavaron 5 veces con PBST.
- (3). La reacción antígeno-anticuerpo se determinó adicionando el anticuerpo antiespecie conjugado a la peroxidasa de rábano (cabra-antirratón IgG-HRP, 2 mg/ml; dilución 1/500 en solución de bloqueo) incubando las placas durante 30 min a 37 °C, y se lavaron por última vez 8 veces con PBST, para eliminar el conjugado no unido específicamente.
- (4). El inmunoensayo se finalizó adicionando el sustrato del enzima, de la manera descrita en el ELISA indirecto. La concentración de nisina de la muestra problema, es inversamente proporcional a la absorbancia de los pocillos en el inmunoensayo y se determina de su extrapolación en la curva patrón.

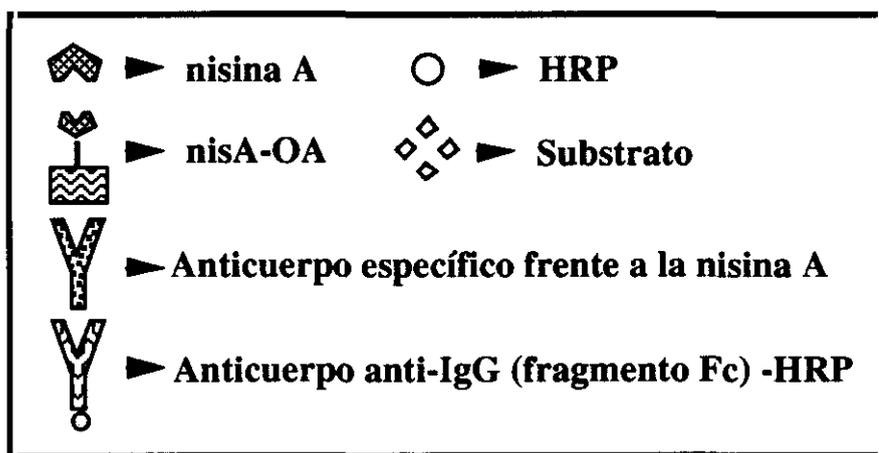
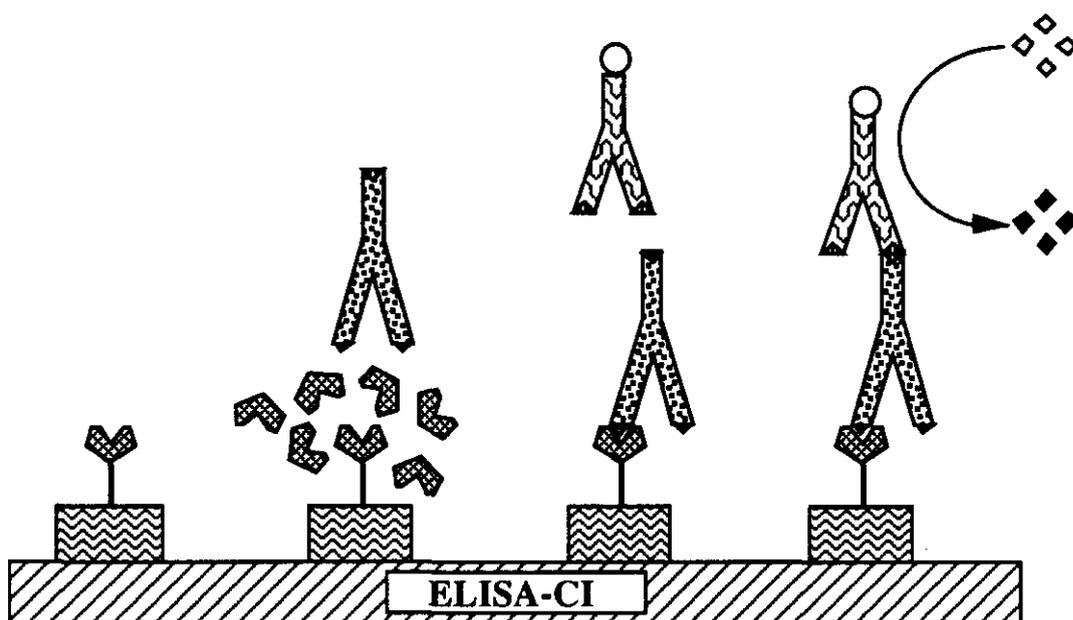


Figura III.5. Representación esquemática de la técnica del ELISA competitivo indirecto (ELISA-CI).

#### **2.9.4.2. ELISA competitivo directo (ELISA-CD)**

En esta técnica, una concentración conocida del anticuerpo específico se fija a una superficie inerte y, a continuación, se añaden simultáneamente la muestra problema (de concentración antigénica desconocida) y el antígeno marcado con un enzima (de concentración fija y conocida), produciéndose la competición entre ambos por la unión al anticuerpo. El ensayo se cuantifica por la concentración del antígeno conjugado unido al anticuerpo adsorbido. Como controles se utilizan los pocillos con cantidades crecientes conocidas de antígeno, con cuyas absorbancias se elabora una curva patrón. Cuanto mayor sea la concentración de antígeno de la muestra, menor será el conjugado unido al anticuerpo adsorbido y, por lo tanto, menor será el color resultante. Los resultados se expresan en función del porcentaje de inhibición, calculado de manera análoga a la explicada en el ELISA-CI.

En este trabajo, se desarrollaron dos modalidades de este tipo de ELISA, la primera (tipo I), tapizando las placas directamente con los anticuerpos específicos anti-nisina A y la segunda (tipo II), tapizando previamente los pocillos con un anticuerpo que reconoce a la fracción Fc de los anticuerpos de ratón. El segundo método se empleó en la detección de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales específicos y en los inmunoensayos subsiguientes realizados con dichos anticuerpos.

##### **2.9.4.2.1. ELISA-CD tipo I (figura III.6.):**

Metodología:

- (1). Los pocillos de las placas se tapizaron con 125  $\mu$ l de una dilución apropiada de los inmunoseros o del líquido ascítico en el tampón de tapizado y se secaron durante 16 h a 40 °C en una estufa de aire forzado, tras lo que se lavaron 5 veces con PBST. A continuación, en cada uno de los pocillos se depositaron 300 $\mu$ l de la solución de bloqueo (ovoalbúmina al 1% en PBS) y las placas se incubaron durante 30 min a 37 °C, tras lo que se lavaron de nuevo 5 veces con PBST.
- (2). A continuación, en cada uno de los pocillos se depositaron sucesivamente y por triplicado 50  $\mu$ l del estándar de nisina A o la muestra (en PBS, MRS o agua destilada) y 50  $\mu$ l de nisA-HRP (2  $\mu$ g/ml en la solución de bloqueo). Las placas se incubaron durante a 1 h a 37 °C y se lavaron 8 veces con PBST.
- (3). Finalmente, la peroxidasa adsorbida a los pocillos se estimó, una vez adicionado el sustrato, de la manera descrita en los otros ensayos.

**2.9.4.2.2. ELISA-CD tipo II** (figura III.6.)

Para detectar la presencia de anticuerpos específicos en los sobrenadantes de los hibridomas y para evaluar la especificidad y sensibilidad de los producidos por los diferentes clones positivos, se desarrolló este segundo tipo de ELISA competitivo directo, que se realizó de la siguiente manera:

- (1). Las placas de ELISA de poliestireno de 96 pocillos, se tapizaron con 125  $\mu$ l/pocillo de un anticuerpo anti-especie (inmunoglobulina G de cabra específica frente a la fracción Fc de los anticuerpos de ratón, o IgG antiFc de ratón) a una concentración de 8  $\mu$ g/ml (dilución 1/500) en el tampón de tapizado. Las placas se mantuvieron durante 16 h a 40 °C en una estufa de aire forzado y se lavaron las placas 5 veces con PBST. Seguidamente, en cada uno de los pocillos se depositaron 300 $\mu$ l de la solución de bloqueo (ovoalbúmina al 1% en PBS) y las placas se incubaron durante 30 min a 37 °C y se lavaron de nuevo 5 veces con PBST.
- (2). Posteriormente, en cada pocillo se depositaron 50  $\mu$ l del anticuerpo anti-nisA diluído apropiadamente en PBS y las placas se incubaron durante 30 min a 37°C, lavándolas de nuevo 5 veces con PBST.
- (3). A continuación, en cada uno de los pocillos se depositaron, sucesivamente y por triplicado, 50  $\mu$ l del estándar de nisA o la muestra (en PBS, MRS o agua destilada) y 50  $\mu$ l de nisA-HRP (2  $\mu$ g/ml, en solución de bloqueo). Las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C y se lavaron 8 veces con PBST.
- (4). Finalmente, la peroxidasa adsorbida en los pocillos se estimó empleando el mismo procedimiento que el indicado en el resto de los inmunoensayos.

Para identificar los hibridomas y los clones productores de anticuerpos específicos, tras el bloqueo y lavado de las placas, se depositaron en grupos de cuatro pocillos 40  $\mu$ l del sobrenadante de cada hibridoma o clon (sin diluir), y las placas se incubaron a 37 °C durante 30 min. Tras el lavado de las placas, en dos de los pocillos de cada grupo se depositaron 50  $\mu$ l del tampón PBS (como blanco) y en los otros dos, 50  $\mu$ l de nisina A (5  $\mu$ g/ml en PBS). A continuación, en los cuatro pocillos se depositaron 50  $\mu$ l del conjugado nisA-HRP (2  $\mu$ g/ml en solución de bloqueo) y el ensayo se completó de la manera descrita previamente. La presencia de anticuerpos específicos se manifiesta por una disminución del color en los dos pocillos donde se depositó la nisina A, en comparación con el de los pocillos con el blanco.

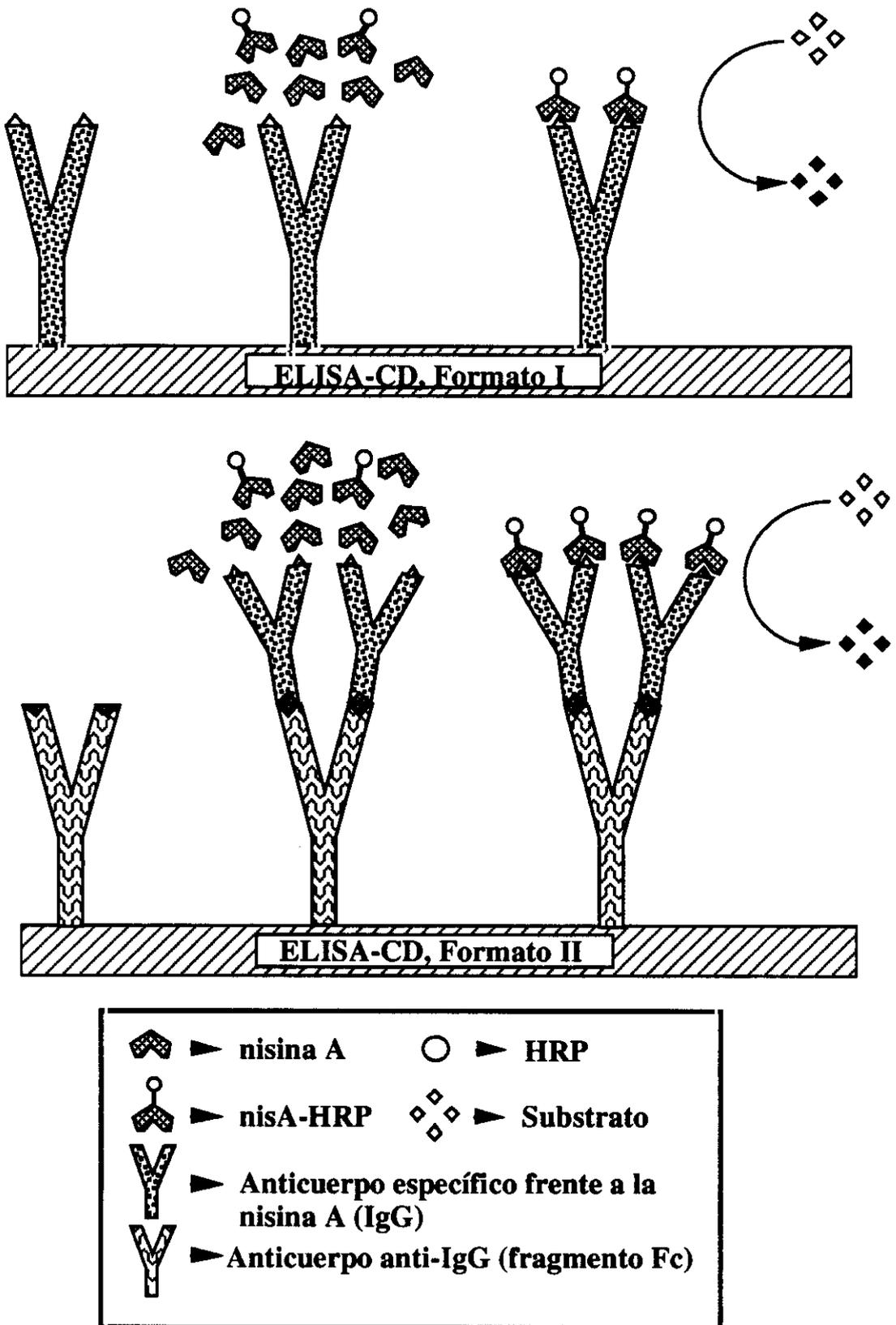


Figura III.6. Representación esquemática de los dos formatos del ELISA competitivo directo (ELISA-CD).

## **2.10. Aplicaciones de los anticuerpos antinisina A desarrollados**

### **2.10.1. Evaluación del crecimiento de *L. lactis* BB24 y seguimiento de la producción de nisina, empleando los anticuerpos policlonales obtenidos del líquido ascítico**

#### **2.10.1.1. Desarrollo de los cultivos**

A partir de un cultivo de *L. lactis* BB24, desarrollado en caldo MRS durante 16 h a 32 °C, se inocularon, aproximadamente,  $1 \times 10^5$  ufc/ml en una batería de tubos con 10 ml de caldo MRS. Los tubos se incubaron a 32 °C, durante tres días y cada 2 horas se retiraron dos de ellos, para determinar por duplicado el crecimiento de los cultivos mediante el recuento en placa de las unidades formadoras de colonias (ufc/ml), así como su actividad antimicrobiana y concentración de nisina A.

#### **2.10.1.2. Actividad antimicrobiana y concentración de nisina A de los sobrenadantes**

Transcurridos los periodos de tiempo preestablecidos, se retiraron los tubos con los cultivos y se obtuvieron los sobrenadantes libres de células de la manera descrita en la sección 2.1.4. La actividad antimicrobiana de estos sobrenadantes se determinó por duplicado, mediante una prueba de difusión en agar (sección 2.2.1.) y la concentración de nisina A mediante un ELISA competitivo directo tipo I (sección 2.9.4.1.), empleando una dilución 1/100 de los anticuerpos policlonales del líquido ascítico de uno de los ratones inmunizados (ratón I.B.). En el mismo inmunoensayo, se realizó una curva patrón con diversas concentraciones de nisina A pura en caldo MRS y un programa informático de tratamiento de datos, incorporado al lector de placas, ajustó los valores de absorbancia resultantes a una curva de regresión, según el método de Healy (1972). Las absorbancias de las muestras se extrapolaron en la curva patrón, para determinar las concentraciones de nisina A correspondientes.

### **2.10.2. Detección y cuantificación de nisina A en los alimentos empleando anticuerpos monoclonales**

Para determinar la capacidad de los anticuerpos monoclonales de detectar y cuantificar la nisina A en los alimentos, se realizó una experiencia en la que concentraciones conocidas de la nisina A se añadieron a un queso de untar comercial y, posteriormente, se identificó y cuantificó la presencia de nisina en las muestras.

#### **2.10.2.1. Preparación de las muestras**

En la experiencia se empleó queso comercial de la marca Philadelphia Light® (Kraft, libre de nisina). La extracción de la nisina A añadida, se realizó según Fowler *et al.* (1975), procediendo de la siguiente manera:

- (1). Se partió de muestras de 2,5 g de queso disueltos en 10 ml de HCl 0,02 M, ajustando su pH a 2,0 con HCl 1 N. A continuación, en cada una de las muestras se añadió la nisina A a una concentración final de 0, 250, 1.250 y 5.000 ng/g, todas las concentraciones se prepararon por triplicado.
- (2). Posteriormente, las muestras se calentaron a 98°C durante 5 min. y, una vez a temperatura ambiente, se ajustó su volumen hasta 12,5 ml con HCl 0,02 M, tras lo cual se centrifugaron a 7.000 rpm durante 20 min a 4°C.
- (3). Tras mantener la muestra centrifugada durante 30 min a 4 °C, el sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro Whatman nº1, ajustando su pH a 7,4±0,1 con NaOH 5 N. Como control experimental, se preparó, de la misma manera pero sin añadir nisina, un extracto de queso cuyo sobrenadante se empleó para elaborar una curva patrón en el inmunoensayo.

#### **2.10.2.2. Determinación y cuantificación de la nisina de las muestras**

La determinación y cuantificación de la nisina de las muestras, se realizó mediante un ELISA competitivo directo tipo II (sección 2.9.4.2.), empleando para ello los anticuerpos monoclonales producidos en líquido ascítico por el clon AD10 a la dilución 1/7.500. La recuperación de la nisina se calculó al extrapolar las absorbancias de las muestras en una curva patrón realizada en el mismo ensayo, añadiendo concentraciones conocidas de nisina A a un extracto de queso libre de nisina. Mediante un programa informático de tratamiento de datos, incorporado al lector de placas, los puntos de la curva se adaptaron a una curva de regresión.

Con el fin de calcular el coeficiente de variación inter- e intraensayo, el proceso de extracción se repitió durante tres días distintos y cada día se prepararon y se extrajeron triplicados de cada concentración.

#### **2.10.3. Purificación de la nisina por cromatografía de inmunoafinidad**

Los anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la nisina A, también se emplearon en la construcción de una columna cromatográfica que permitiese la purificación de esta bacteriocina en un sólo paso por cromatografía de inmunoafinidad. Debido a la complejidad y poca eficacia de los métodos actuales de purificación de la misma, es evidente el interés existente en el desarrollo de métodos más sencillos, eficaces y rápidos.

### **2.10.3.1. Matriz cromatográfica**

Como matriz cromatográfica se empleó una columna HiTrap NHS-activated (Pharmacia) de 1 ml de capacidad. Las columnas se comercializan con la matriz empaquetada y con las conexiones necesarias para unirla a una jeringa o adaptarla a una bomba peristáltica. La matriz está constituida por un gel de agarosa unido a brazos espaciadores de 6 átomos de carbono mediante la epiclorhidrina. El brazo separador es el ácido 6-aminohexanoico cuyo grupo carboxilo terminal está activado con N-hidroxisuccinimida, de forma que reacciona espontáneamente con ligandos que contienen grupos amino primarios. De esta manera, los grupos ε-amino de las lisinas de las moléculas que se desean unir (ligandos) producen un ataque nucleofílico a los ésteres de succinimida, dando lugar a una unión covalente de tipo amida entre el ligando y el brazo espaciador, con la liberación de N-hidroxisuccinimida (figura III.7.).

#### **2.10.3.1.1. Soluciones empleadas**

- a). Tampón de conjugación:  $\text{NaHCO}_3$  0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3.
- b). Tampón A: etanolamina 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3.
- c). Tampón B: acetato sódico 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4.
- d). Solución de conservación: 0,01% de thiomersal en PBS.

#### **2.10.3.1.2. Preparación de la columna y conjugación del ligando**

- (1). Como ligandose utilizaron 10 mg del anticuerpo monoclonal purificado y liofilizado, disueltos en 1 ml de tampón de conjugación.
- (2). Se retiró el tapón superior de la columna cromatográfica, depositando una gota de HCl 1 mM frío para evitar la formación de burbujas de aire, se conectó un adaptador para cono luer de jeringa y se añadió más HCl 1 mM. A continuación, se retiró el tapón inferior de la columna, dejando fluir el isopropanol que contenía como conservante, inyectando seguidamente 6 ml de HCl 1 mM frío con una jeringa de 1 ml, a un flujo aproximado de 1 gota cada tres segundos, para evitar la compresión del gel y que éste se dañase irreversiblemente.

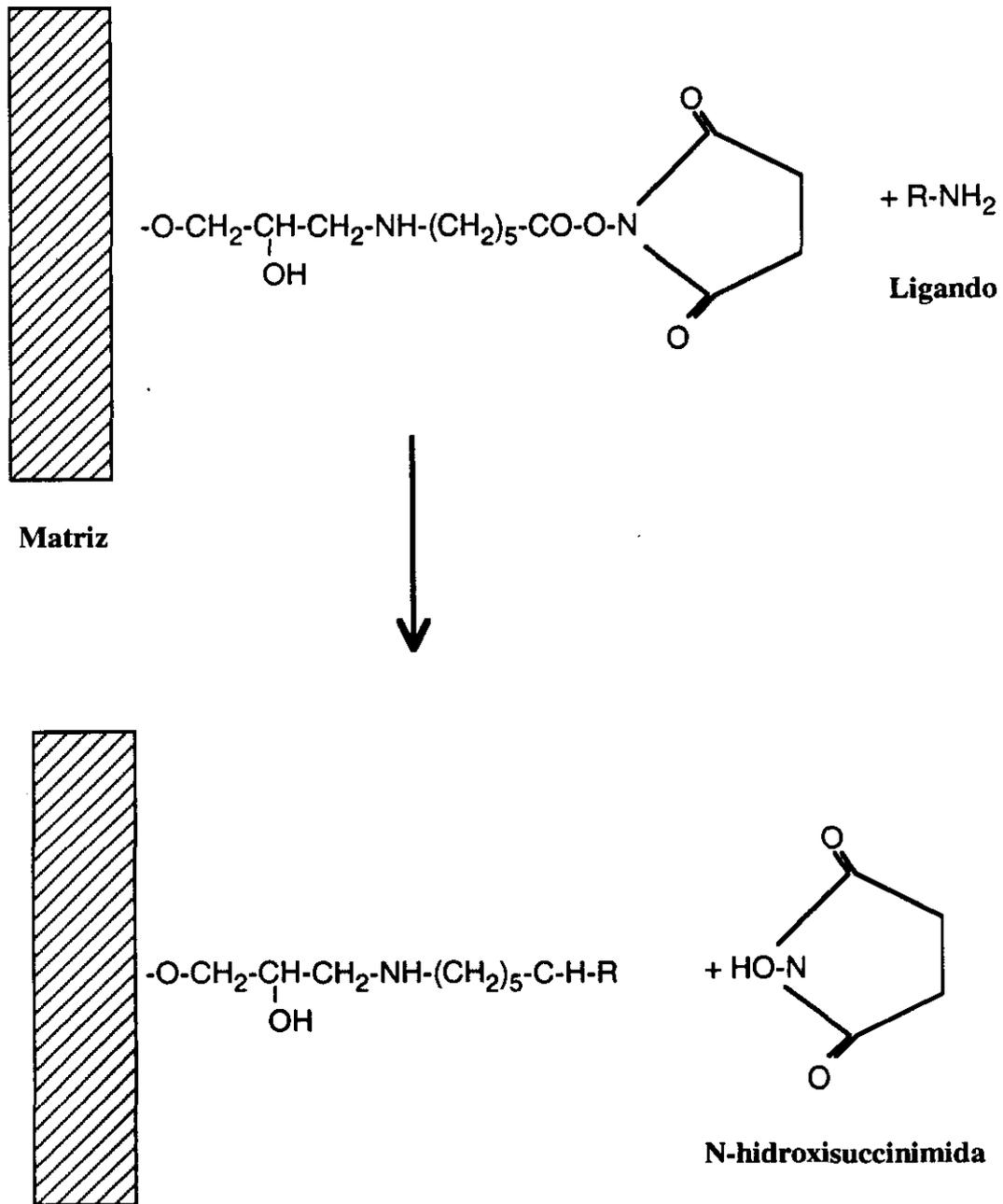


Figura III.7. Conjugación del ligando a la matriz de HiTrap NHS-activada.

- (3). Inmediatamente y con el mismo flujo, se inyectó la solución con los anticuerpos disueltos en el tampón de conjugación. Se cerró la columna y se permitió que la reacción de conjugación continuase durante una hora a temperatura ambiente.
- (4). Una vez finalizada la conjugación, se inactivaron los grupos activos remanentes de la matriz y se eliminó el ligando que no había reaccionado, inyectando alternativamente 6 ml del tampón A y 6 ml del tampón B, repitiendo la misma operación tres veces. La segunda vez que la matriz se lavó con el tampón A, dicha solución se mantuvo en la columna durante 1 hora a temperatura ambiente, para garantizar la inactivación de los grupos que hubieran quedado libres de la matriz.
- (5). Finalmente, el pH de la columna cromatográfica se neutralizó inyectando el tampón PBS 0,1 M pH 7,4 y, a continuación, se inyectó la solución de conservación, en la que la columna se mantuvo hasta su utilización.
- (6). Para determinar la eficacia de la conjugación de los anticuerpos a la columna, se recogieron los 3 primeros ml que salieron de la misma tras el lavado en el paso (4), determinando la concentración de proteína (anticuerpos) presente, mediante la medida de su absorbancia a 280 nm. Antes fue necesario eliminar la hidroxisuccinimida liberada por la unión de la matriz al ligando y presente también en esta muestra, puesto que absorbe fuertemente la luz ultravioleta, lo que se realizó mediante la filtración de la muestra en columnas de filtración en gel.

#### **2.10.3.2. Purificación de la nisina**

##### **2.10.3.2.1. *Soluciones empleadas***

- a) tampón de equilibrado y lavado: PBS 0,1 M pH 7,4. Se prepara de la manera descrita en la sección 2.9.1.1. de esta memoria.
- b) tampón de elución: glicina-HCl 0,05 M, NaCl 0,5 M, pH 2,7. Para su preparación, se disuelven la glicina con el NaCl en la mitad del volumen necesario de agua destilada y, a continuación, se ajusta su pH con HCl 5 N, se enrasa hasta el volumen final con agua destilada y se comprueba de nuevo el pH.

##### **2.10.3.2.2. *Protocolo de purificación***

El protocolo general de purificación de la nisina se expone a continuación. Los volúmenes de lavado y elución variaron en función del volumen inicial de la muestra y la purificación se realizó a temperatura ambiente. Los pasos básicos de este protocolo son:

- (1). Preparar la columna, lavándola con 3 ml de PBS y otros 3 ml del tampón de elución, equilibrándola finalmente con 3 ml de PBS.
- (2). Depositar la muestra a un flujo de 0,5 ml/min.
- (3). Una vez aplicada la muestra, lavar la columna con el volumen necesario de PBS, hasta que no se detecte absorbancia a 220 y 280 nm.
- (4). Eluir la nisina retenida en la columna con el tampón de elución.
- (5). Lavar la columna con PBS y mantenerla en el tampón de conservación.

#### **2.10.3.2.3. Comprobación de la eficacia de la columna**

Para comprobar su eficacia, se inyectaron por la columna alícuotas de 1 ml con concentraciones conocidas de la nisina pura en PBS (0, 1.000 y 10.000 ng/ml). Tras aplicar cada muestra, la columna se lavó con 3 ml de PBS y la nisina retenida se eluyó con 4 ml de tampón de elución.

La presencia de nisina en las muestras eluídas, se determinó mediante la cuantificación de su actividad inhibidora empleando una prueba de difusión en agar (sección 2.2.1.), con *Pediococcus acidilactici* 347 como microorganismo indicador.

#### **2.10.3.2.4. Purificación de nisina a partir del sobrenadante del microorganismo productor *L. lactis* BB24**

*L. lactis* BB24 se cultivó durante 16 h a 32°C, obteniendo el sobrenadante libre de células por centrifugación de los cultivos a 10.000 rpm durante 10 min. a 4 °C. Posteriormente, el pH del sobrenadante se ajustó a 7,4 con NaOH 1 N y se esterilizó por filtración.

A continuación, 10 ml del sobrenadante se pasaron por la columna de inmunoafinidad a un flujo de 0,5 ml/min, lavando la columna con PBS hasta que no se detectó ninguna absorbancia a 280 nm (25 ml) y eluyendo la nisina de la columna con 20 ml de tampón de elución. Las fracciones resultantes de la purificación se recogieron en alícuotas de 1 ml, estimando su absorbancia a 280, 254 y 220 nm.

La detección y cuantificación de la actividad inhibidora de las fracciones eluídas, se realizó mediante un ensayo en placas microtituladoras, empleando *Pediococcus acidilactici*

347 como el microorganismo indicador (sección 2.2.2.), cuantificando la nisina mediante un ELISA competitivo directo tipo II, tras ajustar el pH de las muestras a 7,4 con NaOH 1 N (sección 2.9.4.2.). En este ELISA se utilizaron los anticuerpos monoclonales del clon AD10, obtenidos de líquido ascítico a una dilución 1/7.500. La curva patrón se realizó con distintas concentraciones de nisina A pura en el caldo MRS, ajustando los valores de absorbancia obtenidos a una curva de regresión a través del programa informático de tratamiento de datos incorporado al lector de placas.

Con los resultados obtenidos, se obtuvo una tabla de purificación de la nisina en la que se reflejó el volumen total, la  $A_{220}$  total, la actividad antimicrobiana total (en U.B.), la actividad específica, el incremento de la actividad específica, la cantidad total de nisina recuperada y el rendimiento.

Asimismo, la pureza de la nisina obtenida por cromatografía de inmunoafinidad, se comprobó inyectando la muestra purificada en una columna PepRPC HR 5/5 C<sub>2</sub>/C<sub>18</sub> de fase reversa, integrada en un sistema FPLC (Pharmacia). Tras equilibrar la columna con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% en agua desionizada, se inyectó la muestra y se eluyó empleando un gradiente lineal del 10 al 60% de 0,1% TFA en 2-propanol, a un flujo de 1 ml/min. La elución se monitorizó registrando la absorbancia a 254 nm de las fracciones eluídas. Como controles internos, se pasaron también por la columna el tampón de elución (glicina-HCl) y una muestra con una cantidad equivalente de nisina pura en el tampón de glicina-HCl.

#### ***IV. RESULTADOS***

---



#### IV.1. PURIFICACION DE LA NISINA A

Con el objeto de disponer del inmunógeno necesario para inmunizar a los animales y elaborar los conjugados para los inmunoensayos, inicialmente se procedió a la purificación de la nisina A, mediante el método previamente descrito por Rodríguez *et al.* (1995) y Cintas *et al.* (1995), descrito en la sección III.2.3. de esta memoria.

De esta manera, a partir de un cultivo de 16 horas de *L. lactis* BB24, productor de nisina A, en un litro de caldo MRS, se obtuvo el sobrenadante libre de células y la precipitación de las proteínas con sulfato amónico, que una vez concentradas en un volumen de 20 ml, se sometieron a continuación a la purificación de nisina por cromatografía de intercambio catiónico, interacción hidrofóbica y fase reversa, esta última integrada en un sistema automatizado de FPLC. El seguimiento de la purificación se realizó determinando la actividad antimicrobiana de las fracciones resultantes de cada cromatografía, mediante el ensayo de inhibición en placas microtituladoras (sección III.2.2.2.).

Cuando la fracción eluída de la columna de interacción hidrofóbica, se inyectó en la columna de fase reversa PepRPC HR 5/5 C<sub>2</sub>/C<sub>18</sub>, la nisina A eluyó a una concentración de propanol del 35%, lo que se detectó por la actividad antimicrobiana asociada a un pico de proteína. Al volver a cromatografiar la fracción activa por la misma columna, se obtuvo un único pico de absorbancia con actividad inhibidora, que eluyó a una concentración de propanol del 32% (figuras IV.1.a y b).

Utilizando la metodología citada, se realizaron un total de nueve purificaciones, cada una de ellas a partir de un litro de cultivo. La concentración final de nisina A en las muestras purificadas, se determinó utilizando el parámetro de su coeficiente de extinción molar a 220 nm (21,2). El valor medio de nisina A obtenido de las nueve purificaciones, fue de  $0,115 \pm 0,05$  mg por litro de cultivo ( $0,115 \mu\text{g}$  por ml), obteniendo un total de 1,039 mg de nisina A pura. Este procedimiento de purificación, permitió la obtención de nisina A con un alto grado de pureza y con una recuperación considerable de su actividad antimicrobiana inicial. Sin embargo, la cantidad de nisina obtenida resultó claramente insuficiente para nuestras necesidades, por lo que en la preparación de los conjugados y en otras experiencias donde fue necesaria la utilización de nisina, se empleó un preparado comercial de nisina A de 30.000 UI/mg y una pureza superior al 90%.

Resultados

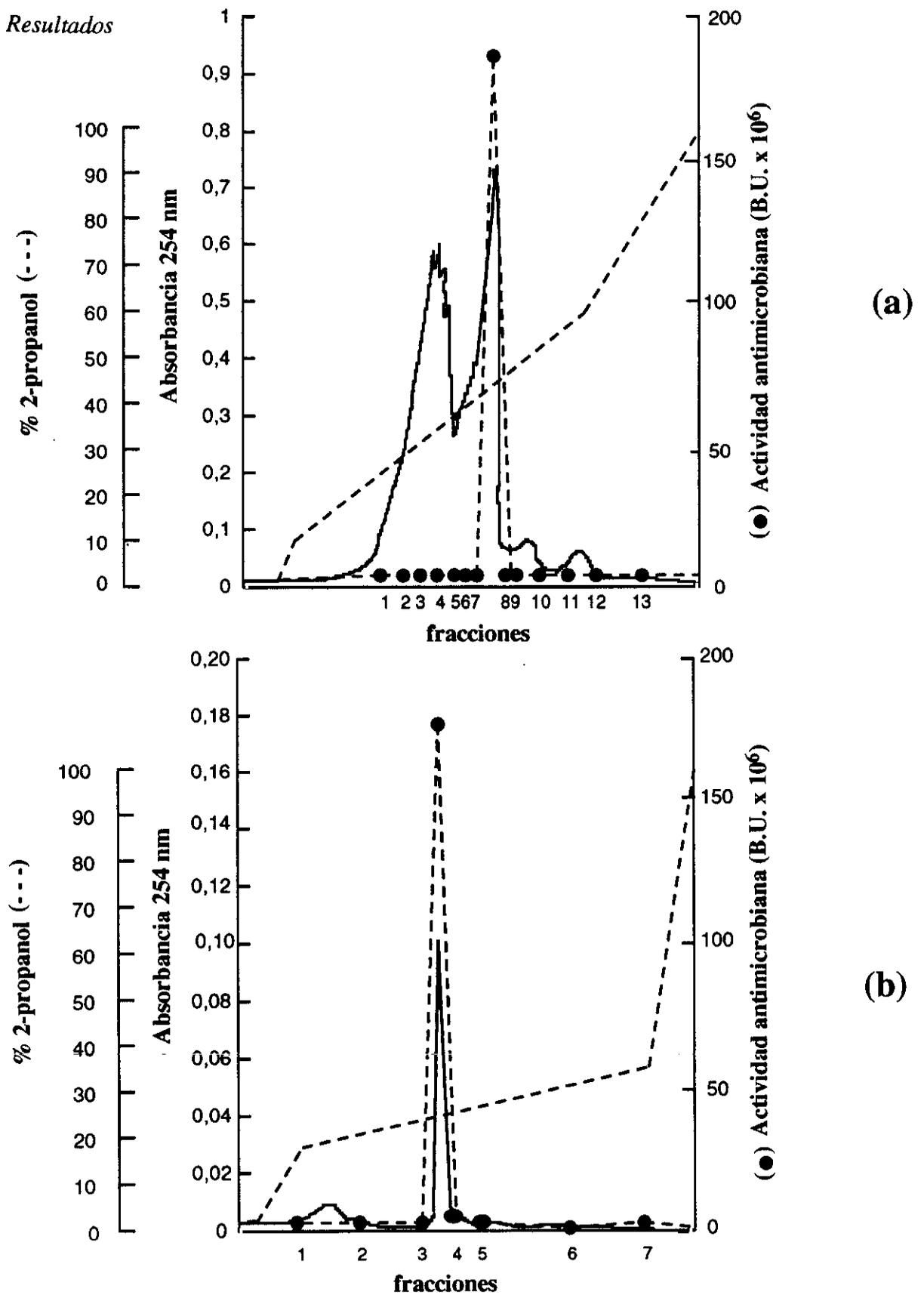


Figura IV.1. Cromatografía de fase reversa en un equipo automatizado de FPLC. La figura (a) muestra el cromatograma del eluato procedente de la cromatografía de interacción hidrofóbica. Las fracciones con actividad antimicrobiana se cromatografiaron de nuevo utilizando los mismos parámetros (figura b).

## IV.2. PREPARACION DE LOS CONJUGADOS PARA LAS INMUNIZACIONES Y LOS ENSAYOS INMUNOENZIMATICOS

### 2.1. Conjugación de la nisina A con la toxina colérica

En el conjugado nisA-TC, la toxina colérica actúa como molécula portadora del hapteno y como adyuvante en la inmunización. Para la conjugación de la toxina colérica con la nisina A, se empleó el método del glutaraldehído, realizando la conjugación en una proporción molar de 50:1 (nisina A:toxina colérica) (sección III.2.4.1.). Tras detener la reacción con borohidruro sódico, el producto de la conjugación se dializó en una membrana de 12.000 D de tamaño de poro, durante 48 h frente al tampón PBS, con el fin de eliminar la nisina A no reaccionante. El volumen obtenido de la diálisis fue de 3,9 ml y la concentración de conjugado resultante, estimada en función de la cantidad inicial de molécula portadora (0,5 mg), fue de 0,13 mg/ml. Finalmente, el conjugado se diluyó con PBS hasta una concentración final de 0,05 mg/ml, con el fin de inmunizar a cada animal con 200  $\mu$ l (10  $\mu$ g) de este conjugado. A continuación, se esterilizó por filtración y se distribuyó en viales de vidrio estériles en tantas alícuotas como dosis necesarias, que se mantuvieron en refrigeración a 4 °C.

### 2.2. Conjugación de la nisina A con la hemocianina KLH

La nisina A también se conjugó a la hemocianina del molusco *Megathura crenulata* (KLH) como molécula portadora. Para la conjugación de la KLH con la nisina A, se empleó el método del glutaraldehído descrito para el conjugado nisA-TC (sección III.2.4.2.). En este caso, la conjugación se realizó en una proporción en peso de 1/2 (nisina A:KLH), y una vez dializado el conjugado, de la misma manera que el conjugado nisA-TC, el volumen final fue de 7,7 ml y la concentración final, estimada en función de la cantidad inicial de KLH (4 mg), fue de 0,52 mg/ml. Finalmente, el conjugado se diluyó hasta la concentración deseada para la inmunización (0,17 mg/ml), con el fin de administrar 25  $\mu$ g de conjugado por animal y dosis (150  $\mu$ l) y se distribuyó en viales de vidrio estériles en tantas alícuotas como dosis necesarias. Las alícuotas se mantuvieron en congelación a -20 °C.

### 2.3. Conjugación de la nisina A con la ovoalbúmina

El conjugado de nisina A-ovolabúmina (nisA-OA), se preparó y utilizó para tapizar las placas en las técnicas del ELISA indirecto y ELISA competitivo indirecto. La conjugación también se realizó por el método del glutaraldehído, de la manera descrita en

la sección III.2.9.2.1. Una vez detenida la reacción de conjugación con borohidruro sódico, la nisina libre se eliminó por diálisis durante 48 h frente al tampón PBS, con una membrana de un tamaño de corte de 12.000 D. A continuación, se determinó el volumen final del conjugado (14,4 ml), estimando su concentración en base al contenido inicial de molécula portadora (7,5 mg de ovoalbúmina), resultando ser de 0,52 mg/ml. El conjugado obtenido se distribuyó en viales con 1 mg de conjugado cada uno, se liofilizó y se mantuvo en congelación a -20 °C.

#### **2.4. Conjugación de la nisina A con la peroxidasa de rábano (HRP)**

El conjugado nisA-HRP se utilizó en los inmunoensayos del tipo competitivo directo. La nisina A se conjugó a la peroxidasa de rábano (HRP) por el método del periodato en una proporción en peso de 1:3 (nisina A:peroxidasa), según el procedimiento descrito en la sección III.2.9.2.2. Tras detener la reacción de conjugación con borohidruro sódico, el conjugado se dializó frente a NaCl 0,85% durante 72 h. El volumen resultante tras la diálisis fue de 5 ml. Considerando la cantidad inicial de peroxidasa (10 mg), se estimó la concentración del conjugado en 2 mg/ml y se diluyó hasta conseguir una concentración final de 1 mg/ml. Finalmente, se distribuyó en alícuotas de 1 ml que se liofilizaron y mantuvieron en congelación a -20 °C.

### **IV.3. PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A LA NISINA A EN EL SUERO DE LOS RATONES INMUNIZADOS**

#### **3.1. Protocolo I: inmunización con el conjugado nisA-TC**

Cuatro ratones se inmunizaron por vía i.p. con cuatro dosis de 10 µg de conjugado cada una. A los 15 días de iniciada la inmunización y tras la segunda dosis del inmunógeno, los títulos de los inmunoseros de los ratones, determinados por un ELISA indirecto, fueron de entre 1.600 y 3.200, incrementándose ligeramente, hasta 6.400, en las siguientes inmunizaciones.

##### **3.1.1. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos generados**

La presencia de anticuerpos específicos anti-nisina A en el inmunosero de los ratones se determinó mediante un ELISA-CI, aunque su afinidad relativa fue baja y no aumentó tras la tercera y cuarta inmunizaciones. Este inmunoensayo permitió la detección de la nisina A a concentraciones de entre 1 y 5 µg/ml, mientras que la concentración de nisina libre requerida para inhibir en un 50% su unión al anticuerpo superó los 40 µg/ml.

La figura IV.2. muestra la evolución de la especificidad y sensibilidad de los inmunosueros de los ratones durante su inmunización. Los inmunosueros se utilizaron a una dilución 1/100, mientras que el conjugado comercial anti-inmunoglobulinas de ratón obtenido de cabra, se empleó a una dilución 1/500. La sensibilidad del ensayo no mejoró cuando los inmunosueros se analizaron con un ELISA-CD (resultados no mostrados).

### **3.2. Protocolo 2: inmunización con el conjugado nisA-KLH**

Cuatro ratones se inmunizaron por vía i.p. y otros cuatro por vía s.c., recibiendo cada uno tres dosis de 25 µg de conjugado cada una. Después de recibir dos dosis del inmunógeno (a los 21 días del inicio de la inmunización), se determinaron, mediante un ELISA indirecto, los títulos de los inmunosueros de los ratones, que fueron de entre 3.200 a 6.400, incrementándose hasta 12.800-25.600 al inyectarles la tercera dosis del inmunógeno. Los títulos de los animales inmunizados por vía i.p., fueron superiores a los de los inmunizados por vía s.c. Dichos títulos no disminuyeron en las sangrías posteriores, realizadas a los dos y tres meses de la última inmunización (91 y 120 días desde el inicio de las inmunizaciones).

#### **3.2.1. Evaluación de la especificidad e inmunoreactividad de los anticuerpos generados**

Cuando los inmunosueros de ambos grupos de animales se analizaron mediante la técnica de ELISA-CI, no se observó un descenso de la absorbancia de los pocillos al incrementar la concentración del antígeno, es decir, la nisina libre no inhibió la interacción de los anticuerpos con la nisina del tapizado, por lo que no pudo demostrarse la presencia de anticuerpos específicos frente a la nisina A. Los resultados no mejoraron con diluciones de los anticuerpos desde la 1/100 hasta la 1/10.000 ni con una mayor dilución del conjugado de anti-inmunoglobulina de ratón marcado con laperoxidasa de rábano. Sin embargo, cuando los inmunosueros se sometieron a un ELISA-CD, se detectaron anticuerpos específicos frente a la nisina A, de una elevada afinidad relativa. La especificidad de los anticuerpos aumentó gradualmente desde la primera hasta la tercera sangría (realizada a los dos meses de la última inmunización) para luego disminuir en la cuarta sangría (un mes más tarde), a pesar de que el título de los inmunosueros se mantuvo constante.

El límite de detección del ELISA-CD, fue de 0,1 µg nisina/ml y la concentración de nisina A libre necesaria para inhibir en un 50% su unión al anticuerpo osciló entre 0,5 y 5 µg/ml, tanto en los ratones inmunizados por vía s.c. como por vía i.p. Las figuras IV.3 y IV.4. muestran la evolución de la especificidad y sensibilidad de los inmunosueros de los

## Resultados

ratones durante su inmunización. Los inmunosueros procedentes de la inmunización i.p. se emplearon a una dilución 1/2.500, mientras que los obtenidos vía s.c. se utilizaron a la 1/1.000; el conjugado de nisina A unido a la peroxidasa se empleó a una dilución 1/500. En la primera y segunda sangrías, los anticuerpos obtenidos por vía i.p. fueron más sensibles que los obtenidos vía s.c.; sin embargo, en la tercera sangría la sensibilidad de éstos últimos aumentó considerablemente, superando la de los anticuerpos obtenidos por inmunización i.p.

Asímismo, cuando la nisina A se incorporó en el caldo MRS, no se produjeron reacciones inespecíficas indeseadas con los componentes del medio, incrementándose, además, la sensibilidad de la técnica, detectando concentraciones de nisina de hasta 5 ng/ml. De la misma manera, la concentración de nisina libre necesaria para inhibir en un 50% la unión del conjugado al anticuerpo fue de 0,25 µg/ml, como se muestra en la figura IV.5.

Tras un análisis minucioso de los resultados previamente citados, se seleccionaron por su mayor sensibilidad los inmunosueros obtenidos de la tercera sangría de los animales inmunizados vía s.c. y con ellos se realizaron las experiencias que se indican a continuación. Los inmunosueros se emplearon siempre en un formato de ELISA-CD y a una dilución 1/1.000, mientras que el conjugado de nisina A unido a la peroxidasa de rábano, se utilizó siempre a la dilución 1/500.

Los inmunosueros citados, se emplearon para determinar la capacidad de los anticuerpos específicos generados de reconocer la nisina de los sobrenadantes de bacterias lácticas productoras, así como su inmunoreactividad frente a sobrenadantes de microorganismos productores de otras bacteriocinas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV.1., en la que se observa que los anticuerpos reaccionaron intensamente con los sobrenadantes de *L. lactis* BB24 y G18, ambas cepas productoras de nisina A y con el sobrenadante de *L. lactis* CNRZ150, cepa productora de nisina Z. Sin embargo, los anticuerpos no mostraron reacción con el sobrenadante de la cepa *L. lactis* MG1614, libre de plásmidos y no productora de nisina, que se empleó como control negativo, ni con los sobrenadantes de las cepas de *Pediococcus acidilactici* L50 (productor de pediocina L50), de *Lactobacillus sake* 148 (productor de lactocina S), ni de *Pediococcus acidilactici* 347 (productor de pediocina PA-1), en los que se determinó una reactividad cruzada del 0, 8,1 y 8,2%, respectivamente..

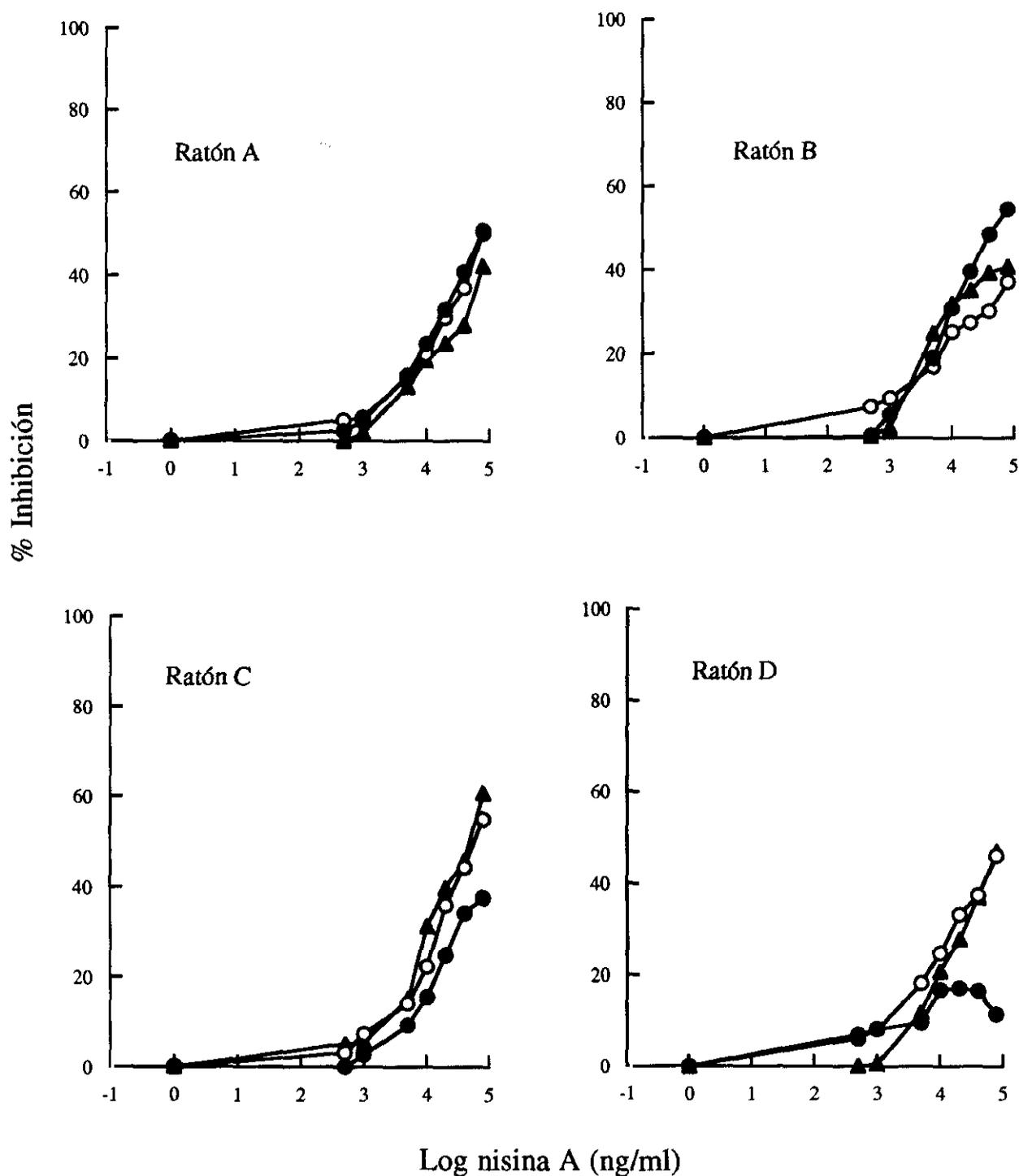


Figura IV.2. Resultados del ELISA-CI de los sueros de los ratones inmunizados vía i.p. con el conjugado nisA-TC. Primera sangría (●), segunda sangría (○) y tercera sangría (▲). Cada punto de la gráfica es el valor medio de los triplicados de cada determinación.

Resultados

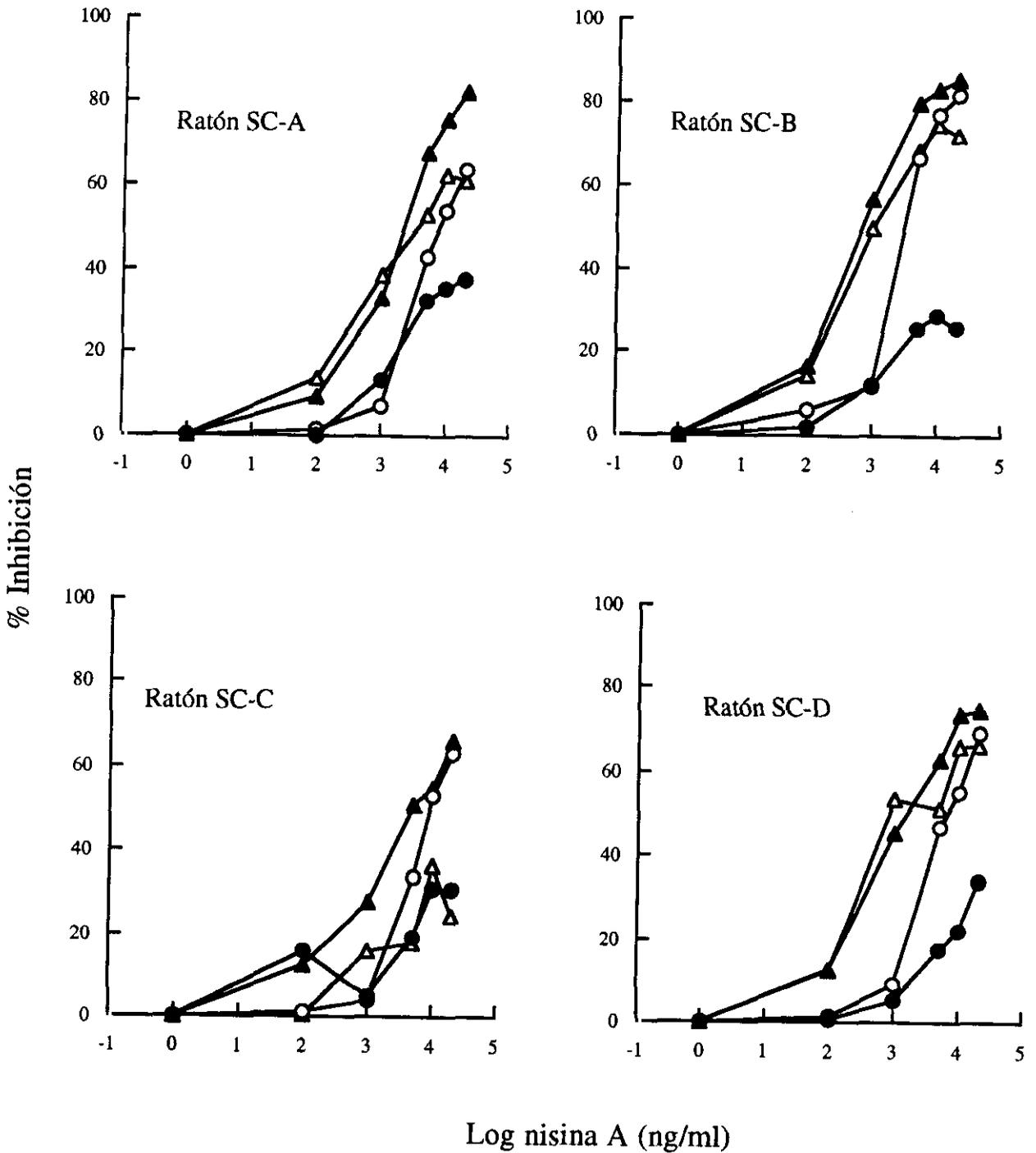
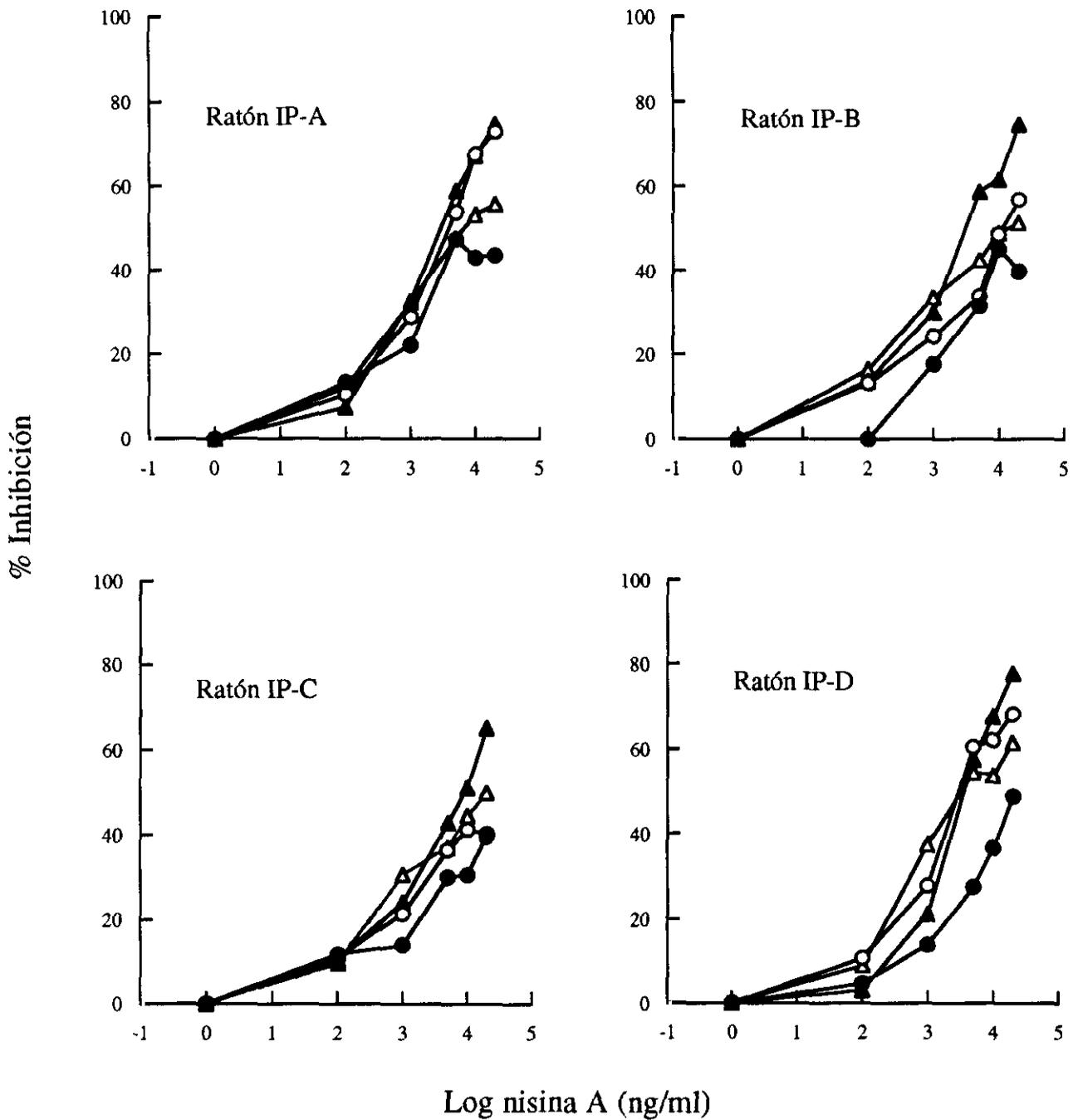
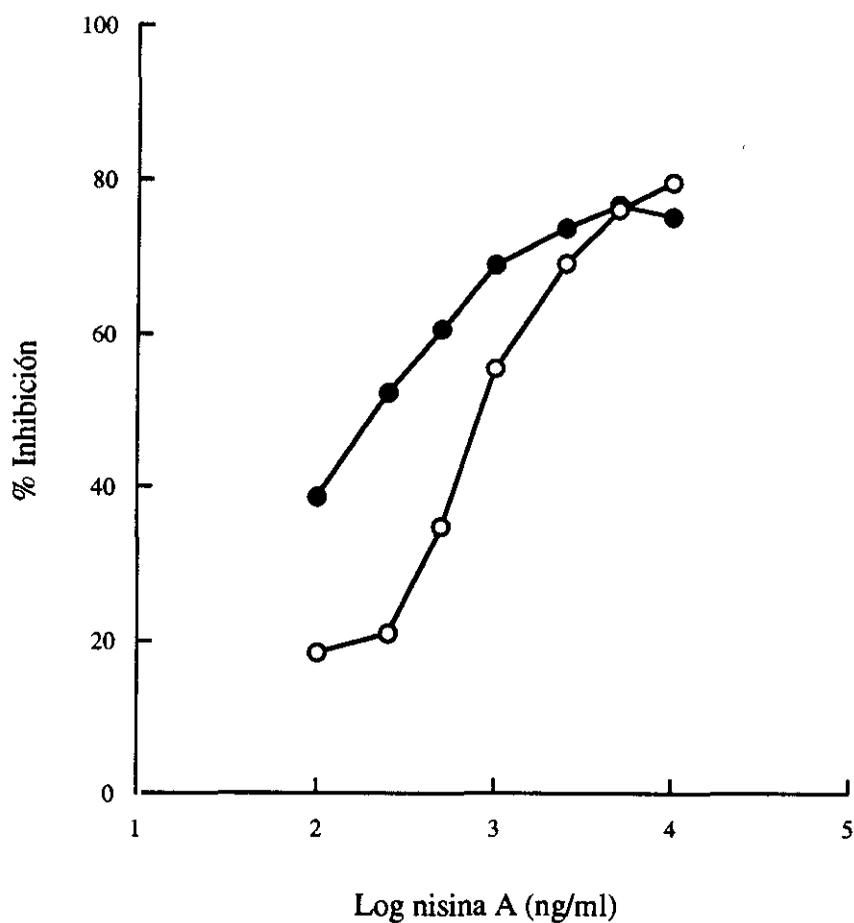


Figura IV.3. Resultados del ELISA-CD de los sueros de los ratones inmunizados vía s.c. con el conjugado nisA-KLH. Primera sangría (●), segunda sangría (○), tercera sangría (▲) y cuarta sangría (△). Cada punto de la gráfica es el valor medio de los triplicados de cada determinación.



**Figura IV.4. Resultados del ELISA-CD de los sueros de los ratones inmunizados vía i.p. con el conjugado nisA-KLH. Primera sangría (●), segunda sangría (○), tercera sangría (▲) y cuarta sangría (△). Cada punto de la gráfica es el valor medio de los triplicados de cada determinación.**



**Figura IV.5. Detección de la nisina A en PBS (○) y en el caldo MRS (●) mediante un ELISA-CD realizado con el suero de uno de los animales (SC-B) inmunizado con el conjugado nisA-KLH. Cada punto de la gráfica representa el valor medio de los triplicados de cada determinación.**

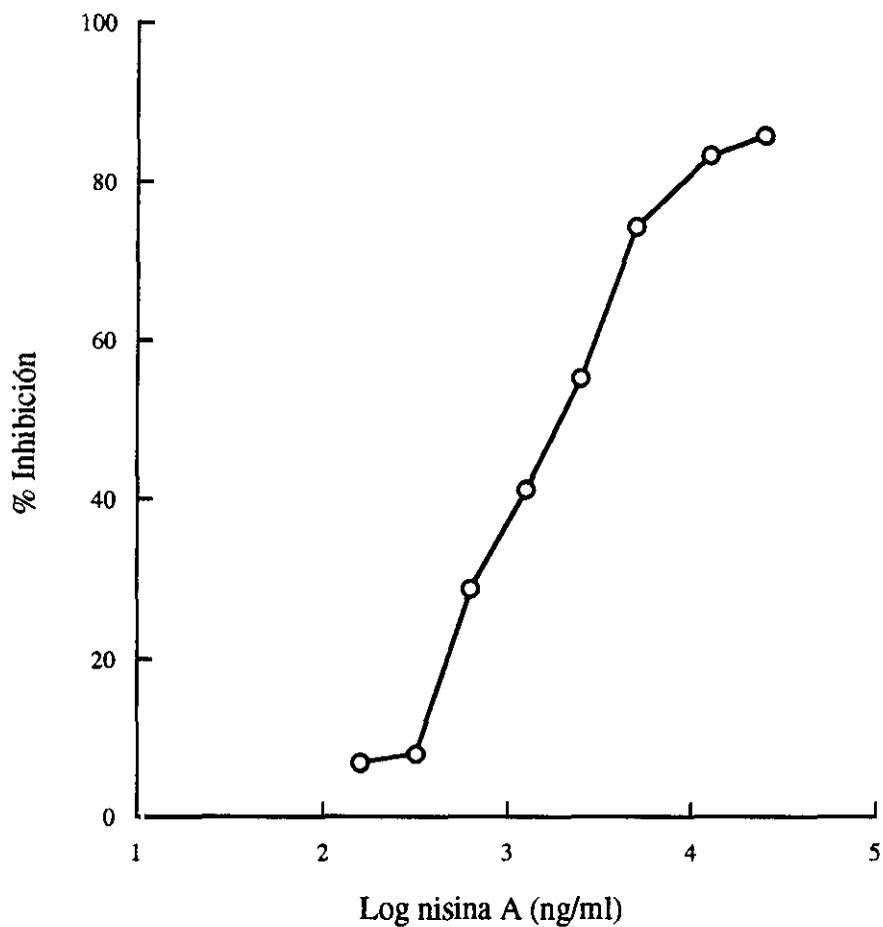
**Tabla IV.1.: Inmunidad cruzada de los inmunosueros obtenidos de la inmunización s.c. de los ratones con el conjugado nisA-KLH, frente a los sobrenadantes de diversas cepas productoras de bacteriocinas, utilizando un formato de ELISA-CD**

Microorganismo <sup>a</sup>	Densidad óptica a 405 <sup>b,c</sup>	Reactividad cruzada <sup>d</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> BB24 (nisina A)	0,350±0,01	100
<i>Lactococcus lactis</i> G18 (nisina A)	0,331±0,02	100
<i>Lactococcus lactis</i> CNRZ150 (nisina Z)	0,343±0,02	100
<i>Lactococcus lactis</i> MG1614 (no productor)	1,510±0,02	0
<i>Lactobacillus sake</i> 148 (lactocina S)	1,265±0,05	8,2
<i>Pediococcus acidilactici</i> 347 (pediocina PA-1)	1,267±0,03	8,1
<i>Pediococcus acidilactici</i> L50 (pediocina L50)	1,384±0,02	0

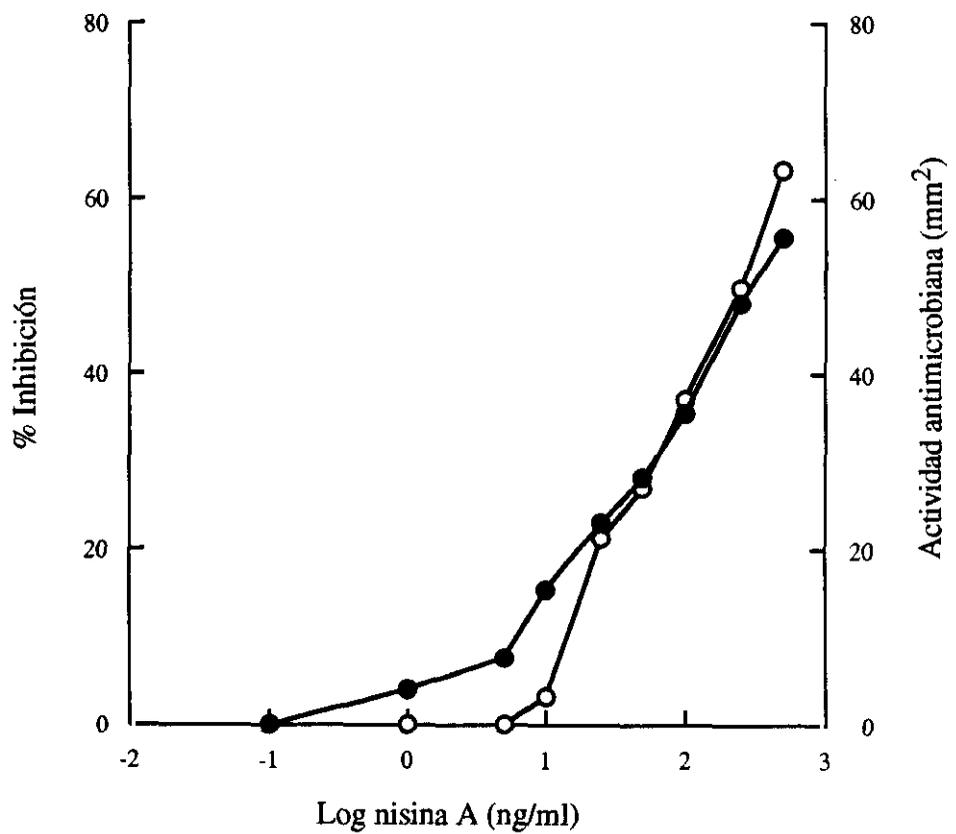
<sup>a</sup>Bacteriocina producida entre paréntesis. <sup>b</sup>D.O.405 del control = 1,347. <sup>c</sup>Los resultados son el valor medio de las muestras analizadas por triplicado. <sup>d</sup>Reactividad cruzada definida como [(inhibición producida por el sobrenadante analizado / inhibición producida por el sobrenadante de *L. lactis* BB24) x 100].

Los anticuerpos descritos también reconocieron a la nisina A del preparado comercial Nisaplin<sup>®</sup> (Applin & Barret Ltd.). Para ello, la concentración de nisina pura del preparado, se estimó como se indica en la sección III.2.5.4., la muestra apropiada se diluyó en PBS y las concentraciones analizadas fueron de 156 a 25.000 ng/ml. La curva resultante con los valores obtenidos se muestra en la figura IV.6.

Finalmente, se comparó la sensibilidad del ensayo inmunoenzimático utilizado (ELISA-CD) con el método tradicional de detección de la nisina por el test de difusión en agar (ADT). Para ello, se emplearon concentraciones de nisina A de 0 a 500 ng/ml en el caldo MRS que se ensayaron con las dos metodologías. Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.7., en la que se observa que con el ELISA-CD existe inhibición desde los 5 ng/ml (7,6%), mientras que en el test de difusión en agar (ADT), los halos de inhibición se observaron a partir de los 10 ng/ml (3,24 mm<sup>2</sup>).



*Figura IV.6.* Detección de la nisina A en el preparado comercial de Nisaplin<sup>®</sup>, mediante un ELISA-CD con el suero obtenido del ratón SC-B inmunizado con el conjugado nisA-KLH. Cada punto de la gráfica representa el valor medio de los triplicados de cada determinación.



**Figura IV.7. Detección de la nisina A en el caldo MRS, mediante un ELISA-CD (●) y en el test de difusión en agar (ADT) (○). Los puntos representan el valor medio de los triplicados de cada determinación.**

#### IV.4. PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A LA NISINA A EN EL LIQUIDO ASCITICO DE LOS RATONES INMUNIZADOS

Cuatro ratones se inmunizaron con el conjugado nisA-KLH y con los Adyuvantes Completo e Incompleto de Freund (grupo I) y otros cuatro con el conjugado sin Adyuvante (grupo II). Los animales recibieron tres dosis de 25 µg por vía intraperitoneal.

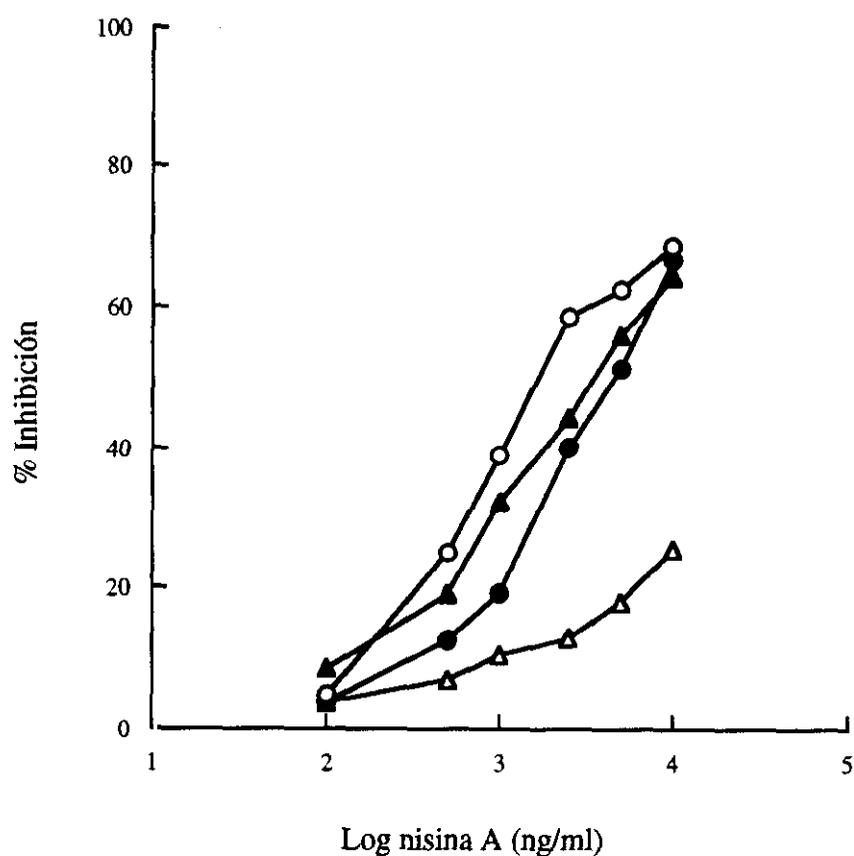
A la semana de recibir la segunda dosis del inmunógeno, los títulos séricos de los animales del grupo I eran de 12.800 y los del grupo II oscilaban entre 6.400 y 12.800, pero la existencia de anticuerpos específicos en los sueros fue casi imperceptible en ambos grupos. No obstante, el suero de los animales volvió a analizarse a las tres semanas de inocular las células de mieloma, habiendo recibido una dosis más del inmunógeno. Aunque los títulos séricos fueron similares, todos los inmunosueros de los animales del grupo I poseían anticuerpos específicos, que se pusieron de manifiesto con un ELISA-CD (figura IV.8.). Los sueros se utilizaron a la dilución 1/100 y el conjugado de nisina unida a la peroxidasa a la de 1/500. En el suero de los animales del grupo II, la presencia de anticuerpos específicos fue casi insignificante.

En el grupo I, dos de los cuatro ratones desarrollaron ascitis (ratones I.A y I.B) y los volúmenes de líquido ascítico obtenidos fueron de 7,2 ml y 11 ml, respectivamente; en el grupo II todos los ratones desarrollaron ascitis, con una producción de 1,5, 7,5, 9,5 y 7,5 ml, respectivamente. Los anticuerpos del líquido ascítico de los ratones I.A. y I. B., se purificaron parcialmente por su precipitación con sulfato amónico.

##### 4.1. Determinación de la concentración de proteína de los anticuerpos

La concentración de proteína de los anticuerpos parcialmente purificados del líquido ascítico, se estimó empleando un método colorimétrico con azul brillante de Coomassie G-25, reactivo específico de las proteínas y utilizando la seroalbúmina bovina fracción 5, como patrón interno. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

<u>Anticuerpos</u>	<u>Concentración de proteína (mg/ml)</u>
Ratón I.A.	1,674
Ratón I.B.	1,401



**Figura IV.8.** Resultados del ELISA-CD de los sueros de los cuatro ratones del grupo I, inmunizados con el conjugado nisA-KLH para obtener los anticuerpos del líquido ascítico. Ratón I.A. (●), ratón I.B. (○), ratón I.C. (▲) y ratón I.D. (△). Cada punto de la gráfica es el valor medio de los triplicados de cada determinación.

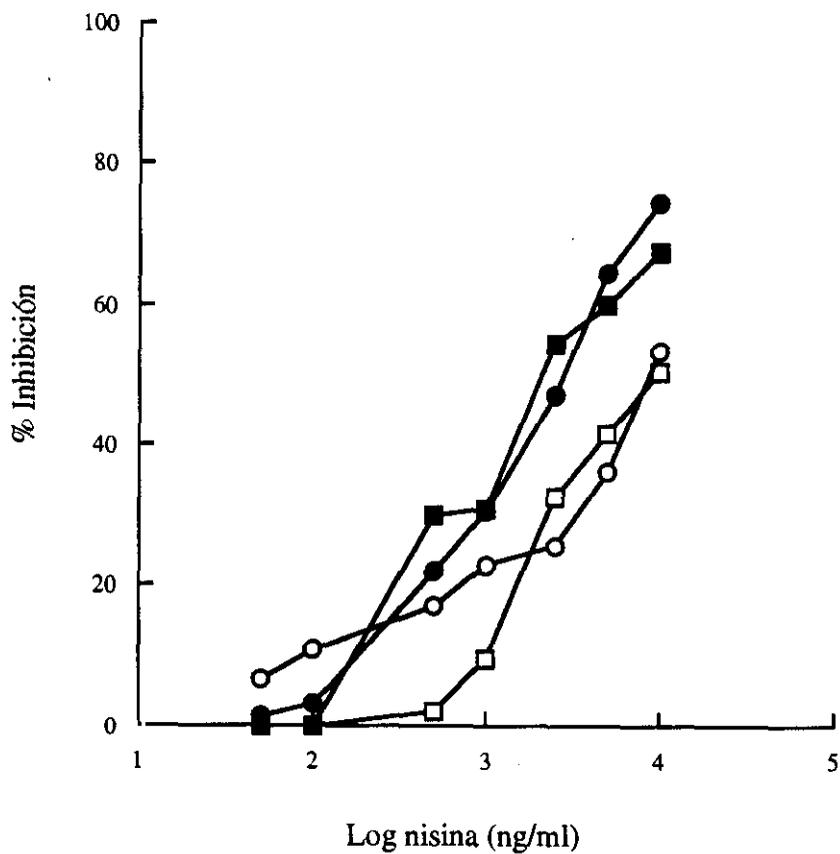
#### **4.2. Caracterización isotópica de los anticuerpos**

La caracterización isotópica de los anticuerpos policlonales parcialmente purificados del líquido ascítico de los ratones A y B, demostró la presencia de todas las clases y subclases de inmunoglobulinas, como cabía esperar de su naturaleza policlonal. No obstante, en el ratón I.A predominaron las IgG1, seguido de las IgA y, a continuación, las IgM. En el ratón I.B., los resultados fueron similares aunque la concentración de IgG2 fue mayor.

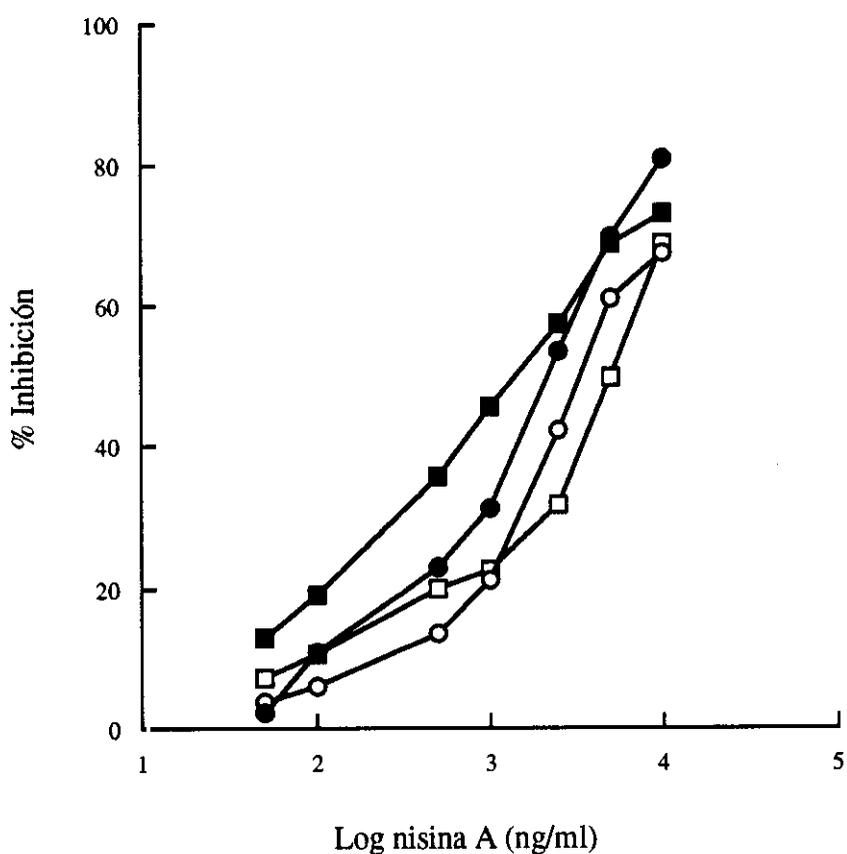
#### **4.3. Evaluación de la especificidad e inmunoreactividad de los anticuerpos generados en el líquido ascítico**

Un ELISA-CD determinó la presencia de anticuerpos específicos en el líquido ascítico de los ratones I.A. y I.B. Las figuras IV.9. y IV.10., muestran la detección de la nisina A y la nisina Z empleando los anticuerpos parcialmente purificados del líquido ascítico de los ratones I.A y I.B, a una dilución 1/100. Las concentraciones de nisina A y nisina Z libres, necesarias para inhibir en un 50% la unión del conjugado al anticuerpo fueron de 1,9  $\mu\text{g/ml}$  y de 3  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, mientras el límite de detección osciló entre 0,05 y 0,1  $\mu\text{g/ml}$ . La sensibilidad del inmunoensayo se incrementó a 0,01  $\mu\text{g/ml}$ , cuando la nisina A se vehiculó en el medio MRS. Aunque todos los animales del grupo II desarrollaron ascitis, la presencia de anticuerpos específicos en el líquido ascítico fue casi insignificante.

También se determinó la capacidad de dichos anticuerpos de detectar la nisina de los sobrenadantes de las cepas productoras, así como su reactividad con los sobrenadantes de microorganismos productores de otras bacteriocinas. Para ello, se emplearon los anticuerpos purificados del líquido ascítico del ratón I.B., a una dilución 1/100, en un formato de ELISA-CD. Como se observa en la tabla IV.2., los resultados fueron muy similares a los obtenidos con los anticuerpos policlonales del suero de los ratones, ya que los anticuerpos reconocieron intensamente la nisina A de los sobrenadantes de las cepas productoras de *L. lactis* BB24 y G18, así como a la nisina Z del sobrenadante de *L. lactis* CNRZ150, sin ninguna diferencia significativa. Sin embargo, no reaccionaron con el sobrenadante de la cepa de *L. lactis* MG1614, libre de plásmidos y no productora de nisina. Tampoco se observó una reacción significativa, con los sobrenadantes de las cepas de *Lactobacillus sake* 148 (productor de lactocina S), *Pediococcus acidilactici* 347 (productor de pediocina PA-1) y de *Pediococcus acidilactici* L50 (productor de pediocina L50).



**Figura IV.9.** Curvas estándar de identificación y cuantificación de la nisina A vehiculada en PBS (●) y MRS (■) y de la nisina Z en PBS (○) y MRS (□), realizadas mediante un ELISA-CD con los anticuerpos purificados del líquido ascítico del ratón I.A. Cada punto de la gráfica representa el valor medio de los triplicados de cada determinación.



**Figura IV.10. Curvas estándar de identificación y cuantificación de la nisina A vehiculada en PBS (●) y MRS (■) y de la nisina Z en PBS (○) y MRS (□), realizadas mediante un ELISA-CD con los anticuerpos purificados del líquido ascítico del ratón I.B. Cada punto de la gráfica representa el valor medio de los triplicados de cada determinación.**

**Tabla IV.2.: Inmunidad cruzada de los anticuerpos policlonales purificados del líquido ascítico del ratón I.B., frente a los sobrenadantes de diversas cepas productoras de bacteriocinas, utilizando un formato de ELISA-CD**

Microorganismo <sup>a</sup>	Densidad optica a 405 <sup>b,c</sup>	Reactividad cruzada <sup>d</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> BB24 (nisina A)	1,364±0,02	100
<i>Lactococcus lactis</i> G18 (nisina A)	1,295±0,03	100
<i>Lactococcus lactis</i> CNRZ150 (nisina Z)	1,335±0,04	100
<i>Lactococcus lactis</i> MG1614 (no productor)	2,335±0,008	0
<i>Lactobacillus sake</i> 148 (lactocina S)	2,364±0,01	0
<i>Pediococcus acidilactici</i> 347 (pediocina PA-1)	2,337±0,007	0
<i>Pediococcus acidilactici</i> L50 (pediocina L50)	2,275±0,02	1,9

<sup>a</sup>Bacteriocina producida entre paréntesis. <sup>b</sup>D.O.405 del control = 2,293. <sup>c</sup>Los resultados son el valor medio de las muestras analizadas por triplicado. <sup>d</sup>Reactividad cruzada definida como [(inhibición producida por el sobrenadante analizado / inhibición producida por el sobrenadante de *L. lactis* BB24) x 100].

#### **IV. 5. OBTENCION Y PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LA NISINA A**

##### **5.1. Inmunización de los ratones**

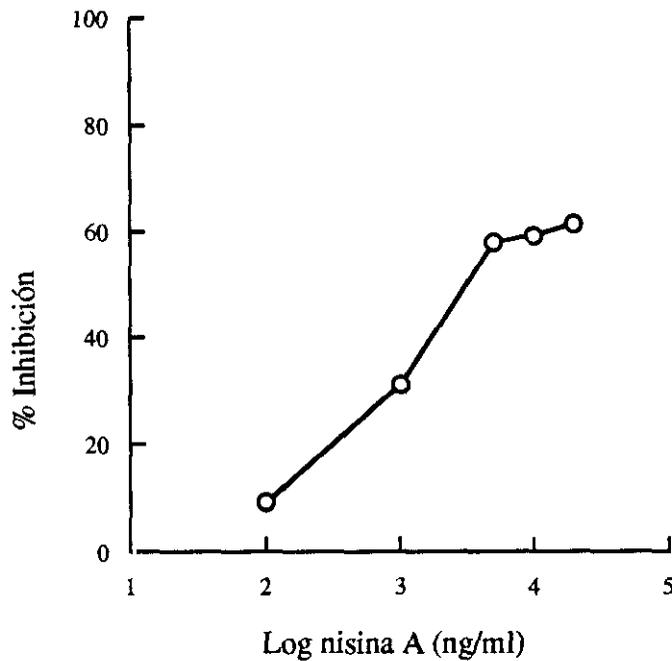
En la obtención de anticuerpos monoclonales frente a la nisina A, se emplearon cuatro ratones hembras de 6-8 semanas de edad de la estirpe BALB/c. La inmunización de los animales se realizó administrando cuatro dosis subcutáneas de 25 µg de nisA-KLH, a intervalos de 2 semanas. Tras la tercera dosis del inmunógeno, todos los animales presentaron títulos séricos de entre 12.800 y 25.600, con anticuerpos específicos frente a la nisina A. Los valores de inhibición (media y rango) de la unión del conjugado nisA-HRP a los anticuerpos, al añadir las concentraciones de nisina A de 0,1, 1 y 10 µg/ml, fueron de 13% (9-16), 41% (28-57) y 72% (58-83), respectivamente.

Cuatro días antes de la fusión, los ratones con la mejor respuesta inmunológica recibieron la última dosis del inmunógeno sin adyuvante, por vía intraperitoneal. Las figuras IV.11. y IV.12., muestran la respuesta de los inmunoseros de los dos animales seleccionados, antes de la fusión de sus linfocitos con las células de mieloma.

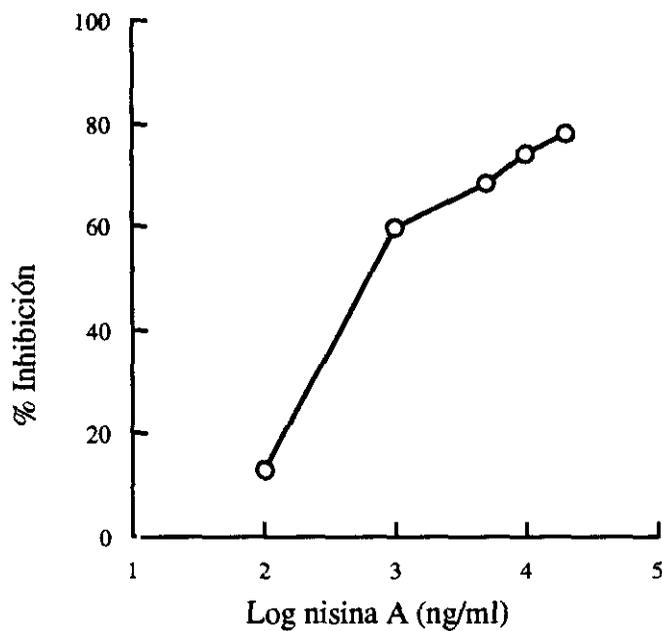
##### **5.2. Fusión celular y selección de los hibridomas**

Se realizaron dos fusiones celulares con los dos animales que presentaron la mejor respuesta sérica frente a la nisina A. En ambos casos, las células del bazo se fusionaron con células de mieloma de ratón de la línea P3X63-Ag8.653, en una proporción de 7,5:1 (linfocitos esplénicos:células de mieloma). A las 24 horas de la fusión, comenzó la selección de los hibridomas con el medio HAT. A la semana ya se observaron los hibridomas al microscopio. En la primera fusión, la eficacia de la misma (porcentaje de pocillos con hibridomas respecto al número total de pocillos sembrados) fue del 99,8%, mientras que, en la segunda, fue del 50%.

A los 11 días de la fusión, momento en el que los hibridomas se observaron a simple vista, se comenzaron a analizar sus sobrenadantes. El ensayo empleado fue un ELISA-CD del tipo II, realizado de la manera descrita en la sección III.2.9.4.2. Como control positivo, se empleó el suero del animal seleccionado para la fusión, obtenido en el momento de su sacrificio. Se analizaron los sobrenadantes de todos los pocillos con un crecimiento celular positivo. En la primera fusión, de 420 pocillos sembrados, sólo uno de ellos, el correspondiente al hibridoma 5G8, presentó en el sobrenadante anticuerpos capaces de reconocer a la nisina A; en la segunda fusión, de 480 pocillos analizados, se



**Figura IV.11.** Respuesta sérica en el momento del sacrificio del ratón empleado en la primera fusión para obtener anticuerpos monoclonales frente a la nisina A. El suero se analizó mediante un ELISA-CD. Cada punto de la gráfica corresponde al valor medio de los triplicados de cada determinación.



**Figura IV.12.** Respuesta sérica en el momento del sacrificio del ratón empleado en la segunda fusión para obtener anticuerpos monoclonales frente a la nisina A. El suero se analizó mediante un ELISA-CD. Cada punto de la gráfica corresponde al valor medio de los triplicados de cada determinación.

obtuvo también un único positivo, el correspondiente al hibridoma 2D10.

### **5.3. Clonación de los hibridomas de interés**

El hibridoma 5G8, de la primera fusión, perdió su viabilidad durante la clonación; el hibridoma 2D10, procedente de la segunda fusión celular, se clonó por el método de la dilución límite en placas, a una concentración celular de 0.5 a 1 célula/pocillo.

Transcurridos diez días de la clonación, se analizó el sobrenadante de los pocillos donde se observó crecimiento celular, para seleccionar los clones que seguían produciendo anticuerpos específicos. Todos los pocillos con crecimiento fueron analizados y todos ellos mostraron anticuerpos específicos frente a la nisina A. De los clones obtenidos, se seleccionaron aquellos cuyas características de crecimiento eran las mejores y poseían valores de inhibición más altos, aunque los valores de todos ellos fueron muy similares. De esta manera, se seleccionaron los clones AB2, AD8, AD10, BF2, BF6 y BF10. Todos ellos se expandieron, mediante subcultivos celulares sucesivos, de placas de 96 pocillos a placas de 48, 24 y 6 pocillos y a frascos de cultivo de 25 y 75 cm<sup>2</sup>, hasta alcanzar la densidad celular adecuada para congelarlos. Su conservación se realizó por congelación a -80 °C y en nitrógeno líquido.

Posteriormente, se procedió a la producción en gran escala de los anticuerpos monoclonales de los clones seleccionados. Esta se realizó *in vitro* por expansión de los clones productores en el medio de cultivo completo en frascos de 75 cm<sup>2</sup> y en el caso del clon AD10, también *in vivo* en el líquido ascítico de ratones BALB/c (sección III.2.7.6.). A continuación, los anticuerpos producidos se purificaron parcialmente mediante su precipitación con sulfato amónico.

### **5.4. Determinación de la concentración de proteína de los anticuerpos monoclonales**

La concentración de proteína de los anticuerpos monoclonales purificados, se determinó empleando un kit comercial con azul brillante de Coomassie G-25, como reactivo colorimétrico específico de las proteínas y la seroalbúmina bovina, fracción 5, como patrón interno. Los resultados obtenidos indican que la concentración de anticuerpos en el líquido ascítico del ratón inmunizado con el clon AD10, fue casi 20 veces superior que la de su producción *in vitro*.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Concentración de proteína (mg/ml)</b>
<u>Sobrenadantes</u>	
Hibridoma 5G8	0,641
Hibridoma 2D10	0,922
Clon AB2	0,413
Clon AD8	0,829
Clon AD10	0,531
Clon BF2	0,670
Clon BF6	0,868
Clon BF10	0,696
<u>Líquido ascítico</u>	
Clon AD10	10,30

### **5.5. Caracterización isotípica de los anticuerpos monoclonales**

La clase y subclase de los anticuerpos monoclonales resultantes se determinó utilizando un inmunosuero comercial de conejo frente a las inmunoglobulinas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA de ratón, mediante un ELISA indirecto. Tanto los hibridomas 5G8 y 2D10, como los diferentes clones derivados del hibridoma 2D10, produjeron anticuerpos del tipo IgG1.

### **5.6. Especificidad e inmunoreactividad de los anticuerpos monoclonales**

En primer lugar, se determinó la capacidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos, de reconocer la nisina A y la nisina Z purificadas a homogeneidad y la de los sobrenadantes de los cultivos productores, así como su reactividad frente a los sobrenadantes de microorganismos productores de otras bacteriocinas. Las bacteriocinas evaluadas fueron la lactocina S, pediocina PA-1 y pediocina L50. En todos los casos, se empleó un formato de ELISA-CD, del tipo II.

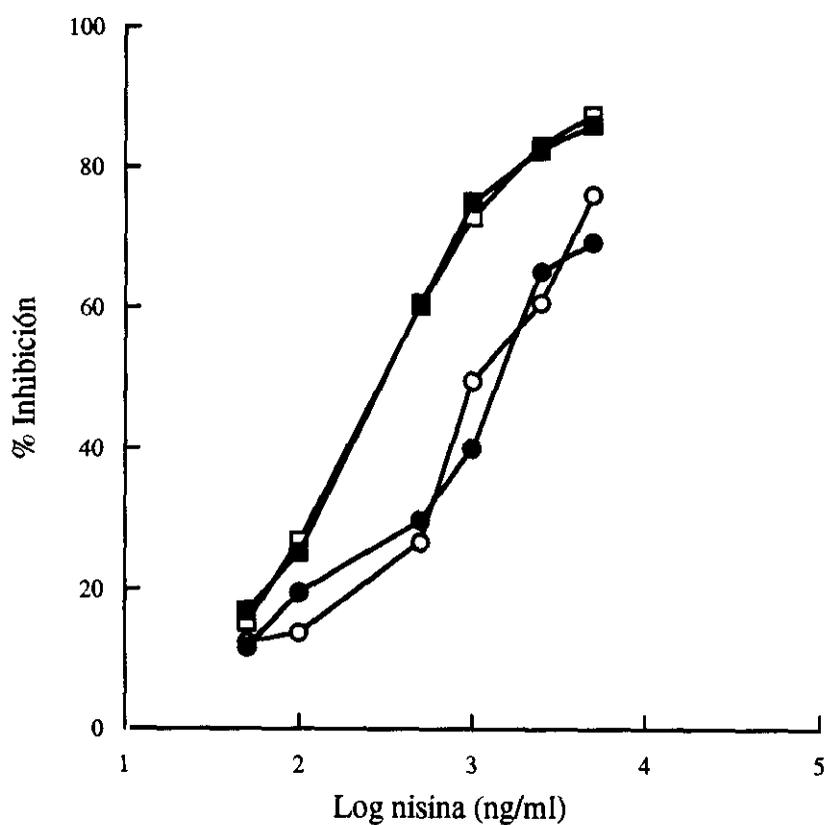
Los anticuerpos parcialmente purificados del hibridoma 5G8 se emplearon en un ELISA-CD del tipo II a la dilución 1/2.000 y como se observa en la figura IV.13., su reactividad frente a la nisina Z fue similar a la de la nisina A. El límite de detección fue de 0,01 µg/ml de nisina A y la concentración de antígeno necesaria para obtener un 50% de inhibición de la unión entre el conjugado y los anticuerpos, fue de entre 1 a 2,5 µg/ml. La sensibilidad del ensayo aumentó hasta 1 ng/ml cuando la nisina se vehiculó en MRS y, en este caso, se necesitaron de 0,1 a 0,25 µg/ml de nisina para obtener un 50% de

## Resultados

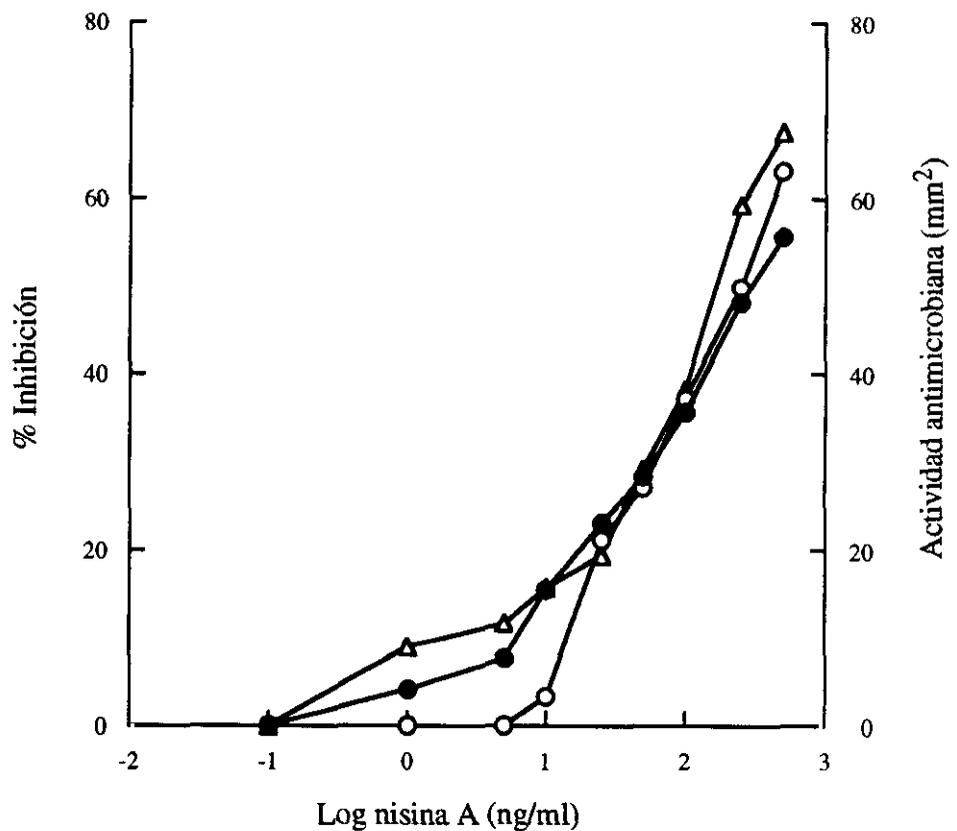
inhibición. Empleando un ELISA-CD del tipo I, se obtuvieron resultados similares, aunque en este caso se necesitó una dilución de los anticuerpos purificados 6 veces mayor (dilución 1/300).

También se comparó la sensibilidad del ensayo inmunoenzimático desarrollado con estos anticuerpos, con los datos obtenidos previamente con los anticuerpos policlonales séricos y con la prueba de difusión en agar (ADT) (figura IV.7.). Para ello, se emplearon igualmente concentraciones de nisina de 0 a 500 ng/ml en MRS ensayando en un ELISA-CD II los anticuerpos monoclonales del hibridoma 5G8, con una dilución de 1/2.000. Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.14, donde se observa que con los anticuerpos monoclonales se incrementa la sensibilidad del ensayo inmunoenzimático, logrando valores de inhibición de 8,9 y 11,6% para concentraciones de nisina de 1 y 5 ng/ml, respectivamente, mientras que para los anticuerpos policlonales dichos valores fueron de 4 y 7,6%, para las mismas concentraciones. En el test de difusión en agar, los halos de inhibición se observaron a partir de los 10 ng de nisina/ml (3,24 mm<sup>2</sup>).

Al analizar los sobrenadantes de las distintas cepas productoras de bacteriocinas con los anticuerpos del hibridoma 5G8 (tabla IV.3.), se observó que dichos anticuerpos reconocían de manera similar la nisina A de las cepas de *L. lactis* BB24 y G18 y la nisina Z de la cepa *L. lactis* CNRZ150. Los anticuerpos no mostraron reacciones cruzadas con el control negativo de *L. lactis* MG1614, no productor de nisina, aunque se detectó una pequeña reactividad (del 11 y del 18% respectivamente) con los sobrenadantes de *P. acidilactici* 347 (productor de pediocina PA-1) y *P. acidilactici* L50 (productor de pediocina L50).



**Figura IV.13. Especificidad de los anticuerpos monoclonales producidos por el hibridoma 5G8, frente a la nisina A vehiculada en PBS (●) y en MRS (■) y frente a la nisina Z en PBS (○) y MRS (□), determinada por un ELISA-CD II. Cada punto corresponde al valor medio de los triplicados de cada determinación.**



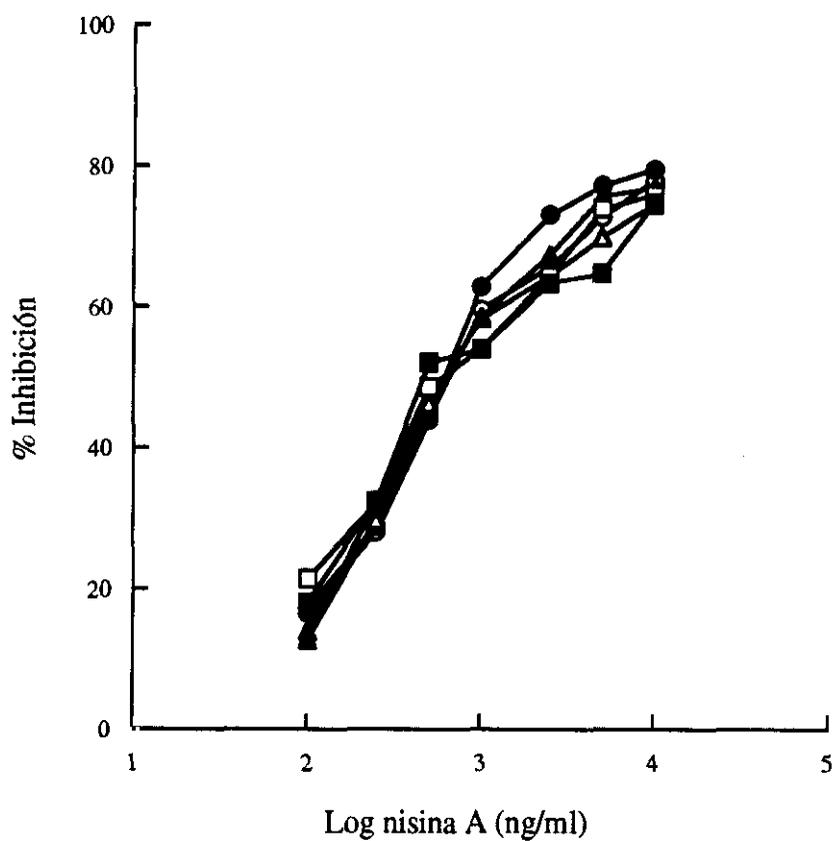
**Figura IV.14.** Detección de la nisina A en el caldo MRS, mediante un ELISA-CD con el suero policlonal (●), con los anticuerpos monoclonales del hibridoma 5G8 (Δ) y mediante el test de difusión en agar (ADT) (○). Los puntos representan el valor medio de los triplicados de cada determinación.

**Tabla IV.3. Inmunidad cruzada de los anticuerpos monoclonales del hibridoma 5G8, frente a los sobrenadantes de diversas cepas productoras de bacteriocinas, utilizando un formato de ELISA-CD**

Microorganismo <sup>a</sup>	Densidad optica a 405 <sup>b,c</sup>	Reactividad cruzada <sup>d</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> BB24 (nisina A)	0,505±0,04	100
<i>Lactococcus lactis</i> G18 (nisina A)	0,576±0,07	94,75
<i>Lactococcus lactis</i> CNRZ150 (nisina Z)	0,529±0,02	98,38
<i>Lactococcus lactis</i> MG1614 (no productor)	1,903±0,08	0
<i>Lactobacillus sake</i> 148 (lactocina S)	1,843±0,08	1,53
<i>Pediococcus acidilactici</i> 347 (pediocina PA-1)	1,710±0,02	11,33
<i>Pediococcus acidilactici</i> L50 (pediocina L50)	1,613±0,10	18,47

<sup>a</sup>Bacteriocina producida entre paréntesis. <sup>b</sup>D.O.<sub>405</sub> del control = 1,864. <sup>c</sup>Los resultados son el valor medio de las muestras analizadas por triplicado. <sup>d</sup>Reactividad cruzada definida como [(inhibición producida por el sobrenadante analizado / inhibición producida por el sobrenadante de *L.lactis* BB24) x 100].

Asimismo, todos los clones seleccionados derivados del hibridoma 2D10, reconocieron a la nisina A de manera similar al emplear sus anticuerpos purificados a la dilución 1/1.000 en un ELISA CD-II (figura IV.15.). Al evaluar la especificidad de los anticuerpos monoclonales de los 10 clones frente a la nisina Z, se observó que todos ellos reconocían a esta variante, pero en menor grado que a la nisina A, como se deduce de los resultados de la tabla IV.4. El límite de detección del ELISA-CD tipo II fue de 0,01 µg nisina/ml en los mejores clones y la concentración de nisina pura necesaria para producir un 50% de inhibición de la unión del conjugado con el anticuerpo, estuvo en el rango de 0,9 a 1,45 µg/ml (con una media de 1,18 µg/ml) para la nisina A y de 3 a 5,1 (con una media de 3,75) para la nisina Z.



**Figura IV.15. Especificidad frente a la nisina A de los anticuerpos monoclonales de los clones derivados del hibridoma 2D10, determinada por un ELISA-CD II. Clones AB2 (●), AD8 (○), AD10 (■), BF2 (□), BF6 (▲) y BF10 (△). Cada punto corresponde al valor medio de los triplicados de cada determinación.**

**Tabla IV.4. Especificidad de los anticuerpos monoclonales derivados del hibridoma 2D10 frente a la nisina A y a la nisina Z, mediante un formato de ELISA-CD**

Clon	% Inhibición					
	50 ng/ml		500 ng/ml		5000 ng/ml	
	nisina A	nisina Z	nisina A	nisina Z	nisina A	nisina Z
AB2	4,0	2,5	26,9	8,0	77,5	43,8
AD8	7,6	1,8	37,6	14,8	79,8	61,1
AD10	7,9	3,2	33,5	11,3	69,6	45,7
BF2	5,4	0,1	31,1	10,9	74,8	46,2
BF6	6,8	2,5	33,0	12,8	77,8	46,2
BF10	7,7	3,7	38,9	14,0	78,1	60,1

También se determinó la reactividad de una mezcla homogénea de los anticuerpos producidos por los diferentes clones seleccionados, frente a los sobrenadantes de distintas cepas productoras de bacteriocinas. Como se observa en los resultados de la tabla IV.5., los anticuerpos utilizados reconocieron tanto a las cepas productoras de nisina A como a las de nisina Z sin ninguna diferencia significativa y no mostraron una reacción cruzada con el sobrenadante de la cepa de *L. lactis* MG1614, no productora de nisina. La reactividad con los sobrenadantes de las otras cepas, fue de 7,7%, 3,7% y 3,1% para la lactocina S, pediocina PA-1 y pediocina L50, respectivamente.

**Tabla IV.5. Inmunidad cruzada de los anticuerpos monoclonales de los clones seleccionados frente a los sobrenadantes de diversas cepas productoras de bacteriocinas, utilizando un formato de ELISA-CD**

Microorganismo <sup>a</sup>	Densidad optica a 405 <sup>b,c</sup>	Reactividad cruzada <sup>d</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> BB24 (nisina A)	0,398	100
<i>Lactococcus lactis</i> G18 (nisina A)	0,471	89,7
<i>Lactococcus lactis</i> 5876 (nisina A)	0,451	92,5
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC11454 (nisina A)	0,545	79,0
<i>Lactococcus lactis</i> CNRZ150 (nisina Z)	0,480	88,4
<i>Lactococcus lactis</i> MG1614 (no productor)	1,105	0
<i>Lactobacillus sake</i> 148 (lactocina S)	1,040	7,8
<i>Pediococcus acidilactici</i> 347 (pediocina PA-1)	1,068	3,7
<i>Pediococcus acidilactici</i> L50 (pediocina L50)	1,072	3,2

<sup>a</sup>Bacteriocina producida entre paréntesis. <sup>b</sup>D.O<sub>405</sub> del control = 1,094. <sup>c</sup>Los resultados son el valor medio de las muestras analizadas por triplicado. <sup>d</sup>Reactividad cruzada definida como [(inhibición producida por el sobrenadante analizado / inhibición producida por el sobrenadante de *L.lactis* BB24) x 100].

#### IV.6. IDENTIFICACIÓN DE LOS DETERMINANTES ANTIGÉNICOS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS POLICLONALES Y MONOCLONALES OBTENIDOS

En la identificación de los epítomos reconocidos por los distintos anticuerpos policlonales y monoclonales obtenidos, se utilizó un ELISA-CD en el que las muestras a analizar compitieron con la nisina A conjugada a la peroxidasa por su unión al anticuerpo. Las muestras analizadas fueron los sobrenadantes de microorganismos modificados genéticamente, productores de variantes de la nisina (tabla III.2.), sus variantes genéticas purificadas y otros fragmentos obtenidos por degradación o rotura enzimática, así como el lantibiótico subtilina (tabla III.4.). Los sobrenadantes se analizaron con el anticuerpo monoclonal del hibridoma 5G8, mientras que las correspondientes variantes purificadas y el resto de los compuestos citados se analizaron con los anticuerpos monoclonales de los hibridomas 5G8 y AD10 y con los policlonales del líquido ascítico del ratón I.B. En el caso de los anticuerpos monoclonales se empleó un ELISA-CD tipo II, mientras que con los policlonales se utilizó un ELISA-CD tipo I. Las diluciones de anticuerpos empleadas fueron de 1/2.000 para el anticuerpo monoclonal purificado del hibridoma 5G8, de 1/1.000 para el clon AD10 y de 1/200 para los anticuerpos policlonales purificados del líquido ascítico.

Los resultados obtenidos con los sobrenadantes de los microorganismos modificados genéticamente y analizados con el anticuerpo monoclonal del hibridoma 5G8, se muestran en la tabla IV.6. De ellos, conviene considerar lo siguiente:

- (a). Como cabía esperar, las cepas MG1614 (control negativo), FI7487 y FI7990, no productoras de nisina, no son reconocidas por el anticuerpo.
- (b). La sustitución de la DHA del primer anillo (posición 5) por una Ala (cepa FI8070), origina una inhibición menor de la unión del conjugado de nisA-HRP al anticuerpo, mientras que la modificación de la DHA de la posición 33 (cepa FI8198), apenas afecta a dicha inhibición. La sustitución de ambas a la vez (cepa FI8199), origina una desaparición casi total de su reconocimiento por el anticuerpo.
- (c). La inducción de la cepa FI8438 con nisina, determina la producción de la prenisina (nisina madura unida al líder) que es reconocida por el anticuerpo monoclonal del hibridoma 5G8. La cepa FI8532 no es reconocida como productora de nisina A, aunque en este caso no se indujo con nisina para favorecer su producción.

**Tabla IV.6. Reactividad del anticuerpo monoclonal del hibridoma 5G8 frente a los sobrenadantes de cepas modificadas genéticamente productoras de variantes de la nisina A, utilizando un formato de ELISA-CD.**

Microorganismo <sup>a</sup>	Densidad Optica a 405 nm <sup>b,c</sup>	Reactividad cruzada <sup>d</sup>
<i>L. lactis</i> FI5876 (nisina A)	0,371±0,03	100
<i>L. lactis</i> MG1614 (np)	1,300±0,01	0
<i>L. lactis</i> FI7847 (np)	1,042±0,02	2,9
<i>L. lactis</i> FI7990 (np)	1,112±0,03	0
<i>L. lactis</i> FI8070 (DHA 5 A)	0,879±0,006	26,5
<i>L. lactis</i> FI8198 (DHA 33 A)	0,468±0,01	86,0
<i>L. lactis</i> FI8199 (DHA 5,33 A)	1,035±0,02	3,9
<i>L. lactis</i> FI8438 (np $\Delta$ nisP)	1,078±0,02	0
<i>L. lactis</i> FI8438 inducido <sup>e</sup> (prenisina)	0,379±0,01	98,9
<i>L. lactis</i> FI8532 (n.p. $\Delta$ nisP, $\Delta$ nisC)	1,083±0,005	0

<sup>a</sup>Variante producida entre paréntesis; np, no productor. <sup>b</sup>D.O.405 del blanco = 1,062±0,01. <sup>c</sup>Los resultados son el valor medio de las muestras analizadas por triplicado. <sup>d</sup>Reactividad cruzada definida como [(inhibición producida por el sobrenadante analizado / inhibición producida por el sobrenadante de *L. actis* FI5876) x 100]. <sup>e</sup>Es necesario inducir la secreción de la variante genética con 100 ng/ml de nisina.

Así mismo, los resultados obtenidos con las variantes genéticas purificadas, con otros fragmentos obtenidos por degradación o rotura enzimática y con el lantibiótico subtilina, analizados con los anticuerpos monoclonales del hibridoma 5G8 y del clon AD10 y por los anticuerpos policlonales del líquido ascítico del ratón I.B., se muestran en la tabla IV.7.

**Tabla IV.7. Reactividad de los anticuerpos policlonales y monoclonales generados frente a diversos fragmentos y variantes genéticas de nisina A purificados, determinada mediante un ELISA-CD.**

Fragmento o variante	Hibridoma 5G8		Clon AD10		Policlonal A5	
	Densidad óptica a	Reactividad	Densidad óptica a	Reactividad	Densidad óptica a	Reactividad
	405 nm <sup>a,b</sup>	cruzada <sup>c</sup>	405 nm <sup>d</sup>	cruzada <sup>c</sup>	405 nm <sup>e</sup>	cruzada <sup>c</sup>
Nisina 1-20	0,261±0,004	100	1,036±0,09	30,4	1,748±0,004	48,6
Nisina 1-31	0,39±0,006	100	0,498±0,03	95,3	1,419±0,03	71,6
Nisina 1-32	n.a.	n.a.	0,461±0,03	99,8	1,040±0,007	98,1
Nisina DHA 5 A	0,701±0,007	62,7	0,626±0,08	70,7	1,923±0,05	36,5
Nisina DHA 33 A	0,446±0,009	93,2	0,576±0,06	77,5	1,030±0,02	93,8
Nisina DHA 5,33 A	1,043±0,03	21,6	0,891±0,09	34,8	2,226±0,07	15,3
Nisina 1-12	0,294±0,02	80,8	1,148±0,08	16,9	2,032±0,04	29,0
Nisina K 12 L	0,372±0,001	71,7	0,573±0,08	77,9	1,049±0,03	97,2
Nisina H 27 K	0,304±0,005	79,4	0,698±0,02	60,9	1,202±0,04	87,0
Nisina 1-32 Des5Ala	0,839±0,04	4,9	0,502±0,04	94,9	2,226±0,02	15,3
Secuencia líder	0,863±0,03	1,5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Subtilina	0,187±0,009	95,7	1,063±0,06	27,1	2,166±0,02	19,6

<sup>a</sup> D.O.<sub>405</sub> del blanco = 1,223±0,02 para los seis primeros; 0,874±0,005 para los restantes. n.a. no analizado. <sup>b</sup> Los resultados son el valor medio de las muestras analizadas por triplicado. <sup>c</sup> Reactividad cruzada definida como [(inhibición producida por el compuesto analizado / inhibición producida por la misma concentración de nisina A) x 100]. <sup>d</sup> D.O.<sub>405</sub> del blanco= 1,288±0,08. <sup>e</sup> D.O.<sub>405</sub> del blanco= 2,446±0,06.

## Resultados

De los resultados de esta tabla para el anticuerpo monoclonal del hibridoma 5G8, conviene destacar lo siguiente:

- (a). El fragmento 1-12, que consta sólo de los anillos A y B, sigue siendo reconocido por el anticuerpo; el 1-20, que consta de los anillos A, B y C, también es reconocido. La ausencia de los anillos D y E en el fragmento 1-20, no afecta a la interacción antígeno-anticuerpo.
- (b). La variante purificada DHA 5 A, manifiesta un cierto descenso en su reconocimiento por el anticuerpo, aunque no tan marcado como el observado con el sobrenadante de su cepa productora; la variante DHA 33 A, apenas afecta al reconocimiento, mientras que la DHA 5,33 A, determina un descenso significativo de su reconocimiento por el anticuerpo, de manera análoga a lo que ocurría con los sobrenadantes de las cepas productoras.
- (c). Las modificaciones puntuales de las variantes K12L y H27K, afectan en cierto grado a su reconocimiento, mientras la destrucción del anillo A en la variante Des5Ala, originada por degradación molecular, determina una pérdida casi total de su reconocimiento por el anticuerpo monoclonal del hibridoma 5G8.
- (d). La subtilina, cuyos anillos A, B y C son prácticamente iguales a los de la nisina, excepto los residuos de las posiciones 4 (Glu en vez de Ile), 12 (Val en lugar de Lys) y 19 (Aba en vez de Ala), es reconocida por el anticuerpo monoclonal del hibridoma 5G8, casi como si fuera la nisina A.
- (e). La secuencia líder apenas muestra reactividad cruzada, de lo que se deduce que el reconocimiento observado en el sobrenadante de la cepa FI8438 inducida, se debe a la parte activa de la prebacteriocina.

Respecto de los resultados de la tabla IV.7., obtenidos con el anticuerpo monoclonal del clon AD10, conviene destacar que:

- (a). A diferencia de lo ocurrido con el anticuerpo monoclonal del hibridoma 5G8, el fragmento 1-12, que consta de los anillos A y B, apenas es reconocido por el anticuerpo monoclonal del clon AD10, mientras que el fragmento 1-20, que incluye además el anillo C, es reconocido un poco mejor. Los fragmentos 1-31 y 1-32, se reconocen de manera análoga a la molécula completa, lo que sugiere que los últimos

tres aminoácidos de la nisina A, no se incluyen en el epítipo que reconoce el anticuerpo monoclonal AD10.

- (b). Las variantes DHA5A y DHA33A, manifiestan un cierto descenso en su reconocimiento por el anticuerpo monoclonal AD10. La desaparición de los dos residuos de DHA en la variante DHA5,33A, determina una disminución considerable de su interacción con el anticuerpo.
- (c). Las modificaciones puntuales de las variantes K12L y H27K, afectan a su interacción con el anticuerpo, en mayor medida la del residuo 27 en donde la Lys sustituye a la His. Asimismo, a diferencia de lo que ocurre con el anticuerpo monoclonal 5G8, la rotura del anillo A en el producto de degradación Des5Ala, no modifica el reconocimiento antígeno-anticuerpo.
- (d). Por el contrario, la subtilina, cuyas principales diferencias con la molécula de nisina radican en la mitad posterior de la molécula, reacciona en mucha menor medida con el anticuerpo monoclonal del clon AD10.

Respecto a los resultados de la tabla IV.7. obtenidos con los anticuerpos policlonales del líquido ascítico del ratón I.B., se observa que:

- (a). Si bien los anticuerpos policlonales reconocen en cierta medida a todos los fragmentos, aquellos correspondientes a la primera mitad de la molécula (fragmentos 1-12 y 1-20), son reconocidos en menor grado.
- (b). La modificación del residuo de DHA en posición 5, afecta al reconocimiento de la molécula en mayor medida que la de la posición 33, mientras que la modificación en ambas posiciones (nisina DHA5,33A), disminuye mucho su reactividad.
- (c). La rotura del anillo A en el producto de degradación nisina 1-32 Des5Ala, también determina una disminución considerable de su reconocimiento por los anticuerpos policlonales utilizados, mientras que la subtilina muestra una pequeña reactividad cruzada respecto de la nisina A.



#### IV.7. APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS ANTINISINA A DESARROLLADOS

##### 7.1. Evaluación del crecimiento de *L. lactis* BB24 y seguimiento de la producción de nisina, empleando anticuerpos policlonales obtenidos de líquido ascítico

Para ello, un cultivo de *L. lactis* BB24 de un inóculo inicial de  $1 \times 10^5$  ufc/ml, se desarrolló en caldo MRS durante 72 horas a 32 ° C y cada dos horas se determinaron, por duplicado, las unidades formadoras de colonias (ufc) mediante su recuento en placa, su actividad antimicrobiana mediante un ensayo de difusión en agar y la cantidad de nisina producida mediante un ELISA-CD I, empleando los anticuerpos policlonales obtenidos del líquido ascítico del ratón I.B. a la dilución 1/100. Los resultados obtenidos, se muestran en la figura IV.16.

En la figura citada, observamos que con el ELISA-CD se comienza a detectar niveles significativos de nisina a partir de las 6 horas, mientras que con el test de difusión en agar, los halos de inhibición se observan a partir de las 8 horas. La máxima producción de bacteriocina se detectó en ambos tests entre las 14 y 16 horas, coincidiendo con el comienzo de la fase estacionaria. A partir de este momento, la concentración de nisina detectada decreció ligeramente.

##### 7.2. Detección y cuantificación de la nisina A en un queso de untar, empleando el anticuerpo monoclonal AD10

Para evaluar la capacidad del anticuerpo monoclonal del clon AD10 de detectar la nisina A en los alimentos, se añadieron concentraciones de 0, 250, 1.250 y 5.000 ng/g de nisina A pura a muestras de un queso de untar comercial y tras su extracción, se determinó su concentración mediante un ELISA-CD II.

La extracción de nisina de las muestras se repitió durante tres días y cada día se prepararon y extrajeron triplicados de cada concentración, con el objeto de calcular el coeficiente de variación inter- e intraensayo. La recuperación se estimó por un ELISA-CD, al extrapolar las absorbancias de las muestras en una curva patrón, obtenida añadiendo concentraciones de nisina A pura de 10 a 5.000 ng/ml a un extracto de queso libre de nisina, obtenido por el mismo procedimiento. Los puntos de la curva patrón se ajustaron a una curva de regresión mediante un programa informático de tratamiento de datos incorporado al lector de placas. Como se observa en la figura IV.17., no se

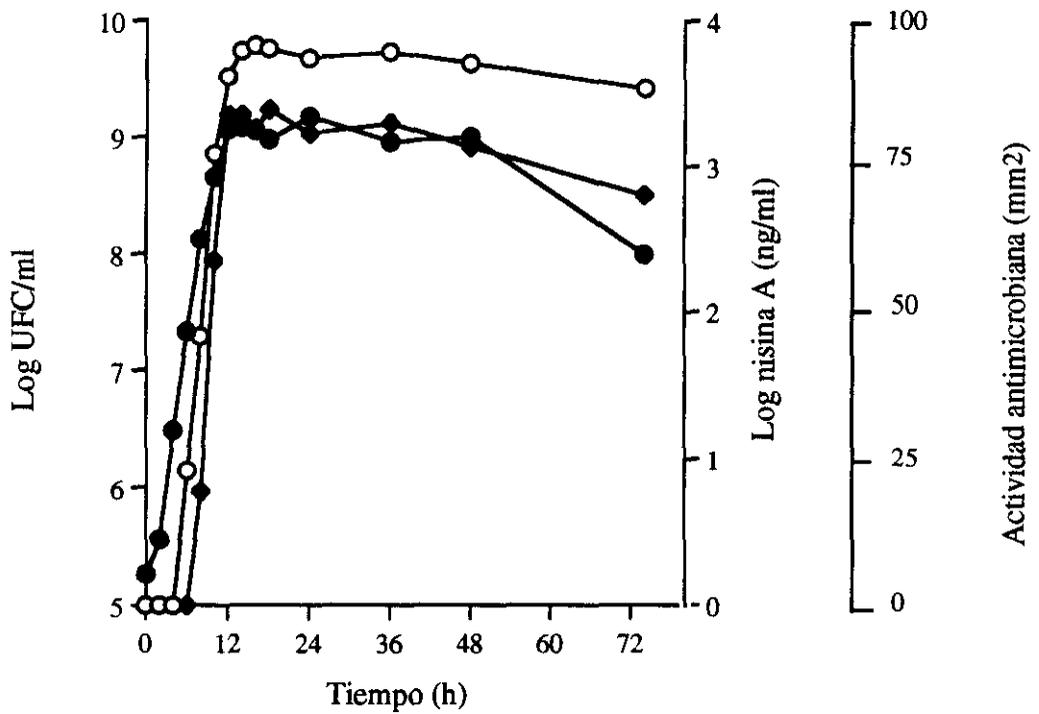
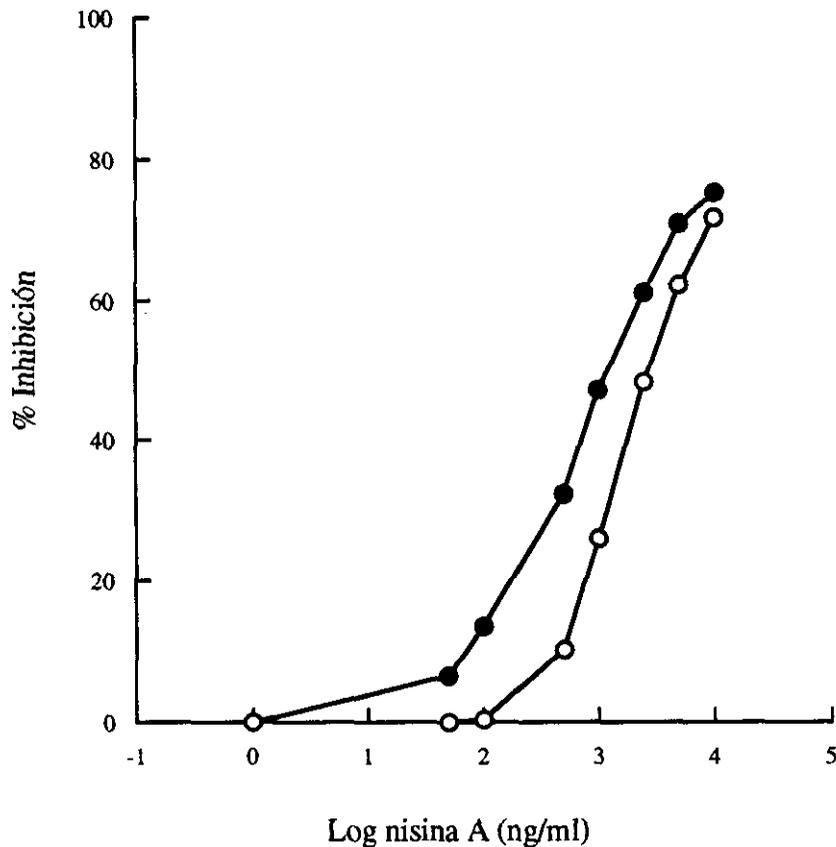


Figura IV.16. Curva de crecimiento de *Lactococcus lactis* BB24 en caldo MRS y producción de la nisina A, detectada por ADT (◆) y mediante un ELISA-CD (○), empleando los anticuerpos policlonales obtenidos del líquido ascítico del ratón I.B. Unidades formadoras de colonias (●).

observaron diferencias significativas al emplear como vehículo en la curva patrón el extracto libre de queso, obteniéndose una respuesta en el ELISA similar a la obtenida cuando la nisina se vehicula en el tampón PBS. Asimismo, los resultados de la extracción se muestran en la tabla IV.8., en la que se observa que los valores medios de recuperación de la nisina fueron de 130, 120 y 98%, respectivamente, para las concentraciones de 250, 1.250 y 5.000 ng nisina/g. La recuperación media fue del 116%, el coeficiente de variación intraensayo medio fue del 13,3% y el interensayo del 14,1%.



**Figura IV.17. Curvas estándar de la nisina A vehiculada en PBS (○) y en un extracto de queso (●), obtenidas mediante un ELISA-CD. Cada punto de la gráfica representa el valor medio de los triplicado de cada determinación. Los valores máximos de absorbancia fueron de 2,0 para la nisina en PBS y de 1,9 para la nisina en el extracto de queso.**

**Tabla IV.8. Recuperación de nisina A de muestras de queso de untar, determinada mediante un ELISA-CD**

Nisina añadida (ng/g)	muestra <sup>a</sup>	recuperación (ng/g) <sup>b</sup>	% recuperación	% medio de recuperación <sup>c</sup>	CV <sup>d</sup>	CV interensayo <sup>e</sup>
250	A	266±43	106		16,2	
250	B	341±39	137	130	11,5	13,5
250	C	370±113	148		30,4	
1250	A	1274±43	102		3,4	
1250	B	1697±36	136	120	2,2	11,6
1250	C	1528±178	122		11,6	
5000	A	4294±548	86		12,8	
5000	B	6096±1166	122	98	19,1	17,1
5000	C	4331±565	87		13,0	

<sup>a</sup>Cada concentración se preparó por triplicado en cada uno de los días (A-C) del ensayo. <sup>b</sup>Recuperación media de los triplicados de cada día. <sup>c</sup>Media del porcentaje de recuperación de los tres días para cada concentración. <sup>d</sup>Coefficiente de variación intraensayo. <sup>e</sup>Coefficiente de variación interensayo.

### **7.3. Purificación de la nisina por cromatografía de inmunoafinidad**

El anticuerpo monoclonal específico frente a la nisina A, obtenido de líquido ascítico y producido por el clon AD10, también se empleó en la construcción de una columna que permitiese la purificación de la nisina A en un sólo paso, por cromatografía de inmunoafinidad.

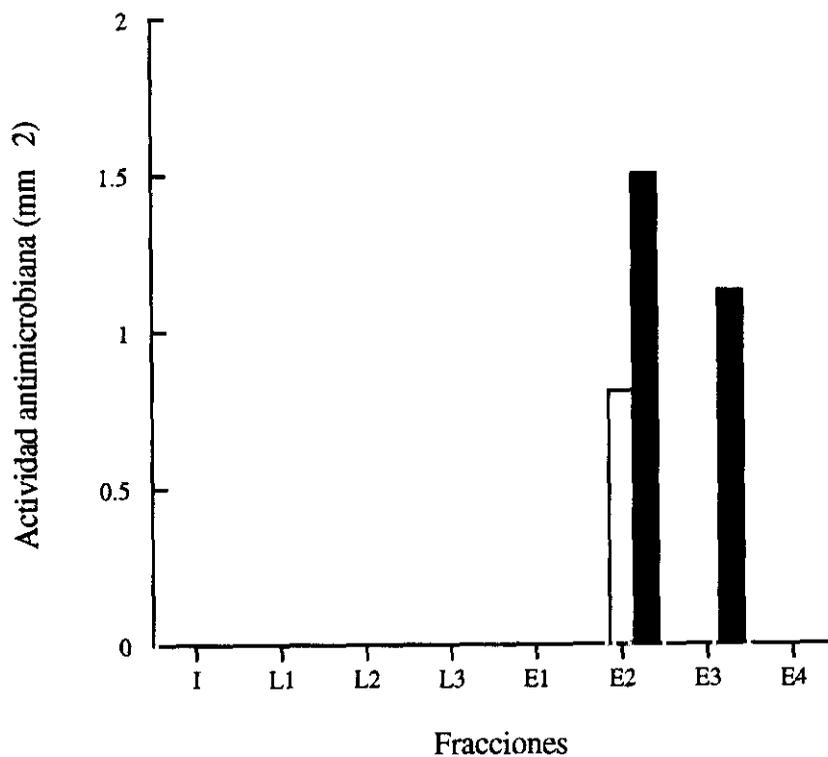
Una vez construída la columna de la manera descrita en la sección III.2.10.3.1., se determinó el grado de unión de los anticuerpos a la columna comparando la absorbancia a 280 nm de la solución del ligando antes y después de la reacción de conjugación, previa eliminación de la hidroxisuccinimida liberada durante la conjugación, que también absorbe luz a esta longitud de onda. De esta manera, se calculó que el 16,5% de los anticuerpos no se conjugaron, o, lo que es lo mismo, que el 83,5% de los anticuerpos utilizados quedaron unidos a la columna. Ya que la cantidad total de anticuerpos reaccionantes fue de 10 mg, fueron 8,3 mg los que se conjugaron a la matriz de la columna.

Inicialmente se comprobó el funcionamiento de la columna, inyectando concentraciones conocidas de nisina pura en el tampón PBS y determinando su capacidad de retención. Para ello, se pasaron muestras de 1 ml con 0, 1.000 y 10.000 ng de nisina pura y se analizó la actividad antimicrobiana de todas las fracciones procedentes de la purificación (inyección, lavado y elución) mediante un test de difusión en agar, empleando como microorganismo indicador a *Pediococcus acidilactici* 347. Como se observa en la figura IV.18., la actividad antimicrobiana se detectó solamente en las fracciones de elución, sin que hubiera pérdidas de nisina durante la inyección o el lavado de la columna.

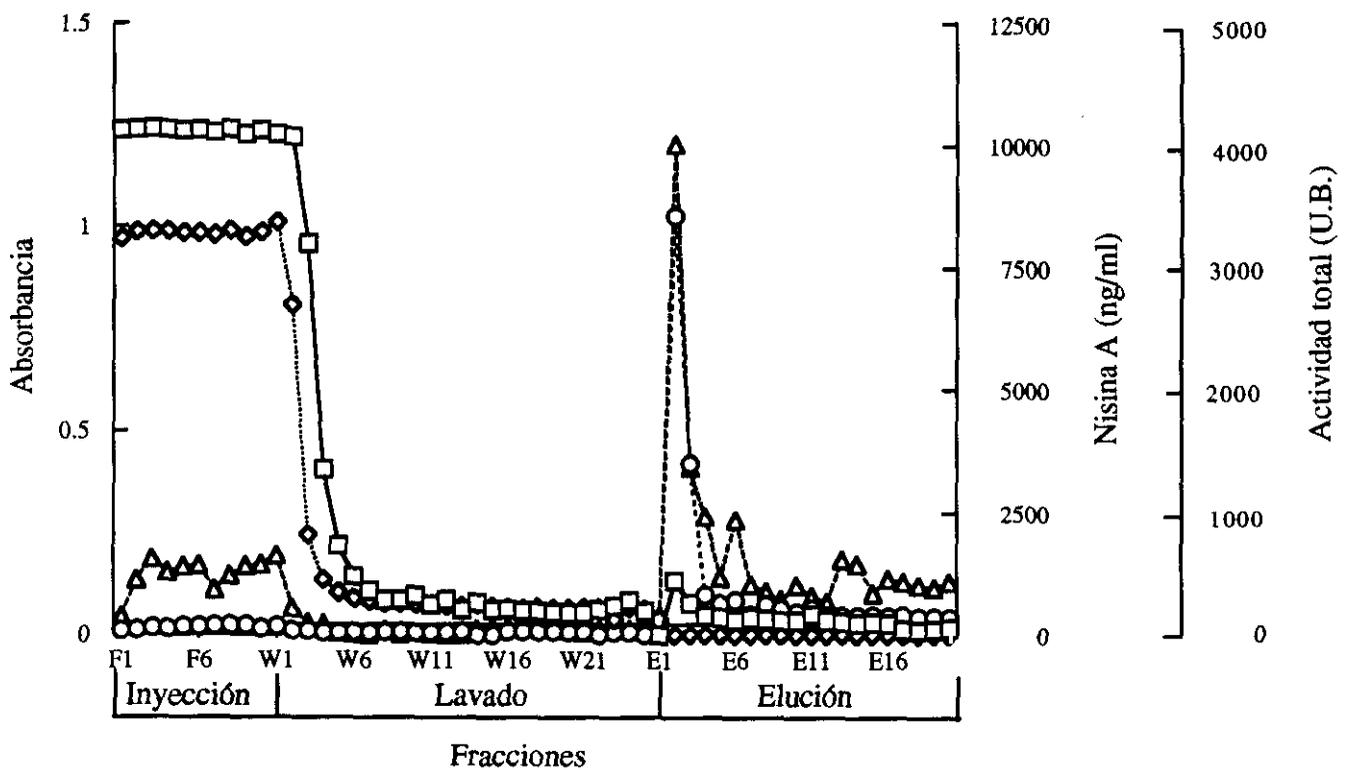
Una vez comprobado el funcionamiento de la columna, se procedió a determinar su capacidad de purificar la nisina A del sobrenadante del microorganismo productor *Lactococcus lactis* BB24. Para ello, 10 ml de sobrenadante del microorganismo productor, libre de células, filtrado y neutralizado, se inyectaron en la columna, recogiendo las fracciones resultantes de la inyección, lavado y elución para medir su absorbancia a 280, 254 y 220 nm, su actividad antimicrobiana mediante un ensayo en placas microtituladoras y para determinar la concentración de nisina mediante un ELISA CD II. El proceso de purificación se repitió varias veces y los resultados más significativos se muestran en la figura IV.19., en la que se observa, tanto en la actividad antimicrobiana, como en la cuantificación de nisina, que la mayor parte de la bacteriocina permanece retenida en la columna y se recupera en las primeras fracciones de la elución.

## Resultados

La máxima actividad antimicrobiana y concentración de nisina, coincidieron con un pico de elución de máxima absorbancia a 220 nm. No obstante, también se detectó una ligera pérdida de nisina en las fracciones correspondientes a la aplicación de la muestra y en las primeras fracciones del lavado.



**Figura IV.18. Actividad antimicrobiana de las fracciones resultantes de la cromatografía de inmunoafinidad al aplicar concentraciones de 1000 (□) y 10.000 (■) ng de nisina/ml. Tras la inyección (I), la columna se lavó con 3 ml de PBS (L1 a L3) y la nisina retenida se eluyó con 4 ml del tampón de elución (E1 a E4).**



**Figura IV.19. Purificación de la nisina A de un sobrenadante de *L. lactis* BB24, mediante cromatografía de inmunoadfinidad.** Absorbancia de las fracciones a 220 (□) y a 280 (◇). Actividad antimicrobiana (U.B.) (○) determinada por un ensayo en placas microtituladoras. Concentración de nisina A (△), determinada por un ELISA-CD en la que cada punto de la gráfica es el valor medio de los triplicados de cada determinación.

## Resultados

Con los resultados obtenidos de varias purificaciones, se construyó una tabla de purificación (tabla IV.9.), en la que el rendimiento de la purificación, respecto a la cantidad de nisina pura recuperada y determinada por un ELISA-CD, fue del  $85,3 \pm 12,6\%$ , con un incremento de la actividad específica de 10 veces, respecto de la de nisina del sobrenadante del microorganismo productor. La cantidad media de nisina purificada, determinada por un ELISA-CD fue de  $32.475 \pm 1.214$  ng por 10 ml de cultivo ( $3,24 \mu\text{g}$  por ml de cultivo purificado) o de  $32.547 \pm 1.887$  ng por 10 ml de cultivo, según el coeficiente de extinción molar.

La pureza de la nisina obtenida por cromatografía de inmunoafinidad, se determinó inyectándola en la misma columna de fase reversa integrada en un sistema de FPLC, empleada en el procedimiento de purificación de la nisina descrito en la sección III.2.3. Como controles internos, se inyectaron también en la columna el mismo volumen del tampón de elución (glicina-HCl) y una muestra con una cantidad equivalente de nisina pura estándar ( $34.000$  ng), en el mismo tampón. La elución se monitorizó registrando la absorbancia de todas las fracciones a  $254$  nm. De los resultados obtenidos, se observa que tanto la muestra purificada por cromatografía de inmunoafinidad, como el control de nisina, mostraron un pico máximo de absorbancia coincidente con un gradiente de isopropanol del  $36\%$  y con un pico único de actividad antimicrobiana (figura IV.20). Además, el pico de la muestra coincidió tanto en situación como en tamaño, con el pico de la nisina control. Los picos de absorbancia adicionales, resultaron proceder de la absorbancia inespecífica producida por el tampón de glicina-HCl empleado en la elución, no detectándose ningún otro pico de absorbancia adicional.

**Tabla IV.9. Purificación de la nisina del sobrenadante de *Lactococcus lactis* BB24 por cromatografía de inmunoafinidad<sup>a</sup>.**

Fracción	Volumen (ml)	A <sub>220</sub> Total <sup>b</sup>	Actividad total <sup>c</sup> (BU)	Actividad específica <sup>d</sup>	Incremento de la actividad específica <sup>e</sup>	Nisina total <sup>f</sup> (ng)	Rendimiento (%)
Muestra (sobrenadante)	10	12,52±0,12	12.228±1.487	975±109	1	39.152±7.212	100
Inyección	10	12,31±0,06	846±249	68,86±21	0,072±0,028	9.799±2.137	24,87±0,87
Lavado	25	7,67±2,18	740±185	97,52±4	0,10±0,008	4.769±580	12,88±3,85
Elución	20	0,69±0,04	6.913±1.209	9.974±1.212	10,21±0,095	32.475±1.214	85,28±12,58

<sup>a</sup> Los datos son la media de los resultados de dos purificaciones distintas.

<sup>b</sup> A<sub>220</sub> total es la absorbancia a 220nm multiplicada por el volumen en mililitros.

<sup>c</sup> La actividad antimicrobiana total (UB) es el recíproco de la dilución que inhibe en un 50% el crecimiento de *P. acidilactici* 347, multiplicado por el volumen en mililitros.

<sup>d</sup> La actividad antimicrobiana específica es la actividad antimicrobiana total (UB) dividida por la A<sub>220</sub> total.

<sup>e</sup> El incremento en la actividad específica es la actividad antimicrobiana específica de cada fracción dividida por la del sobrenadante.

<sup>f</sup> Determinada por ELISA-CD. Cada valor es la suma de los valores medios de las diferentes fracciones analizadas por triplicado en un ensayo.

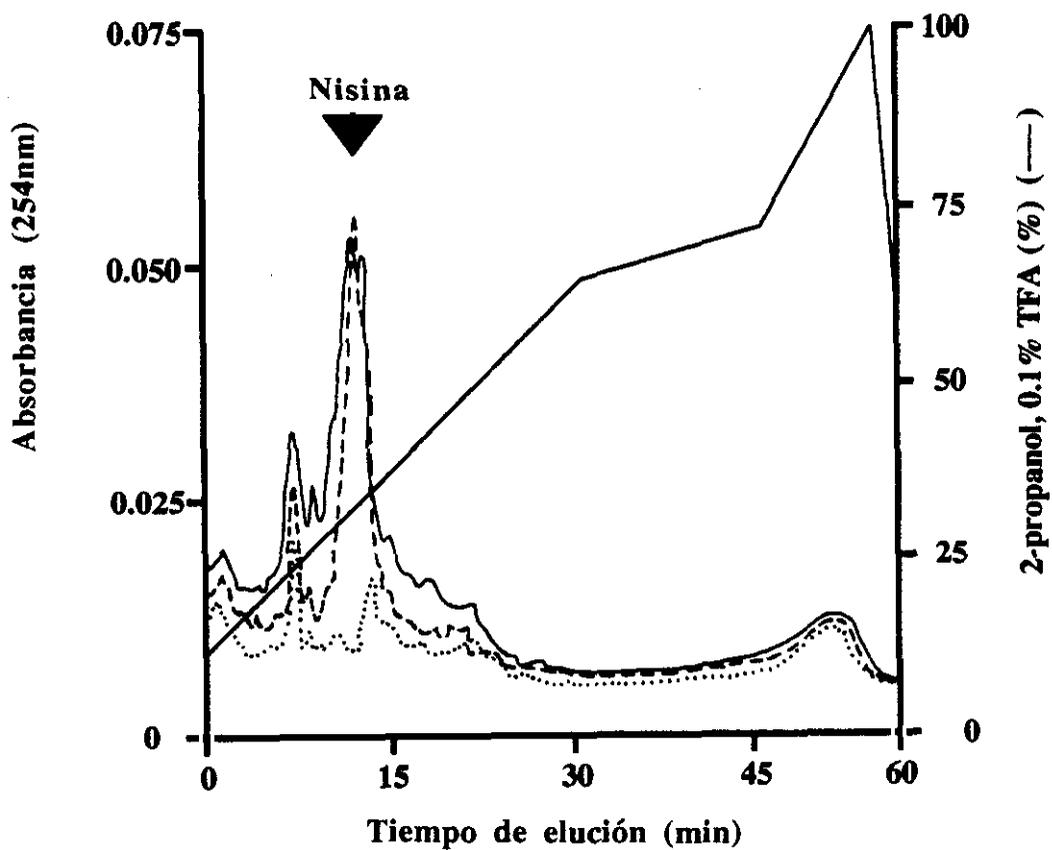


Figura IV.20. Determinación de la pureza de la nisina obtenida por cromatografía de inmunoafinidad tras su cromatografía en fase reversa en un equipo automatizado de FPLC. Muestra (—) y controles: tampón de elución (---) y nisina control (-·-).

## ***V. DISCUSSION***

---



## V.1. PURIFICACION DE LA NISINA A

La precipitación con sulfato amónico, seguida de la utilización sucesiva de diversas cromatografías, se ha empleado con éxito en la purificación a homogeneidad de muchas bacteriocinas (Muriana y Luchansky, 1994; Cintas *et al.*, 1995). Esta metodología se ha utilizado también en nuestro laboratorio en la purificación de la nisina A de la cepa de *L. lactis* BB24 de origen cárnico (Rodríguez *et al.*, 1995). En este trabajo, la nisina A se purificó a homogeneidad para utilizarla como el inmunógeno en la inmunización de los animales y en la preparación de los conjugados para los inmunoensayos. Sin embargo, aunque su purificación de los sobrenadantes de la cepa productora permitió la obtención de una nisina con un alto grado de pureza y una recuperación considerable de su actividad antimicrobiana inicial (figura IV.1.), tras realizar nueve purificaciones, la cantidad total de nisina obtenida (1,039 mg) fue claramente insuficiente para cubrir nuestras necesidades, por lo que, finalmente, empleamos una muestra comercial de nisina pura con un grado de pureza superior al 90%.

## V.2. PREPARACION DE LOS CONJUGADOS PARA LAS INMUNIZACIONES Y LOS ENSAYOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA)

La inmunogenicidad se define como la capacidad de una molécula de inducir una respuesta inmune, lo que depende de su estructura química y de su capacidad de ser reconocida por el organismo como una sustancia extraña. El tamaño molecular mínimo de un inmunógeno oscila entre 3.000 y 5.000 D, las sustancias que poseen un tamaño inferior se denominan haptenos, es decir, sustancias capaces de unirse a un anticuerpo pero incapaces, por sí mismas, de desencadenar una respuesta inmune. Para facilitar su inmunogenicidad, los haptenos se conjugan a otras sustancias denominadas moléculas portadoras o vehiculadoras, con propiedades inmunógenas. Fue Landsteiner (1945), quien demostró la posibilidad de producir anticuerpos frente a moléculas de pequeño tamaño molecular al unirlos covalentemente a una proteína inmunógena.

El tamaño molecular de la nisina A (3.353 D) determinó que la considerásemos como un hapteno, es decir, una molécula que, poseyendo determinantes antigénicos, por sí sola no es capaz de desencadenar una respuesta inmune. Hasta la realización de este trabajo, los estudios sobre la inmunogenicidad y el desarrollo de anticuerpos frente a las bacteriocinas eran escasos. Falahee *et al.*, (1990) obtuvieron anticuerpos policlonales de oveja frente a la nisina A, mediante la conjugación de la nisina pura a la ovoalbúmina

(OA) por el método del glutaraldehído. También se han obtenido anticuerpos policlonales en conejos empleando como inmunógeno la nisina libre, sin conjugar (Stringer *et al.*, 1995), aunque los anticuerpos obtenidos, empleados como reactivos en un producto cárnico fermentado, no detectaron la nisina libre y sólo reaccionaron con las cepas de *L. lactis* productoras de dicha bacteriocina.

Bhunja y colaboradores (1990), evaluaron las propiedades inmunógenas de la pediocina AcH (PA-1) en ratones inoculados con la bacteriocina sin conjugar más un adyuvante oleoso y con la bacteriocina conjugada a la seroalbúmina bovina (BSA) y con el mismo adyuvante. También se determinó su inmunogenicidad en conejos inoculados con la bacteriocina sin conjugar más el Adyuvante Completo e Incompleto de Freund. En ninguno de los casos se obtuvieron anticuerpos séricos específicos frente a dicha bacteriocina. No obstante, un poco más tarde, el mismo investigador obtuvo anticuerpos policlonales y monoclonales frente a la pediocina RS2 que también reaccionaron frente a la pediocina PA-1 (Bhunja, 1994). Para ello una muestra parcialmente purificada de la bacteriocina se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida y, posteriormente, el fragmento de gel con la pediocina purificada se utilizó como inmunógeno; las propiedades adyuvantes del gel de poliacrilamida se describieron por primera vez por Weintraub y Raymond (1963). Un homogeneizado del fragmento del gel con la pediocina purificada se empleó como inmunógeno en la inoculación de los ratones, junto con el Adyuvante de Freund y el compuesto poli(A) poli(U) como adyuvantes, siendo necesarias 12 semanas para alcanzar una respuesta sérica adecuada. También se intentó la obtención de anticuerpos frente a esta bacteriocina, empleando como portadores células inactivadas por el calor de *Lactobacillus plantarum*, a cuya superficie se adherían las moléculas de bacteriocina, pero esta aproximación no resultó exitosa.

En nuestro trabajo, la nisina A se conjugó a dos moléculas portadoras diferentes, para evaluar la eficacia de cada uno de los conjugados en la inducción de la producción de anticuerpos específicos. Estos compuestos fueron la toxina colérica (TC) y la hemocianina del molusco *Megathura crenulata*, denominada KLH (del inglés, *keyhole limpet haemocyanin*).

La toxina colérica, una proteína enterotoxigénica producida por *Vibrio cholerae*, ha demostrado poseer propiedades adyuvantes administrada oral o sistémicamente con otros antígenos (Liang *et al.*, 1989; Lycke y Holmgren, 1986, 1987). Además, su tamaño molecular (unos 85 kDa) permite su empleo como molécula portadora, lo que se facilita por la presencia en la molécula de un número equivalente de lisinas disponibles para la conjugación, parecido al de otras moléculas portadoras como la seroalbúmina bovina

(BSA). De este modo, se ha empleado con éxito anteriormente en la obtención de anticuerpos policlonales frente a diversos haptenos (Silbart *et al.*, 1989; Azcona-Olivera *et al.*, 1992; Abouzied *et al.*, 1993; Chu *et al.*, 1995). Aunque el mecanismo por el que ejerce su actividad adyuvante no se conoce con precisión, se sabe que estimula la presentación del antígeno y la producción de interleukina 1 (Bromander *et al.*, 1991). Además de sus propiedades adyuvantes, la rapidez del proceso de inmunización y la inducción de una respuesta rápida y eficaz con dosis pequeñas de inmunógeno y de la toxina colérica (Azcona-Olivera *et al.*, 1992; Abouzied *et al.*, 1993) aconsejaron que dicha molécula se seleccionara como molécula portadora de la nisina A, puesto que la cantidad de antígeno disponible era limitada.

La hemocianina KLH del molusco *Megathura crenulata*, es uno de los compuestos más empleados como molécula portadora. Esta molécula se caracteriza por inducir una fuerte respuesta inmune, debido a ser una molécula extraña para el organismo animal y poseer un elevado tamaño molecular ( $4,5 \times 10^5$ - $1,3 \times 10^7$  D), además de poseer un gran número de lisinas disponibles para su conjugación por sus grupos amino. Su gran tamaño, sin embargo, limita su solubilidad y posee determinantes antigénicos que pueden enmascarar a los del hapteno.

La albúmina sérica bovina (BSA) es una proteína de menor tamaño, moderadamente inmunógena, con una buena solubilidad, varias lisina disponibles y barata, que se ha empleado también en muchas ocasiones como molécula portadora. Sin embargo, cuando se empleó como molécula portadora en la obtención de anticuerpos frente a la pediocina AcH (o PA-1), no se consiguió la obtención de anticuerpos séricos específicos (Bhunja *et al.*, 1990). En otras experiencias con otros haptenos, los resultados con esta molécula portadora han sido también negativos (Azcona-Olivera *et al.*, 1992; Abouzied *et al.*, 1993).

La nisina A también se conjugó a la ovoalbúmina (OA) y a la peroxidasa de rábano (HRP) como reactivos necesarios en los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA); así, el conjugado nisA-OA se utilizó para tapizar las placas en el ELISA indirecto y en el ELISA competitivo indirecto y el conjugado nisA-HRP se utilizó como reactivo en el ELISA competitivo directo. La ovoalbúmina constituye el 75% de la proteína de la clara del huevo, contiene 20 lisinas y se emplea con frecuencia en la conjugación de los haptenos para favorecer su adhesión a las placas de poliestireno empleadas en los ensayos inmunoenzimáticos, puesto que los péptidos por sí mismos no se adhieren bien a la superficie de los pocillos de las placas microtituladoras. La nisina A también se conjugó a la peroxidasa de rábano por el método del periodato (Nakane y Kawoi, 1974) para

utilizarla en el desarrollo de un inmunoensayo del tipo competitivo directo.

La preparación de conjugados apropiados es vital en la obtención de anticuerpos con la especificidad y afinidad deseadas y en el desarrollo de los métodos inmunoenzimáticos (ELISA) apropiados. La reacción de conjugación no debe modificar la inmunogenicidad del hapteno, es decir, su o sus determinantes antigénicos no deben estar implicados en la reacción con la molécula portadora. Además, con el fin de obtener unos anticuerpos específicos y afines, tampoco deben implicarse en la conjugación los grupos responsables de la diferenciación de esta molécula con moléculas relacionadas. Por otro lado, en el caso de los inmunoensayos competitivos, para evitar que los anticuerpos resultantes reaccionen con el puente de unión y con el fin de asegurar una competición eficiente y ecuánime entre el hapteno libre y el conjugado a la peroxidasa de rábano, el método de conjugación del hapteno con la HRP debe ser distinto al empleado para su conjugación a las moléculas portadoras utilizadas en la inmunización de los animales.

Los grupos reactivos que participan en las reacciones de conjugación son los radicales ionizables de algunos aminoácidos. En solución acuosa, las proteínas poseen los radicales hidrófobos de los aminoácidos (radicales alquilo) hacia el interior de la molécula y, por lo tanto, estos grupos no suelen ser reaccionantes. Por el contrario, son los radicales hidrófilos del exterior de la proteína y, por lo tanto, expuestos al medio acuoso, los disponibles para participar en las reacciones de conjugación. Los grupos hidrofílicos de las proteínas químicamente activos son esencialmente ocho: (1) el grupo amino del extremo N-terminal de la molécula y los grupos  $\epsilon$ -amino de las lisinas, (2) el grupo sulfidrilo de las cisteínas, (3) el radical tioéter de las metioninas, (4) el grupo carboxilo del extremo C-terminal de la proteína y el grupo  $\beta$  y  $\gamma$ -carboxilo de los ácidos aspártico y glutámico, respectivamente, (5) el radical fenol de la tirosina, (6) el grupo imidazol de la histidina, (7) el grupo guanidilo de la arginina y (8) el grupo indol del triptófano.

De los radicales citados, los cinco primeros son los más reactivos y, de entre ellos, los grupos  $\epsilon$ -amino de las lisinas son los más abundantes y accesibles. Son, además, buenos radicales nucleofílicos y reaccionan fácilmente con una gran variedad de radicales para formar uniones estables. Los grupos  $\alpha$ -amino del extremo N-terminal de las proteínas son también bastante reactivos. Dado que ambos radicales amino se encuentran en la mayoría de las moléculas peptídicas y debido a su facilidad para reaccionar, los métodos de conjugación más empleados se basan en la utilización de estos grupos.

Para permitir la reacción entre los grupos amino del hapteno y de la molécula portadora, se utilizó como molécula ligante el glutaraldehído, empleándolo en la reacción

de conjugación según el método descrito por Avraemas y Ternynck (1969). El glutaraldehído reacciona bifuncionalmente con los grupos amino de las dos moléculas, originando a una unión covalente muy estable. No obstante, dicho método tiene como inconvenientes que el puente de unión formado puede actuar como epítipo y que pueden originarse uniones de los haptenos entre sí y de las moléculas portadoras entre sí, así como del hapteno con la molécula portadora a través de varios grupos amino (acoplamiento), lo que puede impedir una correcta exposición del hapteno y dificultar que se generen anticuerpos frente a él. Para evitarlo, la reacción de conjugación se restringe añadiendo una cantidad limitante de glutaraldehído. La reacción de conjugación se realiza a 4 °C puesto que la conjugación es más rápida a temperaturas bajas, en un medio tamponado y añadiendo el agente ligante gota a gota lentamente, para incrementar la selectividad de la reacción y disminuir la hidrólisis del glutaraldehído. Una vez terminada la reacción de conjugación, se realiza una purificación parcial del conjugado, eliminando las moléculas de pequeño tamaño que no hubieran reaccionado, mediante su diálisis frente a un tampón de PBS.

En la conjugación de la nisina A con la peroxidasa de rábano, la reacción se realizó siguiendo el método del periodato (Nakane y Kawoi, 1974). Para ello, la peroxidasa se activó inicialmente con el periodato sódico, que oxida los carbohidratos de la molécula dando lugar a grupos aldehído, los cuales reaccionan con los grupos amino del hapteno para dar lugar a la formación de bases de Schiff. Posteriormente, el conjugado resultante se estabilizó tras su reducción con borohidruro sódico.

En la inmunización con el conjugado de la nisina A con la KLH, se empleó, para potenciar la respuesta inmune, el Adyuvante Completo e Incompleto de Freund. Dichos compuestos favorecen el desarrollo de la reacción inflamatoria, producen un incremento de la respuesta inmune y retardan el catabolismo del antígeno. La proporción adyuvante:antígeno fue de 2:1, puesto que una emulsión de agua en aceite es más eficaz que una de aceite en agua.

### V.3. PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A LA NISINA A EN EL SUERO DE LOS RATONES INMUNIZADOS Y DESARROLLO DE LOS MÉTODOS INMUNOENZIMATICOS (ELISA) ADECUADOS

Puesto que inicialmente se deseaba evaluar la posible inmunogenicidad de los diversos conjugados sintetizados y se disponía de una cantidad limitada de antígeno, se seleccionaron los ratones como los animales de experimentación en la obtención de los correspondientes anticuerpos policlonales, al ser animales de fácil manejo y bajo coste económico.

Los ratones se inmunizaron con dos conjugados distintos: con el conjugado de nisA-TC se inmunizó un grupo de 4 ratones por vía i.p., mientras que con el conjugado de nisA-KLH se inmunizaron 4 ratones por vía i.p. y otros cuatro por vía s.c. Aunque en todos los casos, los animales mostraron un incremento de la respuesta inmune a lo largo de las inmunizaciones, se observaron diferencias en el grado de inmunización alcanzado, así como en la especificidad y en la afinidad de los anticuerpos resultantes. De los resultados obtenidos y expuestos en el capítulo de *Resultados* de esta memoria, se deduce que mientras que los animales inmunizados con el primer conjugado alcanzaron títulos de hasta 6.400, necesitando una dilución del suero de 1/100 para detectar los anticuerpos específicos mediante un ELISA competitivo (directo e indirecto), los inmunizados con nisA-KLH alcanzaron títulos de hasta 25.600 y los sueros se diluyeron a 1/1.000 y 1/2.500 en los ensayos competitivos directos. Estos datos indican que la respuesta inmune fue más fuerte y eficaz con este segundo conjugado. Por otro lado, en la inmunización de los animales con nisA-TC (figura IV.2.) la afinidad relativa y la sensibilidad de los anticuerpos fue baja, siendo necesarios más de 40 µg de nisina/ml para producir un 50% de inhibición tanto en un ELISA-CI como en un ELISA-CD, mientras que en la inmunización con la nisA-KLH en un ELISA-CD (figuras IV.3. y IV.4.), fueron necesarias entre 0,5 y 5 µg de nisina/ml para producir un 50% de inhibición.

Las diferencias observadas en el grado de inmunización de los animales y en la afinidad y la sensibilidad de los anticuerpos obtenidos, utilizando ambos conjugados, podrían deberse, en primer lugar a que la dosis de inmunógeno con el conjugado de nisA-TC (10 µg de conjugado por animal y dosis) fue menor que con el conjugado de nisA-KLH (25 µg por animal y dosis), al poder inmunógeno de la propia proteína portadora o al mecanismo de la repuesta inmune y de la presentación del inmunógeno, desarrolladas para cada uno de los conjugados. Resultados similares se han observado en experiencias con otros haptenos; así Usleberg *et al.* (1994), describieron un incremento en la

sensibilidad de dos órdenes de magnitud en la obtención de anticuerpos policlonales frente a la fumonisina B1, empleando un conjugado con KLH en comparación con los anticuerpos previamente obtenidos con un conjugado de la micotoxina con la toxina colérica (Azcona-Olivera *et al.*, 1992).

En los animales inmunizados con nisA-KLH (figuras IV.3. y IV.4.), la respuesta inmune fue similar tanto en la inmunización s.c. como en la i.p., si bien el segundo grupo de ratones desarrolló títulos séricos ligeramente más altos, empleándose la dilución 1/2.500 en los inmunoensayos competitivos, mientras que los primeros se emplearon a una dilución 1/1.000. En la primera y segunda sangrías, los anticuerpos obtenidos vía i.p. fueron más sensibles que los obtenidos vía s.c., sin embargo en la tercera sangría, (a los 91 días del inicio de la inmunización) la sensibilidad de los segundos aumentó considerablemente, superando la de los primeros. Este efecto se debe, probablemente, a que la inmunización subcutánea ocasiona un efecto más lento pero más prolongado en el tiempo.

El desarrollo de un inmunoensayo de un formato apropiado que permita la detección e identificación de los anticuerpos específicos frente a la nisina A, también ha constituido un punto crítico en el desarrollo de este trabajo. El método del ELISA competitivo fue desarrollado inicialmente por Yalow y colaboradores (Berson *et al.*, 1956; Yalow y Berson, 1959, 1960) y se emplea en la detección y cuantificación de moléculas de pequeño tamaño, que no pueden detectarse mediante un ensayo de tipo sandwich, dado que éste es sólo posible para antígenos lo suficientemente grandes para unirse a la vez con dos moléculas de anticuerpos sin que existan problemas de interferencia estérica. Además, los ensayos competitivos requieren una concentración de anticuerpos muy inferior. La concentración de antígeno de la muestra se cuantifica mediante una competición entre el antígeno marcado o adsorbido a los pocillos de la placa y el antígeno libre no marcado. Finalmente, la cantidad de antígeno o anticuerpo marcado unido a la fase sólida, se cuantifica de manera que la señal resultante es inversamente proporcional a la concentración de antígeno de la muestra problema.

Mientras que en el caso del conjugado nisA-TC, los anticuerpos específicos frente a la nisina A se detectaron tanto en un formato de ELISA-CI como en un ELISA-CD sin diferencias significativas en la sensibilidad de los inmunoensayos, en el caso de la inmunización con nisA-KLH los anticuerpos específicos frente a la nisina solamente se detectaron con un ELISA-CD. En el ELISA-CI desarrollado con estos anticuerpos (resultados no mostrados), no se observó un descenso de la absorbancia al incrementar la concentración del antígeno, es decir, el antígeno libre no disminuyó la interacción de los

anticuerpos con el antígeno conjugado. Los resultados tampoco mejoraron analizando diversas diluciones de los anticuerpos, desde la 1/100 hasta la 1/10.000, ni al ensayar una mayor dilución del conjugado anti-inmunoglobulina de ratón marcado. En este caso, la no de detección de los anticuerpos específicos por un ELISA-CI podría deberse a (1) el suero procedente de la inmunización de los animales con nisA-KLH podría poseer anticuerpos de elevada afinidad que reconocerían el puente de unión de la nisina con la molécula portadora, formado por el glutaraldehído, e interferir de este modo en la competición entre la nisina libre y el conjugado nisA-OA por la unión al anticuerpo y (2), la concentración de antígeno empleada para tapizar la placa no fue la adecuada: en este tipo de ensayos, el anticuerpo tiene mayor tendencia a unirse al antígeno adsorbido a la placa, puesto que éste se encuentra en altas concentraciones locales, lo que incrementa la avidéz del anticuerpo y favorece la formación de uniones bivalentes, mientras que esta interacción bivalente se desarrolla más difícilmente con el antígeno en solución; por ello, quizás una menor concentración de nisiA-OA en las placas podría haber favorecido la acción inhibitoria de la nisina libre.

De los resultados obtenidos se deduce que es conveniente una selección correcta de la proteína portadora, del procedimiento de cojugación y del formato de inmunoensayo ante cada situación experimental y según las peculiaridades de cada bacteriocina.

Con los anticuerpos procedentes de la inmunización de los ratones con nisA-KLH, el método del ELISA-CD se reveló como el más eficaz y sensible de detección de la nisina A. La sensibilidad de este inmunoensayo depende de: (1) la concentración de anticuerpos inmovilizados en la fase sólida, (2) de la avidéz de dichos anticuerpos hacia el antígeno y (3) de la actividad específica del antígeno conjugado a un enzima (Harlow y Lane, 1988). La optimización de este ensayo requiere la selección de la concentración apropiada del anticuerpo y del antígeno conjugado, realizando diversas diluciones de ambos y comprobando la reactividad de las diversas combinaciones en ausencia del antígeno libre, así como con concentraciones del antígeno correspondientes a los valores de la curva patrón. Las concentraciones elegidas deben ser aquellas que originan los cambios mayores y más reproducibles en la respuesta o señal, al incrementar la concentración del antígeno. Los tiempos de incubación y la temperatura del ensayo también deben optimizarse. En nuestro caso, los mejores resultados se obtuvieron empleando una dilución de anticuerpos de 1/1.000 para los procedentes de la inmunización s.c. y una de 1/2.500 para los resultantes de la inmunización i.p., junto con una dilución 1/500 del conjugado nisA-HRP. El rango de concentraciones para el que se obtiene una precisión aceptable es más limitado en este tipo de inmunoensayos que en los de tipo sandwich. Sin embargo, el rango aceptable de precisión y, por lo tanto, los límites en la sensibilidad del

inmunoensayo, pueden modificarse empleando mayores o menores concentraciones del antígeno o modificando las concentraciones de anticuerpo y antígeno conjugado empleadas.

Falahee *et al.* (1990) también obtuvieron anticuerpos policlonales frente a la nisina A, inmunizando una oveja con un conjugado de la nisina A a la ovoalbúmina. A pesar de tratarse de un hapteno, el formato de inmunoensayo desarrollado con estos anticuerpos fue un ELISA tipo sandwich, en el que el límite de detección fue de 0,019 U.I./ml, nivel de detección ligeramente superior al límite detectado con el ELISA-CD desarrollado en este trabajo (de 5 a 10 ng/ml o de 0,15 a 0,30 U.I.). No obstante, además del formato del inmunoensayo empleado, existen otras diferencias entre el método desarrollado por Falahee y el descrito en este trabajo. En primer lugar, para obtener sus anticuerpos, Falahee empleó un proceso largo de inmunización (9 meses), en contraste con el aquí descrito, que permite la obtención de anticuerpos específicos en menos de 8 semanas. En segundo lugar, en el primer método fue necesario recuperar de los inmunoseros los anticuerpos específicos frente a la nisina A, mediante una columna cromatográfica de afinidad, con la matriz conjugada a la nisina A, mientras que en nuestro caso este paso no es necesario, puesto que el inmunoensayo desarrollado permite la selección de los anticuerpos específicos, detectando aquellos que compiten por la unión al hapteno. Por último, el consumo de nisina A pura fue muy inferior en nuestro trabajo, puesto que no fue necesario construir la columna de afinidad y porque los requerimientos para inmunizar a los ratones (de 10 a 25  $\mu$ g por ratón y dosis), son inferiores a los requeridos para grandes animales (de 0,5 a 1 mg por dosis). El consumo de anticuerpos también es inferior en el ELISA-CD en comparación con el ELISA tipo sandwich. Estas diferencias indican que el método descrito en este trabajo, probablemente sea más factible y económico que el empleado por Falahee en la obtención de anticuerpos policlonales y en el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) frente a otras bacteriocinas.

Mientras que las curvas resultantes de la detección la nisina A en el preparado comercial de Nisaplin® y en PBS fueron similares, la curva obtenida en MRS mostró un desplazamiento hacia la derecha, lo que indica que para las mismas concentraciones de nisina, el grado de inhibición fue mayor y, por tanto, mayor la sensibilidad del inmunoensayo (figuras IV.5. y IV.6.). Teniendo en cuenta que la solubilidad de la nisina depende en gran medida del pH, siendo máxima a pH ácido y disminuyendo a medida que el pH aumenta, la diferencia entre las curvas patrón de la nisina A vehiculada en PBS y MRS podría deberse a un efecto del pH, puesto que el menor pH del MRS (6,2) favorecería la solubilidad de la nisina frente al del PBS (pH 7,4). El pH podría incluso determinar una mejor interacción entre el antígeno y los anticuerpos, afectando también a

la sensibilidad del inmunoensayo. Por otra parte, la presencia de Tween 80 en el medio MRS también puede influir, puesto que esta sustancia surfactante reduce la adhesión de las bacteriocinas a los materiales plásticos, favoreciendo su disponibilidad para competir en el ELISA-CD (Huot *et al.*, 1996).

Los anticuerpos policlonales obtenidos de la inmunización s.c. de los ratones con el conjugado nisA-KLH, no solamente detectaron la nisina presente en distintos vehículos y en el Nisaplin® sino también la de los sobrenadantes de las cepas productoras, sin apenas interferencia de otros componentes del medio, como lo demuestra el hecho de que no exista reactividad cruzada con el sobrenadante de la cepa de *L. lactis* MG 1614 no productora de nisina (tabla IV.1.). Los anticuerpos obtenidos, por lo tanto, son también útiles en la identificación rápida y sensible de cepas de *L. lactis* productoras de nisina, aunque no diferencian entre las dos variante de nisina, la A y la Z, lo que podía esperarse puesto que ambas variantes difieren sólo en un aminoácido de su secuencia (el de la posición 27). No obstante, también se observó una pequeña reactividad cruzada con algunos sobrenadantes de cepas productoras de otras bacteriocinas (*L. sake* y *P. acidilactici*), pero el grado de inhibición en caso de la presencia de nisina en los sobrenadantes es considerablemente superior.

El método ELISA-CD de detección de la nisina, resultó ser ligeramente más sensible que el método tradicional de detección de dicha bacteriocina por la prueba de difusión en agar, permitiendo la detección de la nisina desde concentraciones de 5 ng/ml (figura IV.7.). No obstante, lo más destacable es la especificidad considerablemente superior del ensayo inmunoenzimático frente al microbiológico, en el que los halos de inhibición resultantes pueden deberse a la presencia en las muestras de otros factores antimicrobianos.

#### V.4. PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A LA NISINA A EN EL LIQUIDO ASCITICO DE LOS RATONES INMUNIZADOS

Considerando que el volumen sanguíneo de los ratones es pequeño y, por tanto, la cantidad de anticuerpos policlonales en el suero limitada, para obtener una mayor cantidad de anticuerpos se procedió a su producción en el líquido ascítico de los ratones inmunizados. Este procedimiento fue descrito inicialmente por Kurpisz y colaboradores, en 1988.

Para ello, se emplearon dos grupos de animales, el primero se inmunizó con el conjugado administrado con el Adyuvante de Freund y el otro sin Adyuvante. La evaluación de los sueros durante la inmunización de los ratones reveló la presencia de anticuerpos específicos solamente en el suero de los animales inmunizados con el conjugado más el Adyuvante (figura IV.8.). Asimismo sólo se detectaron anticuerpos específicos en el líquido ascítico de los animales de este grupo, lo que indica la importancia del Adyuvante en el desarrollo de una respuesta inmune eficaz. Si bien Kurpisz *et al.* (1988) no emplearon el Adyuvante de Freund en sus experiencias por considerar que este compuesto podía alterar la respuesta inmune y originar la aparición de anticuerpos no deseados (fundamentalmente frente a componentes antigénicos de la pared de las micobacterias), en su lugar emplearon el antígeno vehiculado en un gel de poliacrilamida. En nuestro trabajo, el ensayo inmunoenzimático empleado (ELISA-CD) permitió la selección de los anticuerpos específicos frente a la nisina A y no se detectaron interferencias con otros anticuerpos posiblemente presentes en el líquido ascítico.

El volumen de líquido ascítico obtenido con este método (una media de 7,4 ml), es considerablemente superior a la cantidad total de suero que se obtiene de un ratón (entre 0,5 y 1 ml). Generalmente, la concentración de anticuerpos policlonales obtenidos en líquido ascítico no son mayores a los alcanzados en el suero (entre 2 y 10 mg/ml) (Goding, 1993), pero este método tiene la ventaja de que el volumen es mayor. Sin embargo, en este trabajo, la concentración de anticuerpos en el líquido ascítico fue inferior a la del suero, necesitando una dilución 1/100 de los anticuerpos en el inmunoensayo, mientras que con el suero se podían emplear diluciones de 1/1.000 y 1/2.500. Los anticuerpos resultantes analizados mediante un ELISA-CD (figuras IV.9. y IV.10.) mostraron una sensibilidad similar a la de los anticuerpos séricos, con un límite de detección de entre 0,05 y 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , siendo necesarios 1,9  $\mu\text{g/ml}$  de nisina A para inhibir en un 50% la unión del conjugado al anticuerpo. Dichos anticuerpos también detectaron la nisina de los sobrenadantes de las cepas productoras de nisina, tanto la A como la Z, sin

reacción cruzada con el sobrenadante de *L. lactis* MG1614, microorganismo no productor de nisina. Tampoco se detectó una reactividad cruzada significativa con el sobrenadante de microorganismos productores de otras bacteriocinas, lo que indica que estos anticuerpos son eficaces en el reconocimiento rápido y específico de cepas productoras de nisina (tabla IV.2.).

## **V.5. OBTENCION Y PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LA NISINA A**

La concentración de anticuerpos policlonales en el suero de los ratones es limitada, lo que se superó en parte desarrollando la alternativa previamente descrita, que permitió la obtención, en menos de 8 semanas, de una cantidad mayor de anticuerpos al inducir su producción en el líquido ascítico de los ratones inmunizados. No obstante, existen todavía limitaciones para el empleo de forma rutinaria de los inmunoensayos desarrollados, derivadas del carácter policlonal de los anticuerpos utilizados: las cantidades de anticuerpos disponibles son siempre limitadas y las características de los mismos (sensibilidad y especificidad), varían de unos a otros inmunosueros.

Por ello, con el fin de disponer de una fuente ilimitada de anticuerpos de características uniformes y de naturaleza clonal y que, por lo tanto, reconocieran una sola región (epítipo) de la molécula de nisina, se procedió a la obtención de anticuerpos monoclonales. Para conseguirlo, los ratones se inmunizaron con el conjugado nisA-KLH por vía s.c., puesto que era el que mejores resultados había dado en las experiencias anteriores. Los linfocitos del bazo de los ratones con la mejor respuesta inmunológica (figuras IV.11. y IV.12.), se fusionaron con las células de mieloma de ratón de la línea celular P3X63-Ag8.653 en una proporción de 7,5:1 (linfocitos:células de mieloma). En la primera fusión, la eficacia de la misma (porcentaje de pocillos con hibridomas respecto al número total de pocillos sembrados) fue del 99,8%. A los 11 días de la fusión, se comenzó a analizar el sobrenadante de los pocillos que mostraban crecimiento celular.

Puesto que en los ratones inmunizados con el conjugado nisA-KLH, los anticuerpos específicos del suero sólo se detectaron mediante un ELISA-CD, para analizar los sobrenadantes de los hibridomas resultantes de la fusión, fue necesario diseñar un nuevo inmunoensayo que nos permitiera hacerlo de una manera más rápida, sin esperar las 16 horas necesarias durante el primer paso del ELISA-CD, en el que los pocillos de las placas de ELISA se tapizan con los anticuerpos específicos. De este modo, se diseñó el ELISA-CD tipo II en el que los pocillos de las placas se tapizaban previamente con un

anticuerpo específico comercial frente a la fracción Fc de las IgG de ratón, de manera que al añadir el sobrenadante de los hibridomas a analizar, el inmunoensayo se realizaba en unas dos horas y media. Además, con este tipo de inmunoensayo se realizó una selección previa de los hibridomas de manera que sólo se detectaron aquellos productores de IgG.

De los hibridomas resultantes de la primera fusión, solamente uno fue productor de anticuerpos específicos frente a la nisina A, sin embargo perdió su viabilidad durante la clonación, por lo que se realizó una segunda fusión con el bazo de otro de los animales que mostraba una buena respuesta inmune. La eficacia de esta segunda fusión fue del 50%, analizándose los sobrenadantes de todos los pocillos con un crecimiento positivo y detectando, de nuevo, un único hibridoma productor de anticuerpos específicos frente a la nisina A.

Los anticuerpos monoclonales se caracterizan porque sólo reconocen una región antigénica (o epítipo) de la molécula. Al considerar a la nisina A como un hapteno, que por tanto consta de un número limitado de epítipos (probablemente uno o dos), cabe esperar un número restringido de hibridomas positivos, puesto que cada clon solamente reconoce un epítipo y existirán otros muchos hibridomas productores de anticuerpos que reconocen a otros componentes de la mezcla inmunógena, como son la proteína portadora (que, por su gran tamaño, dispone de múltiples epítipos), el puente de unión con el hapteno y el adyuvante. En estudios precedentes realizados por Bhunia, para obtener anticuerpos monoclonales frente a la pediocina RS2, fueron necesarias dos fusiones celulares para obtener dos hibridomas productores de anticuerpos, uno secretor de IgG1 y otro de IgM (Bhunia, 1994). En nuestro caso, la obtención de hibridomas también se limitó por la selección primaria realizada durante el análisis de los sobrenadantes, puesto que mediante el ensayo inmunoenzimático desarrollado, sólo se detectaron los hibridomas positivos productores de IgG.

Se considera que un hibridoma está clonado y estabilizado cuando, al menos, el 95% de los pocillos son positivos en el ensayo de selección. El hibridoma resultante de la segunda fusión (2D10) se consideró clonado con éxito, puesto que todos los pocillos con crecimiento celular mostraron anticuerpos específicos frente a la nisina A. De los clones obtenidos, se seleccionaron seis (AB2, AD8, AD10, BF2, BF6 y BF10), que mostraban las mejores características de crecimiento y los mejores valores de inhibición. Estos clones se expandieron gradualmente y, tan pronto como fue posible, se congelaron y conservaron en nitrógeno líquido.

Con los clones seleccionados se procedió a la producción de anticuerpos

monoclonales en gran escala, mediante su cultivo *in vitro* y, en el caso del clon AD10, también *in vivo* induciendo la formación de líquido ascítico en ratones BALB/c. Cuando los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales se inyectan en la cavidad peritoneal de los ratones sensibilizados, el peritoneo sirve como fuente de alimentación y el hibridoma se desarrolla y produce los anticuerpos, que se acumulan en el líquido ascítico. Este método permite obtener una concentración superior de anticuerpos a la obtenida en los sobrenadantes de los cultivos celulares, 20 veces superior en nuestro caso, aunque posee la desventaja de mostrar una mayor contaminación con otros componentes del líquido ascítico, como lípidos, otros anticuerpos, etc. Por el contrario, la producción de anticuerpos mediante el crecimiento de los hibridomas *in vitro*, origina concentraciones inferiores de anticuerpos con una menor contaminación, aunque también existen proteínas del suero fetal bovino y el coste de producción por mg de anticuerpo es mayor. En ambos casos, los anticuerpos monoclonales resultantes se purificaron por precipitación con sulfato amónico, lo que protege a las inmunoglobulinas de su desnaturalización, inhibe el crecimiento microbiano y reduce las interacciones inespecíficas de los anticuerpos.

La caracterización isotópica de los anticuerpos monoclonales demostró que todos los clones producían anticuerpos del tipo IgG y de la subclase IgG1, este tipo era de esperar por la selección primaria determinada por el inmunoensayo empleado en la identificación de los hibridomas y clones productores.

Los anticuerpos secretados por el hibridoma 5G8, obtenido de la primera fusión, se emplearon tanto en un ELISA-CD del tipo I como del tipo II, resultando el segundo de una sensibilidad considerablemente superior, puesto que para obtener los mismos resultados que en el ELISA-CD I, se necesitó una concentración 6 veces superior (1/300) a la empleada en el ELISA-CD II (1/2.000). Por el contrario, los anticuerpos de los clones procedentes de la segunda fusión sólo pudieron emplearse en un ELISA-CD II, a una dilución 1/1.000. Con estos anticuerpos, no se consiguió desarrollar un ELISA-CD del tipo I, probablemente debido a requerir concentraciones de anticuerpos superiores a las ensayadas (diluciones 1/100 y 1/200) o a que el tapizado inicial de los anticuerpos en los pocillos de las placas impedía su reacción con la nisina debido a un efecto estérico, siendo necesario un brazo espaciador (el anticuerpo de captura que tapiza la placa) para permitir la interacción entre el antígeno y su correspondiente anticuerpo.

La sensibilidad de los anticuerpos procedentes de las dos fusiones fue similar, ya que con los anticuerpos del primer hibridoma (figura IV.13.) se consiguió un límite de detección de 0,01 µg de nisina /ml y se necesitaron de 1 a 2,5 µg de nisina/ml para

obtener un 50% de inhibición de la unión entre el conjugado y los anticuerpos, mientras que los anticuerpos obtenidos de la segunda fusión, mostraron un límite de detección de 0,01  $\mu\text{g}$  de nisina/ml y la cantidad de nisina necesaria para obtener un 50% de inhibición fue de 0,9 a 1,45  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (figura IV.15). En ambos casos, la sensibilidad del inmunoensayo se incrementó al vehicular la nisina en MRS, probablemente por los mismos motivos que los indicados previamente para los anticuerpos policlonales. El ensayo inmunoenzimático utilizado resultó más sensible para detectar la nisina en MRS que el desarrollado con los anticuerpos policlonales y, por lo tanto, también más sensible que la prueba de difusión en agar (figura IV.14).

Teniendo en cuenta la homología estructural entre la nisina A y la nisina Z (sólo se diferencian en el aminoácido de la posición 27), era de esperar que los anticuerpos monoclonales manifestasen reactividad cruzada con la nisina Z. El anticuerpo monoclonal 5G8 reconoce de manera similar a las dos variantes (figura IV.13.), mientras que, por el contrario, los anticuerpos obtenidos de la segunda fusión, reconocieron en menor grado a la nisina Z (un 21,5% de inhibición menos para 500 ng/ml de nisina) (tabla IV.4.). Dichos resultados hicieron sospechar que los anticuerpos de las dos fusiones reconocían epítomos distintos, estando el aminoácido de la posición 27, probablemente implicado en el determinante antigénico reconocido por los clones derivados del hibridoma 2D10.

Los anticuerpos monoclonales resultantes también se analizaron frente a los sobrenadantes de las distintas cepas productoras de nisina y de otras bacteriocinas (tablas IV.3. y IV.5.). Como sucedía con los anticuerpos policlonales, no se observaron reacciones cruzadas con el sobrenadante de *L. lactis* MG1614, no productor de nisina. Tampoco se apreciaron diferencias significativas entre los sobrenadantes de las cepas productoras de nisina A y Z, al analizarlos tanto con el anticuerpo monoclonal 5G8 como con los derivados de 2D10. No obstante, se detectó una cierta reactividad cruzada con los sobrenadantes de los microorganismos productores de otras bacteriocinas (pediocinas PA-1 y L50 y lactocina S) y dado que no existe ninguna homología estructural entre estas bacteriocinas y la nisina A, dichos resultados probablemente derivan de una reacción inmunológica inespecífica.

Hasta la realización de este trabajo, los únicos anticuerpos monoclonales obtenidos frente a una bacteriocina eran los de Bhunia (1994). En este caso, las células de mieloma empleadas en la fusión celular fueron de la línea P3/Ns1/1-Ag4-1 (NS1), descrita por Köhler y colaboradores en 1976, como una variante de la línea celular original (MOPC-21), empleada por Köler y Milstein (1976) en las primeras experiencias de fusión celular. La línea celular MOPC-21, tenía el inconveniente de secretar inmunoglobulinas, de

manera que muchos de los hibridomas resultantes producían moléculas de IgG cuyas cadenas ligeras y/o pesadas procedían de las células de mieloma y, por ello, no se unían al antígeno de interés. Las células de la línea NS1, no secretan cadenas pesadas pero sí cadenas ligeras, de manera que parte de los hibridomas producirán anticuerpos con las cadenas ligeras de la célula de mieloma original y, por lo tanto, con lugares de unión no funcionales, aunque en menor medida que en el caso de la línea celular MOPC-21. En consecuencia, se han desarrollado otras líneas celulares no secretoras de anticuerpos, pero que dan lugar a la formación de hibridomas secretores un vez que se fusionan con los linfocitos esplénicos. De ellas, la línea celular X63-Ag8.653 es la más recomendable por su alta eficacia de fusión y clonación y su rápido crecimiento.

Tras inmunizar a los animales con la bacteriocina vehiculada en un gel de poliacrilamida, Bhunia (1994) realizó dos fusiones celulares, de las que se obtuvieron dos hibridomas positivos, uno de ellos productor de IgG1 y otro de IgM, este último capaz de reconocer tanto a la pediocina RS2 como a la AcH (PA-1). El ensayo inmunoenzimático empleado tanto en el análisis de los hibridomas como en las experiencias posteriores, fue un *Western blotting* (transferencia electroforética y reconocimiento inmunológico), que permitió identificar la presencia de estas bacteriocinas en los sobrenadantes de los microorganismos productores, pero no su cuantificación. El análisis de los sobrenadantes obtenidos tras 27 horas de incubación de los cultivos, originó una única banda de transferencia correspondiente a la pediocina RS2 y AcH, respectivamente, aunque en los cultivos más jóvenes, de 20 horas, se reconocieron inmunológicamente otras bandas sin actividad antimicrobiana, que se correspondían, según el propio investigador, a las prepediocinas. De la misma manera se analizaron los sobrenadantes de microorganismos productores de otras bacteriocinas (sakacina A, leuconocina LCM1, nisina A y pediocina A), detectando solamente una débil reacción inespecífica con el sobrenadante del microorganismo productor de la sakacina A. Con el desarrollo de un método de *colony immunoblotting* (detección de colonias por transferencia y reconocimiento inmunológico), también se detectaron directamente los microorganismos productores de las pediocinas RS2 y AcH. En las experiencias de *dot immunoblotting*, los anticuerpos monoclonales utilizados mostraron un límite de detección de 9 µg/ml para la pediocina RS2 y de 10 µg/ml para la pediocina AcH. Aunque el investigador cita en su artículo que también se desarrollaron ensayos inmunológicos del tipo ELISA con los anticuerpos obtenidos, los resultados de dichos ensayos no se han mostrado ni en esta publicación ni en ninguna otra posterior.

## V.6. IDENTIFICACIÓN DE LOS DETERMINANTES ANTIGENICOS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS GENERADOS

En la identificación de los determinantes antigénicos (epítomos) de la molécula de nisina, reconocidos por los anticuerpos policlonales del líquido ascítico del ratón I.B. y por los anticuerpos monoclonales del hibridoma 5G8 y del clon AD10, se emplearon los sobrenadantes de microorganismos modificados por reemplazamiento génico para producir variantes de nisina (tabla III.2.), sus variantes purificadas, así como diversos fragmentos de la nisina A obtenidos por degradación o rotura enzimática y el lantibiótico subtilina (tabla III.4.). Todas las muestras se analizaron empleando un ELISA-CD tipo I con los anticuerpos policlonales y del tipo II con los monoclonales.

En el caso del anticuerpo monoclonal del hibridoma 5G8, destacamos los resultados obtenidos con las variantes que afectan a los residuos de DHA de la moléculas de nisina (tablas IV.6. y IV.7.). De estos resultados, se deduce que, mientras que la sustitución del residuo de DHA de la posición 33 por una alanina, apenas afecta al reconocimiento de la nisina, la misma sustitución en el residuo 5, constituyente del primer anillo, determina un descenso considerable de la reacción antígeno-anticuerpo, cuyos resultados se observan tanto en el sobrenadante de los microorganismos productores como en las variantes purificadas, aunque en este segundo caso la diferencia es menor. Asimismo, el anticuerpo monoclonal 5G8 reconoció intensamente los fragmentos procedentes de la primera mitad de la molécula (fragmentos 1-12 y 1-20) en un 89 y un 100%, respectivamente, todo ello indica que el determinante antigénico reconocido por este anticuerpo se localiza en la primera mitad de la molécula. La subtilina, otro lantibiótico cuyos 20 primeros aminoácidos (correspondientes a los anillos A, B y C de la molécula) son prácticamente iguales a los de la nisina, excepto el de la posición 4 (Glu en vez de Ile), el de la posición 12 (Val en lugar de Lys) y el de la posición 19 (Aba en vez de Ala), también es reconocida por este anticuerpo. La rotura del anillo A, en el producto de degradación Des5Ala, determinó una pérdida casi completa de la reacción antígeno anticuerpo, lo que refleja, junto con los resultados anteriores, que este anillo forma parte del determinante antigénico de la molécula de nisina reconocido por el anticuerpo monoclonal 5G8.

Respecto a los resultados obtenidos con el anticuerpo monoclonal AD10 (tabla IV.7.), los fragmentos 1-12 (que consta de los anillos A y B) y 1-20 (que incluye, además, el anillo C), manifiestan solamente una reactividad cruzada del 17 y 30%, respectivamente, de lo que se deduce que la otra mitad de la molécula, es importante en la interacción antígeno-anticuerpo. Además, la rotura del anillo A en el producto de degradación Des5Ala, que fue determinante para que el anticuerpo 5G8 perdiera su

reactividad, en este caso apenas afectó al resultado del ensayo, lo que sugiere que este primer anillo no forma parte del epítopo que reconoce el anticuerpo AD10. Con este anticuerpo observamos anteriormente que el reconocimiento de la nisina Z pura era inferior al de la nisina A, estas moléculas sólo se diferencian en el aminoácido de la posición 27; de una manera análoga, la sustitución de este aminoácido por una lisina, origina también un descenso de la reactividad cruzada. El lantibiótico subtilina también manifestó una reactividad cruzada de sólo el 27% y aunque existe una cierta analogía entre la nisina y la subtilina en esta parte de la molécula (la configuración de los anillos D y E es similar), existen diferencias entre los aminoácidos 24, 27, 29, y 31.

De los resultados obtenidos se deduce que el determinante antigénico del anticuerpo monoclonal AD10 se sitúa en la segunda mitad de la molécula, concretamente entre los residuos 23 (puesto que el 22 es una lisina que reaccionó en la conjugación con la molécula portadora) y el 31 (los tres aminoácidos finales no son indispensables, puesto que la molécula de nisina 1-31 se reconoce prácticamente como si fuera la molécula nativa). Por otro lado, la sustitución de los residuos de DHA por Ala en las posiciones 5 (variante DHA 5 A) y 33 (DHA 33 A), originan un cierto descenso en su reconocimiento, con una reactividad cruzada del 71 y 77% respectivamente, sin embargo, la alteración de ambos residuos de forma conjunta determinó, como ocurrió en el caso del anticuerpo 5G8, un descenso considerable de la reactividad cruzada (de un 35%).

De lo que antecede se deduce que los anticuerpos monoclonales obtenidos de dos fusiones distintas, reconocen determinantes antigénicos diferentes de la molécula de nisina. Concretamente, el anticuerpo monoclonal 5G8 reconoce fundamentalmente la primera mitad de la molécula, siendo importante la presencia íntegra del anillo A, mientras que el anticuerpo monoclonal AD10 reconoce la segunda mitad de la molécula, concretamente el epítopo estaría localizado en los anillos D y E. Es fácil deducir que los anillos son estructuras inmunógenas importantes en la molécula de nisina, lo que se ha visto favorecido por el método de conjugación empleado, puesto que las lisinas disponibles para reaccionar con la molécula portadora se localizan en la posición 12 (entre el anillo B y el C), 22 (entre el anillo C y D) y 43 (en el extremo final de la molécula). El extremo N-terminal de la molécula también se conjugó con la molécula portadora por su radical amino libre, todo ello determinó la presencia de tres posibles dominios inmunógenos, uno constituido por los anillos A y B, otro por el anillo C y otro por el anillo D y E, confirmados por un anticuerpo monoclonal que reconoce el primer dominio citado y otro, que reconoce el último.

En el caso de los anticuerpo policlonales del líquido ascítico del ratón I.B., cabe

esperar la existencia de anticuerpos que reconozcan todos los dominios inmunogénicos de esta molécula. Por ello, observamos (tablaIV.7.) que la alteración del primer anillo, por modificación de la DHA en DHA5 o por su rotura en Des5Ala, disminuye el reconocimiento de la molécula de nisina en más de un 60%, pero por su parte, la segunda mitad de la molécula también es importante puesto que en el fragmento 1-20 la reactividad cruzada disminuye aproximadamente un 50%, lo que constituye un descenso incluso mayor que en el fragmento 1-12 (reactividad de un 30%).

En todos los casos, la modificación conjunta de los dos residuos DHA por Ala, originó un descenso en la reactividad inmunológica muy superior al que provoca la modificación de cada residuo por separado. Esto podría deberse a que la pérdida de los dos residuos de DHA origina una modificación en la conformación estructural de la molécula, que determina la pérdida de su reconocimiento por los anticuerpos. Estos resultados podrían estar relacionados con el hecho de que la variante de nisina con ambos residuos modificados, manifiesta un descenso considerable de su actividad antimicrobiana, lo que no se observa en las variantes que presentaban sólo uno de los residuos modificados (Dodd *et al.*, 1996).

Los anticuerpos policlonales desarrollados por Falahee *et al.* (1990) no detectaron la nisina cuando ésta se inactivó por el método de Fowler *et al.* (1975), de lo que se dedujo que los epítomos reconocidos por aquellos anticuerpos estaban relacionados con las estructuras responsables de su actividad antimicrobiana.

## V.7. APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS ANTINISINA A DESARROLLADOS

### 7.1. Evaluación del crecimiento de *L. lactis* BB24 y seguimiento de la producción de nisina, empleando anticuerpos policlonales obtenidos de líquido ascítico.

Con los anticuerpos policlonales obtenidos del líquido ascítico del ratón I.B. y con un ELISA-CD del tipo I, se realizó el seguimiento de la producción de nisina por *L. lactis* BB24, al tiempo que se determinaban las unidades formadoras de colonias y la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes por la prueba de difusión en agar. Los resultados del ELISA de los sobrenadantes en los diferentes momentos del crecimiento microbiano, se extrapolaron a una curva patrón de la nisina A en MRS, para determinar la cantidad de nisina producida. La curva patrón se ajustó empleando un soporte informático mediante un modelo de regresión desarrollado por Healy (1972), que fue el que mejor se ajustaba al formato de la curva. Este tipo de regresión se emplea frecuentemente en los ensayos inmunoenzimáticos, y ofrece resultados más precisos y menos susceptibles de variaciones, que otros métodos descritos anteriormente (Deshpande, 1996).

De los resultados obtenidos (figura IV.16), se deduce que el ELISA-CD comenzó a detectar la producción de nisina a las 6 horas de crecimiento, mientras que con la prueba de difusión en agar los halos de inhibición empezaron a observarse a las 8 horas, lo que ratifica la mayor sensibilidad del inmunoensayo respecto del método microbiológico. Asimismo, según los resultados del inmunoensayo, la mayor producción de nisina se observa entre el final de la fase de crecimiento exponencial y el inicio de la fase estacionaria, entre las 14 y las 16 horas del crecimiento. Los datos obtenidos concuerdan con las afirmaciones de De Vuyst y Vandamme (1993), según los cuales la tasa máxima de producción de nisina se alcanza al final de la fase de crecimiento exponencial, mostrando la cinética propia de un metabolito primario asociado al crecimiento celular y, por lo tanto, relacionada con la masa celular total. Otras bacteriocinas también se producen durante o al final de la fase de crecimiento exponencial (Piard y Desmazeaud, 1992). Por otro lado, teniendo en cuenta que para que la nisina madure previamente deben sintetizarse las enzimas responsables de la maduración del péptido, es lógico que deban transcurrir unas horas desde el inicio del crecimiento hasta la detección del compuesto maduro, así Buchman *et al.* (1988) observaron un retraso de unas horas desde la transcripción del gen estructural hasta la aparición de la nisina madura. En la fase de crecimiento estacionario, los niveles de nisina disminuyen a pesar de que los niveles de inmunidad y de transcripción de la nisina son todavía altos, probablemente debido a la

liberación de enzimas proteolíticos no específicos durante la lisis celular (De Vuyst y Vandamme, 1992).

Por otra parte, Ra *et al.* (1996) han indicado que la nisina se produce desde los estadios iniciales del crecimiento a un nivel similar al de fases subsiguientes. Sin embargo, al inicio no se detectaría su actividad antimicrobiana en el sobrenadante debido a que la nisina secretada se adsorbe a la superficie de las células y se libera al medio hacia la mitad de la fase exponencial, cuando el pH del medio decae por debajo de 5,5. Esta nisina adsorbida a las células tampoco se habría detectado en nuestro inmunoensayo, puesto que las muestras analizadas procedían de los sobrenadantes libres de células.

## **7.2. Detección y cuantificación de la nisina A en los alimentos: detección en un queso de untar empleando el anticuerpo monoclonal AD10**

Para evaluar la capacidad del anticuerpo monoclonal AD10 de detectar y cuantificar la nisina A potencialmente presente en los alimentos, se añadieron concentraciones conocidas de la bacteriocina purificada a muestras de un queso de untar comercial y, tras su extracción, se determinó su recuperación mediante un ensayo de ELISA-CD II.

El método de extracción de la nisina de las muestras de alimento fue el descrito por Tramer y Fowler (1975). Tras someter la muestra a ebullición en HCl 0,02 N durante 10 minutos, para liberar la nisina de su unión a determinados componentes del alimento, se eliminó la materia sólida por centrifugación y se determinó la concentración de nisina extraída mediante el ensayo de ELISA. En la misma placa de ELISA, se ensayaron cantidades conocidas de nisina en un extracto de queso, obtenido por el procedimiento citado previamente. Los resultados de estas muestras patrón, se ajustaron a una curva de regresión con la ayuda de un soporte informático. No se observaron interferencias al emplear el extracto de queso como vehículo de la nisina en la curva patrón (figura IV.17). De los resultados de la tabla IV.8., se observa que la recuperación media de la nisina de las muestras empleando el ensayo del ELISA-CD II, fue de un 116%, con unos coeficientes medios intra e interensayo de 13,3 y 14,1%, respectivamente. Posibles fuentes de variabilidad, no debidas al propio inmunoensayo, podrían deberse a la adsorción de la nisina en las muestras y al método de extracción. El método inmunoenzimático desarrollado por Falahee *et al.* (1990), mostró un límite de detección de la nisina de  $1,9 \times 10^{-2}$  UI y al analizar la recuperación de la nisina de muestras de queso de una forma similar a la desarrollada en este estudio, se obtuvo una recuperación media del 85%, con unos coeficientes de variación intra- e interensayo de 5,3 y 10,9%, respectivamente. Los valores de recuperación de la nisina obtenidos en nuestro trabajo,

así como los coeficientes de variación intra- e interensayo, son ligeramente superiores a los obtenidos por Falahee con un ELISA tipo sandwich, pero similares a los descritos para otros analitos empleando ensayos de ELISA competitivos (Azcona-Olivera *et al.*, 1990, 1992).

Los métodos empleados actualmente en la detección de la nisina, se han descrito previamente en la introducción de este trabajo. De todos ellos, el método estándar de determinación rutinaria de la nisina en los alimentos es el descrito por Tramer y Fowler (Fowler *et al.*, 1975), en el que, tras la extracción de la nisina de la muestra, se realiza un test de difusión en agar con la incorporación de un 1% de Tween 20 para favorecer la difusión de la bacteriocina y aumentar la sensibilidad del ensayo, utilizando *Micrococcus luteus* como microorganismo indicador. Las ventajas de los métodos inmunoenzimáticos frente al ensayo microbiano ya se han indicado anteriormente, concluyendo que el ensayo del ELISA-CD es ligeramente más sensible y su especificidad es mucho mayor, puesto que la actividad antimicrobiana que se observa, puede deberse a otros metabolitos de las bacterias lácticas con actividad antimicrobiana como el ácido acético, láctico propiónico, etanol, diacetilo, y el peróxido de hidrógeno; por otro lado, el ensayo inmunoenzimático es más rápido y permite su automatización y el análisis simultáneo de un gran número de muestras.

Otro método alternativo descrito para detectar y cuantificar la presencia de nisina en los alimentos (en este caso cerveza) fue el diseñado por Waites y Ogden (1987), basado en la observación de que la lisis de las células bacterianas por la nisina origina un incremento del ATP del medio, cuantificable por bioluminiscencia. De esta manera, se estableció una relación reproducible entre la concentración de ATP medido y la de nisina, detectando la nisina en un rango de entre 0 y 120 UI/ml, con un error de menos del 5%. Aunque este método es más rápido que la prueba de difusión en agar, supone un alto coste inicial por los reactivos y el instrumental de medición de la luminiscencia del ATP.

Los límites máximos de nisina permitidos en los alimentos, varían según los países (algunos, incluso, no han definido límites en su empleo) y en la mayoría de los casos se encuentran en el rango de las partes por millón (de 2 a 100 mg/kg de alimento). El ensayo del ELISA-CD II desarrollado con el anticuerpo monoclonal AD10, puede ser de gran utilidad en la estimación rápida de la nisina en los alimentos, dado que su límite de detección es de 10 ng de nisina/ml.

### 7.3. Purificación de la nisina por cromatografía de inmunoafinidad

La purificación de las bacteriocinas a homogeneidad es necesaria para determinar sus características bioquímicas, secuencia aminoacídica, mecanismo de acción y estudiar sus posibles aplicaciones. Hasta la fecha se han empleado diversas técnicas (o combinación de ellas) con el objeto de obtener bacteriocinas puras o parcialmente purificadas. El método de purificación empleado también depende del fin que se le quiera dar al producto final, de modo que para la caracterización de las bacteriocinas y su secuenciación aminoacídica, se requiere un producto muy puro aunque el rendimiento de la purificación sea bajo, mientras que para su aplicación como conservante en los alimentos, se preferirán unos rendimientos altos aunque ello suponga una reducción parcial de la pureza del producto.

Puesto que las bacteriocinas se liberan al medio extracelular, el primer paso de su purificación suele ser su concentración mediante la precipitación de las proteínas totales del sobrenadante con sulfato amónico, lo que es fácil de realizar y poco traumática para las proteínas. Posteriormente, la purificación de las bacteriocinas prosigue con la utilización sucesiva de diversos métodos cromatográficos, como los de filtración en gel, intercambio catiónico, interacción hidrofóbica y fase reversa (Muriana y Luchansky 1993). En nuestro laboratorio, este procedimiento se ha adaptado y puesto a punto para la purificación de diversas bacteriocinas, entre las que destacan la pediocina L50 y la nisina A (Cintas *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1995). En nuestro trabajo, la purificación de la nisina mediante su precipitación con sulfato amónico, cromatografía de intercambio catiónico, interacción hidrofóbica y fase reversa en un equipo automatizado de FPLC, se utilizó en un principio para obtener suficiente bacteriocina para proceder a la inmunización de los animales y para el desarrollo y puesta a punto de los métodos inmunoenzimáticos (ELISA) adecuados. Sin embargo, a pesar de obtener un compuesto muy puro, los rendimientos de la purificación fueron insuficientes para nuestras necesidades (de nueve purificaciones, se obtuvo un total de 1 mg de nisina pura), por lo que fue necesario la utilización de nisina A purificada comercial.

Así pues, debido a la escasa eficacia del método de purificación de la nisina previamente descrito y una vez dispusimos de los anticuerpos monoclonales frente a la nisina A, se planteó el objetivo de desarrollar un método de cromatografía de inmunoafinidad que permitiese purificar este compuesto de una manera más sencilla, rápida y eficaz, que los métodos empleados hasta la fecha. La cromatografía de inmunoafinidad es un método de purificación basado en la especificidad de la unión de un antígeno y su correspondiente anticuerpo. Este método se ha empleado con éxito en la

purificación de muchas proteínas, aunque nunca se había empleado anteriormente para purificar bacteriocinas, probablemente debido a la dificultad para obtener anticuerpos frente a las mismas.

En la elección de la matriz para construir la columna de afinidad, debe tenerse en cuenta que ésta carezca de adsorción inespecífica, no posea grupos cargados y sea capaz de unirse al anticuerpo sin que éste pierda su actividad biológica. La agarosa activada con cianuro de bromo es la matriz más utilizada con este propósito y se encuentra disponible comercialmente (CNBr-activated Sepharose 4B, Pharmacia). Sin embargo, esta matriz no fue útil en nuestro trabajo, puesto que tras la construcción de la columna de afinidad, las muestras de nisina inyectadas no quedaron retenidas en la columna (resultados no mostrados). Como no se determinó la eficacia de la unión de los anticuerpos a la columna, una posible explicación podría ser que los anticuerpos no se hubiesen unido a la resina, sin embargo esta matriz es un producto comercial especialmente preparado para su unión a los anticuerpos y el proceso de conjugación se realiza siempre de una forma sencilla y rutinaria. Otra posible explicación sería la de un efecto estérico que impida la interacción entre el antígeno y el anticuerpo, de una manera análoga a lo que ocurría en el ensayo del ELISA-CD I.

Dada la ineficacia de la columna previamente descrita y considerando la segunda explicación indicada, se seleccionó otra matriz que disponía de un brazo espaciador, para favorecer la interacción entre el antígeno y el anticuerpo. En la actualidad se dispone de matrices comerciales en las que la agarosa se ha unido a un brazo espaciador con un éster de N-hidroxisuccinimida en su extremo terminal. Los ésteres de succinimida son muy susceptibles al ataque nucleofílico de los grupos  $\epsilon$ -amino de la lisina, dando lugar al desplazamiento de la N-hidroxisuccinimida y a la formación de una unión estable del tipo amida entre el ligando (anticuerpo) y el brazo espaciador. Para evaluar la eficiencia de la unión es necesario eliminar previamente la N-succinimida liberada mediante una cromatografía de filtración en gel, puesto que ésta absorbe fuertemente la luz ultravioleta a 280 nm. En nuestro trabajo, la eficacia de la unión de los anticuerpos a la matriz resultó ser de, aproximadamente, un 83%.

A continuación, se comprobó el funcionamiento de la columna inyectando concentraciones conocidas de nisina A pura en PBS y determinando su capacidad de retención. El tampón de elución empleado fue el de glicina-HCl, que origina un descenso del pH a 2,2-2,8 determinando un cambio en la conformación del anticuerpo y el antígeno y dando lugar a la liberación de éste último. Como se observa en la figura IV.18., no se detectaron pérdidas de nisina durante la inyección y el lavado y toda la actividad

antimicrobiana se detectó en las fracciones de elución.

Posteriormente, se procedió a purificar la nisina A producida por el microorganismo productor *Lactococcus lactis* BB24, a partir de dos muestras de sobrenadante de 10 ml cada una. El seguimiento del proceso se realizó midiendo la absorbancia de las fracciones a 280, 254 y 220 nm, evaluando la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas mediante un ensayo en placas microtituladoras y determinando la concentración de nisina mediante un ELISA-CD II. Tras la inyección, la columna se lavó hasta que no se detectó absorbancia a 280 y 254 nm en el eluato, para proceder, a continuación, a la elución de la nisina. La mayor parte de la bacteriocina se retuvo en la columna y se eluyó en las primeras fracciones de la elución. El pico máximo de actividad antimicrobiana y de concentración de nisina, coincidió con un pico de absorbancia a 220 nm. Los resultados de la purificación se muestran en la figura IV. 19 y en la tabla IV.9., en las que se observa una ligera pérdida de bacteriocina durante la inyección y las primeras fases del lavado. Este hecho es difícil de explicar, ya que no es probable que se deba a la saturación de la columna con la muestra, puesto que entonces la pérdida de nisina se detectaría una vez se ha alcanzado el punto de saturación y no queda más ligando disponible para reaccionar, sin embargo la pérdida de nisina se observó desde el inicio de la inyección de la muestra. Aunque el flujo de elución fue lo suficientemente lento (0,5 ml/min) para permitir la interacción del antígeno y el anticuerpo, puede que una disminución del mismo hubiera dado lugar a una mayor retención de la muestra; por otro lado, otros componentes del sobrenadante podrían haber interferido en la unión. Otra explicación sería que la nisina no retenida en la columna mostrase una conformación diferente que no fue reconocida por los anticuerpos empleados.

La cantidad de nisina pura recuperada por cromatografía de inmunoafinidad y determinada por el ELISA-CD II, fue de  $32.475 \pm 1.214$  ng por 10 ml de cultivo, valor muy similar al resultante de determinar la absorbancia de la muestra a 220 nm y calcular la concentración de nisina por su coeficiente de extinción molar ( $32.547 \pm 1.887$ ), resultando la cuantificación por el ELISA más específica y sensible.

La pureza del producto obtenido se determinó utilizando una columna de fase reversa conectada a un equipo automatizado de FPLC, empleada anteriormente en la purificación de este péptido. De los resultados de la elución (figura IV.20), se observó un único pico proteico con actividad antimicrobiana que coincidió en tamaño y localización con el de la nisina utilizada como control. Otros picos de absorbancia adicionales, resultaron ser interferencias debidas al tampón de glicina empleado en la elución. En el pico proteico de la nisina purificada se detectó un pequeño hombro con actividad

antrimicrobiana, que podría deberse a la tendencia de este compuesto a formar agregados o polímeros o a la presencia de productos de degradación que aparecen frecuentemente durante la conservación de la nisina y que también poseen actividad antimicrobiana.

El rendimiento de la purificación de la nisina por cromatografía de inmovilización (3,24  $\mu\text{g/ml}$  de cultivo), resultó ser 30 veces superior al método de purificación empleando diversos métodos cromatográficos (0,115  $\mu\text{g/ml}$  de cultivo), requiriendo cantidades inferiores de muestra (10 ml frente a un litro), con el consiguiente ahorro de material y reactivos que ello supone (tabla IV.9.).

Actualmente existe un gran interés en el desarrollo de métodos rápidos y sencillos de purificación de las bacteriocinas. El método de cromatografía de inmovilización, desarrollado por primera vez en este trabajo, permite la purificación de la nisina de los medios complejos empleados para cultivar estos microorganismos, sin que se produzca la adsorción inespecífica de otros compuestos no deseados. El procedimiento es simple, rápido, específico, reproducible, económico y permite la purificación de esta bacteriocina en un sólo paso. Estas características pueden permitir el desarrollo a mayor escala de un sistema de purificación de la nisina en las cantidades necesarias para su utilización en los alimentos y como agente terapéutico. La disponibilidad de preparaciones de nisina muy puras y la potenciación de su actividad con compuestos quelantes, pueden favorecer el empleo de este compuesto como agente terapéutico en los tratamientos de úlceras pépticas, infecciones dermatológicas, infecciones bucales y mastitis, así como en el tratamiento de múltiples infecciones sistémicas del hombre y de los animales, resistentes a los antibióticos convencionales.

## ***VI. CONCLUSIONES***

---



**Primera.** Para obtener anticuerpos específicos frente a la nisina A, se conjugó esta bacteriocina con dos moléculas portadoras; el conjugado con hemocianina KLH originó una respuesta inmune más potente y específica que el de nisina A con toxina colérica. La respuesta fue mejor en los animales inmunizados subcutáneamente que en los inmunizados por vía intraperitoneal. Los inmunosueros más potentes y específicos se obtuvieron a los 91 días de iniciada la inmunización, esto es, 60 días después de aplicar a los animales la tercera dosis del inmunógeno.

**Segunda.** La especificidad de los anticuerpos producidos inmunizando ratones con nisina A conjugada a la toxina colérica, pudo determinarse tanto con un ELISA competitivo indirecto como con otro directo; la de los originados con el conjugado de KLH, solamente se detectó con un ELISA competitivo directo. No obstante, la afinidad relativa y la sensibilidad de los anticuerpos eran mayores con el segundo conjugado que con el primero. El límite de detección de nisina A en tampón PBS utilizando anticuerpos de conjugado KLH y un ELISA competitivo directo, fue de 100 ng/ml; la sensibilidad llegó a 5 ng/ml con nisina A vehiculada en medio MRS.

**Tercera.** Los anticuerpos policlonales originados inmunizando los ratones con nisina A conjugada a hemocianina KLH también detectaron la nisina en el producto comercial Nisaplin® y en el sobrenadante de cultivos de *Lactococcus lactis* productores de nisina; el ensayo del ELISA competitivo directo fue algo más sensible que el método tradicional de difusión en agar.

**Cuarta.** Los anticuerpos policlonales del líquido ascítico de ratones inmunizados con nisina A conjugada a la hemocianina KLH, tenían una sensibilidad similar a la de los anticuerpos séricos, con un límite de detección entre 50 y 100 ng/ml. También detectaban la nisina de los sobrenadantes de los cultivos de cepas productoras de esta bacteriocina sin mostrar una reactividad cruzada significativa con los sobrenadantes de cultivos de microorganismos productores de otras bacteriocinas.

**Quinta.** Cuando se fusionaron los linfocitos del bazo de dos animales inmunizados con el conjugado de nisina A y hemocianina KLH, con células de mieloma de la línea celular P3X63-Ag8.653, se obtuvieron dos hibridomas productores de anticuerpos monoclonales específicos frente a la nisina A, al primero se le denominó 5G8 y al segundo 2D10. Con ambos anticuerpos se ha desarrollado un ELISA competitivo directo de tipo II cuyo límite de detección de nisina A en tampón PBS es de 10 ng/ml, su sensibilidad aumenta con la nisina A vehiculada en medio MRS.

## *Conclusiones*

**Sexta.** El anticuerpo monoclonal 5G8 reconoce un determinante antigénico localizado entre los residuos 1 y 12 de la molécula de nisina (anillos A y B), siendo el anillo A vital para el reconocimiento. El anticuerpo monoclonal AD10 reacciona, preferentemente, con la segunda mitad de la molécula de nisina, entre los residuos 23 y 31 (anillos D y E), el aminoácido de la posición 27 es importante para dicho reconocimiento.

**Séptima.** El ELISA competitivo directo, utilizando tanto anticuerpos policlonales como monoclonales, sirve para detectar con eficacia la nisina de los sobrenadantes de los cultivos de sus microorganismos productores, por lo que puede emplearse como método rápido, sensible y eficiente en la identificación de los microorganismos productores de nisina, tanto en cepas salvajes como en las modificadas genéticamente.

**Octava.** El ensayo del ELISA competitivo directo, utilizando anticuerpos monoclonales frente a la nisina A, ha permitido la detección y cuantificación de esta bacteriocina en una muestra comercial de queso fundido, por lo que podría utilizarse con el mismo fin en otros alimentos, dado que es un método rápido, sencillo y fiable para el análisis simultáneo de muchas muestras. Es algo más sensible y mucho más específico que el método tradicional de detección y cuantificación de nisina con la prueba de difusión en agar.

**Novena.** La cromatografía de inmutafinidad desarrollada por primera vez en este trabajo, permite concentrar y purificar a homogeneidad la nisina del sobrenadante de un medio de cultivo complejo, sin que se produzca la adsorción inespecífica de otros compuestos no deseados. El procedimiento es simple, rápido, específico, reproducible, económico y más eficaz que cualquier otro método de purificación de nisina descrito hasta la fecha.

**VII. TRABAJO FUTURO**

---



En el trabajo presentado en esta memoria, se ha descrito la obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales específicos frente a la nisina A y su utilización en el desarrollo y puesta a punto de ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), que permitan su detección y cuantificación en el sobrenadante de cultivos productores y en los alimentos. Uno de los anticuerpos obtenidos, también ha demostrado su utilidad en la concentración y purificación a homogeneidad de la nisina A en un sólo paso por cromatografía de inmunoafinidad.

De los resultados obtenidos, se deduce que el escalado de la técnica cromatográfica de inmunoafinidad utilizada en la purificación de la nisina a homogeneidad, podría permitir la obtención de mayores concentraciones de esta bacteriocina, lo que permitiría disponer de suficiente cantidad de nisina pura para utilizarla en diversos sustratos alimenticios y evaluar su actividad antimicrobiana y conservadora, tanto utilizándola sola como en combinación con otros sistemas de conservación de los alimentos, como la utilización de atmósferas controladas y modificadas, presiones elevadas (*ultrahigh hydrostatic pressure*) y campos eléctricos pulsantes (*pulsed electric field*), así como la potenciación de su acción con agentes quelantes.

Asimismo, los anticuerpos policlonales y monoclonales generados en este trabajo, podrían utilizarse tanto en la detección y cuantificación de la nisina en los alimentos, así como para determinar su localización en productos fermentados, como los embutidos crudos curados. Por otro lado, los anticuerpos descritos también pueden constituir una herramienta eficaz en la detección y cuantificación de la nisina, en las cepas productoras modificadas genéticamente. Las técnicas recientes de ingeniería genética, se utilizan tanto para modificar la expresión de los genes que permiten una mayor producción de nisina, como para permitir la obtención de derivados con modificaciones en su secuencia aminoacídica, con el objeto de mejorar sus características físico-químicas e incrementar su actividad antimicrobiana. Los anticuerpos obtenidos, también podrían utilizarse en estudios de regulación de la síntesis y del mecanismo de acción de la nisina.

Finalmente, considerando la utilidad de las bacteriocinas como conservadores de los alimentos, es probable que, en un futuro próximo, se permita el empleo de otras bacteriocinas en los alimentos. De esta manera, de nuevo sería útil disponer de técnicas inmunológicas que permitiesen la identificación y cuantificación de estos compuestos en los alimentos, así como su purificación a homogeneidad en un sólo paso por cromatografía de inmunoafinidad. Como uno de los factores limitantes en la obtención de anticuerpos frente a las bacteriocinas, radica en la dificultad de obtener concentraciones suficientes de bacteriocinas purificadas a homogeneidad, proponemos la utilización de las

nuevas técnicas de inmunización genética, que permiten la obtención de anticuerpos frente a cualquier proteína o péptido expresado en los animales de experimentación, sin necesidad de purificar previamente dicho compuesto.

Las técnicas de inmunización genética, consisten en depositar intradérmicamente o en el tejido muscular de los animales de experimentación, un vector de ADN eucarionte con el marco abierto de lectura de la proteína o péptido a expresar y las señales de control apropiadas, lo que permite la transcripción, traducción, procesado y excreción de las proteínas de interés de las células infectadas por el vector. Este sistema induce una respuesta inmune sorprendentemente elevada, que incluye una respuesta tanto humoral como celular, sin la necesidad de adyuvantes y empleando solamente el vector apropiado de ADN. Este método, además de constituir una alternativa potencialmente eficaz ante los actuales sistemas de protección inmunológica (vacunas) empleados en el hombre y en los animales, también podría emplearse en la inmunización de animales de experimentación con el fin de obtener anticuerpos específicos frente a determinadas sustancias, como las bacteriocinas. La secuencia génica del compuesto a expresar por el vector, podría deducirse de su secuencia aminoacídica o de experiencias previas de secuenciación génica, por lo que la inserción de dicha secuencia en el vector apropiado, sería relativamente sencilla. Este método tiene además la ventaja de que la obtención de ADN es relativamente barata y que los genes pueden manipularse con el fin de producir moléculas inmunógenas con las características deseadas, además de clonar y modificar los genes en los plásmidos de expresión, lo que permitiría la obtención de nuevos derivados que podrían analizarse en un corto espacio de tiempo.

**VIII. BIBLIOGRAFIA**

---



**Abee, T., Rombouts, F.M., Hugenholtz, J., Guihard, G. y Letellier, L.** 1994. Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 1962-1968.

**Abee, T., Krockel, L. y Hill, C.** 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.*, **28**: 169-185.

**Abouzied, M.M., Azcona-Olivera, J.I., Yoshizawa, T. y Pestka, J.J.** 1993. Production of polyclonal antibodies to the trichothecene mycotoxin 4,15-diacetylivalenol with the carrier-adjuvant cholera toxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 1264-1268.

**Alifax, R. y Chevalier, R.** 1962. Etude de la nisinase produite par *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Res.*, **29**: 233-240.

**Allgaier, H., Jung, G., Werner, R.G., Schneider, U. y Zähler, H.** 1985. Elucidation of the structure of epidermin, a ribosomally synthesized, tetracyclid heterodetic polypeptide antibiotic. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **24**: 1051-1053.

**Allgaier, H., J. Walter, M. Schlüter, and R.G. Werner.** 1991. Strategy for purification of lantibiotics. En *Nisin and Novel Lantibiotics*, Jung G. y Sahl, H. G. (ed.), pp.422-433. ESCOM Publishers B. V., Leiden.

**Andersson, R.E., Daeschel, M.A. y Hassan, H.M.** 1988. Antibacterial activity of plantaricin SIK-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Biochimie* **70**: 381-390.

**Augustin, J., Rosenstein, R. Wieland, B., Schneider, U., Schnell, N., Engelke, G., Entian, K.D. y Götz, F.** 1992. Genetic analysis of epidermin biosynthesis genes and epidermin-negative mutants of *Staphylococcus epidermidis*. *Eur. J. Biochem.*, **204**: 1149-1154.

**Avrameas, S., y Ternynck, S.** 1969. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents. *Immunochemistry*, **6**: 53-66.

**Azcona-Olivera, J.I., Abouzied, M.M., Plattner, R.D., Norred, W.P. y Pestka, J.J.** 1992a. Generation of antibodies reactive with fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub>, by using cholera toxin as the carrier-adjuvant. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 169-173.

**Azcona-Olivera, J.I., Abouzied y Pestka, J.J.** 1990. Detection of zearalenone by tandem immunoaffinity-enzyme linked immunosorbent assay and its application to milk. *J. Food Prot.*, **53**: 577-580.

**Azcona-Olivera, J.I., Abouzied, M.M., Plattner, R.D. y Pestka, J.J.** 1992b. Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub>. *J. Agric. Food Chem.*, **40**: 531-534.

**Bailey, F.J. y Hurst, A.** 1971. Preparation of a highly active form of nisin from *Streptococcus lactis*. *Can. J. Microbiol.*, **17**: 61-67.

**Banerjee, S. y Hansen, J.N.** 1988. Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.* **263**: 9508-14.

**Baranova, I.P. y Egorov, N.S.** 1981. Nisin adsorption on substrate solids. *Antibiotiki*, **26**: 753-756.

**Barber, M., Elliot, G.J., Boroli, R.S., Green, B.N. Bycroft, B.W.** 1988. Confirmation of the structure of nisin and its major degradation products by FAB-MS and FAB-MS/MS. *Experientia* **44**: 266-270.

**Barber, R.S., Braude, R. y Hirsch, A.** 1952. Growth of pigs given skim milk soured with nisin-producing streptococci. *Nature*, **169**: 200.

**Barefoot, S.F. y Klaenhammer, T.R.** 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1808-1815.

**Barefoot, S.F. y Klaenhammer, T.R.** 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, lactacin B. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **26**: 328-334.

**Beach, A.S.** 1952. An agar diffusion method for the assay of nisin. *J. Gen. Microbiol.*, **6**: 60-63.

**Bell, R.G. y De Lacy, K.M.** 1985. The effect of nisin-sodium chloride interactions on the outgrowth of *Bacillus licheniformis* spores. *J. Appl. Bacteriol.*, **59**: 127-132.

**Bell, R.G. y De Lacy, K.M.** 1986. Factors influencing the determination of nisin in meat products. *J. Food Technol.*, **21**: 1-7.

**Benkerroum, N. y Sandine, W.E.** 1988. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.*, **71**: 3237-3245.

**Berridge, N.J.** 1952. Counter-current distribution of nisins. *Nature* **169**: 707-708.

**Berridge, N.J. y Barrett, J.** 1952. A rapid method for the turbidimetric assay of antibiotics. *J. Gen. Microbiol.*, **6**: 14-20.

**Berson, S.A., Yalow, R.S., Bauman, A., Rothschild, M.A. y Newerly, K.** 1956. Insulin-I<sup>131</sup> metabolism in human subjects. Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin-treated subjects. *J. Clin. Invest.*, **35**: 170-190.

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

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

**Bhunja, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. y Kalchayanand, N.** 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.* **70**: 25-30.

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

**Bierbaum, G. Götz, F., Peschel, A., Kupke, T., van de Kamp, M. y Sahl, H.G.** 1996. The biosynthesis of the lantibiotics epidermin, gallidermin, Pep5 and epilancin K7. *Anton. Leeuwen.* **69**: 119-127.

**Bierbaum, G. y Sahl, H.G.** 1985. Induction of autolysis of staphilococci by the basic peptide antibiotics Pep5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch. Microbiol.* **141**: 249-254.

**Bierbaum, G. y Sahl, H.G.** 1987. Autolytic system of *Staphylococcus simulans* 22: influence of cationic peptides on activity of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *J. Bacteriol.*, **169**: 5452-5458.

**Bierbaum, G. y Sahl, H.G.** 1991. Induction of autolysis of *Staphylococcus simulans* 22 by Pep5 and nisin and influence of the cationic peptides on the activity of the autolytic enzymes. En *Nisin and novel lantibiotics* pp. 386-396. Jung, G. y Sahl, H.-G.(eds.). Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.

**Biswas, S.R., Purbita, R., Johnson, M.C. y Ray, B.** 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 1265-1267.

**Blackburn, P. y Projan S.J.** 1994. Pharmaceutical bacteriocin combinations and methods for using the same. United States Patent N° 5.304.540. Applied Microbiology Inc., New York, USA.

**Blackburn, P., Polak, J., Gusik, S. y Rubino, S.D.** 1989. Nisin compositions for use as enhanced, broad range bacteriocins. International Patent N° PCT/US89/02525; international publication number W089/12399. Applied Microbiology Inc., New York, USA.

**Boulnois G.J., Paton, G.C. Mitchell, T.J. y Adrew, P.W.** 1991. Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxins of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, **5**: 2611-2616.

**Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-251.

**Briand, J.P., Muller, S. y van Regenmortel, M.H.V.** 1985. Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. *J. Immunol. Methods*, **78**: 59-69.

**British Standard.** 1974. Methods for the estimation and differentiation of nisin in processed cheese. BS 4020.

**Briz, S.H.** 1972. Algunos aspectos complementarios en la valoración de nisina residual en quesos fundidos. *Anal. Bromatol.*, **24**: 217-230.

**Broadbent, J.R. y Kondo, J.K.** 1991. Genetic construction of nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and analysis of a rapid method for conjugation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 517-524.

**Bromander, A., Holmgren, J. y Lycke, N.** 1991. Cholera toxin stimulates IL-1 production and enhances antigen presentation by macrophages in vitro. *J. Immunol.*, **146**: 2908-2914.

**Buckenhüskes, H. J.** 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**: 253-272.

**Buchman, G.W., Banerjee, S., Hansen, J.N.** 1988. Structure, expression and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.*, **263**: 16260-16266.

**Calderon, D. Collins-Thompson, D.L. y Usborne, W.R.** 1985. Shelf-life studies of vacuum packaged bacon treated with nisin. *J. Food Prot.*, **48**: 330-333.

**CEE (1983).** Comisión de la CEE , directiva **83/463/CEE**.

**Chu, F.S., Huang, X. y Maragos, C.M.** 1995. Production and characterization of anti-idiotypic and anti-anti-idiotypic antibodies against fumonisin B<sub>1</sub>. *J. Agric. Food Chem.*, **43**: 261-267.

**Cintas, L.M.** 1995. Caracterización bioquímica y genética parcial de la pediocina L50, una bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* L50 aislado de embutidos crudos curados. Tesis doctoral. Universidad Complutense. Madrid.

**Cintas, L.M., Rodríguez, J.M., Fernández, M.F., Sletten, K., Nes, I.F., Hernández, P. E. y Holo, H.** 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2643-2648.

**Claypool, L., Heinemann, B., Voris, L. y Stumbo, C.R.** 1966. Residence time of nisin in the oral cavity following consumption of chocolate milk containing nisin. *J. Dairy Sci.*, **49**: 314-316.

**Coates, M.E., Harrison, G.F., Kon, S.K., Mann, M.E. y Rose, C.D.** 1951. Effect of antibiotics and vitamin B12 on the growth of normal and "Animal Protein Factor" deficient chicks. *Proc. Biochemical Society*, xii-xiii.

**Coventry, M.J., Gordon, J. B., Alexander, M., Hickey, M.W. y Wan, J.** 1996. A food-grade process for isolation and partial purification of bacteriocins of lactic acid bacteria that uses diatomite calcium silicate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 1764-1769.

**Cox, G.A.** 1934. A simple method for the detecting of non-acid milk. *N. Z. J. Agric.*, **49**: 231-234.

**Cutter, C.N., y Siragusa, G.R.** 1995. Population reductions of Gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. *J. Food Prot.*, **58**: 977-983.

**Chan, W.C., Dodd, H.M., Horn, N. Maclean, K., Lian, L.-Y. Bycroft, B.W. Gasson, M.J. y Roberts, G.C.K.** 1996. Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: role of dehydroalanine 5. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 2966-2969.

**Chan, W.C., Leylan, M., Clarke, J., Lian, L.Y., Gassen, M.J. y Roberts, G. C. K.** 1996. Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: antibacterial activity of fragments of nisin. *FEBS Lett.* , 390: 129-132.

**Chan, W.C., Lian, L.Y., Bycroft, B. W.y Roberts, G.C.K.** 1989b. Confirmation of the structure of nisin by complete <sup>1</sup>H-NMR resonance assignment in aqueous and dimethyl sulphoxide solution. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 2359-2367.

**Chan, W.C., Roberts, G.C.K. y Bycroft, B.W.** 1993. Structure-activity relationships of nisin and subtilin. En: *Peptides 1992*. Schneider y Eberle, A. N. (eds.), pp 770-771. Escom science publishers, Leiden.

**Chan, W.C., Bycroft, B.W., Lian, L.Y. y Roberts, C.K.** 1989a. Isolation and characterization of two degradation products derived from the peptide antibiotic nisin. *FEBS Lett.*, **252**: 29.

**Chan, W.C., Dodd, H.M., Horn, N., Maclean, K., Lian, L.-Y., Bycroft, B.W., Gasson, M.J. y Roberts, G.C.K.** 1996. Structure-Activity relationships in the peptide antibiotic nisin: role of dehydroalanine 5. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 2966-2969.

**Cheeseman G.C. y Berridge, N.J.** 1957. An improved method of preparing nisin. *Biochem. J.*, **65**: 603-608.

**Cheeseman G.C. y Berridge, N.J.** 1959. Observations on the molecular weight and chemical composition of nisin A. *Biochem. J.*, **71**: 185-194.

**Chevalier, R.J., Fournaud, J., Levebre, E., Mocquot, G.** 1957. Mise en evidence des streptocoques lactiques inhibiteurs et stimulants dans le lait et les fromages. *Ann. Technol. Agric.* **2**: 117-137.

**Chung, Y.J. y Hansen, J.N.** 1992. Determination of the sequence of spaE and identification of a promoter in the subtilin (spa) operon in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **174**: 6699-6702.

**Davey, G.P. y Pearce, L.** 1982. Production of diplococcin by *Streptococcus cremoris* and its transfer to nonproducing group N streptococci. En *Microbiology*, Schlessinger S. (ed.), pp. 221-224. American Society for Microbiology, Washington D.C.

**Davey, G.P. y Richardson, B.C.** 1981. Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**: 84-89.

**de Vos W. M., Kuipers, O. P., Van der Meer, J. R. y Siezen, R. J.** 1995. Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, **17**: 427-437.

**de Vos W. M., Mulders, J. W. M., Siezen, R. J. Hugenholtz, J. Kuipers, O. P. 1993.** Properties of nisin Z and distribution of its gene, nisZ in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 213-218.

**de Vuyst, L. 1994.** Nisin production variability between natural *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains. *Biotech. Lett.*, **16**: 287-292.

**de Vuyst, L. 1995.** Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. *J. Appl. Bacteriol.*, **78**: 28-33.

**de Vuyst, L. y Vandame, E.J. 1993.** Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations using a complex medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**: 17-22.

**de Vuyst, L. y Vandame, E.J. 1994.** Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. En *Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and application*, De Vuyst, L. y Vandame, E. J. (eds.) pp 91-142. Chapman & Hall, Ltd. Londres.

**de Vuyst, L. y Vandame, E.J. 1992.** Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 571-578.

**de Vuyst, L. y Vandame, E.J. 1994.** Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. En *Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and application*. De Vuyst, L. y Vandame, E. J. (eds.), pp 91-142. Chapman & Hall, Ltd. Londres.

**de Ruiter, P.G.G.A., Kuipers, O.P. y de Vos, W.M. 1996.** Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 3662-3667.

**Delves-Broughton, J. 1990.** Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology*, **44**: 100-117.

**Delves-Broughton, J. y Williams, G.C. 1993.** Nisin. En: *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. Macrae, R., Robinson, R.K. y Sadler, M.J. (eds ) pp. 3234-3240. Academic Press, Londres.

- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.E. y Hugenholtz, J.** 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Anton. Leeuwen.* **69**: 193-202.
- Deshpande, S.S.** 1996. *Enzyme Immunoassays. From Concept to Product Development.* Chapman & Hall, Ltd. Nueva York.
- Dobrzanski, W.T., Bardowski, J., Kozak, W. y Zajdel, J.** 1982. Lactostrepcins: bacteriocins of lactic streptococci. En *Microbiology-1982*, Schlessinger, D. (ed.), pp. 225-229. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Dodd, H.M., Horn, N., Chan, W.C., Giffard, C.J., Bycroft, B.W., Roberts, G.C.K. y Gasson, M.J.** 1996a. Molecular analysis of the regulation of nisin immunity. *Microbiology*, **142**: 2385-2392.
- Dodd, H.M., Horn, N., Giffard, C.J., y Gasson, M.J.** 1996b. A gene replacement strategy for egicering nisin. *Microbiology*, **142**: 47-55.
- Dodd, H.M., Horn, N., y Gasson, M.J.** 1990. Analysis of the genetic determinant for the production of the peptide antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.*, **136**: 555-566.
- Dodd, H.M., Horn, N. Hao, Z. y Gasson, M. J.** 1992. A lactococcal expression system for engineered nisins. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3683-3693.
- Dodd, H.M. y Gasson, M.J.** 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. En *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, Gasson, M.J. y de Vos, W.M. (eds.), pp. 211-251. Blackie, Londres.
- Donkersloot, J.A. y Thompson, J.** 1990. Simultaneous loss of N<sup>5</sup>-(carboxyethyl)ornithine synthase, nisin production, and sucrose fermenting ability by *Lactococcus lactis* K1. *J. Bacteriol.*, **172**: 4122-4126.
- Driessen, A.J.M., van den Hooven, H.W., Kuiper, W. van de Kamp, M. Sahl, H.-G., Konings, R.N.H. y Konings, W.N.** 1995. Mechanistics studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry* **34**, 1606-1614.

- Duan, K., Harvey, M.L. Liu, C.-Q. y Dunn, N.W.** 1996. Identification and characterization of a mobilizing plasmid, pND300, in *Lactococcus lactis* M189 and its encoded nisin resistance determinant. *J. Appl. Bacteriol.*, **81**: 493-500.
- Dykes, G.A.** 1995. Bacteriocins. Ecological and evolutionary significance. *Trends Ecol. Evol.*, **10**: 186-189.
- Dzung, D.B., Nissen-Meyer, J., Havarstein, L.S. y Nes, I.F.** 1993. Characterization of the bacteriocin plantaricin A from *Lactobacillus plantarum* C11: purification of the bacteriocin, cloning and sequencing of its gene. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 143.
- Egorov, N.S., Baranova, I.P. y Kozlova, Y.I.** 1971. Optimization of nutrient medium composition for the production of the antibiotic nisin by *Streptococcus lactis*. *Mikrobiologiya*, **40**: 993-998.
- Egorov, N.S., Baranova, I.P. y Kozlova, Y.I.** 1979. Procedure for isolating nisin from *Streptococcus lactis*. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, **15**: 712-714.
- Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z. Kiesau, P. Siegers, K., Hammelman, M. y Entian, K.-D** 1994. Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 814-825.
- Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Hammelman, M. y Entian, K.D.** 1992. Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane location of the NisB protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3730-3743.
- Entian, K.D. y De Vos, W.M.** 1996. Genetics of subtilin and nisin biosyntheses. *Anton. Leeuwen.* **69**: 109-117.
- Falahee, M.B. y Adams, M.R.** 1992. Cross-reactivity of bacteriocins from lactic acid bacteria and lantibiotics in a nisin bioassay and ELISA. *Lett. in Appl. Microbiol.*, **15**: 214-216.
- Falahee, M.B., Adams, M.R., Dale, J.W. y Morris, B.A.** 1990. An enzyme immunoassay for nisin. *Int. J. Food Sci. and Technol.*, **25**: 590-595.

**Falahee, M.B., y Adams, M.R.** 1992. Cross reactivity of bacteriocins from lactic acid bacteria and lantibiotics in a nisin bioassay and ELISA. *Lett. Appl. Microbiol.* **15**: 214-216.

**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.

**Falconer, R.** 1952. Brit. Pat. 683423.

**FAO/WHO Expert Committee on food Additives.** 1969. Specifications for identity and purity of some antibiotics. 12th report. *WHO Technical Reports Series*, N° 430.

**Fath, M.J. y Kolter, R.** 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.*, **57**: 995-1017.

**Feeney, R. E., Garibaldi, J. A. y Humpreys, E. M.** 1948. Nutritional studies on subtilin formation by *Bacillus subtilis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **17**: 435-445.

**Fowler, G.G., Jarvis, B. y Tramer, J.** 1975. The assay of nisin in foods. En *Some methods for microbiological assay*. R. G. Board y D. W. Lovelock (eds.), pp. 91-105. Academic Press, Londres.

**Fowler, G.G.; Jarvis, B.; Tramer, J.** 1975. The assay of nisin in foods. *Society for Applied Bacteriology, Technical Series*, **8**: 91-105.

**Frazer, A.C., Sharott, M. y Hickman, J.R.** 1962. The biological effects of food additives. I nisin. *J. Sci. Food Agric.*, **13**: 32-42.

**Fredenhagen, A., Marki, F., Fendrich, G., Marki, W. y Gruner, J.** 1990. Duramycins B and C, two new lanthinine containing antibiotics as inhibitors of phospholipase A2. Structural revision of duramycin and cinnamycin. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **43**: 1403-1412.

**Fremeux, C., Anh, C. y Klaenhammer, T.R.** 1993. Molecular analyses of the lactacin F operon. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 3906-3915.

**Friedmann, R. y Beach, S. A.** 1950. New methods of assay for the antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.* **5**: V.

**Friedmann, R. y Epstein, C.** 1951. The assay of the antibiotic nisin by means of a reductase (resazurin) test. *J. Gen. Microbiol.*, **5**: 830-839.

**Froseth, B. R. y McKay, L.L.** 1991. Molecular characterization of the nisin resistance region of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* DRC3. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 804-811.

**Fuchs, P.G., Zajdel, J., Dobrzanski, W.T.** 1975. Possible plasmid nature of the determinant for production of the antibiotic nisin in some strains of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.*, **88**: 189-192.

**Fukase, K. Kitazawa, M., Sano, A., Shimbo, K., Fujita, H., Horimoto, S., Wakamiya, T. y Shiba T.** 1988. Total synthesis of peptide antibiotic nisin. *Tetr. Lett.*, **29**: 795-798.

**Galfrè, G., Howe, S.C., Milstein, C., Butcher, G.W. y Howard, J.C.** 1977. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature*, **266**: 550-552.

**Galfre, G.; Milstein, C.** 1981. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods in Enzymol.*, **73**: 3-46.

**Gao, F.H. , Abee, T. y Konings, W.N.** 1991. Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c oxidase-containing proteoliposomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2164-2170.

**Garcia-Garcera, M.J., Elferink, M.G.L., Driessen, A.J.M. y Konings, W.N.** 1993. In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin. Role of proton motive force and lipid composition. *Eur. J. Biochem.*, **212**: 417-422.

**Gasson, M.G.** 1983. Plasmid components of *Streptococcus lactis* NCDO712 and other lactic streptococci after protoplast induced curing. *J. Bacteriol.*, **154**: 1-9.

**Gasson, M.J.** 1984. Transfer of sucrose fermenting ability, nisin resistance and nisin production in *Streptococcus lactis* 712. *FEMS Microbiol. Lett.*, **21**: 7-10.

**Geis, A., Singh, J. y Teuber, M.** 1983. Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**: 205-211.

**Gillmore, M.S., Segarra, R.A., Booth, M.C., Bogie, C.P., Hall, L.R. y Clewels, D.B.** 1994. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAS1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* **176**: 7334-7335.

**Gireesh, T., Davidson, B.E. y Hillier, A.J.** 1992. Conjugal transfer in *Lactococcus lactis* of a 68-kilobase-pair chromosomal fragment containing the structural gene for the peptide bacteriocin nisin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 1670-1676.

**Goding, J.W.** 1980. Antibody production by hybridomas. *J. Immunol. Methods*, **39**: 285-308.

**Goding, J.W.** 1993. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press, Londres.

**Gonzalez, C.F. y Kunka, B.S.** 1985. Transfer of sucrose-fermenting ability and nisin production phenotype among lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**: 627-633.

**Goodman, M., Palmer, D.E., Mierke, D., Ro, S., Nunami, K., Wakamiya, T., Fukase, K., Horimoto, S., Kitazawa, M., Fujita, H., Kubo, A., y Shiba, T.** 1991. Conformations of nisin and its fragments using synthesis, NMR and computer simulations. En *Nisin and Novel Lantibiotics*, Jung G. y Sahl, H. G. (ed.), pp. 59-75. ESCOM Publishers B. V., Leiden.

**Gould, G.W.** 1992. Ecosystem approaches to food preservation. *J. Appl. Bacteriol.* **73** (Supplement): 58S-68S.

**Gratia, A.** 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C. R. Soc. Biol. Fil.*, **93**: 1040-1041.

**Gross E. y Morell, J.L.** 1967. The presence of dehydroalanine in the antibiotic nisin and its relationship to activity. *J. Am. Chem. Soc.* **89**: 2791-2792.

**Gross E. y Morell, J.L.** 1968. The number and nature of  $\alpha,\beta$ -unsaturated amino acids in nisin. *FEBS Lett.*, **2**: 61-64.

**Gross E. y Morell, J.L.** 1970. Nisin. The assignment of sulfide bridges of b-methylsantonine to a novel bicyclic structure of identical ring size. *J. Am. chem. Soc.*, **93**: 4634-4635.

**Gross E. y Morell, J.L.** 1971. The structure of nisin. *J. Am. Chem.Soc.*, **93**: 4634-4635.

**Gross, E. y Kiltz, H.H.** 1973. The number and nature of  $\alpha,\beta$ -unsaturated amino acids in subtilin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **50**: 559-565.

**Gross, E., Morell, J.L., y Craig, L.C.** 1969. Dehydroalanyllysine: identical COOH-terminal structures in the peptide antibiotics nisin and subtilin. *Biochemistry*, **62**: 952-956.

**Gudkov, A.V., Lubimova, L.A., Trofimova, T.I., Sileva, M.N. y Litvinova, M.N.** 1973a. Determination of nisin activity by resazurin method. *Antibiotiki*, **18**: 346-350.

**Gudkov, A.V., Trofimova, T.I., Dolidze, G.G., Lynbimova, L.A., Sileva, M.N. y Blagushnia, R.F.** 1993b. Comparison of nisin preparations of English, Polish and Soviet manufacture. *Antibiotiki*, **18**: 162-165.

**Gutowski-Eckel, Z., Klein, C., Siegers, K., Bohm, K., Hammelmann, M. y Entian, K.D.** 1994. Growth phase-dependent regulation ad membrane localizaton of SpaB, a protein involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 1-11.

**Hall, R.H.** 1963. The production opf nisin. Patente 916, 351.

**Hall, R.H.** 1966. Nisin and food preservation. *Proc. Biochem.*, **1**: 461-464.

**Hara, S. Yakazu, K., Nakakawaji, K., Takenchi, T., Kobayashi, T., Sata, M. Imai, Z. y Shibuya, T.** 1962. An investigation of toxicity of nisin with a particular reference to experimental studies of its oral administration and influences on digestive enzymes. *Tokyo Med. Univ. J.*, **20**: 175.

**Harlow, E. y Lane, D.** 1988. *Antibodies: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.

**Harris, L.J., Fleming, H.P., Klaenhammer, H.R.** 1992a. Characterization of two nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from a commercial sauerkraut fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1477-1483.

**Harris, L.J., Fleming, H.P., Klaenhammer, H.R.** 1992b. Developments in nisin research. *Food Res. Int.* **25**: 57-66.

**Hawley, H.B.** 1962. The uses of antibiotics in canning. En *Antibiotics in Agriculture*, Woodbine, M. (ed.), pp. 272-288. Butterworth, Londres.

**Hawley, H.B. y Hall, R.H.** 1957. The production of nisin. Patente 844, 782.

**Healy, M.J.R.** 1972. Statistical analysis of radioimmunoassay data. *Biochem. J.*, **130**: 207-210.

**Hebert, G.A.; Pelham, P.L.; Pittman, B.** 1973. Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse and goat antisera. *Appl. Microbiol.*, **25**: 26-36.

**Heinemann, B., Voris, L. y Stumbo, C.R.** 1965. Use of nisin in processing food products. *Food Technol.*, **19**: 592-596.

**Heinemann, B., y Williams, R.** 1966. The inactivation of nisin by pancreatin. *J. Dairy Sci.*, **49**: 312-313.

**Henning, S. Metz, R. y Hammes, W.P.** 1986b. New aspects for the application of nisin to foods based on its mode of action. *Int. J. Food Microbiol.*, **3**: 135-141.

**Henning, S., Metz, R. y Hammes, W.P.** 1986a. Studies on the mode of action of nisin. *Int. J. Food Microbiol.*, **3**: 121-134.

**Higgins, C.F.** 1992. ABC transporters : from microorganism to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **8**: 67-113.

**Hirsch, A.** 1950. The assay of the antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.*, **4**: 70-83.

**Hirsch, A.** 1951. Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.*, **5**: 208-221.

**Hirsch, A.** 1952. The evolution of the lactic streptococci. *J. Dairy Res.*, **19**: 290-293.

**Hirsch, A.** 1954. Some polypeptide antibiotics. *J. Appl. Bacteriol.*, **17**: 108-115.

**Hirsch, A. Grimsted, E., Chapman, H.R. y Mattick, A.T.R.** 1951. A note on the inhibition of an anaerobic spore former in Swiss-type cheese by a nisin producing *Streptococcus*. *J. Dairy Res.*, **18**: 205.

**Hirsch, A. y Grinsted, E.** 1951. The differentiation of the lactic streptococci and their antibiotics. *J. Dairy Res.*, **18**: 198-204.

**Hirsch, A. y Grinsted, E.** 1954. Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore-formers from cheese, with observations on the effect of nisin. *J. Dairy Res.*, **21**: 101-110.

**Holck, A., Axelsson, L., Hühne, K. y Kröckel, L.** 1994. Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb674. *FEMS Microbiol. Lett.* **115**: 143-150.

**Holck, A.L., Axelsson, S.E., Birkeland, T., Aukrust, T. y Blom, H.** 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin form *Lactobacillus sake* LB706. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2715-2720.

**Holo, H. Nissen, O. y Ness, I.F.** 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* , **173**: 3879-3887.

**Holzappel, W.H., Geisen, R. y Schillinger U.** 1995. Biological preservation of food with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* **24**: 343-362.

**Holzappel, W.H., Geisen, R. y Schillinger U.** 1995. Biological preservation of food with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* **24**: 343-362.

**Hoover, D.G. y Steenson, L.R.** 1993. *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Academic Press, Inc., San Diego, California.

**Horn, N., Swindell, S., Dodd, H.M. y Gasson, M.J.** 1991. Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 129-135.

**Howell, T.H., Fiorellini, J.P., Blackburn, P., Projan, S.J., de la Harpe, J. y Williams, R.C.** 1993. The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagle dogs. *J. Clin. Periodont.*, **20**: 335-339.

**Huot, E., Barrena-Gonzalez, C. y Petitdemage, H.** 1996. Tween 80 effect on bacteriocin synthesis by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46. *Lett. in Appl. Microbiol.*, **22**: 307-310.

**Hurst, A.** 1966a. Biosynthesis of the antibiotic nisin by whole *Streptococcus lactis* organisms. *J. Gen. Microbiol.*, **44**: 209-220.

**Hurst, A.** 1966b. Biosynthesis of the antibiotic nisin and other basic peptides by *Streptococcus lactis* grown in batch culture. *J. Gen. Microbiol.*, **45**: 503-513.

**Hurst, A.** 1972. Interactions of food starter cultures and food-borne pathogens: the antagonism between *Streptococcus lactis* and sporeforming microbes. *J. Milk Food Technol.*, **35**: 418-423.

**Hurst, A.** 1978. Nisin: its preservative effect and function in the growth cycle of the producer organism. En *Streptococci*, Skinner F.A. y Quesnel, L.B. (eds.), pp. 297-314. Academic Press, Londres.

**Hurst, A.** 1981. Nisin. En: *Advances in Applied Microbiology*, Perlman, D. y Laskin, A.I. (eds.), pp 85-123. Academic Press, Inc., Nueva York.

## Bibliografía

- Hurst, A.** 1983. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. En *Antimicrobials in Foods*, Branen, A.L. y Davidson, P.M. (eds.), pp. 327-351. Marcel Dekker, Nueva York.
- Hynes, W.L., Friend, V.L., y Ferretti, J.J.** 1993. Cloning of the gene encoding streptococcin A-FF22, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus pyogenes*, and determination of its nucleotide sequence. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 1969-1971.
- Immonen, T. Ye, S., Ra, R., Qiao, M., Paulin, L. y Saris, P.E.J.** 1995. The codon usage of the nisZ operon in *Lactococcus lactis* N8 suggests a non-lactococcal origin of the conjugative nisin-sucrose transposon. *DNA Sequence*, **5**: 203-218.
- Ingram, L.** 1969. Synthesis of the antibiotic nisin: formation of lanthionine and  $\beta$ -methyl lanthionine. *Biochim. Biophys. Acta*, **184**: 216-219.
- Ingram, L.** 1970. A ribosome mechanism for synthesis of peptides related to nisin. *Biochim. Biophys. Acta*, **224**: 263-265.
- Ingram, L., Tombs, M.P. y Hurst, A.** 1967. Mobility-molecular weight relationships of small proteins and peptides in acrylamide-gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **20**: 24-29.
- Jack, R. Bierbaum, G., Heidrich, C. y Sahl, H.G.** 1995. The genetics of lantibiotic biosynthesis. *BioEssays*, **17**: 793-802.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. y Ray, B.** 1995. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microb. Rev.*, **59**: 171-200.
- Jack, R.W., Carne, A., Metzger, J., Stefanović, S., Sahl, H.G., Jung, G. y Tagg, J.R.** 1994. Elucidation of the structure of SA-FF22, a lanthionine-containing antibacterial peptide produced by *Streptococcus pyogenes* strain FF22. *Eur. J. Biochem.*, **220**: 455-462.
- Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A. y Wollman, E.L.** 1953. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur*, **84**: 222-224.
- Jarvis, B.** 1967. Resistance to nisin and production of nisin-inactivating enzymes by several *Bacillus* species. *J. Gen. Microbiol.*, **47**: 33-48.

**Jarvis, B.** 1970. Enzymatic reduction of the C-terminal dehydroalanyllysine sequence of nisin. *Biochem. J.*, **119**: 56.

**Jarvis, B. y Farr, J.** 1971. Partial purification, specificity and mechanism of action of the nisin-inactivating enzyme from *Bacillus cereus*. *Biochem. Biophys. Acta* **227**: 232-240.

**Jarvis, B. y Mahoney, R.R.** 1969. Inactivation of nisin by alpha-chymotrypsin. *J. Dairy Sci.*, **52**: 1448-1450.

**Jarvis, B., Jeffcoat, J. y Cheeseman, G.C.** 1968. Molecular weight distribution of nisin. *Biochem. Biophys. Acta*, **168**: 153.

**Jiménez-Díaz, R., Ríos-Sánchez, R.M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J.L. y Piard, J.C.** 1993. Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. microbiol.*, **59**: 1416-1424.

**Joerger, C. y Klaenhammer, T.R.** 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.*, **167**: 439-446.

**Jones, L.W.** 1974. Effect of butterfat on inhibition of *Staphylococcus aureus* by nisin. *Can. J. Microbiol.*, **20**: 1257-1260.

**Jung, D.S., Bodyfelt, F.W. y Daeschel, M.A.** 1992. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *J. Dairy Sci.*, **75**: 387-393.

**Jung, G.** 1991. Lantibiotics: a survey. En *Nisin and Novel Lantibiotics*, Jung G. y Sahl, H. G. (ed.), pp 1-34. ESCOM Publishers B. V., Leiden.

**Jung, G. y Sahl, H.G.** 1991. *Nisin and Novel Lantibiotics*. ESCOM Publishers B.V., Leiden, The Netherlands.

**Kalchayanand, N. Sikes, T., Dunne, C.P. y Ray, B.** 1994. Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 4174-4177.

**Kaletta , C. y Entian, K.** 1989. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.*, **171**: 1597-1601.

**Kaletta , C., Entian, K.D., Kellner, R., Jung, G. Reis, M.** 1989. Pep5, , a new lantibiotic: structural gene isolation and prepeptide sequence. *Arch. Microbiol.* **152**: 16-19.

**Kaletta, C. Entian, K.D.y Jung, G.** 1991a. Prepeptide sequence of cinnamycin (Ro 09-0198): the first structural gene of a duramycin-type lantibiotic. *Eur. J. Biochem.* **199**: 411-415.

**Kaletta, C. y Entian, K.D.** 1989. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.* **171**: 1597-1601.

**Kaletta, C., Klein, C., Schnell, N. y Entian, K.D.** 1991b. An operon-like structure of genes involved in subtilin biosynthesis. En *Nisin and Novel Lantibiotics*, JungG. y Sahl, H.G. (eds.), pp. 309-319. ESCOM Publishers B. V., Leiden.

**Kalra, M.S., Dudani, A.T. y Laximinarayana, H.** 1973. Tetrazolium reduction method fr assay of nisin. *Ind. J. Dairy Sci.*, **26**: 137-138.

**Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B. y Rajewsy, K.** 1979. A new mouse myeloma cell line wich has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody insecreting hybrid cell lines. *J. Immunol.*, **123**: 1548-1550.

**Kellner, R., Jung, G., Hörner, T., Zähler, H., Schnell, N., Entian, K. D. y Götz, F.** 1988. Gallidermin: a new lanthionine-containing polypeptide antibiotic. *Eur. J. Biochem.*, **177**: 53-59.

**Kettenring, J. K., Malabarba, A., Vekey, K. y Cavalleri, B.** 1990. Sequence determination of actagardine, a novel lantibiotic, by homonuclear 2D NMR spectroscopy. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **43**: 1082-1088.

**Klaenhammer, T.R. y Sanozky, R.B.** 1985. Conjugal transfer from *Streptococcus lactis* ME2 of plasmids encoding phage resistance, nisin resistance and lactose-fermenting ability: evidence for a high frequency conjugative plasmid responsible for abortive infection of virulent bacteriophage. *J. Gen Microbiol.*, **131**: 1531-1541.

**Klaenhammer, T.R.** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, **70**: 337-349.

**Klaenhammer, T.R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**: 39-86.

**Klein, C. y Etian, K.D.** 1994. Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 2793-2801.

**Klein, C., Kaletta, C., Schell, N. y Entian, K.D.** 1992. Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 132-142.

**Klein, C., Kaletta, y Entian, K.D.** 1993. Biosynthesis of lantibiotic subtilin is regulated by a histidin kiase/response regulator system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 296-303.

**Knox, J. R. y Keck, P.C.** 1973. Conformation and absolute configuration of  $\beta$ -methyllantionine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**: 567-571.

**Knox, J.R. y Keck, P.C.** 1975.  $\beta$ -Methyllantionine: a sulfur amino acid in subtilin and nisin antibiotics. *Acta Cryst.* **31**: 2698-2700.

**Köhler, G , Howe, S.C. y Milstein, C.** 1976. Fusion between immunoglobulin-secreting and non-secreting myeloma cell lines. *Eur. J. Immunol.*, **6**: 292-295.

**Köhler, G y Milstein, C.** 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**: 495-497.

**Koninsky, J.** 1982. Colicins and other bacteriocins with established mode of action. *Ann. Rev. Microbiol.*, **36**: 125-144.

**Kordel, M. y Sahl, H.G.** 1986. Susceptibility of a bacterial eukariotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep5 and nisin. *FEMS Microbiol. Lett.* **34**: 139-144.

**Kordel, M., Schüller, F. y Sahl, H.G.** 1989. Interaction of the pore-forming, peptide antibiotic Pep5, nisin and subtilin with non-energized liposomes. *FEBS Lett.*, **224**: 99-102.

**Kozak, W., Bardowski, J. y Dobrzanski, W.** 1978. Lactostrepcins-acid bacteriocins produced by lactic streptococci. *J. Dairy Res.*, **45**: 247-257.

**Kozak, W., Rajchert-Trzpil, M., Dobrzanski, W.T.** 1973. Lysogeny in lactic streptococci producing and not producing nisin. *Appl. Microbiol.*, **25**: 305-308.

**Kozak, W., Rajchert-Trzpil, M., Dobrzanski, W.T.** 1974. The effect of proflavin, ethidium bromide and elevated temperature on the appearance of nisin-negative clones in nisin-producing strains of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.*, **83**: 295-302.

**Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., de Ruyter, P.G.G.A., Luesink, E.J. y de Vos, W.M.** 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **270**: 27299-27304.

**Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., Siezen, R.J., y de Vos, W.M.** 1993a. Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPRK* of *Lactococcus lactis* and evidence for the involvement of expression of the *nisA* and *nisA* genes in product immunity. *Eur. J. Biochem.*, **216**: 281-291.

**Kuipers, O.P., de Ruyter, P.G.G.A., Kleerebezem, M. y de Vos, W.M.** 1997. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends in Biotechnol.*, **15**: 135-140.

**Kuipers, O.P., Bierbaum, G., Ottelwälder, G., Dodd, H.M., Horn, N., Metzger, J. Kupke, T., Gnau, V., Bongers, R., Van den Bogaard, P., Kusters, H., Rollema, H.S., De Vos, W.M., Siezen, R.J., Jung, G., Götz, F., Sahl, H.G. y Gasson, M.J.** 1996. Protein engineering of lantibiotics. *Anton. Leeuwen.*, **69**: 161-169.

**Kuipers, O.P., Rollema, H.S., de Vos, W.M. y Siezen, R.J.** 1993b. Biosynthesis and secretion of a precursor of nisin Z by *Lactococcus lactis*, directed by the leader peptide of the homologous lantibiotic subtilin from *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.* **330**: 23-27.

**Kuipers, O.P., Rollema, H.S., Yap, W.M.G.J., Boot, H.J., Siezen, R.J. y de Vos, W.M.** 1992. Engineering dehydrated amino acid residues in the antimicrobial peptide nisin. *J. Biol. Chem.*, **267**: 24340-24346.

**Kupke, T. y Götz, F.** 1996. Post-translational modification of lantibiotics. *Anton. Leeuwen.*, **69**: 139-150.

**Kupke, T., Stevanovic, S., Sahl, H.G. y Götz, F.** 1992. Purification and characterization of EpiD, a flavoprotein involved in the biosynthesis of the lantibiotic epidermin. *J. Bacteriol.* **174**: 5354-5361.

**Kurpisz, M., S.K. Gupta, D.L. Fulgham, y N.J. Alexander.** 1988. Production of large amounts of mouse polyclonal antisera. *J. Immunol. Methods*, **115**: 195-198.

**Landsteiner, K.** 1945. *The Specificity of Serological Reactions*. Harvard University Press, Boston, MA.

**Leblanc, D.J., Crow, V.L. y Lee, L.N.** 1980. Plasmid mediated carbohydrate catabolic enzymes among strains of *Streptococcus lactis*. En *Plasmids and Transposons. Environmental Effects and Maintenance Mechanisms*, pp. 31-41. Stuttard, C. y Rozee, K.R. (eds.). Academic Press, New York.

**Lewus, C.B., Su, S. y Moteville, T.J.** 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc parameseteoides* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 143-149.

**Lian, L.Y., Chan, W.C. Morley, S.D., Roberts, G.C.K., Bycroft, B.W. y Jackson, D.** 1992. Solution structures of nisin A and its two degradation products determined by NMR. *Biochem. J.* **283**: 413-420.

**Lian, L.Y., Chan, W.C. Morley, S.D., Roberts, G.C., Bycroft, B.W. y Jackson, D.1991.** NMR studies of the solution structure of nisin A and related peptides. En *Nisin and Novel Lantibiotics*, Jung G. y Sahl, H. G. (ed.), pp.43-58. ESCOM Publishers B. V., Leiden.

**Liang, X., Lamm, M.E. y Nedrud, J.G.** 1989. Cholera toxin as a mucosal adjuvant. Glutaraldehyde treatment dissociates adjuvanticity from toxicity. *J. Immunol.*, **143**: 484-490.

**Lipinska, E.** 1977. Nisin and its applications. En *Antibiotics and antibiosis in agriculture*, Woodbine, M. (ed.), pp 103-130. Butterworth, Londres.

**Liu, W. y Hansen, J.N.** 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 2551-2558.

**Liu, W. y Hansen, J.N.** 1992. Enhancement of the chemical and antimicrobial properties of subtilin by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **267**: 25078-25085.

**Liu, W. y Hansen, J.N.** 1993. The antimicrobial effect of a structural variant of subtilin against outgrowing *Bacillus cereus* T spores and vegetative cells occurs by different mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 648-651.

**Lycke, N. y Holmgren, J.** 1986. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune response to orally presented antigens. *Immunol.*, **59**: 301-308.

**Lycke, N. y Holmgren, J.** 1987. Long-term cholera antitoxin memory in the gut can be triggered to antibody formation associated with protection within hours of an oral challenge immunization. *Scan. J. Immunol.*, **2**: 407-412.

**Marteau, P. y Rambaud, J.C.** 1993. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microb. Rev.* **12**: 207-220.

**Martínez, M.I., Rodríguez, J.M., Suárez, A., Martínez, J.M., Azcona, J.I. y Hernández, P.E.** 1996. Generation of polyclonal antibodies against a chemically synthesized N-terminal fragment of the bacteriocin pediocin PA-1. *Letters in Appl. Microbiol.* **24**: 488-492.

- Marugg, J.D., González, C.F., Kunka, B.S., Ledebøer, A.M., Pucci, M.J., Toonen, M.Y., Wlaker, S.A., Zoetmulder, L.C.M. y Vanderberg, P.A.** 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2360-2367.
- Mattick, A.T.R. y Hirsch, A.** 1944. A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. *Nature* **154**: 551-552.
- Mattick, A.T.R. y Hirsch, A.** 1947. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet* **2**: 5-7.
- McClintock, M., Serres, L. Marzolf, J.J., Hirsch, A. y Mocquot G.** 1952. Action inhibitrice des streptocoques producteurs de nisine sur le developpement des sporules anaerobies dans le fromage de Gruyère fondue. *J. Dairy Res.*, **19**: 187-193.
- McClintock, M., Serres, L., Marzolf, J.J., Hirsch, A. y Mocquot, G.** 1953. Action inhibitrice des estreptocoques producteurs de nisine sur de développement des sporulés anáerobies dans le fromage de Gruyère fondu. *J. Dairy Res.*, **19**: 187-193.
- McKay, L.L.** 1983. Functional properties of plasmid in lactic streptococci. *Anton. Leeuwen.*, **49**: 259-274.
- McKay, L.L. y Baldwin, K.A.** 1984. Conjugative 50-megadalton plasmid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* DRC3 is associated with resistance to nisin and bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**: 68-74.
- McKay, L.L. y Baldwin, K.A.** 1990. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **87**: 3-14.
- Meanwell, L.J.** 1943. The influence of raw milkquality on Slowness in cheesemaking. *Proc. Soc. Agr. Bacteriol.*, **19**.
- Metchnikoff.** 1907. The prolongation of life. Optimistic studies. William Heinemann. Londres.
- Meyer, C., Bierbaum, G., Heidrich, C., Reis, M., Süling, J., Iglesias-Wind, M., Kempter, C., Molitor, E. y Sahl, H.G.** 1995. Nucleotide sequence

of the lantibiotic Pep5 biosynthetic gene cluster and functional analysis of PepP ad PepC. Evidence for a role of PepC in thioether formation. *Eur. J. Biochem.*, **232**: 478-489.

**Mocquot, G. y Lefebvre, E.** 1956. A simple procedure to detect nisin in cheese. *J. Appl. Bacteriol.*, **19**: 322-323.

**Moll, G.N., Roberts, G.C.K., Konings, W N. y Driessen, A.J.M.** 1996. Mechanism of lantibiotic-induced pore-formation. *Anton. Leeuwen.*, **69**: 185-191.

**Monticello, D.J.** 1989. Control of microbial growth with nisin/lisozyme formulations. Miles Inc., Elkhart, Indiana. Patente Europea de Aplicación Nº: 0374-823.

**Morell, J.L., y Gross, E.** 1973. Configuration of the b-carbon atoms of the b-methylantionine residues in nisin. *J. Am. Chem. Soc.* **95**: 6480-6481.

**Morris, S.L., Walsh, R.C. y Hansen, J.N.** 1984. Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *J. Biol. Chem.*, **259**: 13590-13594.

**Mørtvedt, C. y Nes, F.I.** 1990. Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus sake* strain. *J. Gen. Microbiol.*, **136**: 1601- 1607.

**Mørtvedt-Abildgaard, C.I., Nissen-Meyer, J., Jelle, B., Grenov, B., Skaugen, M. y Nes, I.F.** 1995. Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 175-179.

**Mossel D.A.A. y Struijk, C.B.** 1991. Public health implication of refrigerated pasteurized ("sous vide") foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **13**: 187-206.

**Msadek, T. Kunnst, F. y Rapoport, G.** 1993. Two component regulatory systems. En *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*, Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. y Losick, R. (eds.), pp. 729-746. American Society of Microbiology, Washington D.C.

**Mulders, J.W.M., Boerrigter, I.J. Rollema, H.S. Siezen, R.J. y de Vos, W.M.** 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.* **201**: 581-584.

**Muriana, P.M. y Klaenhammer T.R.** 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 114-121.

**Muriana, P.M. y Luchansky, J.B.** 1993. Biochemical methods for purification of bacteriocins. En *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Hoover, D.G. y Steenson, L.R. (eds.), pp. 41-61. Academic Press, Inc., San Diego, California.

**Nakane, P.K., y A. Kawaoi.** 1974. Peroxidase-labeled antibody: a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, **22**: 1084-1091.

**Nes, I. F. y Tagg, J.R.** 1996. Novel lantibiotics and their pre-peptides. *Anton. Leeuwen.*, **69**: 89-97.

**Newton, G.G.F., Abraham, E.P. y Berridge, N.J.** 1953. Sulphur-containing amino acids of nisin. *Nature*, **171**: 606.

**Nieto-Lozano, J.C., Nissen-Meyer, J., Sletten, K., Peláez, C. y Nes, I. F.** 1990. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Gen. Microbiol.*, **138**: 1-6.

**Nissen-Meyer, J. Harvastein, L.S., Holo, H., Sletten, K. y Nes, I.F.** 1993. Association of the lactococcin A immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immune factor. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1503-1509.

**Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K., Pelaz, Z. y Nes., I.F.** 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. of Bacteriol.*, **174**: 5686-5692.

**Niu, W.W., y Neu, H.C.** 1991. Activity of mersadicin, a novel peptide, compared with that of vancomycin, teicoplanin, and daptomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 998-1000.

**Norman Hansen, J.** 1993. Antibiotics synthesized by posttranslational modification. *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**: 535-564.

- Ogden, K. y Tubb, R.S. 1985. Inhibition of beer spoilage lactic acid bacteria by nisin. *J. Inst. Brew.*, **91**: 390-392.
- Ogden, K., Waites, M.J. y Hammond, J.R.M. 1988. Nisin and brewing. *J. Inst. Brew.*, **94**: 233-238.
- Ogden, K. y Waites, M.J. 1986. The action of nisin on beer-spoilage lactic acid bacteria. *J. Inst. Brew.*, **92**: 463-467.
- Pestka, J.J., Li, Y.K. y Chu, F.S. 1982. Reactivity of aflatoxin B<sub>2a</sub> antibody with aflatoxin B<sub>1</sub> modified DNA and related metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**: 1159-1165.
- Pestka, J.J., Abouzied, M.M. y Sutikno, S. 1995. Immunological assays for mycotoxin detection. *Food Technol.*, **49**: 120-128.
- Piard, J.C., Muriana, P.M. Desmazeaud, M.J. y Klaenhammer, T.R. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 279-284.
- Piard, J.C. y Desmazeaud, M. 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, **71**: 525-541.
- Piard, J.C. y Desmazeaud, M. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, **72**: 113-142.
- Piard, J.C., Delorme, F., Giraffa G., Commissaire, J., Desmazeaud M. 1990. Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. *Neth Milk Dairy J.*, **44**: 143-158.
- Pucci, M.J., Vedamuthu, R.E.R., Kunka, B.S., y Vanderbergh, P.A. 1988. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 2349-2353.
- Pugsley, A.P. 1988. The immunity and lysis genes of ColIN plasmid pCHAP4. *Mol. Gen. Genet.*, **211**:335-341.

- Qiao, M. y Saris, P.E.J.** 1996. Evidence for a role of NisT in transport of the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* N8. *FEMS Microbiol. Lett.*, **144**: 89-93.
- Qiao, M., Immonen, T., Koponen, O. y Saris, P.E.J.** 1995. The cellular location and effect on nisin immunity of the NisI protein from *Lactococcus lactis* N8 expressed in *Escherichia coli* and *L. lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **131**: 75-80.
- Qiao, M., Ye, S., Koponen, O., Ra, R. Usabiaga, M., Immonen, T. y Saris, P.E.J.** 1996. Regulation of the nisin operons in *Lactococcus lactis* N8. *J. Appl. Bacteriol.*, **80**: 626-634.
- Quadri L.E.N. Sailer, M., Roy, K.L. Vederas, J.C. y Stiles, M.E.** 1994. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV 17B. *J. Biol. Chem.*, **269**: 12204-12211.
- Ra, R., Qiao, M., Immonen, T., Pujana, I. y Saris, P.E.J.** 1996. Genes responsible for nisin synthesis, regulation and immunity form a regulon of two operons and are induced by nisin in *Lactococcus lactis* N8. *Microbiology*, **142**: 1281-1288.
- Radler, F.** 1990a. Possible use of nisin in winemaking. I. Action of nisin against lactic acid bacteria and wine yeasts in solid and liquid media. *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**: 1-6.
- Radler, F.** 1990b. Possible use of nisin in winemaking. II. Experiments to control lactic acid bacteria in the production of wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**: 7-11.
- Rammelsberg M., y Radler, F.** 1990. Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 177-184.
- Ramseier, H. R.** 1960. The action of nisin on *Clostridium butyricum*. *Arch. Mikrobiol.*, **37**: 57-94.
- Rauch, P.G.J., Beerthuyzen, M.M. y de Vos, W.M.** 1991. Molecular analysis and evolution of conjugative transposons encoding nisin production and sucrose fermentation in *Lactococcus lactis*. En *Nisin and novel lantibiotics*, Jung, G. y Sahl, H.-G. (eds.) pp. 243-249. ESCOM science publishers Ltd. Leiden.

**Rauch, P.G.J., Beerthuyzen, M.M. y de Vos, W.M.** 1994. Distribution and evolution of nisin-sucrose elements in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 1652-1657.

**Rauch, P.J.G. y de Vos, W.M.** 1992a. Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its integration in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, **174**: 1280-1287.

**Rauch, P.J.G. y de Vos, W.M.** 1992b. Transcriptional regulation of the Tn5276-located *Lactococcus lactis* sucrose operon and characterization of the *sacA* gene encoding sucrose-6-phosphate hydrolase. *Gene* **121**: 55-61.

**Ray, B.** 1992. The need for food biopreservation. En *Food biopreservatives of Microbial Origin*, Ray, B. y Daeschel, M. (eds.), pp. 1-23. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

**Ray, B.** 1993. Sublethal injury, bacteriocins and food microbiology. *ASM News*, **59**: 285-291.

**Ray, B. y Daeschel, M.** 1992. *Food biopreservatives of microbial origin*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.

**Ray, B., Motlagh, A. y Johnson, M.C.** 1993. Processing of prepediocin in *Pediococcus acidilactici*. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 119.

**Rayman, M. K., Aris, B. y Hurst, A.** 1981. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 375-380.

**Rayman, M. K., Malik, N. y Hurst, A.** 1983. Failure of nisin to inhibit outgrowth of *Clostridium botulinum* in a model cured meat system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 1450-1452.

**Reddy, S.G., Chen, M.L. y Patel, P.J.** 1975. Influence of lactic cultures on the biochemical, bacterial ad organoleptic changes in beef. *J. Food Sci.* **40**: 314-318.

**Reddy, S.G., Henrickson, R.L. y Olson, H.C.** 1970. The influence of lactic cultures on ground beef quality. *J. Food Sci.*, **35**: 787-791

**Registro Federal.** 1988. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Fed. Reg.*, **53**: 11247-11251.

**Reichin, M. Schnure, J.J. y Vance, V. K.** 1968. Induction of antibodies to porcine ACTH in rabbits with non-steroidogenic polymers of BSA and ACTH. *Proc. of the Soc. for Experim. Biol. And Med.*, **128**: 347-380.

**Reisinger, P. Seidel, H., Tschesche H. y Hammes W. P.** 1980. The effect of nisin on murein synthesis. *Archiv. Microbiol.* **127**: 187-193.

**Richard, J.** 1993. Inhibition of *Listeria monocytogenes* during cheese manufacture by adding nisin to milk or using a nisin-producing starter. Food Ingredients Europe, resúmenes del congreso, pp. 59-64. Expoconsult Publishers, Maarsen, The Netherlands.

**Rintala, H., Graeffe, T., Paulin, L., Kalkkinen, N. y Saris, P.E.J.** 1993. Biosynthesis of nisin in the subtili producer *Bacillus subtilis* ATCC6633. *Biotechnology Lett.*, **15**: 991-996.

**Rodríguez, J.M.** 1991. Aislamiento y caracterización parcial de bacterias lácticas de origen cárnico antagonistas del desarrollo de otros microorganismos. Tesis doctoral. Universidad Complutense. Madrid.

**Rodríguez, J.M., Cintas, L.M. Casaus, P., Horn, N., Dodd, H.M. Hernández, P.E. y Gasson, M. J.** 1995. Isolation of nisin producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* **78**: 109-115.

**Rodríguez, J.M., Cintas, L.M. Casaus, P., Martínez, M.I., Suárez, A. y Hernández, P.E.** 1997. Detection of pediocin PA-1 producing pediococci by rapid molecular producing by rapid molecular procedures. *Food Microbiol.* **14**: 363-37.

**Rodríguez, J.M., Cintas, L.M. Casaus, Suárez, A. y Hernández, P.E.** 1995. PCR detection of the lactocin S structural gene in bacteriocin-producing lactobacilli from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 2802-2805.

**Rodríguez, J.M., Martínez, M.I., Suárez, A.M., Martínez, J.M. y Hernández, P.E.** 1996. Unsuitability of the MRS medium for the screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria. *Letters in Appl. Microbiol.* **25**: 73-74.

**Rogers, A. M. y Montville, T.J.** 1991. Improved agar diffusion assay for nisin quantification. *Food Biotechnol.*, **5**: 161-168.

**Rogers, L.A. y Whittier, E.O.** 1928. Limiting factors in lactic fermentation. *J. Bacteriol.*, **16**: 321-325.

**Rogers, L.A.** 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.*, **16**: 321-325.

**Rollema, H.S., Both, P. y Siezen, R.J.** 1991. NMR and activity studies of nisin degradation products. En *Nisin and novel lantibiotics*, Jung, G. y Sahl, H.-G. (eds.) pp. 123-130. ESCOM science publishers Ltd. Leiden.

**Rollema, H.S., Kuipers, O.P., Both, P., de Vos, W.M. y Siezen, R.J.** 1995. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 2873-2878.

**Ross, K.F., Ronson, C.W., y Tagg, J.R.** 1993. Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene salA1 from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 2014-2021.

**Ruhr, E. y Sahl, H.G.** 1985. Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence of the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**: 841-845.

**Sahl H.G., Reis, M., Eschbach, M., Szekat, C., Beck-Sickinger, A.G., Metzger, J., Stevanovic, S. y Jung, G.** 1991. Isolation of Pep5 prepeptides in different stages of modification. En *Nisin and novel lantibiotics*, Jung G. Y Sahl, H. (eds.)pp. 332-346. Escom publishers, Leiden, The Netherlands.

**Sahl H.G. y Brandis, H.** 1981. Production, purification and chemical properties of an antistaphylococcal agent produced by *Staphylococcus epidermidis*. *J. Gen. Microbiol.* **127**, 377-383.

**Sahl, H.G. y Brandis, H.** 1983. Efflux of low Mr substances from the cytoplasm of sensitive cells caused by the staphylococcin-like agent Pep5. *FEMS Microbiol. Lett.* **16**: 75-79.

**Sahl, H.G., Jack, R.W. y Bierbaum, G.** 1995. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of peptides with unique posttranslational modification. *Eur. J. Biochem.* **230**: 827-853.

**Sahl, H.G., Kordel, M. y Benz, R.** 1987. Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. *Arch. Microbiol.* **149**: 120-124.

**Sanders, D.A. y Koshland D.E. Jr.** 1988. Reception interaction through phosphorylation and methylation pathways in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8425-8429.

**Saris, P.E.J., Immonen, T., Reis, M. y Sahl, H.G.** 1996. Immunity to lantibiotics. *Anton. Leeuwen.*, **69**: 151-159.

**Scott, V.N. y Taylor, S.L.** 1981a. Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *J. Food Sci.*, **46**: 117-120.

**Scott, V.N. y Taylor, S.L.** 1981b. Temperature, pH and spore load effects on the ability of nisin to prevent the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *J. Food Sci.*, **46**: 121-126.

**Schleifer, K.H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W. y Amann, R.** 1995. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, **5**: 1081-1089.

**Schnell, N., Engelke, G., Augustin, J., Rosenstein, R. y Ungermann, V.** 1992. Analysis of genes involved in the biosynthesis of lantibiotic epidermin. *Eur. J. Biochem.* **204**: 57-68.

**Schnell, N., Entian, K.D., Gotz, F., Horner, T. y Kellner, R.** 1989. Structural gene isolation and prepeptide sequence of gallidermin, a new lanthionine containing antibiotic. *FEMS Microbiol. Lett.*, **49**: 263-267.

**Schnell, N., Entian, K. D., Schneider, U., Gotz, F. y Zahner, H.** 1988. Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-bridges. *Nature* **333**: 276-278.

- Schved, F. Lalazer, A. Henis, Y. y Juven, J. 1993. Purification, partial characterization and plasmid linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.*, **74**: 67-77.
- Shattock, P.M.F. y Mattick, A.T.R. 1943. *J. Hyg. Comb.*, **43**: 173.
- Siegers, K. Heinzmann, S. y Karl-Dieter, E. 1996. Biosynthesis of lantibiotic nisin. Posttranslational modification of its prepeptide occurs at a multimeric membrane-associated lathionine synthetase complex. *J. Biol. Chem.*, **271**: 12294-12301.
- Siegers, K. y Entian, K.D. 1995. Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 1082-1089.
- Siezen, R.J., de Vos, W.M., Leunissen, A.M., Dijkstra, B.W. 1991. Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases. *Protein Eng.*, **4**: 719-737.
- Siezen, R.J., Rollema, H.S., Kuipers, O.P. y de Vos, W.M. 1995. Homology modelling of the *Lactococcus lactis* leader peptidase NisP and its interaction with the precursor of the lantibiotic nisin. *Protein Eng.*, **8**: 117-125.
- Silbart, L.K. y Keren, D.F. 1989. Reduction of intestinal carcinogen absorption by carcinogen-specific secretory immunity. *Science*, **243**: 1462-1464.
- Skaugen, M., Nissen-Meyer, J., Jung, G., Stevanovic, S., Sletten, K., Mørtvedt-Abildgaard, C.I. y Nes, I.F. 1994. Introduction of D-Ala by modification of L-Ser. *J. Biol. Chem.* **269**: 27183-27185.
- Slijper, M., Hilbers, C.W., Konings, R.N.H. y van de Ven, F.J.M. 1989. NMR studies of lantibiotics: assignment of the H-NMR spectrum of nisin and identification of inter-residual contacts. *FEBS Lett.*, **252**: 22-28.
- Smith, J.L. y Palumbo, S.A. 1981. Microorganism as food additives. *J. Food Prot.* **44**: 936-955.
- Sobrino, O.J., J.M. Rodríguez, W.L. Moreira, L.M. Cintas, M.F. Fernández, B. Sanz y P.E. Hernández. 1992. Sakacin M, a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake* 148. *Int. J. Food Microbiol.*, **16**: 215-225.

**Sobrino, O.J., J.M. Rodríguez, W.L. Moreira, M.F. Fernández, B. Sanz y P.E. Hernández.** 1991. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, **13**: 1-10.

**Somers, E.B. y Taylor, S.L.** 1981. Further studies on the antibotulinal effectiveness of nisin in acidic media. *J. Food Sci.*, **46**: 1972-1973.

**Somers, E.B. y Taylor, S.L.** 1987. Antibotulinal effectiveness of nisin in pasteurised processed cheese spreads. *J. Food Prot.*, **50**: 842-848.

**Song, H.Y. y Cramer, W.A.** 1991. Membrane topography of ColEI gene products: the immunity protein. *J. Bacteriol.*, **173**: 2935-2943.

**Steele, J.L. y McKay, L.L.** 1986. Partial characterization of the genetic basis for sucrose metabolism and nisin production in *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**: 57-64.

**Steen, M.T. y Hansen, J.N.** 1991. Structure, expression and evolution of the nisin gene locus in *Lactococcus lactis*. En *Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci*, G. M. Dunny, P. P. Cleary y L. L. McKay (eds.), pp. 109-114. American Society for Microbiology, Washington DC.

**Steen, M.T., Chung, Y.J. y Hansen, J.N.** 1991. Characterization of the nisin gene as part of a polycistronic operon in the chromosome of *Lactococcus lactis* ATCC 11454. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 1181-1188.

**Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., y Klaenhamer, T.R.** 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram negative bacteria. *Appl. Environ. microbiol.*, **57**: 3613-3615.

**Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., y Klaenhamer, T.R.** 1992. Effect of treatment conditions on nisin inactivation of Gram-negative bacteria. *J. Food Prot.*, **55**: 763-766.

**Stiles, M. E. y Hastings, J.W.** 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends in Food Sci. and Technol.*, **2**: 247-251.

- Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Anton. Leeuwen.* **70**: 331-345.
- Stoddard, G.W., Petzel, J.P., van Belkum, M.J., Kok, J. y McKay, L.L. 1992. Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* WM4. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1952-1961.
- Stoddard, G.W., Petzel, J.P., van Belkum, M.J., Kok, M.J., y Mc.Kay, L.L. 1992. Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* WM4. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 1952-1961.
- Stoffels, G., Gudmundsdottir, A. y Abee, T. 1994. Membrane associated proteins encoded by the nisin gene cluster may function as a receptor for the lantibiotic carnocin UI49. *Microbiology* **140**: 1443-1450.
- Stoffels, G., Nes, I.F. y Gudmundsdottir, A. 1992. Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* strain isolated from fish. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**: 309-316.
- Stoffels, G., Sahl, H.G. y Gudmundsdottir, A. 1993. Carnocin UI49, a potential biopreservative produced by *Carnobacterium piscicola*. Large scale purification and activity against various Gram-positive bacteria including *Listeria* sp. *It. J. Food Microbiol.*, **20**: 199-210.
- Stringer, S.C., Dodd, H.M., Morgan, M.R.A. y Waites, W.M. 1995. Locating nisin-producing *Lactococcus lactis* in a fermented meat system. *J. Appl. Bacteriol.*, **78**: 341-348.
- Stumbo, C.R. Voris, L. Skaggs, B.G. y Heinemann, B. 1964. A procedure for assaying residual nisin in food products. *J. Food Sci.*, **29**: 859-861.
- Suárez, A.M., Rodríguez, J.M., Hernández P.E. y Azcona-Olivera, J.I. (1996). Generation of Polyclonal Antibodies Against Nisin: Immunization Strategies and Immunoassays Development. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2117-2121.
- Suárez, A.M., Rodríguez, J.M., Morales, P. Hernández, P.E. y Azcona-Olivera, J.I. 1996. Development of monoclonal antibodies to the lantibiotic nisin A. *J. Agric. Food Chem.* **44**:2936-2940.

**Tagg, J.R., Read, R.S.D. y McGiven, A.S.** 1971. Bacteriocin production by Group A streptococci. *Pathology*, **3**: 277-278.

**Tagg, J.R.** 1991. Bacterial BLIS. *ASM News Am. Soc. Microbiol.* **57**: 611.

**Tagg, J.R., Dajani, A.S. y Wannamaker, L.W.** 1976. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **40**: 722-756.

**Taylor, L.Y., Cann, D.D. y Welch, B.J.** 1990. Antibotulinal properties of nisin in fresh fish packaged in an atmosphere of carbon dioxide. *J. Food Prot.*, **48**: 949-952.

**Taylor, S.L., Somers, E.B. y Krueger, L.A.** 1984. Antibotulinal effectiveness of nisin-nitrite combinations in culture medium and chicken frankfurter emulsions. *J. Food Prot.*, **48**: 234-239.

**Ter Steeg, P.F.** 1993. Interacties tussen nisine, lysozym en citraat in bioconserving. *De Ware (n) Chemicus*, **23**: 183-190.

**Ter Steeg, P.F., van Oorschot, G.W., Anderson, W.A., Gould, G.W., Cole, M.B. Jones, M.V. y Anslow, P.** 1994. Interactions of nisin, lysozyme, and citrate in biopreservation. Poster presentado en el 2º *Workshop on Lantibiotics*, Papendal, Arnhem, Holanda. 20-23 nov., 1994.

**Thompson, J. Nguyen, N.Y., Sackett, D.L. y Donkersloot, J.A.** 1991. Transposon-encoded sucrose metabolism in *Lactococcus lactis*. Purification of sucrose-6-phosphate hydrolase and genetic linkage to N<sup>5</sup>-(L-1-carboxyethyl)-L-ornitine synthase in strain K1. *J. Biol. Chem.*, **266**: 14573-14579.

**Thorpe, R.H.** 1960. The action of nisin on spoilage bacteria. I. The effect of nisin on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *J. Appl. Bacteriol.*, **23**: 136-143.

**Tichaczek, P.S., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Vogel, R.F., y W.P. Hammes.** 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *Lactobacillus sake* LTH673. *Syst. Appl. Microbiol.*, **15**: 460-468.

## Bibliografía

**Toba, T. Yoshioka, E. e Itoh, T.** 1991. Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT1060. *Lett. Appl. Microbiol.* **12**: 106-108.

**Toba, T. Yoshioka, E. e Itoh, T.** 1991. Lacticin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **12**: 43-45.

**Tramer, J.** 1966. Nisin in food preservation. *Chem. Ind.*, **11**: 446-450.

**Tramer, J. y Fowler, G.G.** 1964. Estimation of nisin in foods. *J. Sci. Food Agric.*, **15**: 522-528.

**Tsai, H.J. y Sandine, W.E.** 1987. Conjugal transfer of nisin plasmid genes from *Streptococcus lactis* 7962 to *Leuconostoc dextranicum* 181. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 352-357.

**Uhlman, L. Schillinger, U. Rupnow, J.R. y Holzapfel, W.H.** 1992. Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* isolated from vegetables. *Int. J. food Microbiol.* **16**: 141-151.

**Upreti, G.C. y Hinsdill R.D.** 1975. Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, **7**: 139-145.

**Usleberg, E., Straka, M. y Terplan, G.** 1994. Enzyme immunoassay for fumonisin B<sub>1</sub> applied to corn-based food. *J. Agric. Food Chem.*, **42**: 1392-1396.

**Van de Kamp, M., Horstink, L.M., Stevens, A., van den Hooven, H. W., Mronga, S., Konongs, R.N.H., Hilbers, C.W., van de Ven, F.J.M., Bierbaum, G., Frey, A., Sahl, H.G., Metzger, J.W., Jung, G., Kuipers O.P., Siezen, R.J. y de Vos, W.M.** 1994. Epilancin K7, a novel lantibiotic from *Staphylococcus epidermidis*. Primary structure, gene sequence, and studies with micelles. Abstract del 2º *International Workshop on Lantibiotics*. 20-23 Noviembre, 1994. Papendal, Arnhem. The Netherlands.

**Van de Ven, F.J.M. y Jung, G.** 1996. Structures of lantibiotics studied by NMR. *Anton. Leeuwen.*, **69**: 99-107.

**Van de Ven, F.J.M., Van den Hooven, H.W., Konings, R.N.H. y Hilbers, C.W.** 1991a. NMR studies of lantibiotics. The structure of nisin in aqueous solution. *Eur. J. Biochem.*, **202**: 1181-1188.

**Van de Ven, F.J.M., Van den Hooven, H.W., Konings, R.N.H. y Hilbers, C.W.** 1991b. The spatial structure of nisin in aqueous solution. En *Nisin and Novel Lantibiotics*, Jung G. y Sahl, H. G. (ed.), pp.35-42. ESCOM Publishers B. V., Leiden.

**Van den Hooven, H.W., Fogolari, F., Rollema, H.S., Konings, R.N. H., Hilbers, C.W. y Van de Ven, F.J.M.** 1993. NMR and circular dichroism studies on the lantibiotic nisin in non-aqueous environments. *FEBS Lett.* **319**: 189-194.

**van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Jeeninga, R.E., Kok, J. y Venema, G.** 1991. Organization and nucleotide sequence of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 492-498.

**van Belkum, M.J., kok, J. y Venema, G.** 1992. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of lcnB, a third bacteriocin ceterminant from the lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 572-577.

**van de Guchte, M., Kok, J. y Venema, G.** 1992. Gene expression in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **88**: 73-92.

**van den Hooven, H.W., Fogolari, F. Rollema, H.S. Konings, R.N.H. Hilbers, C.W. y van den Ven, F.J.M.** 1993. NMR and circular dichroism studies of the lantibiotic nisin in non aqueous environments. *FEBS Lett.*, **319**: 189-194.

**van der Meer, J.R., Polman, J., Beethuyzen, M.M., Siezen, R.J., Kuipers, O.P. y de Vos, W.M.** 1993. Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J. Bacteriol.*, **175**: 2578-2588.

**van der Meer, J.R., Rollema, H.S., Siezen, R.J., Beerthuyzen, M.M., Kuipers, O.P. y de Vos, W.M.** 1994. Influence of amino acid substitutions in the

## Bibliografía

nisin leader peptide on biosynthesis and secretion of nisin by *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.*, **269**: 3555-3562.

**Vandamme, E.J.** 1984. *Biotechnology of Industrials Antibiotics*. Marcel Dekker, Nueva York.

**Vandenbergh, P.A.** 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microb. Rev.* **12**: 221-238.

**Venema, K., Haverkort, R.E., Abee, T., Haadrikma, A.J., Leenhouts, K.J., de Lei, L., Venema, G. y Kok, J.** 1994. Mode of action of LciA, the lactococcin A immunity protein. *Mol. Microbiol.*, **14**: 521-532.

**Venema, K. Venema, G. y Kok, J.** 1995. Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends in Microbiol.*, **3**: 299-304.

**Venema, K., Abee, t., Haandrikman, A.J., Leenhouts, K.J., Kok, J., Konings, W.M. y Venema, G.** 1993. Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1041-1048.

**von Heijne, G.** 1988. Transcending the impenetrable: how proteins come to terms with membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **947**: 307-333.

**von Wright, A., Wessels, S., Tynkkynen, S. y Saarela, M.** 1990. Isolation of a replication region of a large lactococcal plasmid and use in cloning of a nisin resistance determinant. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 2029-2035.

**Waites, M. J. y Ogden, K.** 1987. The estimation of nisin using ATP-bioluminometry. *J. Inst. Brew.*, **93**: 30-32.

**Wakamiya, T. Ueki, Y., Shiba, T. Kido, Y., Motoki, Y.** 1985. The structure of ancovenin, a new peptide inhibitor of angiotensine I converting enzyme. *Tetrahedron Lett.* **26**: 665-668.

**Weil, H.P., Beck-Sickinger, A.G., Metzger, J., Stevanovic, S., Jung, G. Josten, M. y Sahl, H.G.** 1990. Biosynthesis of the lantibiotic Pep5: isolation and

characterization of a prepeptide containing dehydro amino acids. *Eur. J. Biochem.* **194**: 217-223.

**West, C. y Warner, P.J.** 1988. Plantaricin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO1193. *FEMS Microbiol. Rev.*, **49**:163-165.

**White, R.J. y Hurst, A.** 1968. The location of nisin in the producer organism, *Streptococcus lactis*. *J.Gen. Microbiol.*, **53**: 171-179.

**Whitehead H.R. y Riddet, W.** 1933. Slow development of acidity in cheese manufacture. *N. Z. J. Agric.* **46**: 225-229.

**Whitehead, H.R.** 1933. A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci. *Biochem. J.* **27**: 1793-1800.

**WHO Expert Committee on Biological Standardization.** 1969. Twenty-second report, *WHO Technical Report Series* Nº 444.

**Wojcieszyn, J.W., Schelegel, R.A., Limlsey-Sapanski, K. y Jacobson, K.A.** 1983. Studies on the mechanism of polyethylene glycol-mediated cell fusion using fluorescent membrane and cytoplasmic probes. *J. Cell. Biol.*, **96**: 151-159.

**Wolf, C.E. y Gibbons, W.R.** 1996. Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. *J. Appl. Bacteriol.* **80**: 453-457.

**Wu, H.C. y Hayashi, S.** 1986. Lipoprotein secretion in bacteria. En *Microbiology-1986*, Leive, L. (ed.), pp. 260-265. American Society for Microbiology, Washington D.C.

**Yallow, R.S. y Berson, S.A.** 1959. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*, **184**: 1648-1649.

**Yallow, R.S. y Berson, S.A.** 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Cli. Invest.* **39**: 1157-1175.

**Yang, R. Johnson, M.C., y Ray, B.** 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3355-3359.

## *Bibliografia*

**Zajdel, J.K., Ceglowski, P. y Dobranski, W.T.** 1985. Mechanism of action of lactostrepcin 5, a bacteriocin produced by *Streptococcus cremoris* 202. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 969-974.