



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EXPRESIÓN DE LA ENTEROCINA A EN UNA CEPA DE *Enterococcus faecalis* PARA MEJORAR SU CAPACIDAD ANTIBACTERIANA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

CARLOS EDUARDO SERRANO MALDONADO

TUTOR PRINCIPAL

MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

FACULTAD DE QUÍMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

ADELFO ESCALANTE LOZADA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Ciudad de México, Junio 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Reconocimientos

Esta tesis fue realizada en el laboratorio 312 del conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch.

El comité tutor estuvo integrado por:

Dra. Bertha González Pedrajo Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Adelfo Escalante Lozada Instituto de Biotecnología, UNAM.

Se otorga un agradecimiento especial a Christopher J. Kristich, Sruti DebRoy y Danielle A. Garsin por la donación de las cepas *E. coli* EC1000 y *E. faecalis* CK111 y los plásmidos pCJK47 y pSD15, los cuales fueron la base para realizar este proyecto.

Este trabajo fue financiado por: DGAPA-UNAM-PAPIIT IN222115 e IN222717, PAIP-FQ 5000-9102. Se reconoce a CONACYT por la beca de doctorado y al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado por el apoyo para la asistencia a congresos.

Jurado de examen:

PRESIDENTE Dr. Gerardo Alonso Corzo Burguete

VOCAL Dr. Francisco Ruiz Terán

VOCAL Dr. Sergio Sánchez Esquivel

VOCAL Dra. Edith Ponce Alquicira

SECRETARIO Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por ser mi casa durante tanto tiempo y brindarme la mejor educación.

A la doctora Maricarmen Quirasco Baruch, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y crecer académicamente.

A Myrna, mi esposa, porque siempre me apoyas y haces que los obstáculos se superen más fácilmente. Eres mi equipo y juntos somos mejores. Te amo.

A mis papás y hermanos, porque sin ellos nunca hubiera llegado hasta este punto, me ayudaron a ser quien soy.

A mis amigos y todos los miembros del Laboratorio 312.

Índice

1. Resumen.....	6
2. Abstract.....	7
3. Introducción.....	8
3.1 Enfermedades transmitidas por alimentos	8
3.1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	9
3.2 Bacterias ácido lácticas.....	10
3.3 Género <i>Enterococcus</i>	10
3.4 Papel de los enterococos en alimentos fermentados	10
3.4.1 Bacteriocinas.....	12
3.4.2 Peptidoglucano hidrolasas.....	15
3.5 Los enterococos en la salud humana.....	15
3.6 Ingeniería genética aplicada en alimentos fermentados	16
4. Antecedentes.....	19
4.1 Grupo de trabajo.....	19
4.2 Enterocinas de <i>E. faecalis</i>	20
4.2.1 Enterocina A	20
4.2.2 Producción heteróloga de bacteriocinas y su aplicación en alimentos	21
4.2.3 Clonación en <i>Enterococcus faecalis</i>	22
5. Justificación.....	23
6. Hipótesis.....	25
7. Objetivo general.....	25
7.1 Objetivos particulares	25
8. Metodología	25
8.1 Cepas y plásmidos.....	25
8.2 Medios de cultivo y antibióticos.....	28
8.3 Manipulación de ADN, síntesis de la construcción génica y de los cebadores para PCR.....	28
8.4 Detección del gen de la enterocina A mediante PCR	29
8.5 Clonación de la quimera (P ₃₂ -MP-EntAI) en el vector pSD15.....	30
8.5.1 Ligación de P ₃₂ -MP-EntAI en pSD15.....	32
8.5.2 Transformación de pSD15- P ₃₂ -MP-EntAI en <i>E. coli</i> DH5α	32
8.6 Construcción del vector derivado de pCJK47	33

8.6.1	Digestión de pSD15- P ₃₂ -MP-EntAI y pCJK47	33
8.6.2	Ligación de la quimera con los sitios de recombinación en pCJK47	34
8.6.3	Transformación en <i>E. coli</i> EC1000.....	35
8.7	Transformación en <i>E. faecalis</i> F.....	35
8.7.1	Segundo evento de recombinación y selección de clonas positivas	37
8.8	Detección de la expresión de la enterocina A y la actividad antibacteriana	37
8.8.1	Detección del ARN mensajero	37
8.8.2	Semipurificación de la bacteriocina	38
8.8.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida Tris-Tricina y zimogramas.....	38
8.8.4	Difusión en agar.....	39
8.8.5	Inhibición del crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en co-cultivo con <i>E. faecalis</i> F EntA	40
9.	Resultados y discusión	40
9.1	Síntesis de los genes	40
9.2	Clonación en pSD15	44
9.3	Construcción derivada de pCJK47	45
9.4	Transformación de <i>E. faecalis</i> F	46
9.5	Liberación del vector.....	48
9.6	Detección del ARNm.....	51
9.7	Detección de la actividad	52
9.9	Pruebas de inhibición de <i>L. monocytogenes</i> en co-cultivo con <i>E. faecalis</i> F EntA	56
10.	Conclusiones.....	60
11.	Perspectivas	60
12.	Bibliografía.....	61
13.	Productos de la investigación	68
14.	Anexo.....	69

1. Resumen

El género *Enterococcus* pertenece al grupo de las bacterias ácido lácticas. Puede encontrarse como microbiota nativa en diferentes productos fermentados debido a que está presente en una gran variedad de ambientes y a su gran capacidad de resistir condiciones de estrés como pueden ser altas concentraciones de sal. *Enterococcus faecalis* F es una cepa no patógena aislada de queso Cotija, un alimento artesanal madurado. Esta cepa ha sido estudiada en este grupo de investigación y ha mostrado actividades enzimáticas de utilidad biotecnológica, por ejemplo, actividad antibacteriana en contra de algunos patógenos de importancia en alimentos. Dicha actividad está dada principalmente por la producción de peptidoglucano hidrolasas. Su utilización como un agente de control de patógenos natural podría mejorarse mediante la producción de una bacteriocina. El análisis de la secuencia del genoma de *E. faecalis* F indica que sólo posee un gen que codifica para bacteriocinas, pero la producción de ésta no se ha comprobado fenotípicamente. Por lo que se propone la clonación de una bacteriocina, como la enterocina A, para su expresión por esta cepa. La enterocina A es una bacteriocina que presenta una gran actividad en contra de *Listeria monocytogenes*, una bacteria patógena de gran interés en salud debido a que posee un elevado índice de mortalidad y a que es una bacteria que se puede transmitir por alimentos. En este trabajo se utilizó un método de inserción alélica sin marcadores para obtener una cepa de enterococos capaz de producir una bacteriocina funcional. Se diseñó una construcción génica que permitiría a la bacteria producir de manera constitutiva la enterocina A, secretarla y protegerse contra su acción lítica. Esta construcción se insertó directamente en el cromosoma de la cepa *E. faecalis* F, lo cual se corroboró mediante PCR. Además, se comprobó su expresión mediante la presencia del ARN mensajero. Mediante ensayos de difusión en agar, se observó que la cepa recombinante fue capaz de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y la cepa patógena *E. faecalis* V583. Al hacerla crecer en medio líquido en conjunto con *L. monocytogenes*, fue capaz de inhibir en dos unidades logarítmicas las cuentas del patógeno después de 8 horas. Además, el efecto se observa en menor tiempo que en la cepa nativa. Debido a que la construcción génica se integró directamente al cromosoma, la cepa recombinante no requiere del uso de antibióticos como marcador de selección ni para mantener la presión selectiva; además, no requiere de un inductor porque la construcción incluye un promotor constitutivo. Sus capacidades tecnológicas y antibacterianas hacen de la cepa mejorada de *E. faecalis* un potencial cultivo protector para su uso en la industria alimentaria.

2. Abstract

The genus *Enterococcus* belongs to lactic acid bacteria and occurs as native microbiota of fermented products due to its broad environmental distribution and its capability to resist stress conditions like high salt concentrations. *Enterococcus faecalis* F is a non-pathogenic strain isolated from Cotija cheese, an artisanal ripened food. This strain has been studied in this research group and it has demonstrated biotechnologically useful enzymatic capabilities, e.g. antibacterial activity against some food-borne pathogens. Such activity is caused mainly by the production of peptidoglycan hydrolases. Its use as a natural pathogen-control agent could be further enhanced through the production of a bacteriocin. Genome sequence analysis of *E. faecalis* F reveals that it has just one bacteriocin gene, but its production has not been demonstrated phenotypically. We proposed to clone a bacteriocin, such as Enterocin A, to be expressed by this strain. Enterocin A is a bacteriocin that shows a remarkable activity against *Listeria monocytogenes*, a public health important pathogen because it displays a high mortality rate and it is a foodborne pathogen. In this work, a markerless allelic insertion method was used to obtain an enterococcal strain capable of producing a functional enterocin. A genic construction was designed in order to produce and secrete enterocin A, as well as to produce the immunity protein to protect the producer strain. The construction was inserted directly to the chromosome of *E. faecalis* F, and it was confirmed by PCR. Moreover, the expression was tested by the presence of the mRNA. Agar diffusion tests showed that the recombinant strain was active against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and the pathogenic strain *E. faecalis* V583. When grown in liquid culture together with *L. monocytogenes*, it attained a two-log reduction of the pathogen counts in lesser time relative to the native strain. Because the DNA construction is integrated into the chromosome, the improved strain avoids the use of antibiotics as selective pressure; besides, it does not require an inductor because of the inclusion of a constitutive promoter in the construction. Its technological and antibacterial capabilities make the improved *E. faecalis* strain a potential culture for use in the food industry.

3. Introducción

La fermentación de alimentos es un proceso llevado a cabo por microorganismos que, además de contribuir a la bioconservación del producto, colaboran en la generación de las propiedades organolépticas características. En quesos, la población bacteriana que puede estar en el producto se compone de: i) microorganismos presentes originalmente en la leche o el ambiente y que pueden ser iniciadoras o no iniciadoras, ii) cepas iniciadoras seleccionadas para llevar a cabo una función específica y adicionadas intencionalmente durante la producción del alimento y iii) bacterias contaminantes presentes accidentalmente (patógenas y de descomposición) (Salminen *et al.*, 2004). Generalmente, las bacterias que se incorporaron al producto no intencionalmente y las iniciadoras contribuyen en conjunto a las transformaciones que darán las características finales al queso; por ejemplo, la conversión de macromoléculas como proteínas y lípidos en componentes de menor tamaño, modificando la textura del queso y generando sabores particulares deseables. Éstas, también pueden contribuir a la seguridad del producto, ya que pueden sintetizar compuestos con actividad antibacteriana que actúan contra los microorganismos patógenos o de descomposición (Salminen *et al.*, 2004). Por el contrario, los microorganismos de descomposición tienen una influencia negativa en las propiedades organolépticas del producto, mientras que los patógenos son capaces de producir enfermedades transmitidas por alimentos a través de la generación de moléculas dañinas como las toxinas o causar una infección en humanos (Pessione *et al.*, 2012).

3.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (2017), cada año enferman cerca de 600 millones de personas en el mundo de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), de las cuales, aproximadamente 420 000 mueren. Y no sólo es un problema de países en vías de desarrollo, también es un problema importante en Europa y Estados Unidos (Newell *et al.*, 2010). En Estados Unidos, 9.4 millones de episodios de enfermedad por alimentos se registran cada año, provocando 1 351 muertes; mientras que en la Unión Europea en 2013 se registraron 5 196 brotes, 43 183 personas infectadas y 11 muertes (SINAVE/DGE/SALUD 2010; Martinović *et al.*, 2016; Organización Mundial de la Salud, 2017). En México en el 2016 se registraron 4 885 562 casos de infecciones intestinales y se calcula que cada año mueren alrededor de 16 mil personas (Jimenez-Corona, 2018).

Las ETA pueden ser causadas por diferentes agentes, que incluyen bacterias, virus, parásitos y agentes químicos (Newell *et al.*, 2010). En el caso de las bacterias, los principales patógenos son: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia*

enterocolítica., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Aeromonas* spp. (Amalaradjou y Bhunia, 2012). De estos, *L. monocytogenes* destaca por su distribución en el ambiente, persistencia, resistencia al estrés y por el elevado porcentaje de mortalidad que causa.

3.1.1 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo que causa una enfermedad transmitida por alimentos. Esta bacteria afecta principalmente a niños, ancianos, personas inmunocomprometidas y mujeres embarazadas (Gray *et al.*, 2018). Las infecciones causadas por *L. monocytogenes* no son tan comunes como las causadas por otras bacterias como *E. coli* o *Salmonella*, ya que en 2010 sólo se reportaron 23 150 casos en todo el mundo. Sin embargo, este microorganismo recibe gran atención e importancia en salud pública debido a su alto porcentaje de mortalidad, ya que éste se encuentra en un rango del 20 al 30 %. Tan solo en Estados Unidos causa el 25 % de las muertes relacionadas con el consumo de alimentos. Los síntomas asociados con esta bacteria son vómito, diarrea, meningitis, septicemia, abortos y muerte (Cotter *et al.*, 2005; Vivant *et al.*, 2013; Radoshevich y Cossart, 2018). *L. monocytogenes* es una bacteria ubicua, por lo que el riesgo de contaminación de alimentos por esta bacteria es muy alto. Puede introducirse al proceso de fabricación de alimentos por materias primas contaminadas, el ambiente, manipulación de los operadores o contaminación cruzada. Debido a su gran capacidad de resistir condiciones desfavorables y condiciones de estrés, persisten en superficies de trabajo de donde son difíciles de eliminar (Gray *et al.*, 2018). Puede resistir bajas temperaturas, incluso crece en temperaturas de refrigeración, resiste un amplio intervalo de pH y altas concentraciones de sal (Radoshevich y Cossart, 2018). Debido a esto, se han realizado muchos esfuerzos para la eliminación de *L. monocytogenes* de los alimentos, descartando algunos de los métodos tradicionales de conservación, como salado o disminución de pH, que no son efectivos. Se ha puesto gran interés en la utilización de bacteriocinas, que son péptidos de bajo peso molecular que producen las bacterias para inhibir el crecimiento de otras bacterias (Cotter *et al.*, 2005). De las más estudiadas son las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas, por su asociación con alimentos. Existe una clase de bacteriocinas (clase IIa) que se caracteriza por su alto poder antilisterial, por lo que resultan una alternativa viable para el control de este patógeno (Álvarez-Sieiro *et al.*, 2016). Dentro del grupo de las bacterias ácido lácticas, algunas cepas del género *Enterococcus* son productoras de bacteriocinas antilisteriales.

3.2 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son cocos o bacilos Gram positivos que producen ácido láctico como producto principal del metabolismo de azúcares. Se han empleado como microorganismos iniciadores en productos fermentados como yogurt, queso, kéfir, etc. Los cultivos iniciadores no solamente aportan sabores y aromas, sino que también ayudan a extender la vida de anaquel de los productos alimenticios, principalmente por la producción de ácido láctico (Khan *et al.*, 2010). Dentro de los géneros más importantes de las BAL se encuentran *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*. De éstos, *Enterococcus* es de gran interés, ya que se encuentra en el intestino de humanos y animales, donde habita como comensal y puede causar efectos benéficos. Las especies más importantes del género son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* que se encuentran comúnmente en alimentos fermentados (Khan *et al.*, 2010).

3.3 Género *Enterococcus*

Las especies pertenecientes al género *Enterococcus* son ubicuas y se pueden encontrar en nichos heterogéneos como suelos, vegetales, alimentos y en el tracto gastrointestinal de animales y humanos. Actualmente, el género está conformado por 37 especies, dentro de las que destacan *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* por encontrarse comúnmente en alimentos fermentados. Son cocos Gram positivos, no forman esporas, son catalasa negativos, oxidasa negativos, anaerobios facultativos, toleran hasta 6.5% de NaCl, se mantienen viables en un amplio intervalo de pH (4.6-9.6) y temperatura (10-45°C), pueden sobrevivir a tratamientos térmicos como la pasteurización clásica (30 min a 62.8°C), son capaces de hidrolizar la esculina y crecer en presencia de 40% de sales biliares. Por todas estas características, presentan una gran capacidad para sobrevivir en ambientes adversos, fuera del tracto gastrointestinal de mamíferos (Giraffa, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2011). Se pueden encontrar en alimentos fermentados de origen vegetal, como aceitunas, o de origen animal, como salchichas o quesos artesanales, donde participan y prevalecen hasta el final del periodo de maduración y son ampliamente utilizados para su elaboración (Martín-Platero *et al.*, 2009; Franz *et al.*, 2011; Escobar-Zepeda *et al.*, 2016).

3.4 Papel de los enterococos en alimentos fermentados

Los enterococos forman parte de las BAL no iniciadoras en quesos, pueden incorporarse a la matriz del alimento en la leche, cuajada o en el queso, directamente de heces de animales, agua, recipientes, superficies, equipos para el almacenamiento de leche y producción del queso o por las manos del hombre. Se consideran esenciales para la maduración de muchos quesos

tradicionales del sur de Europa como Manchego, Armada, Cebreiro, Picante, Majoero, Feta, Teleme, Mozzarella, Monte Veronese, Fontina, Caprino, Serra, Venaco y Comté, donde contribuyen al desarrollo de aromas y sabores por su actividad lipolítica, proteolítica y la degradación de citrato (Franz *et al.*, 1999; Sarantinopoulos *et al.*, 2001; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Se asocian principalmente a alimentos artesanales elaborados con leche no pasteurizada, donde persisten durante todo el proceso de maduración. Esta persistencia se asocia principalmente a su capacidad para sobrevivir en condiciones desfavorables, como bajo pH y alta concentración de sal (Serio *et al.*, 2010). No todas las especies son capaces de metabolizar el citrato, pero las que son capaces de hacerlo pueden generar productos diferentes al ácido láctico, como son el diacetilo, acetaldehído, acetoína y 2,3-butanodiol, que son compuestos que contribuyen al aroma del producto terminado (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Aunque, en general, las cepas de enterococos no se caracterizan por su actividad lipolítica y proteolítica, la especie *E. faecalis* es la que presenta mayor capacidad con respecto a otras especies del género. Andrighetto *et al.* (2001) probaron la actividad proteolítica de 124 cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos italianos. La mayoría mostraron baja actividad; sin embargo, 30 de ellas mostraron una actividad mucho mayor, todas pertenecientes a la especie *E. faecalis*. Sarantinopoulos *et al.* (2001) obtuvieron resultados similares a partir de evaluar la actividad proteolítica extracelular de 129 cepas de enterococos, siendo *E. faecalis* la especie que presentó mayor actividad. Algo similar ocurre con la actividad lipolítica; en general, las BAL no se caracterizan por ésta, sin embargo, es importante en la producción de quesos debido a que son capaces de sobrevivir a tratamientos como la pasteurización. Del género *Enterococcus*, *E. faecalis* es el que presenta mayor actividad (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Tampoco se consideran buenas acidificadoras del medio; sin embargo, algunas cepas de *E. faecalis* aisladas de quesos han mostrado gran capacidad para acidificar leche (Suzzi *et al.*, 2000; Giraffa, 2003). Monteagudo-Mera *et al.* (2011) realizaron un estudio en el que se evaluó la capacidad acidificadora y la actividad proteolítica de BAL aisladas de leche y quesos de oveja y vaca de España, donde se incluyeron cinco cepas de *E. faecalis*, una de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, una de *Leuconostoc mesenteroides* y una de *Lactobacillus paracasei*. Dichas propiedades tecnológicas fueron evaluadas en leche en donde dos de las cepas de *E. faecalis* mostraron capacidad para acidificar el medio igual o mayor que el resto de las BAL y fueron las únicas que mostraron actividad proteolítica, por lo que son candidatos para su utilización como cultivos iniciadores. Sin embargo, su principal participación es como cultivos no iniciadores.

3.4.1 Bacteriocinas

Otra propiedad tecnológica importante para la elaboración de alimentos que presentan los enterococos es la producción de compuestos con actividad antibacteriana, como las bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos sintetizados ribosomalmente que presentan actividad antagonista contra otras bacterias. Las bacteriocinas pueden ser de espectro reducido, es decir, que son activas contra microorganismos relacionados filogenéticamente; o de espectro amplio, presentando actividad, incluso, en contra de bacterias de diferente Gram, por lo que algunas son activas contra muchos microorganismos patógenos que se pueden encontrar en alimentos. Son estables en rangos amplios de pH y son resistentes a tratamientos térmicos (Khan *et al.*, 2010). Muchas bacteriocinas son producidas por bacterias ácido lácticas, lo que ofrece la posibilidad de aplicarlas en alimentos con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas o de descomposición (Cotter *et al.*, 2005). Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo, razón por la cual han sido clasificadas de diferentes maneras por muchos autores. Una de esas clasificaciones es la propuesta por Cotter y colaboradores (2005), quienes las dividen en: bacteriocinas de clase I, que incluyen aquellas bacteriocinas que poseen residuos de lantionina y β -metil lantionina (también conocidas como lantibióticos), dichos residuos se generan a partir de modificaciones postraduccionales. El mecanismo de acción de estas bacteriocinas se basa en la unión de éstas al lípido II, principal translocador de subunidades de peptidoglucano ubicado en la membrana celular, con lo que impiden la regeneración de la pared celular; además, una vez ancladas, pueden formar poros en la membrana. En la clasificación también se incluye la clase II, la cual se divide a su vez en cuatro grupos (a, b, c y d). Las bacteriocinas de la clase II son todas aquellas que no contienen residuos de lantionina y que no sufren modificaciones postraduccionales mayores. La mayoría de las bacteriocinas de esta clase basan su actividad en la permeabilización de la membrana celular. La clase IIa, también conocidas como bacteriocinas tipo pediocina, se caracterizan por su gran poder antilisterial. Contienen un motivo conservado en el extremo amino terminal (YGNGVXCXXXXVXV) y pueden tener uno o dos puentes disulfuro. El mecanismo de acción de las bacteriocinas de esta subclase se basa en la unión a un transportador del sistema de fosfotransferasa de manosa (Man-PTS), el cual mantienen abierto, generando un poro que desestabiliza la membrana. Existen otras subclases, como la IIb, que está integrada por bacteriocinas formadas por dos péptidos; la clase IIc, integrada por bacteriocinas cíclicas (su extremo amino y carboxilo están unidos covalentemente); y la clase IId, que incluye otras bacteriocinas lineales no del tipo de la pediocina.

Franz *et al.* (2007) clasifican a las enterocinas (bacteriocinas del género *Enterococcus*) en: clase I o lantibióticos, son aquellos que sufren modificaciones postraduccionales importantes; la clase II incluye los péptidos lineales pequeños que no sufren modificaciones postraduccionales, la clase III son las enterocinas cíclicas y la clase IV son proteínas grandes. La clase II se subdivide en: II.1, enterocinas de la familia de las pediocinas; II.2, enterocinas sintetizadas sin péptido señal y II.3, otras enterocinas lineales que no son tipo pediocinas.

Muchas cepas de enterococos aisladas de alimentos, principalmente *E. faecalis* y *E. faecium*, son capaces de producir una variedad de enterocinas con actividad contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp. y *Vibrio cholerae* (Giraffa, 2003), como la enterocina A, la bacteriocina 31, la bacteriocina RC714, la enterocina SE-K4, la enterocina P, la enterocina L50 o la enterocina Q, entre otras. Se han realizado investigaciones sobre las características de las enterocinas, cepas que las producen, estabilidad y producción en leche y queso, sensibilidad a la renina y al calor, compatibilidad con otras LAB iniciadoras y estabilidad a diferentes valores de pH (Giraffa, 1995), mostrando un gran potencial para su aplicación en alimentos como cultivos protectores. La mayoría de éstas son resistentes a tratamientos térmicos y son estables en rangos amplios de pH, principalmente en condiciones ácidas, y presentan actividad en contra de patógenos Gram positivos, como *Listeria monocytogenes*. Se evaluó la producción de la enterocina 1146 por la cepa de *E. faecium* DPC 1146 en leche descremada y su acción contra *L. monocytogenes*, observándose que esta última fue inhibida de manera efectiva después de 24 h a 30 °C. Un caso similar fue el de la enterocina EFS2, de *E. faecalis* EFS2, que también fue capaz de inhibir al patógeno en leche descremada (Giraffa, 1995).

Las bacteriocinas no son riesgosas para las células eucariontes, se han estado consumiendo en alimentos fermentados desde hace miles de años. Existen estudios sobre la toxicidad de algunas bacteriocinas en donde se ha demostrado la baja toxicidad de la nisina y otros lantibióticos en células humanas. Existen otras que sí muestran citotoxicidad, como la pediocina PA-1, que a concentraciones de 10-20 µg/mL mostró citotoxicidad contra células Vero de riñón de mono; en cambio, otras, como la carnobacteriocina BM1 y B2, no mostraron citotoxicidad significativa en contra de células Caco-2 cuando se probaron a concentraciones 100 veces superiores a las necesarias para observar la actividad antibacteriana (Cotter *et al.*, 2013).

El principal blanco de las bacteriocinas es la envoltura celular de las bacterias blanco, incluyendo la membrana celular y la pared celular (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006), aunque tienen diferentes formas de actuar. Los lantibióticos y la mayoría de las bacteriocinas de la clase II

actúan sobre la pared celular, ya que se anclan al lípido II, que es un intermediario en la síntesis de peptidoglucano, impidiendo su formación. También pueden anclarse al mismo para formar poros en la membrana citoplasmática. Otras bacteriocinas, especialmente las de la clase IIa (como la pediocina PA-1), pueden unirse a otros transportadores de la membrana para la formación de poros. Sin embargo, también pueden actuar a otro nivel, interfiriendo con el metabolismo del ADN, ARN o proteínas (Cotter *et al.*, 2013). Este tipo de bacteriocinas actúan más comúnmente contra bacterias Gram negativas. Un ejemplo es la microcina MccB17, de *E. coli*, que es activa contra *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* y *Pseudomonas* spp. Actúa inhibiendo la DNA girasa, por lo que interfiere con la replicación del ADN. Otro caso es el de la bacteriocina MccJ25, también producida por algunas cepas de *E. coli*, que inhibe la transcripción del ADN al bloquear el canal secundario de la ARN polimerasa (Cotter *et al.*, 2013).

De la clase IIa, destaca la enterocina A por su potente actividad en contra de *Listeria monocytogenes*. La enterocina A es producida principalmente por cepas de *E. faecium*, aunque también se ha reportado en cepas de *E. faecalis* (Franz *et al.*, 2007). Esta enterocina tiene una masa molecular de 4829 Da y está formada por 47 aminoácidos. Es sintetizada como un propéptido biológicamente inactivo con una secuencia líder de 18 aminoácidos, que debe ser cortada al momento de ser externalizada por su propio transportador (Franz *et al.*, 2007). Está codificada en un operón de 10.5 kb, conocido como *entAIFKRTD*, el cual incluye la enterocina A (*entA*), una proteína de inmunidad (*entI*) que evita que la enterocina sea activa en contra de la cepa productora, un sistema regulatorio para su expresión (*entFKR*) y un transportador tipo ABC (*entTD*) (O'Keeffe *et al.*, 1999). El mecanismo de acción de la enterocina A consiste en su unión al transportador de azúcares del sistema de fosfotransferasa de manosa (Man-PTS), que es un transportador que internaliza azúcares y los fosforila. No es exclusivo de manosa, sino que puede transportar una variedad de hexosas como glucosa, manosa, fructosa, glucosamina, galactosamina, etc. La enterocina A se une a este transportador, lo que le provoca cambios estructurales haciendo que el transportador permanezca abierto, como un poro, lo que causa una desestabilización en la membrana celular y la posterior muerte. Este tipo de transportadores no se encuentran en células eucariontes, lo que reduce la toxicidad de esta enterocina en contra de células humanas. Para que la célula productora no se vea afectada por su propia bacteriocina, debe producir una proteína de inmunidad, que está incluida en el operón (*entI*). Esta proteína citosólica se mantiene cerca del transportador Man-PTS; en el momento en que la enterocina abre el poro, la proteína de inmunidad actúa como un tapón, sellando el poro y evitando que se desestabilice la membrana (Kjos *et al.*, 2011).

3.4.2 Peptidoglucano hidrolasas

Otros compuestos con actividad antibacteriana producidos por los enterococos son las peptidoglucano hidrolasas. Aunque no son producidas con este fin, son enzimas que pueden inhibir el desarrollo de otras bacterias. Las peptidoglucano hidrolasas son enzimas que hidrolizan el peptidoglucano, principal componente de la pared celular de bacterias. Están involucradas en funciones que requiere el microorganismo productor para su correcto desarrollo para la modificación de la red tridimensional del peptidoglucano durante el crecimiento y la división celular, tales como el crecimiento de la pared celular, el intercambio de unidades de peptidoglucano durante el crecimiento, la separación de las células hijas durante la división y la autólisis (Vollmer *et al.*, 2008). Sin embargo, también pueden ser utilizadas como agentes antimicrobianos, ya que pueden romper la pared celular de otras bacterias. Un ejemplo es la lisozima, que se utiliza en alimentos como conservador (Callewaert *et al.*, 2011). Los enterococos pueden ser utilizados para la obtención de peptidoglucano hidrolasas con fines tecnológicos y su estudio es un campo prometedor en la sustitución del uso de antibióticos. Por ejemplo, en el genoma de la cepa de *E. faecalis* JH2-2 se detectó la presencia de 20 genes de peptidoglucano hidrolasas (Mesnage *et al.*, 2008), las cuales pueden tener un potencial de aplicación como agentes antimicrobianos.

3.5 Los enterococos en la salud humana

Los enterococos se han utilizado en la producción de alimentos y como probióticos. Por ejemplo, se utiliza una cepa de *Enterococcus faecalis* en el producto Symbioflor 1 (Symbiopharm) como probiótico de uso humano. Sin embargo, a diferencia de otras BAL, no son consideradas generalmente como seguras o GRAS, por sus siglas en inglés, Generally Recognized As Safe (Moraes *et al.*, 2012) y su uso como probióticos y en alimentos es controversial, debido a que se asocian con infecciones nosocomiales, endocarditis, infecciones del tracto urinario, sistema nervioso central, abdomen y pelvis en pacientes inmunocomprometidos. Pueden poseer varios genes de resistencia a antibióticos que son transmisibles por conjugación a otros microorganismos. Además, se han identificado factores de virulencia en cepas de enterococos de origen nosocomial, como sustancias de agregación, gelatinasas, citolisinas, proteínas de superficie y hialuronidasa. A pesar de esto, algunos de los factores de virulencia se pueden considerar como genes importantes en su función como probióticos, tal es el caso de las proteínas de superficie y las sustancias de agregación (Franz *et al.*, 1999; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Martín-Platero *et al.*, 2009; Cebrián *et al.*, 2012; Moraes *et al.*, 2012). Cuando se analiza la presencia de factores de virulencia en aislados de diferentes

fuentes, se ha observado que su incidencia es significativamente mayor en aislados clínicos que en aislados de animales y alimentos. Además, se ha concluido que las cepas de enterococos que carecen de actividad hemolítica y que no presentan genes de citolisinas ni de resistencia a antibióticos como la vancomicina, pueden ser consideradas como seguras y se pueden utilizar como cultivos en alimentos (iniciadores y no iniciadores) o probióticos (De Vuyst *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2010).

3.6 Ingeniería genética aplicada en alimentos fermentados

Las BAL se han usado desde hace siglos en procesos fermentativos para la producción de alimentos, muchos de los cuales incluso se continúan haciendo de forma tradicional. Aunque algunos procesos tecnológicos se han ido mejorando con el paso del tiempo, el metabolismo de las bacterias utilizadas se ha mantenido prácticamente sin cambios. La optimización de su rendimiento ocurre a través de un periodo muy largo por selección natural o estudios de mutagénesis, seguido de un trabajo arduo de escrutinio (Peterbauer *et al.*, 2011).

En los últimos años se han llevado a cabo numerosas investigaciones de ingeniería genética en BAL usadas en alimentos fermentados a nivel industrial, lo que ha resultado en la posibilidad de crear nuevas cepas, cultivos iniciadores o probióticos. Ahora es una realidad el diseño de cepas productoras de proteínas, enzimas o metabolitos con aplicación en alimentos, favoreciendo características como mayor viabilidad, estabilidad, producción y tasas de crecimiento (Peterbauer *et al.*, 2011). Un ejemplo es la modificación de una cepa de *L. lactis* para acelerar la maduración de quesos. Esto se logró mediante la clonación y expresión de los genes *lytA* y *lytH*, que codifican para una lisina y una holina, utilizando un vector grado alimenticio inducido con nisina. Con esto, se obtuvo una lisis controlada de la bacteria con el fin de que liberara al medio enzimas involucradas en la producción de aromas y sabores deseables en quesos. Se realizaron experimentos en quesos modelo, pudiéndose obtener una lisis y liberación de enzimas, acelerando el proceso de maduración (de Ruyter *et al.*, 1997). Otro ejemplo es la producción de bacteriocinas, como la enterocina A de *E. faecium* en cepas de *Lactococcus* o *Lactobacillus*. Las BAL se han estado desarrollando como fábricas celulares grado alimenticio para la producción de enzimas, proteínas o péptidos para su uso como ingredientes o agentes terapéuticos. La producción de este tipo de compuestos ha sido estimulada por el desarrollo de sistemas de clonación y expresión de genes. El más utilizado es el sistema de expresión controlado por nisina. Sin embargo, muchas veces presenta bajos rendimientos. Además, no siempre es deseable la necesidad de emplear un inductor. La BAL más empleada con este

propósito es *Lactococcus lactis*, la cual se ha utilizado para la producción de nisina y lisostafina (de Vos y Hugenholtz, 2004).

Por otro lado, estas nuevas herramientas conllevan consideraciones sobre la seguridad de las cepas y productos, así como medidas regulatorias para su control. El uso de organismos genéticamente modificados (OGM) en la industria alimentaria está muy regulado. Las cepas hospedadoras utilizadas en ingeniería genética deben ser seguras, estar bien caracterizadas taxonómicamente, ser estables en procesos de gran escala a nivel industrial y tener el estatus GRAS. No se puede utilizar la resistencia a antibióticos como marcador de selección. Tampoco está permitido la producción de compuestos peligrosos (tóxicos o alérgenos). Las técnicas de manipulación genética deben cumplir con el criterio de la autoclonación (self-cloning). La autoclonación se refiere a que el ADN que se introduce en la cepa hospedadora debe ser obtenido de un organismo del mismo género, además de pequeños fragmentos sintéticos que no codifiquen para proteínas o ARN, tales como sitios de reconocimiento. Incluso se permite la introducción de genes de organismo que no están estrechamente relacionados (de otros géneros), siempre y cuando el organismo donador sea GRAS. Los microorganismos modificados que cumplen con los principios de autoclonación no son considerados OGMs mientras sean utilizados en contención. Se consideran OGMs en el momento en el que son liberados al ambiente (Peterbauer *et al.*, 2011).

Durante los últimos años se han desarrollado sistemas de expresión de genes con marcadores de selección grado alimenticio, basados en la integración de genes y estrategias de replicación.

Manipulación del cromosoma: Muchos de los vectores de integración utilizados en BAL se utilizan para generar mutaciones, ya sea por interrupción sitio-específica, por integración o reemplazo de un gen. Muchos de los vectores se han diseñado para llevar a cabo recombinaciones de manera "limpia", es decir, que el gen de interés es integrado al cromosoma sin afectar a los genes contiguos. Generalmente, el proceso de recombinación ocurre en regiones no codificantes. No se inserta ADN adicional al gen blanco para no interferir con la expresión de los genes vecinos. La integración de genes blanco al cromosoma por autoclonación se considera segura y da gran estabilidad. Los plásmidos de integración se pueden dividir en dos grupos: los de integración en un solo paso tipo Campbell y los de recombinación homóloga en uno o dos pasos. Durante la integración tipo Campbell ocurre una sola reacción de entrecruzamiento y se inserta el vector completo en el cromosoma. En el caso del evento de recombinación en uno o dos pasos, el plásmido de integración cuenta con dos regiones homólogas que están cercanas. Cuando se lleva a cabo la recombinación en un paso,

ocurre un doble entrecruzamiento simultáneo, mientras que para el de dos pasos, primeramente, se integra el vector completo (integración tipo Campbell) y posteriormente ocurre una deleción de un asa. Para este tipo de sistemas de integración, el origen de replicación del vector no debe ser funcional o debe ser termosensible para que no se pueda replicar por sí solo y no se conserve en las siguientes generaciones. Se han creado una serie de vectores en los que se eliminó el gen de inicio de la replicación (*repA*) para evitar que ésta se lleve a cabo en cualquier cepa. Sin embargo, es necesario replicarlo en algún hospedero, por lo que este gen fue integrado al cromosoma de algunas cepas para que ejerciera su función en *trans* (Peterbauer *et al.*, 2011).

Dentro de las técnicas de manipulación del cromosoma, se ha desarrollado una técnica conocida como intercambio alélico o intercambio genético sin marcadores, debido a que las mutantes no retienen ningún marcador de resistencia a antibióticos. El intercambio alélico se lleva a cabo usando una estrategia de dos pasos de integración-segregación, en la cual un plásmido no replicativo acarrea el gen de interés y se integra al cromosoma mediante una recombinación homóloga tipo Campbell. Posteriormente, se lleva a cabo una segunda recombinación para integrar únicamente el gen de interés. Debido a que las recombinantes pierden el esqueleto del plásmido, no hay una manera directa de seleccionarlas. Para facilitar su identificación, se usa un marcador de contraselección. Se han desarrollado varias estrategias de contraselección que se basan en la inhibición del crecimiento de las recombinantes al adicionar al medio alguna sustancia en específico, como puede ser *p*-Cl-Phe, que se incorpora a las proteínas y las hace no funcionales (Kristich *et al.*, 2007a).

Vectores de expresión: Estos sistemas se basan en la integración y retención de un vector de expresión en la cepa hospedera. No deben contener resistencia a antibióticos como marcadores de selección, para disminuir el riesgo de su transferencia horizontal a bacterias presentes en el tracto gastrointestinal de humanos. En su lugar, pueden contener genes que les permitan utilizar azúcares raros o poco comunes (selección dominante) o se pueden seleccionar mediante la complementación de mutaciones específicas en un paso esencial de alguna ruta metabólica (Peterbauer *et al.*, 2011).

Una parte importante para la expresión de genes es la presencia y la fuerza de un promotor. Un promotor es una secuencia de ADN cuya función es ser reconocida por proteínas, en este caso, la ARN polimerasa, para que se inicie la transcripción. Los sistemas de expresión basados en vectores pueden hacer uso de promotores inducibles, como el promotor inducible con nisina

P_{nisA} (Peterbauer *et al.*, 2011), o hacer uso de promotores constitutivos, como el promotor P_{32} (Borrero *et al.*, 2011).

4. Antecedentes

4.1 Grupo de trabajo

El queso Cotija se elabora de manera artesanal a partir de leche entera y bronca que proviene de ganado cebú o criollo alimentado por pastoreo libre. En ninguna etapa de la elaboración sufre algún tratamiento térmico como la pasteurización, ni se adicionan cultivos iniciadores intencionalmente. El queso Cotija artesanal madurado, tiene un mínimo de tres meses de vida dentro del lugar que se produce antes de ser comercializado, por lo que desarrolla aromas y sabores característicos intensos (Álvarez-Barajas *et al.*, 2005; Cervantes-Escoto *et al.*, 2008). Después de este tiempo, la calidad microbiológica del queso es aceptable, ya que la cuenta de coliformes totales disminuye drásticamente y no se han encontrado microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*, *Brucella abortus*, *Salmonella enterica*, etc. Esta buena calidad microbiológica se atribuye en parte a las características fisicoquímicas del queso, como la baja actividad acuosa, alto contenido de sal y bajo pH; sin embargo, se pensó que ésta podría ser atribuible a la presencia de BAL y a la producción de compuestos antibacterianos. En el grupo de trabajo se aislaron siete cepas de *Enterococcus* spp. de queso Cotija artesanal madurado (Bravo-Mendoza, 2008), de las cuales, tres fueron *E. faecalis* y cuatro *E. faecium* (Zúñiga-Bustos, 2009; Serrano-Maldonado, 2010). El género *Enterococcus* persiste al final de la maduración como una de las bacterias subdominantes (entre 1 y 10 % de la población total) (Escobar-Zepeda *et al.*, 2016) y se piensa que contribuyen a la buena calidad microbiológica del queso. Una cepa de las cepas aisladas de *E. faecalis* (F) es capaz de producir compuestos extracelulares con actividad antibacteriana contra microorganismos patógenos, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella entérica* y *Pseudomonas aeruginosa*. Esta actividad está dada principalmente por la acción de peptidoglucano hidrolasas (García-Cano *et al.*, 2014). En un estudio realizado para conocer más del papel de esta cepa de enterococos en el queso Cotija realizado por Olvera-García *et al.* (2018), en el cual se realizó la secuenciación completa de su genoma, se encontró la presencia de genes relacionados con la producción de compuestos antibacterianos, entre ellos el operón para la producción de la enterocina P y 15 genes de peptidoglucano hidrolasas; también se encontraron genes relacionados con actividad caseinolítica, actividad de lipasa y esterasa, para la producción de acetoína, diacetilo, acetato, acetaldehído y etanol, involucrados en la generación de aromas, sabores y textura del producto final.

En lo referente a la seguridad de esta cepa, no presenta potencial de patogénesis, ya que no tiene genes que codifican para citolisinas, y fenotípicamente resultó ser no hemolítico. En ensayos de adherencia a células de adenocarcinoma de colon, no mostró adherencia ni daño a células de intestino; además, es susceptible a antibióticos como vancomicina, penicilina, ampicilina y tetraciclina, y resistente a bajas concentraciones de eritromicina, gentamicina, estreptomina y kanamicina, lo que lo aleja de las cepas nosocomiales que presentan múltiple resistencia a antibióticos, ni presenta islas de patogenicidad. También se buscó la presencia de aminas biógenas en muestras de queso Cotija, encontrándose una muy baja concentración por debajo de los límites permitidos (Olvera-García *et al.*, 2018). Con todos estos elementos, la cepa F de *E. faecalis* puede ser considerada como segura.

4.2 Enterocinas de *E. faecalis*

4.2.1 Enterocina A

La enterocina A (EntA) es una bacteriocina de 4.8 kDa, resistente al calor, perteneciente a la clase IIa y consiste en 47 aminoácidos. Fue descrita por primera vez en *E. faecium*. Se ha reportado que es activa contra un amplio espectro de bacterias Gram positivas, dentro de las que se encuentran algunas especies de los géneros *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Listeria*, *Staphylococcus* y otras bacterias ácido lácticas. Es estable al calor y su síntesis es dirigida por el operón *entAIFKRTD*. El operón completo consta de 10879 bp. Muchas bacteriocinas se sintetizan como precursores inactivos que contienen una secuencia líder en el extremo N-terminal. Esta secuencia es cortada cuando se exporta a través de la membrana por transportadores ABC. Tal es el caso de EntA. Los genes *entA*, *entI* y *entF* codifican para el prepéptido con la secuencia líder, la proteína de inmunidad y el factor de inducción, respectivamente. EntK y EntR forman el sistema de transducción de señales de dos componentes y, finalmente, EntT y EntD son homólogos al transportador ABC.

Se ha clonado un amplicón de 10.5 kpb que incluye el operón completo (todos los marcos de lectura y regiones regulatorias), resultando en la producción heteróloga de la enterocina A. También se ha clonado una construcción de cuatro genes (*entAITD*) bajo el control del promotor constitutivo P₃₂ (4 kpb), resultando en la producción heteróloga de la enterocina A tanto en *E. faecalis* como en *Lactococcus lactis* (O’Keeffe *et al.*, 1999). De la misma manera se clonó una construcción de los genes *entAI* bajo el control de P₃₂, resultando en la producción de la enterocina A y la inmunidad de la cepa productora; sin embargo, la proteína no fue secretada debido a la ausencia de los genes involucrados en el transporte (O’Keeffe *et al.*, 1999).

La Enterocina A ha sido clonada y expresada en otras cepas de bacterias lácticas. Se pudo producir en *Lactococcus lactis* MG1614 mediante el plásmido pEnt02, que contenía los genes para la producción de la Enterocina A. Sin embargo, disminuyó su tasa de crecimiento y producción de ácido. Por lo que se tuvo que emplear en conjunto con otra cepa no productora de la enterocina en queso Cottage. Las muestras de queso fueron inoculadas con *L. monocytogenes*, observándose disminución hasta niveles no detectables (Liu *et al.*, 2008).

Existen otras bacteriocinas, como la enterocina P de *Enterococcus faecium*, que contienen un péptido señal que es cortado proteolíticamente al externalizarlo por la vía dependiente de Sec. Este sistema está conservado universalmente, por lo que cualquier proteína que contenga el péptido señal será transportada, ya madura, al exterior. Existen trabajos en los que se crean quimeras en las que se fusiona el péptido señal de la enterocina P con la secuencia que codifica para la proteína madura de la enterocina A bajo el control del promotor P₃₂ (585 pb), obteniéndose buenos resultados de actividad antibacteriana (Borrero *et al.*, 2011).

4.2.2 Producción heteróloga de bacteriocinas y su aplicación en alimentos

Como se mencionó, las BAL juegan un papel importante en alimentos fermentados a través de la acidificación del medio, competencia por nutrientes y la producción de compuestos inhibitorios que actúan como conservadores naturales para prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos. Por estas razones, las BAL son usadas frecuentemente para aumentar la seguridad y extender la vida de anaquel de muchos alimentos perecederos (Franz *et al.*, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Por lo que sería interesante desarrollar métodos grado alimenticio para la expresión de los compuestos inhibitorios que las BAL producen. Se pueden construir cepas modificadas que difieran únicamente en su capacidad de producir algún compuesto, como pudiera ser una bacteriocina, resultando así más fácil evaluar el efecto de dicho compuesto en el alimento. Además, el desarrollo de estrategias para la expresión heteróloga de bacteriocinas de BAL ofrece algunas ventajas sobre el uso de sistemas nativos, permitiendo seleccionar organismos productores seguros para su uso como cultivos iniciadores, protectores o probióticos (Fernández *et al.*, 2006).

Aunque el género *Enterococcus* es el grupo más controversial de las BAL, su contribución a las propiedades organolépticas de alimentos fermentados (quesos, salchichas, vegetales, etc.) y, además, su capacidad de producir enterocinas, son importantes para ser considerados para su aplicación en tecnología de alimentos (Giraffa, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Pese a que muchos autores los consideran inaceptables para su aplicación, algunas cepas, como *E.*

faecium K77D, han sido aprobadas para su uso como cultivos iniciadores en productos lácteos y otras para su uso como probióticos (Fernández *et al.*, 2006). Una razón de esto es la capacidad para producir bacteriocinas, como la AS-48. Sin embargo, la selección de las cepas productoras debe estar basada siempre en la ausencia de factores de virulencia. Estudios recientes han revelado que tales características dependen de cada cepa (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Existen varios reportes de enterococos manipulados genéticamente con el fin de sobreexpresar distintas bacteriocinas, pero no siempre se mantiene el estatus de grado alimenticio (Fernández *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2006; Borrero *et al.*, 2011).

4.2.3 Clonación en *Enterococcus faecalis*

Se han desarrollado varios plásmidos que permiten la clonación y expresión de proteínas heterólogas en *Enterococcus faecalis*. Así se tienen los vectores pDL267 (Dunny, 1991); pLS1 (Lacks *et al.*, 1986); pHHA223 (Hasman *et al.*, 2006); pMSP3535 y pMSP3535VA, cuya expresión es inducida con nisina (Bryan *et al.*, 2000); pCJK96, inducible con ramnosa (Kristich *et al.*, 2007b). Sin embargo, todos estos plásmidos confieren resistencia a algún antibiótico como marcadores de selección. *E. faecalis* muestra grandes niveles de resistencia a antibióticos usados normalmente en el laboratorio y tiene la capacidad de intercambiarla mediante transferencia horizontal. Por tal razón, existe un número limitado de marcadores de selección y los plásmidos enunciados previamente resultan inconvenientes.

Dadas las desventajas de los sistemas de clonación con plásmidos, también se han probado distintos métodos de integración de genes directamente en el cromosoma de *Enterococcus*. Kristich y colaboradores (2007a) desarrollaron un sistema de intercambio alélico sin marcadores con el que se pueden insertar fragmentos de ADN en sitios específicos del genoma de *E. faecalis*. Para llevar a cabo la inserción de genes en el cromosoma, este sistema se basa en la utilización de un plásmido auxiliar que contiene al gen de interés. Para que dicho gen sea entregado dentro del cromosoma de la bacteria, el plásmido completo se debe de integrar mediante recombinación homóloga. En esa primera instancia, para poder diferenciar a las colonias que han integrado el plásmido de las que no, se incluye en el plásmido uno (o varios) marcadores de selección. Después, se debe de llevar a cabo un segundo evento de recombinación para que se libere el resto del plásmido y únicamente se mantenga en el cromosoma el gen de interés. Como sólo se desea seleccionar aquellas clonas que hayan integrado el gen al cromosoma, el plásmido no es replicativo, es decir, no tiene un origen de replicación, por lo que, para que las nuevas generaciones contengan el gen de interés, debe estar integrado al cromosoma y replicarse con la maquinaria propia de la célula. Para poder

hacer toda la manipulación y construcción del vector, así como replicarlo para tenerlo en concentraciones adecuadas para trabajar, se hace uso de una cepa especial que contiene el origen de replicación del plásmido codificado en su cromosoma, es decir, en *trans*. Mientras el plásmido esté dentro de esta cepa, se podrá replicar de manera normal. Si está dentro de otra cepa, pero no integrado al cromosoma, no se replicará y se perderá, ya que las nuevas generaciones no lo tendrán. En este sistema, la entrega del plásmido se hace mediante conjugación y no por transformación (como pudiera ser la electroporación), ya que, tras varias pruebas, se determinó que la efectividad era mayor por este método. Por tal razón, el plásmido incluye también un origen de transferencia.

Posteriormente, DebRoy y colaboradores (2012) identificaron un sitio en el genoma de *E. faecalis* OG1RF y muchas otras cepas, flanqueado por dos marcos de lectura convergentes en el cual es posible insertar genes de interés sin afectar la expresión de otros y utilizaron el sistema de intercambio alélico de Kristich para la expresión de proteínas fluorescentes.

Este sistema tiene varias ventajas. Primero, permite hacer ensayos de complementación sin necesidad de mantener dos plásmidos diferentes dentro de la misma bacteria. Segundo, elimina la necesidad de utilizar antibióticos como marcadores de selección, ya que, al final del proceso, no se retiene ningún marcador de selección. Tercero, permite la introducción de uno o varios genes, o el mismo gen en múltiples copias. Y finalmente, permite la adición de genes que no son parte del genoma nativo de una manera estable. Esta metodología hace uso del plásmido pCJK47, el cual fue construido a partir de un fragmento de 243 pb que contiene el origen de transferencia (*oriT*) del vector pCF10 y se insertó en el vector pORI280 (Kristich *et al*, 2007a). Posteriormente, se amplificaron los genes de los dos marcos de lectura entre los cuales se identificó el sitio de inserción de genes de interés (*ef2238* y *ef2239*). También se le incorporó un promotor constitutivo, el cual fue ligado con el gen de interés. La construcción fue introducida por electroporación a la cepa *E. faecalis* CK111 (que contiene el origen de replicación del plásmido en su cromosoma), la cual, mediante conjugación, transfirió el plásmido a las cepas de expresión (DebRoy *et al*, 2012). El intercambio alélico se realizó según la metodología planteada por Kristich *et al* (2007a).

5. Justificación

La justificación de este proyecto se puede ver desde dos puntos de vista que se complementan. El primero es un punto de vista tecnológico y el segundo es un punto de vista meramente para el estudio de la cepa *E. faecalis* F aislada de queso Cotija. A continuación, se describe la importancia de cada uno.

Punto de vista tecnológico.

Desde este punto de vista, es relevante seguir generando herramientas para el control de *Listeria monocytogenes*, dada su importancia en salud pública, debido a su alto porcentaje de mortalidad, su ubicuidad y la dificultad para eliminarlo por su alta resistencia a condiciones de estrés, como bajas temperaturas, alta concentración de sal y bajo pH. Es necesario continuar generando métodos efectivos para su control, sobre todo en alimentos con estas características, como algunos quesos o productos cárnicos madurados. Otro microorganismo que puede resistir condiciones similares es *Enterococcus faecalis*. Además, se trata de una bacteria ácido láctica que puede desarrollar funciones tecnológicas en algunos alimentos. Una cepa en especial, la cual fue aislada de queso Cotija artesanal, presenta actividad antibacteriana en contra de algunos patógenos. Parte de esta actividad está dada por la producción de peptidoglucano hidrolasas. No se ha observado que produzca bacteriocinas, y si lo pudiera hacer, su actividad inhibitoria podría ser mayor. Una bacteriocina que destaca por su fuerte poder antilisterial es la enterocina A, producida por cepas de *E. faecium* y *E. faecalis*. Otros grupos de trabajo han realizado esfuerzos por sacar provecho de esta bacteriocina, al clonarla y sobre expresarla o al clonarla en algunas cepas de bacterias ácido lácticas con el fin de utilizarlas en alimentos. Sin embargo, su aplicación no puede llevarse a cabo debido a que se utilizaron sistemas de expresión en los que se utilizan genes de resistencia a antibióticos como marcadores de selección.

Con todo lo anterior, se propone clonar y expresar la enterocina A en la cepa de *E. faecalis* F (aislada de queso Cotija) con el fin de utilizarla como un cultivo protector en alimentos fermentados. Para ello, es muy importante el método a utilizar. Para no tener que trabajar con el operón completo para la expresión y externalización de la bacteriocina, se planteó utilizar una construcción previamente empleada con éxito por Borrero y colaboradores (2011) en la que se emplea un promotor constitutivo, un péptido señal reconocido por un sistema de transporte de proteínas presente en todas las bacterias y los genes estructurales de la enterocina A y su proteína de inmunidad, con lo que el tamaño se reduce a poco más de 700 pb. Además, para el desarrollo de este trabajo se propuso utilizar un método de integración directa al cromosoma, con el fin de no depender de un plásmido y su marcador de selección, ni de tener que someter a ese estrés a la célula para que retenga el plásmido a lo largo de muchas generaciones. También se elimina la necesidad de incluir genes de resistencia a antibióticos que pudieran ser transferidos a otras cepas que pudieran ser patógenas. Además, se aprovecha una cepa

aislada de un alimento y que puede aportar no sólo a la inocuidad del producto, si no a la generación de aromas y sabores deseables en quesos y productos cárnicos madurados.

Estudio de la cepa E. faecalis F.

E faecalis F es una cepa que continúa en estudio en el grupo de trabajo. Su genoma ya fue secuenciado y no se ha observado evidencia de que pueda resultar un patógeno oportunista y, por el contrario, se puede pensar que tiene potencial como probiótico. Al aprovechar un método de manipulación genética como el reportado previamente por Kristich y colaboradores (2007a), es posible agregar o eliminar genes y ver cómo esto afecta en el comportamiento general de la cepa. Se pueden integrar genes para la expresión de proteínas con fin tecnológico o de salud, además de que también se pueden eliminar genes involucrados en resistencia a antibióticos o algunos otros indeseados.

6. Hipótesis

La clonación y expresión eficiente de la enterocina A en la cepa *E. faecalis F*, mediante la inserción de los genes que codifican para la bacteriocina y su proteína de inmunidad, permitirán que la cepa presente mayor actividad antibacteriana, sobre todo contra *L. monocytogenes*,

7. Objetivo general

Aumentar la actividad antibacteriana de la cepa *Enterococcus faecalis F* mediante la clonación y expresión de los genes que codifican para la Enterocina A y su proteína de inmunidad para su posible aplicación como cultivo protector en alimentos.

7.1 Objetivos particulares

- Producción de la enterocina A en la cepa *Enterococcus faecalis F*.
- Incrementar la actividad antibacteriana de la cepa *Enterococcus faecalis F* contra *L. monocytogenes*.
- Determinar actividad antibacteriana contra patógenos y bacterias ácido lácticas.

8. Metodología

8.1 Cepas y plásmidos

Las cepas y vectores fueron donadas por el Dr. Christopher J. Kristich (Medical College of Wisconsin) y las Dras. Sruti DebRoy y Danielle Garsin (The University of Texas Health Science Center at Houston). Las características de cada uno y de todas las demás cepas, vectores y cebadores utilizados en este estudio se muestran en la Tabla 1.

El plásmido pCJK47 (Figura 1) es la base para la construcción del que se transfirió a la cepa receptora para producir las proteínas de interés. Se replica en *E. coli* EC1000 (RepA en *trans*). Tiene un tamaño de 6816 pb. Confiere resistencia a eritromicina para poder seleccionar, en un primer paso, a las colonias que integraron el plásmido por recombinación. Contiene el gen *lacZ*, que codifica para la β -galactosidasa, la cual hidroliza el X-gal, por lo que las colonias que lo contienen son azules. También presenta el gen de *PheS*, por lo que las transformantes pueden utilizar p-cloro fenilalanina, haciendo que las proteínas no sean funcionales, impidiendo su crecimiento (contra selección). Una vez en la cepa de *E. faecalis*, las colonias que integraron el plásmido a su cromosoma, se lleva a cabo un segundo evento de recombinación, por lo que pierden la resistencia al antibiótico, la capacidad de hidrolizar X-Gal y de utilizar p-cloro fenilalanina.

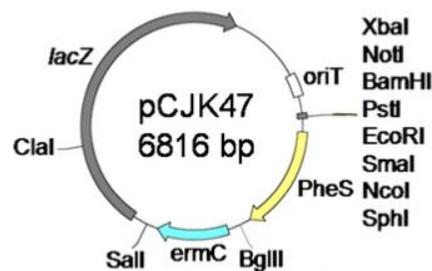


Figura 1. Plásmido pCJK47.

El plásmido pSD15 (Figura 2) se deriva de pTOPOIC, que a su vez proviene de pCR/GW8/TOPO, pero con los sitios de recombinación en donde se va a insertar la construcción de interés. Ese sitio está compuesto por los genes *ef2238* y *ef2239* con la secuencia de corte de la enzima *SmaI* intermedio y el sitio múltiple de clonación del plásmido pSTBlue. Se utilizó para realizar la construcción del gen de interés con las secuencias de recombinación para insertar en el cromosoma de *E. faecalis*; después, esta construcción se insertó directamente en el vector pCJK47, que es el que se usó para transformar en *E. faecalis* F. Codifica para resistencia a espectinomicina. Replica en *E. coli* EC1000 y tiene un tamaño de 4941 pb.

Tabla 1. Cepas, plásmidos y cebadores utilizados en este estudio.

	Descripción	Referencia
Cepas		
<i>Enterococcus faecalis</i>		
F	Cepa silvestre, aislada de queso Cotija, no productora de EntA.	García-Cano <i>et al.</i> , 2014.
F EntA	Cepa recombinante productora de enterocina A.	Este estudio.
V583 (ATCC 700802)	Cepa patógena usada en espectro de inhibición.	ATCC.
ATCC 29212	Cepa patógena usada en espectro de inhibición.	ATCC
<i>Enterococcus faecium</i>		
G	Aislada de queso. Usada en espectro de inhibición.	García-Cano <i>et al.</i> , 2014.
<i>Escherichia coli</i>		
EC1000	Hospedero para los plásmidos basados en pCJK47; provee RepA <i>en trans</i> .	Kristich <i>et al.</i> , 2007a.
DH5 α	Cepa usada para la construcción de los plásmidos basados en pSD15.	Laboratorio.
<i>Listeria monocytogenes</i>		
CFQ-B-103	Usada en espectro de inhibición.	Colección del cepario de la Facultad de Química, UNAM (WDCM No. 100).
<i>Listeria innocua</i>		
CFQ-B-232	Usada en espectro de inhibición.	Colección del cepario de la Facultad de Química, UNAM (WDCM No. 100).
<i>S. aureus</i>		
ATCC 6538	Usada en espectro de inhibición.	ATCC
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		
R011	Usada en espectro de inhibición.	Lallemand Health Solutions.
<i>Lactobacillus casei</i>		
R0215 ND	Usada en espectro de inhibición.	Lallemand Health Solutions.
Plásmidos		
pUCP32	Construcción P ₃₂ -MP-EntAI insertada en el vector pUC18 digerido con PstI.	Este estudio. Sintetizado por Epoch Life Sciences.
pSD15	Plásmido con el sitio de inserción a cromosoma (pTOPOIC MCS).	DebRoy <i>et al.</i> , 2012.
pCJK47	Plásmido para intercambio alélico sin marcadores.	Kristich <i>et al.</i> , 2007a.
Cebadores		
338F	5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'	Muyzer <i>et al.</i> 1993.
518R	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'	Muyzer <i>et al.</i> 1993.
ES-MPf	5'-CCT GCA GTA AGG AGG ATT TTT GAA ATG AGA AA AA-3'	Este estudio.
ES-AX	5'-CGC TCG AGG CAT TTT TTT TCA TTT TAG CAC TTC-3'	Este estudio.
Ef2238F	5'-GCA CCA TGG GAG AAG GAG GCA TTT AGA-3'	Este estudio.
Ef2239R	5'-GTC GGA TCC GCC CTT GGT AAA ACT AG-3'	DebRoy <i>et al.</i> , 2012.
entAF	5'-AAATATTATGGAAATGGAGTGTAT-3'	Du Toit <i>et al.</i> 2000
entAR	5'-GCACTTCCCTGGAATTGCTC-3'	Du Toit <i>et al.</i> 2000

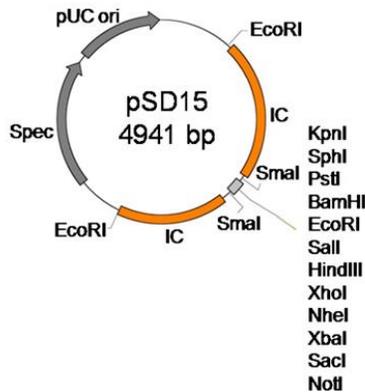


Figura 2. Plásmido pSD15.

8.2 Medios de cultivo y antibióticos

E. coli EC1000 fue utilizada como cepa hospedera para los plásmidos basados en pCJK47 y *E. coli* DH5 α para los basados en pSD15. Ambas cepas fueron cultivadas en caldo Luria Bertani [Bacto Triptona 10 g/L (Becton, Dickinson and Company (BD), Sparks, MD, USA), extracto de levadura 5 g/L (BD), NaCl 10 g/L (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA), pH 7.5] a 37 °C. Cuando fue necesario, se agregaron antibióticos en las siguientes concentraciones: eritromicina (Em; E5389) 300 μ g/mL; espectinomicina (Sp; S4014) 100 μ g/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). *E. faecalis* F (CFQ-B-254) fue utilizada como la cepa receptora de la construcción génica y productora de la enterocina A. Las cepas de *Enterococcus* fueron propagadas en caldo BHI (BD). Para la selección de las transformantes se utilizó X-Gal a 250 μ g/mL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y p-Cl-fenilalanina 10mM (C6506, Sigma-Aldrich) Todas las cepas utilizadas para determinar el espectro de inhibición fueron cultivadas en caldo BHI. Para la cuantificación selectiva de *L. monocytogenes*, se utilizó agar Vogel-Johnson (VJ, Oxoid, Basingstoke, UK) adicionado con 5 g/L de LiCl (10 g/L en total) (J.T. Baker), mientras que para la cuantificación de *E. faecalis* se utilizó agar kanamicina esculina azida de sodio (KAA, Oxoid) adicionado con 20 mg/L de kanamicina.

8.3 Manipulación de ADN, síntesis de la construcción génica y de los cebadores para PCR

La construcción génica o quimera que contiene los genes que codifican para el péptido señal de la enterocina P (*MP*) fusionado con el gen de la enterocina A madura y su proteína de inmunidad (*entA*), como lo reportado en Borrero *et al.* (2011), más el promotor constitutivo P₃₂ (van der Vossen *et al.* 1987), fue sintetizada por Epoch Life Science Inc. (Sugar Land, TX, USA)

y recibida dentro del vector pUC18. La secuenciación de los amplicones y plásmidos se realizó en Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). Todos los cebadores utilizados fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, Iowa, USA) y se muestran en la Tabla 1. Se utilizó la *Pfu* DNA polimerasa (EP0501) para las reacciones de PCR con tamaños de amplicones de menos de 1000 pb, mientras que para los amplicones mayores, se utilizó la Long PCR Enzyme Mix (K0182). Las enzimas de restricción utilizadas fueron PstI (ER0611) y Fast Digest EcoRI (FD0247), mientras que la ligasa fue la T4 DNA Ligase (EL0011), todas de Thermo Scientific.

La extracción de plásmidos se realizó a partir de 5 mL de un cultivo de 12 h a 37 °C. Se utilizó el kit GeneJET plasmid miniprep de Thermo Scientific y se siguieron las instrucciones del proveedor.

Para la determinación de la concentración de ADN y la relación 260/280 nm, se utilizó el lector de microplacas Epoch con el aditamento Take3.

8.4 Detección del gen de la enterocina A mediante PCR

Para detectar la presencia del gen de la enterocina A, tanto en las cepas control como en los plásmidos y construcciones realizadas, se utilizaron dos pares de cebadores: ES-MPf / ES-AX o entAF / entAR (Tabla 1). Se realizó una PCR utilizando la *Pfu* DNA Polimerasa (Thermo Scientific) siguiendo las concentraciones y condiciones mostradas en las Tablas 2 y 3. Los amplicones obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 2. Componentes de la reacción para la detección de la enterocina A.

Reactivo	Concentración final
Buffer Pfu + MgSO ₄	1x
dNTPs	0.2 mM
Cebador directo	0.2 μM
Cebador reversa	0.2 μM
ADN	2 ng/μL
<i>Pfu</i> polimerasa	0.025 U/μL

Tabla 3. Condiciones para la reacción de detección de la enterocina A.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30 s	
Alineamiento	52 (entAF/R) ó 55 ES-MPf/AX)	30 s	30
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	10 min	1

Adicionalmente, fue utilizado otro par de cebadores para amplificar una región más grande, que incluye los sitios de recombinación, usando el par de cebadores Ef2238F / Ef2239R (Tabla 1); el amplicón incluye los genes contiguos utilizados para la recombinación homóloga (*ef2238* y *ef2239*). La composición de la mezcla de PCR fue la misma que la de la Tabla 2, sólo que la enzima utilizada fue la Long PCR Enzyme Mix. Las condiciones de la PCR fueron las mostradas en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones para la reacción de confirmación de la inserción de la enterocina A en el sitio.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	20 s	
Alineamiento	56	30 s	10
Extensión	68	4 min	
Desnaturalización	94	20 s	
Alineamiento	56	30 s	20
Extensión	68	4 min + 2 s / ciclo	
Extensión final	68	10 in	1

8.5 Clonación de la quimera (P₃₂-MP-EntAI) en el vector pSD15

El primer paso para la integración de un gen de interés al cromosoma de *Enterococcus faecalis* siguiendo la metodología de DebRoy (2012), consiste en la construcción de un vector que contenga dicho gen y los sitios en donde se llevará a cabo la recombinación homóloga (Figura 3). Para esto, se utilizó el vector pSD15, que contiene los genes *ef2238* y *ef2239*, los cuales están presentes en todas las cepas de *E. faecalis* y al clonar algún gen entre ellos no se ve afectada la expresión de ningún otro gen. La quimera sintetizada contiene la secuencia que

reconoce la enzima de restricción PstI en ambos extremos, y que también está incluida en el sitio múltiple de clonación del vector pSD15.

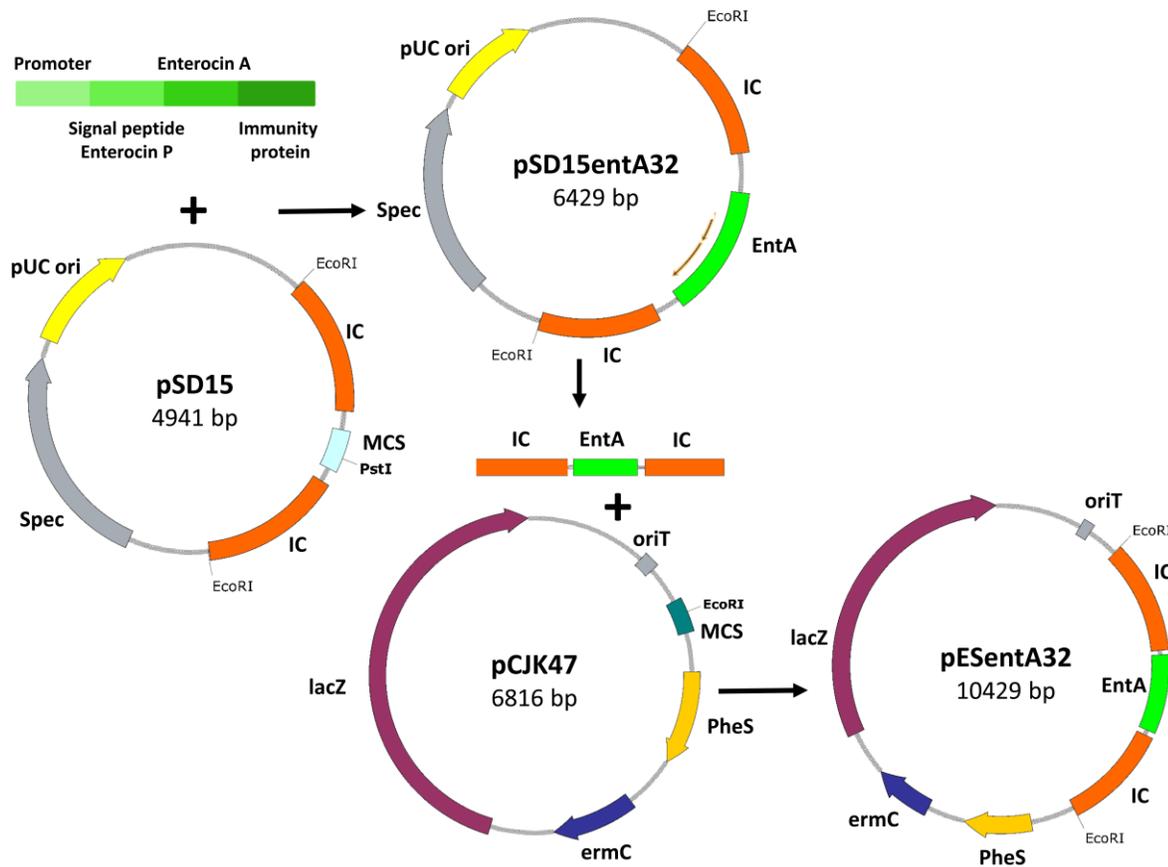


Figura 3. Estrategia de clonación y construcción de plásmidos.

Se llevó a cabo la digestión tanto de pUCP32 como de pSD15 con la enzima PstI (Thermo Scientific) en una primera instancia. Las concentraciones de los reactivos se muestran en la Tabla 5. La digestión se llevó a cabo durante 1 h a 37°C. Transcurrido este tiempo, la enzima fue inactivada a 80°C durante 20 min.

Tabla 5. Componentes de la reacción de digestión de pUCP32 y pSD15.

Reactivo	Digestión PstI
Buffer Orange	1x
ADN (MP-EntAI o pSD15)	1 µg
PstI	1 U

Reacción de 20 µL

El vector pSD15 después fue desfosforilado para evitar una posterior re-circularización sin ningún inserto, utilizando la fosfatasa alcalina Fast AP (Thermo Scientific). Las concentraciones de la reacción se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Componentes de la reacción de desfosforilación de pSD15.

Reactivo	Concentración final
Buffer Fast AP	1x
ADN (pSD15)	1 µg
Fosfatasa alcalina	1 U

Reacciones de 20 µL

Tras la digestión, el gen de interés se purificó empleando el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific), mientras que el plásmido pSD15 digerido y desfosforilado fue purificado con el kit DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research, Irvine, CA, USA).

8.5.1 Ligación de P₃₂-MP-EntAI en pSD15

Para ligar el gen de interés dentro del vector, se utilizó la enzima T4 DNA Ligasa (Thermo Scientific). Las concentraciones de los componentes de la reacción se muestran en la Tabla 7. La reacción se llevó a cabo durante 1 h a 22°C, seguida de la inactivación de la enzima a 65°C durante 10 min.

Tabla 7. Componentes de la reacción de ligación de P₃₂-MP+EntAI en pSD15.

Reactivo	Concentración final
Buffer T4 DNA ligase	1x
P ₃₂ -MP-EntAI (inserto)	23 ng
pSD15 (vector)	50 ng
T4 DNA ligase	1 U

Reacciones de 20 µL. Relación molar inserto:plásmido = 3:1

8.5.2 Transformación de pSD15- P₃₂-MP-EntAI en *E. coli* DH5α

El vector pSD15- P₃₂-MP-EntAI se utilizó para transformar células competentes de la cepa *E. coli* DH5α. La transformación se realizó por choque térmico. Se tomaron las células de un cultivo de 50 mL en caldo LB con una densidad óptica a 600 nm de 0.1. Las células se resuspendieron en 15 mL de CaCl₂ 100 mM y se dejaron incubar en hielo durante 30 min. Se centrifugaron para obtener las células nuevamente, se resuspendieron en 2 mL de CaCl₂ 50 mM y se dejaron incubar al menos 2 h. Se tomaron 80 µL de éstas, se agregaron 8 µL de la

mezcla de ligación (sección 6.5.1) y se dejó incubar durante 30 min en hielo. Transcurrido este tiempo, se le dio el choque térmico a 42°C durante 2 min y se regresó al hielo por otros 5 min. Para que las células se recuperaran, se agregó 1 mL de caldo LB y se incubó durante 1 h a 37°C, que posteriormente, se centrifugaron, se resuspendieron en 200 µL de caldo LB y se repartieron en 4 cajas Petri con LB agar 1% con antibiótico (espectinomicina 100 mg/mL). Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 h.

Para corroborar que las células transformantes tuvieran el inserto deseado, se seleccionaron algunas de las colonias crecidas en las cajas con agar LB. Se inocularon en 5 mL de caldo LB con antibiótico y se incubaron a 37°C y 200 rpm durante 12 h en tubos de ensaye. De estas clonas, se extrajo plásmido utilizando el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific), el cual fue utilizado como molde para la PCR con el par de cebadores específicos del gen de interés, como se indica en la sección 6.4. Aquellas clonas en las que se observó amplificación fueron consideradas positivas.

8.6 Construcción del vector derivado de pCJK47

Siguiendo la metodología de DebRoy (2012), el siguiente paso para la integración de un gen de interés al cromosoma de *Enterococcus faecalis* consiste en escindir dicho gen del vector pSD15 mediante la digestión con la enzima SmaI. Con esto, se saca únicamente al gen del vector y se debe insertar en el vector pRV1 (derivado de pCJK47), el cual contiene los sitios de recombinación en el cromosoma de la cepa receptora. Éste último también debe digerirse con SmaI. Cabe destacar que el sentido del inserto no es importante, ya que la construcción tiene todos sus elementos necesarios para su expresión. Posteriormente, se realiza la ligación del inserto en el vector y se debe transformar la construcción resultante en una cepa de *E. coli* EC1000, la cual posee el gen *repA* en *trans* y permite la replicación del plásmido. Se realizaron numerosos intentos con distintas variaciones sin éxito, por lo que se optó por realizar la siguiente metodología:

8.6.1 Digestión de pSD15- P₃₂-MP-EntAI y pCJK47

La construcción pSD15- P₃₂-MP-EntAI fue digerida con la enzima EcoRI (Fast Digest, Thermo Scientific) con el objetivo de obtener la construcción de interés con los sitios de recombinación flanqueándolo. De la misma manera se digirió el vector pCJK47. Debido a que la construcción fue digerida en tres fragmentos, las condiciones empleadas para la reacción fueron de únicamente 1 min a 37°C, con lo que se pudo obtener el inserto deseado, cuyo tamaño

esperado era de 2869 pb (744 pb del gen de la quimera + 2125 pb de los genes del sitio de inserción, Figura 3). Éste fue purificado a partir del gel de agarosa con el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific). Para pCJK47, se llevó a cabo una digestión y desfosforilación simultánea con EcoRI y una fosfatasa alcalina rápida (FastAP, Thermo Scientific). Las concentraciones utilizadas en las reacciones se muestran en la Tabla 8. Las condiciones de reacción fueron 10 min a 37°C, seguidos de una inactivación de la enzima a 80°C durante 5 min. Después, se purificó con el kit DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research).

Tabla 8. Componentes de la reacción de digestión de pSD15- P₃₂-MP-EntAI y pCJK47.

Reactivo	pSD15-MP+EntAI	pCJK47
Buffer Fast Digest	1x	1x
ADN	2 µg	2 µg
Fast Digest EcoRI	1 U	1 U
FastAP	1 U	

Reacciones de 20 µL.

Se corroboró que el fragmento digerido y purificado contuviera el gen de interés mediante una PCR con primers específicos (Tabla 2 y 3).

8.6.2 Ligación de la quimera con los sitios de recombinación en pCJK47

Para ligar el gen de interés junto con los sitios de recombinación dentro del vector pCJK47, se utilizó la enzima T4 DNA Ligasa (Thermo Scientific). Las concentraciones de los componentes de la reacción se muestran en la Tabla 9. La reacción se llevó a cabo durante 1 h a 22°C, seguida de la inactivación de la enzima a 65°C durante 10 min. La construcción resultante se nombró como pESentA32 (Figura 3).

Tabla 9. Componentes de la reacción de ligación de P₃₂-MP-EntAI +sitios de recombinación en pCJK47.

Reactivo	Concentración final
Buffer T4 DNA ligase	1x
P ₃₂ -MP-EntAI+sitios de recombinación (inserto)	62 ng / 120 ng
pCJK47 (vector)	50 ng
T4 DNA ligase	1 U

Reacciones de 20 µL. Relación molar inserto:plásmido = 3:1

8.6.3 Transformación en *E. coli* EC1000

La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de la cepa *E. coli* EC1000. La transformación se realizó por choque térmico como se indica en la sección 6.5.2. Las células se sembraron en cajas de agar LB con eritromicina a una concentración de 200 µg/mL. Se incubaron a 37°C durante 24 h.

Para corroborar que las células transformantes tuvieran la construcción deseada, se seleccionaron algunas de las colonias crecidas en las cajas con agar LB. Se inocularon en 10 mL de caldo LB con antibiótico y se incubaron a 37°C y 200 rpm durante 12 h en tubos de ensayo. De estas clonas, se extrajo plásmido utilizando el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific), el cual fue utilizado como molde para la PCR con los dos pares de cebadores específicos del gen de interés. Las condiciones de la reacción fueron las indicadas en la sección 6.4.

8.7 Transformación en *E. faecalis* F.

A partir de las construcciones positivas, se transformaron células de *E. faecalis* F mediante electroporación (Figura 4), utilizando la siguiente metodología (Dunny *et al.*, 1991):

1. Se realizó un cultivo de la cepa *E. faecalis* F en medio BYGT (1.9% de medio BHI, 0.5% de extracto de levadura, 0.2% de glucosa y 10% de Tris-HCl 1 M pH 8) adicionado con 4% de glicina. La concentración de glicina debe reducir entre 70 y 90% el crecimiento de la bacteria midiendo a una absorbancia de 660 nm con respecto a un cultivo sin glicina en el mismo tiempo. Se dejó incubando durante 15 h a 37°C y 200 rpm.
2. Después de este tiempo, se inoculó en medio fresco con 4.5% de glicina, obteniendo una DO_{660nm} de 0.05-0.08. Se dejó incubar durante 90 min a 37°C y 200 rpm.
3. Posteriormente, se centrifugó a 6400 *g* durante 15 min a 4°C para separar las células.
4. Se realizó un lavado con 1/3 del volumen original con solución de electroporación previamente enfriada, que contiene 0.625 M de sacarosa y 1 mM de MgCl₂, pH 4.
5. Después se resuspendió en 1/100 del volumen original y se incubó en hielo durante 60 min. Estas células se pueden almacenar a -70°C para su uso posterior, hasta 30 días.
6. Se agregaron 300 ng del vector y se electroporó con 25 µF, 200 Ω y 25000 mV/cm.
7. Se dejó reposar en hielo durante 2 min.
8. Se añadió 1 mL de caldo BHI y se dejó recuperar durante 2 h a 37°C.

9. Después de transcurrido ese tiempo, se bajaron las células por centrifugación a 19000 g durante 5 min y se resuspendieron en 150 μ L de medio fresco.
10. Se repartieron en 3 cajas Petri (50 μ L en cada una) con agar BHI con 250 mM de sacarosa con 250 μ g/mL de X-gal y 10 μ g/mL de eritromicina (Em).

Se seleccionaron algunas de las colonias azules para probar su capacidad de crecer en presencia de p-Cl-Phe. Se realizaron diluciones 10^{-2} y 10^{-3} de un cultivo de 18 h y se inocularon en cajas Petri con agar BYGT con p-Cl-Phe a 10 mM y, en paralelo, en el mismo medio sin p-Cl-Phe para determinar si hubo deficiencia en el crecimiento. Las cajas se incubaron a 37 $^{\circ}$ C por 24 h. Las colonias azules, resistentes a eritromicina y con deficiencia de crecimiento en presencia de p-Cl-Phe fueron seleccionadas como clonas positivas, es decir, que integraron el plásmido completo a su cromosoma (Figura 4). A algunas de éstas se les realizó una PCR para determinar la presencia del gen de interés.

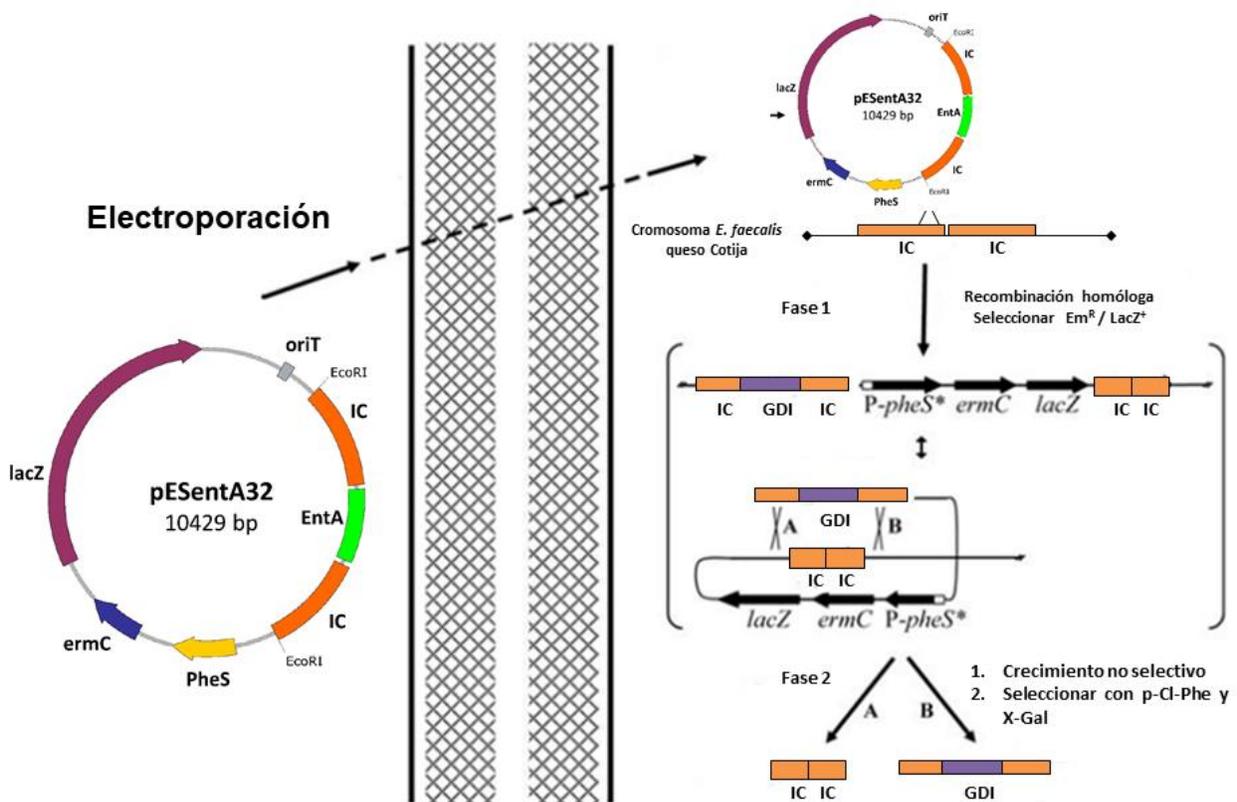


Figura 4. Integración de la construcción génica de interés al cromosoma de *E. faecalis* F mediante transformación por electroporación del plásmido auxiliar y recombinación.

8.7.1 Segundo evento de recombinación y selección de clonas positivas

Con el fin de que las células que aceptaron e integraron el plásmido a su cromosoma lo liberen y retengan únicamente el gen de interés, es necesario que se lleve a cabo un segundo evento de recombinación (Figura 4). Para esto, se dejaron multiplicar las células durante varias generaciones, realizando varias resiembras en medio BHI sin antibiótico. Posteriormente, se realizó un aislamiento en agar BHI sin antibiótico y con X-Gal. Se seleccionaron colonias blancas, ya que fueron las que habían perdido el resto del plásmido. Además, se corroboró que hubieran perdido la resistencia a eritromicina y que pudieran crecer de manera normal en presencia de p-CI-Phe.

Para comprobar la presencia del gen de interés, se realizó una extracción de ADN y se llevó a cabo una PCR, utilizando las concentraciones y condiciones de reacción de las Tablas 2 y 3. Además, se llevó a cabo la reacción de PCR para amplificar los sitios de recombinación con el par de cebadores Ef2238F / Ef2239R, descrito en la sección 6.4. Como control se utilizó ADN de la cepa F silvestre y se compararon los tamaños de los amplicones, ya que en aquellas cepas que hubieran integrado el gen de interés en el sitio indicado, tendrían un amplicón de mayor tamaño que el de la cepa silvestre.

8.8 Detección de la expresión de la enterocina A y la actividad antibacteriana

Una vez que se seleccionaron clonas que resultaron positivas para la presencia del gen de interés, se determinó la expresión de la enterocina A, mediante la búsqueda del ARN mensajero y de su actividad, mediante ensayos de difusión en agar y por zimografía en geles de poliacrilamida de Tris-Tricina.

8.8.1 Detección del ARN mensajero

Una vez clonado el gen de interés dentro del genoma de *Enterococcus faecalis* F, el paso siguiente fue determinar si se estaba llevando a cabo su expresión. El gen pudo haberse expresando, aunque la proteína no fuera activa. Por lo que un primer paso para determinar la expresión fue la búsqueda del ARNm. Para esto, se realizó una extracción de ARN total mediante el uso del kit Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Para corroborar la integridad del ARN, se corrieron geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes (agarosa 1.5%, formaldehído 6.5%, 40mM MOPS, 10 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA, pH 7).

A partir del ARN extraído, se llevó a cabo la síntesis del ADN complementario, utilizando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizaron los cebadores específicos de la enterocina A (ES-MPf / ES-AX). A partir del ADNc, se realizó una reacción de amplificación para visualizar la banda correspondiente. Adicionalmente, se llevó a cabo una reacción de control para corroborar la ausencia de ADN en la muestra de ARN, utilizando el par de cebadores 338F / 518R (Tabla 1), los cuales amplifican el gen ribosomal 16S. Se utilizaron las condiciones descritas por Muyzer y colaboradores (1993).

8.8.2 Semipurificación de la bacteriocina

La enterocina A fue semipurificada mediante la técnica de adsorción-desorción (Yang *et al.*, 1992), la cual se basa en la adsorción de las bacteriocinas en la membrana celular para retenerlas, eliminar la mayor parte de otras proteínas y una posterior desorción. *E. faecalis* F y *E. faecalis* F EntA (mutantes que expresan la enterocina A) fueron cultivadas en caldo BHI a 37 °C por 15 h. Pasado este tiempo, se sometieron a un tratamiento térmico de 70 °C durante 30 min para la inactivación de proteasas que pudieran estar presentes en el medio. Posteriormente, se ajustó el medio a pH 5 para permitir la adsorción de las bacteriocinas a la membrana celular bacteriana. A continuación, se obtuvo el paquete celular por centrifugación, el cual se lavó con buffer de fosfatos 50 mM pH 6.5. Finalmente, las células se resuspendieron en una solución 100 mM de NaCl a pH 2 para favorecer la desorción y liberación de las bacteriocinas desde la membrana celular de la bacteria hacia el medio. Así mismo, el NaCl previene la aglutinación de las bacteriocinas, lo cual evita que éstas no sean removidas. Los sobrenadantes se dializaron contra agua destilada empleando membranas de celulosa con un tamaño de corte de 1 kDa y, posteriormente, se liofilizaron para concentrar. Las muestras fueron resuspendidas en buffer de fosfatos.

8.8.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida Tris-Tricina y zimogramas

Para identificar la producción de enterocinas en la cepa transformante se llevó a cabo una electroforesis en geles de SDS-Tris-Tricina al 16% (p/v) siguiendo la metodología descrita por Schägger y von Jagow (1987) con el equipo Mini Protean 3 System, Electrophoresis Module de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Se utilizaron este tipo de geles para obtener una

mejor resolución en el rango de 1 a 10 kDa. Paralelamente se corrió otro gel del mismo tipo, pero con células de *L. monocytogenes* embebidas, con una concentración final en el gel del 0.2% (p/v); es decir, al momento de preparar el gel, se agregaron las células bacterianas para que funcionaran como sustrato para la bacteriocina y que funcionara como un zimograma. Después de la electroforesis, se incubaron a 37°C y 50 rpm durante 18 h en una solución renaturalizante (Tris HCl 100 mM y Tritón 1% (v/v), pH 8) para que las proteínas recobraran su actividad. La actividad se detectó por la presencia de una banda clara o translúcida sobre un fondo opaco. Para aumentar el contraste, el gel fue teñido con una solución de azul de metileno 0.1% (p/v) en KOH 0.01% (p/v) durante 20 minutos y posteriormente desteñido en agua hasta observar la aparición de las bandas (Leclerc y Asselin, 1989). Para estimar la masa molecular de las bandas, se utilizó el marcador Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards (161-0326, Bio-Rad) y se documentaron utilizando el equipo Gel-Doc system (Bio-Rad).

8.8.4 Difusión en agar

La prueba de difusión en agar se realizó para comprobar la actividad antibacteriana de la cepa transformante contra una batería de microorganismos de interés, que incluyen *L. monocytogenes* CFQ-B-103, *L. innocua* CFQ-B-232, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *E. faecalis* V583, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* F, *E. faecalis* F EntA, *E. faecium* G, *Lactobacillus rhamnosus* R011 y *L. casei* R0215 ND (Tabla 1). Las cepas se reactivaron en 5 mL de caldo BHI en tubos de ensaye con tapón de rosca. Se incubaron a 37°C durante 24 h sin agitación (Gravity Convection Incubator) y, concluido este tiempo, se tomaron 200 µL y se inocularon en 5 mL de caldo BHI, incubando en las mismas condiciones hasta que alcanzaran una D.O._{600nm} de 0.4. De este cultivo, se tomaron 30 µL y se inocularon en 30 mL de BHI con agar al 0.8 %. Se mezclaron y se vertieron en cajas Petri. Una vez solidificadas, se cortaron pozos de 9 mm de diámetro para cargar la muestra a evaluar y después se incubó durante 24 h a 37 °C y se observó si se generaba un halo de inhibición alrededor del pozo. Se utilizaron estas condiciones y concentraciones porque se observó que se producía un césped bacteriano homogéneo idóneo para la detección de la actividad antibacteriana. Las muestras evaluadas se obtuvieron de un cultivo de 15 h (fase estacionaria temprana), al que se le separaron las células por centrifugación a 6400 g durante 15 min a 4°C y se neutralizó (pH 7) para descartar el efecto del ácido láctico; finalmente se esterilizó por filtración con una membrana de 0.22 µm (GVWP04700, Durapore Membrane Filters, Millipore, Danvers, MA, USA). Para descartar el efecto de proteínas mayores de 10 kDa, las muestras fueron ultrafiltradas con una membrana

de tamaño de corte de 10 kDa (PLGC07610, Ultrafiltration Discs, Millipore) y el permeado fue concentrado por liofilización. La cantidad de muestra cargada por pozo fue de 0.25 mg.

8.8.5 Inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* en co-cultivo con *E. faecalis* F EntA

Este ensayo se realizó para evaluar la producción de la enterocina A por parte de la cepa recombinante y su efecto al crecer en el mismo medio de cultivo que una cepa de *L. monocytogenes*. Ambas cepas se hicieron crecer en un cultivo mixto en caldo BHI a 37 °C y 250 rpm, utilizando un inóculo inicial de 10⁵ UFC/mL, en una relación 1:1, en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo. Se tomaron muestras en intervalos de 4 h para realizar las cuentas de ambas bacterias. Para la cuantificación selectiva de *L. monocytogenes* y *E. faecalis*, se realizaron las diluciones apropiadas y se sembraron en cajas de agar VJ y KAA, respectivamente (ver sección 6.2). La cepa silvestre de *E. faecalis* F se utilizó como control.

9. Resultados y discusión

9.1 Síntesis de los genes

Para la clonación de la enterocina A, se decidió seguir la estrategia empleada por Borrero *et al.* (2011), en la que se fusiona el péptido señal de la enterocina P con el gen estructural de la enterocina A y su proteína de inmunidad. Con esto se evita tener que clonar el operón completo, el cual es muy grande (>10 kpb) por lo que podría resultar difícil su manipulación. A la construcción se le incluyó un promotor constitutivo para no tener que depender de un inductor y poder utilizar la cepa directamente en un alimento. Se decidió utilizar el promotor P₃₂. El promotor P₃₂ fue reportado por primera vez en *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, derivado de un estudio de promotores en esta cepa (van der Vossen *et al.* 1987). Ha sido utilizado en numerosos estudios como promotor constitutivo para la expresión de diferentes genes, incluida la enterocina A (Borrero *et al.* 2011). La región -35 (**TAGAAA**) difiere en dos nucleótidos de la secuencia consenso (TTGACA), mientras que la región -10 difiere sólo en uno (TATA**CT** vs TATAAT). Esta última se encuentra a 33 pb del codón de inicio y, además, presenta una secuencia -10 extendida (**TGCTATACT**), lo que le pudiera ayudar a ser más fuerte. El sitio de unión al ribosoma (secuencia Shine-Dalgarno) se encuentra a 9 nucleótidos del codón de inicio. En un estudio realizado por Tauer *et al.* (2014), se evalúa la influencia de la distancia que hay entre estas dos secuencias, alcanzándose la máxima expresión de una proteína mCherry con 8 nucleótidos de separación en *Lactobacillus plantarum*. Para el caso del promotor P₃₂, los nueve nucleótidos de separación le permiten ser un promotor eficiente.

Cabe destacar que también se intentó utilizar el promotor P_x y evaluar los niveles de expresión entre ambos promotores. El promotor P_x forma parte de un regulón para la utilización de maltosa en *Streptococcus pneumoniae* (Nieto *et al.* 1997). Ha sido utilizado con éxito para la expresión de proteínas fluorescentes en *E. coli*, *E. faecalis* y *L. lactis* (García-Cayuela *et al.* 2012). Además, ha sido comparado con los promotores del operón de la enterocina AS-48, mostrando niveles de expresión superiores (Cebrián *et al.* 2014). La región -35 (TTG**C**AA) difiere en dos nucleótidos de la secuencia consenso (TTGACA), mientras que la región -10 difiere sólo en uno (TATA**C**T vs TATAAT), siendo la misma que la del promotor P₃₂. Se encuentra a 69 pb del codón de inicio y presenta una secuencia -10 extendida (TGCTATACT). El sitio de unión al ribosoma se encuentra a 8 nucleótidos del codón de inicio, como fue observada la máxima expresión en *L. plantarum* (Tauer *et al.* 2014). El gen con el promotor P_x no pudo ser sintetizado por la empresa, ya que resultó ser muy tóxico para las cepas hospederas (*E. coli*). Se trató de clonar con el uso del mismo vector que P₃₂ (pUC18) en las cepas de *E. coli* JM109, DH10B y DH5α. También se utilizaron plásmidos de bajo número de copia, ninguno con éxito. Esto puede explicarse debido a que es posible que el promotor P_x resultó ser muy fuerte y la expresión de la enterocina fue elevada, causando la muerte a la misma cepa productora. Pese a que se incluye también el gen de la proteína de inmunidad, no fue efectivo para proteger a las cepas de *E. coli* utilizadas. Este promotor pudo haber resultado el óptimo para la expresión de la enterocina por parte de *E. faecalis* F, ya que se necesita de un promotor fuerte al tratar de expresar un gen de copia única que se encuentra en el cromosoma. A diferencia de las proteínas expresadas mediante el uso de plásmidos, ya que éstos pueden estar en un número de copias elevado. Por lo anteriormente expuesto, se trabajó solamente con la construcción con P₃₂.

Para el diseño de la quimera se realizó un análisis de la secuencia de la enterocina A reportada en el GenBank (Acceso: AF099088.1) y el péptido señal de la enterocina P (Acceso: AF005726.1), ambos en la especie *E. faecium*. Se corroboró que los genes entraran en marco de lectura con los promotores y el péptido señal. La secuencia teórica de la quimera se muestra en la Figura 5.

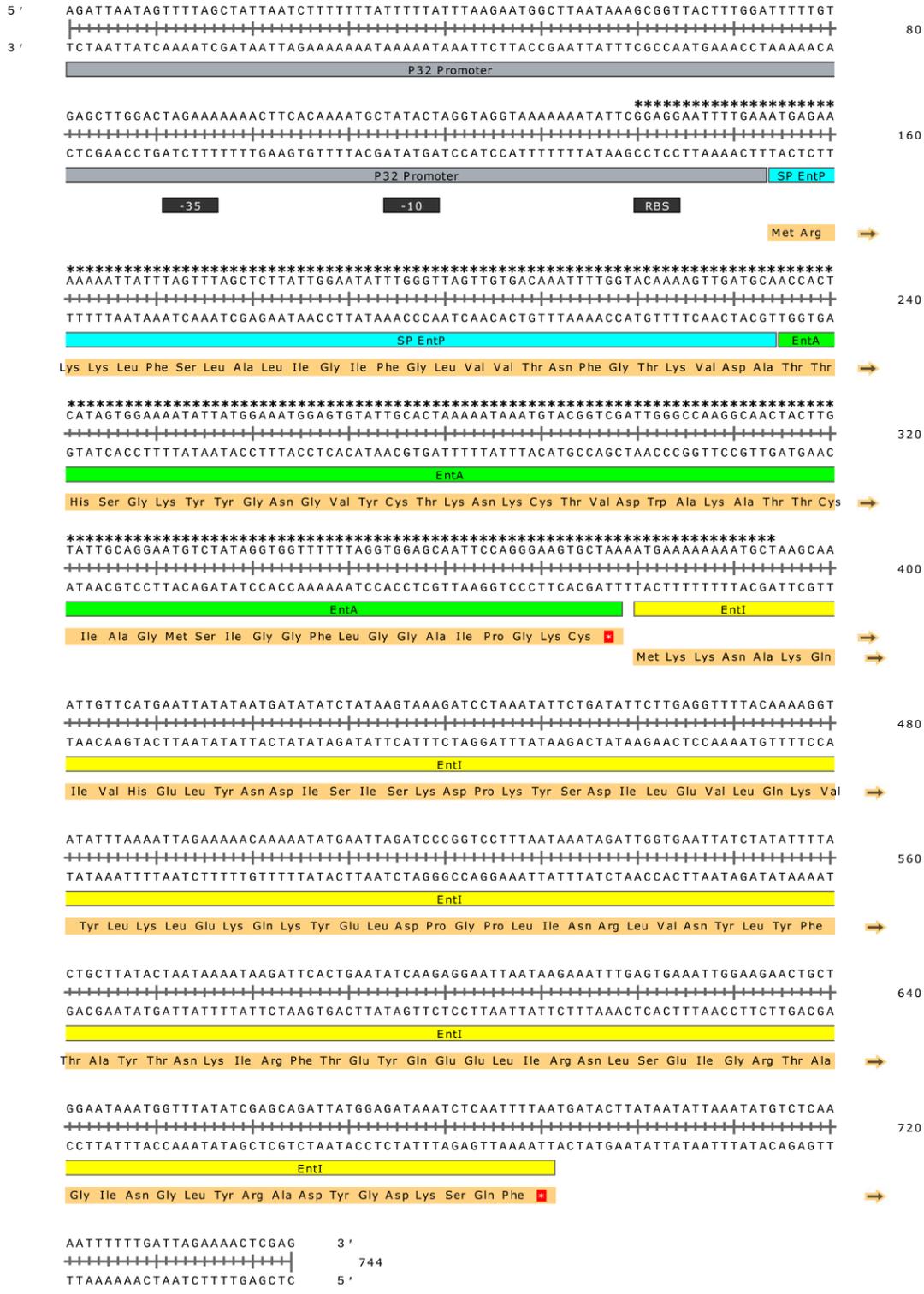


Figura 5. Secuencia teórica de la quimera P₃₂-MP-EntAI. Gris: Promotor P₃₂. Azul: Péptido señal de la enterocina P. Verde: Enterocina A madura. Amarillo: Proteína de inmunidad de la enterocina A.

Los genes fueron sintetizados por la empresa Epoch Life Science. El gen con el promotor P₃₂ fue recibido dentro del vector pUC18 (Figura 6).

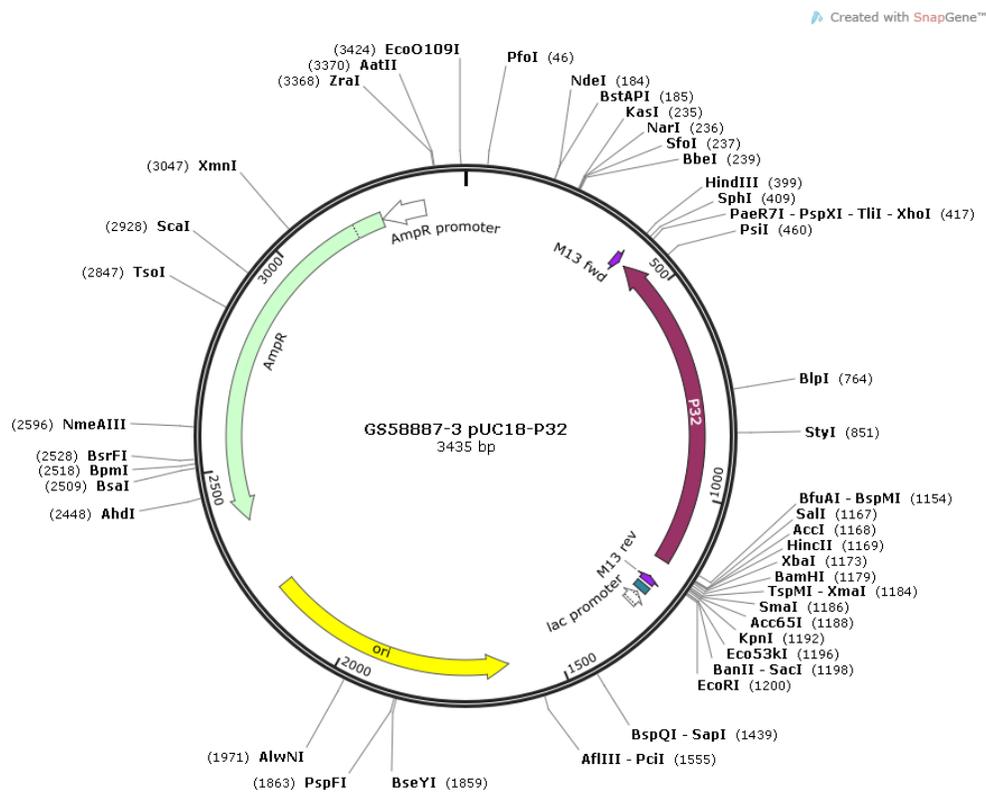


Figura 6. Mapa del vector pUCP32.

Para corroborar que el plásmido recibido contuviera el gen de interés, se realizó una reacción de amplificación con los cebadores entAF/R, obteniéndose la banda del tamaño esperado (126 pb), como se muestra en la Figura 7, por lo que se continuó con la clonación.

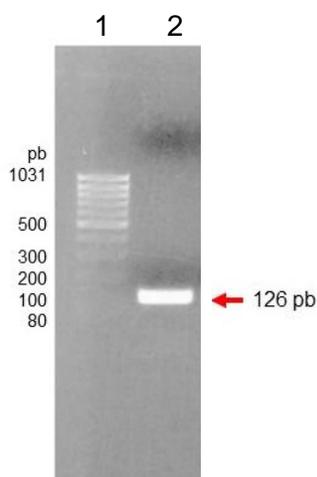


Figura 7. Detección del gen de la enterocina A en el vector pUCP32 mediante PCR. La banda de 126 pb indica un resultado positivo. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. 1) Marcador de peso molecular (Mass ruler DNA Ladder Low range), 2) Amplicón de la enterocina A a partir del vector.

9.2 Clonación en pSD15

Para la adición de las secuencias de recombinación a la construcción de interés, ésta fue integrada al vector pSD15. La quimera fue digerida del vector pUC18 con la enzima PstI, ya que se diseñó con la secuencia de reconocimiento de esta enzima en ambos extremos. El vector pSD15 también fue digerido con la misma enzima y, posteriormente, desfosforilado. Ambos fueron purificados para continuar con la ligación.

Se llevó a cabo la ligación de ambos productos y se transformó en *E. coli* DH5 α . Hubo crecimiento de colonias, de las cuales se seleccionaron algunas para corroborar la presencia del gen de interés mediante PCR con cebadores específicos. Se detectó la presencia del gen de interés en algunas de las colonias seleccionadas, ya que se obtuvieron amplicones con el tamaño esperado de 126 pb a partir del plásmido extraído de algunas de ellas (Figura 8).

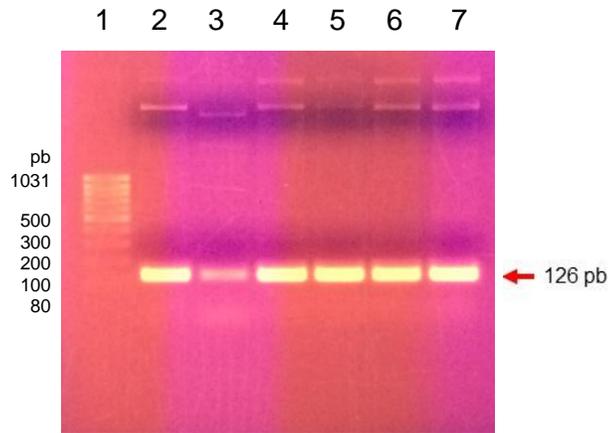


Figura 8. Detección del gen de interés con cebadores específicos para la enterocina A. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. 1) Gene Ruler 1kb DNA Ladder; 2-7) Amplificación del gen de interés a partir de plásmidos de colonias transformantes con cebadores específicos, presuntamente positivos, se observa amplicón de 126 pb.

9.3 Construcción derivada de pCJK47

El siguiente paso para la integración del gen de interés en el cromosoma consistía en la construcción de un vector derivado de pCJK47 (el cual permite la integración al cromosoma) con los sitios de recombinación. Para lo cual se realizó la digestión de pSD15 con la enzima EcoRI, con lo que se escinde el gen de interés con los sitios de recombinación completos y se ligó directamente en pCJK47 (Figura 3).

La construcción se pasó del vector pSD15 al vector pCJK47 y se transformó en la cepa *E. coli* EC1000, la cual contiene el gen de la proteína RepA en *trans*, que permite la replicación del vector. Se comprobó que la construcción contuviera el inserto mediante PCR con primers específicos, obteniéndose algunas clonas positivas (Figura 9). Además, el vector fue enviado a secuenciar con el par de primers entAF / entAR para corroborar la presencia del inserto y que no hubiera mutaciones. La secuencia obtenida fue la esperada, ya que no se presentó ningún cambio de base.

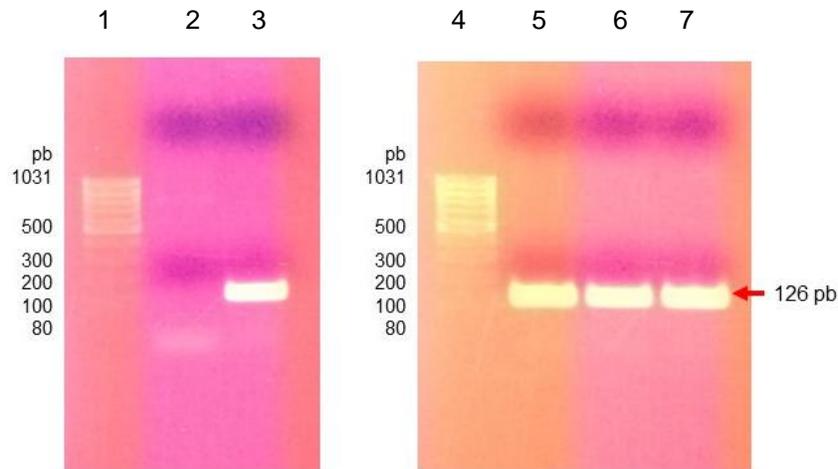


Figura 9. Detección del gen de la enterocina A en pCKJK47 (pESentA32) mediante PCR con primers específicos. 1 y 4) Marcador de peso molecular (Mass ruler DNA Ladder Low range); 2) pCJK47 vacío (control negativo); 3-7) Amplificación a partir de diferentes clones seleccionados. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

Esta construcción se utilizó para transformar células de *E. faecalis* F y que se integrara a su cromosoma.

9.4 Transformación de *E. faecalis* F

Una vez que el vector pESentA32 fue insertado dentro de la cepa *E. faecalis* F por electroporación, se seleccionaron algunas colonias que pudieron crecer en presencia del antibiótico y que fueron de color azul, las cuales fueron catalogadas como presuntas positivas (Figura 10). Algunas presentaron deficiencia de crecimiento en medio con p-Cl-Phe, por lo que fueron seleccionadas como positivas (Figura 11). De éstas, se realizó una extracción de ADN y se realizó una PCR utilizando cebadores entAF/R. Se obtuvieron algunas clones con el amplicón esperado, que era de 126 pb (Figura 12). En este punto, las clones integraron el plásmido completo, incluyendo la construcción de interés.

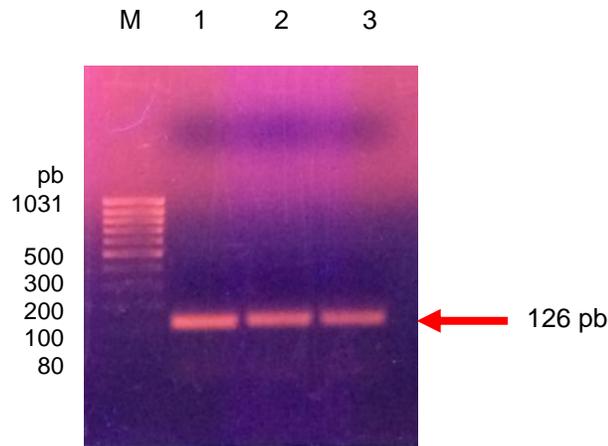


Figura 12. Detección del gen de la enterocina A en las clonas que presuntamente han integrado el vector completo mediante PCR. M: Marcador de peso molecular (Mass ruler DNA Ladder Low range); 1-3: número de clona. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

9.5 Liberación del vector

Una vez que se comprobó la integración del vector en varias clonas, se llevó a cabo el segundo evento de recombinación, con la finalidad de que se liberara el resto del vector (perdiendo la resistencia a eritromicina, el gen de β -galactosidasa y la deficiencia de crecimiento con p-Cl-Phe), y que sólo permaneciera el gen de interés. Para esto, se permitió la reproducción de las células durante varias generaciones en medio BHI sin antibiótico y se realizó un aislamiento en agar con X-Gal. Las colonias blancas habrían perdido el vector (Figura 13), lo cual se corroboró ya que no presentaron resistencia a eritromicina y crecían de manera normal en presencia de p-Cl-Phe (Figura 14). Para comprobar que hubieran retenido el gen de interés, se extrajo el ADN y se realizó una PCR con cebadores específicos (ES-MPf / ES-AX). En la Figura 15 se muestra un gel de agarosa en el que se incluye una clona positiva (panel A, carril 4). El amplicón fue enviado a secuenciar, obteniéndose la secuencia esperada sin ningún cambio (ver anexo).



Figura 13. Aislamiento de clonas en medio con X-gal. Las colonias blancas perdieron el resto del vector.

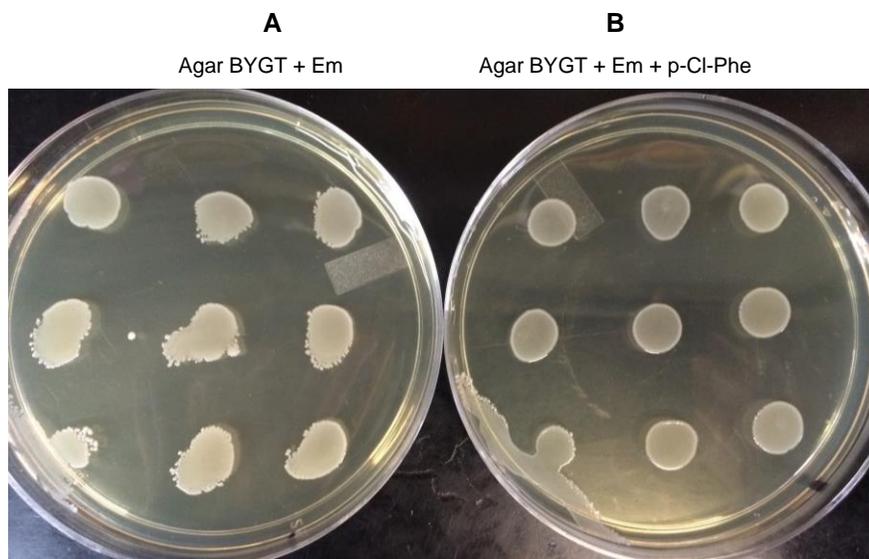


Figura 14. Comprobación de la pérdida del vector mediante prueba de crecimiento en medio con p-Cl-Phe. A) Medio sin p-Cl-Phe, B) Medio con p-Cl-Phe. Se muestran las nueve clonas presuntamente positivas, en una dilución 10^{-3} .

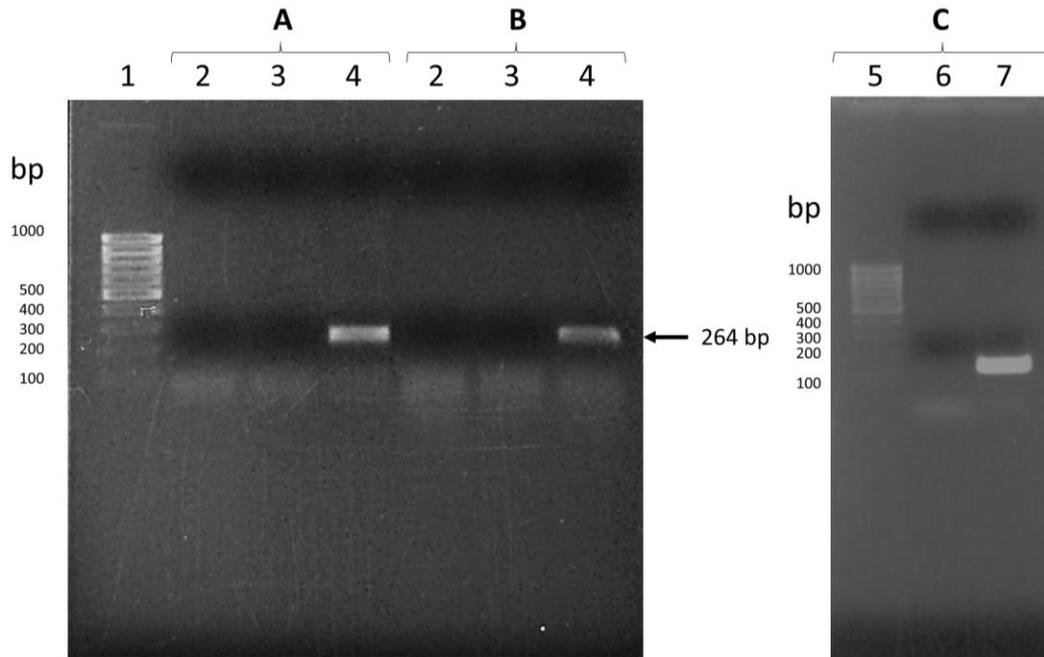


Figura 15. Detección del gen de la enterocina A en A) ADN cromosomal por PCR, B) ARNm por RT-PCR. Carril 1, marcador de peso molecular (MassRuler Low Range DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific); carril 2, control negativo sin ADN molde; carril 3, *E. faecalis* F silvestre; carril 4, *E. faecalis* F EntA. C) Control para corroborar ausencia de ADN tras la extracción de ARN. Carril 5, marcador de peso molecular (MassRuler Low Range DNA Ladder); PCR con cebadores para la región V3 del gen ribosomal 16S de: carril 6, ADNc de la cepa recombinante; carril 7, ADN genómico de *E. faecalis* F como control positivo. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

Adicionalmente, se realizó otra amplificación con cebadores que alinean en los genes contiguos al de interés, utilizados para la recombinación homóloga. En este caso, para la cepa silvestre se obtuvo un amplicón de aproximadamente 1900 pb y para el caso de la clona en la que se insertó la construcción, se obtuvo un amplicón de aproximadamente 3500 pb (Figura 16), lo que indica que el gen fue insertado en el sitio correcto. El tamaño de la construcción diseñada es de aproximadamente 750 pb; sin embargo, el inserto real fue del doble de tamaño (aprox. 1500 pb). Esto puede deberse a que en el plásmido enviado por la empresa que sintetizó la construcción, se pudieron haber incluido dos copias del gen, haciendo que el tamaño fuera mayor. Esto resultó beneficioso para la expresión, ya que, en lugar de tener una sola copia, se tienen dos y es posible que se hayan aumentado los niveles de expresión.

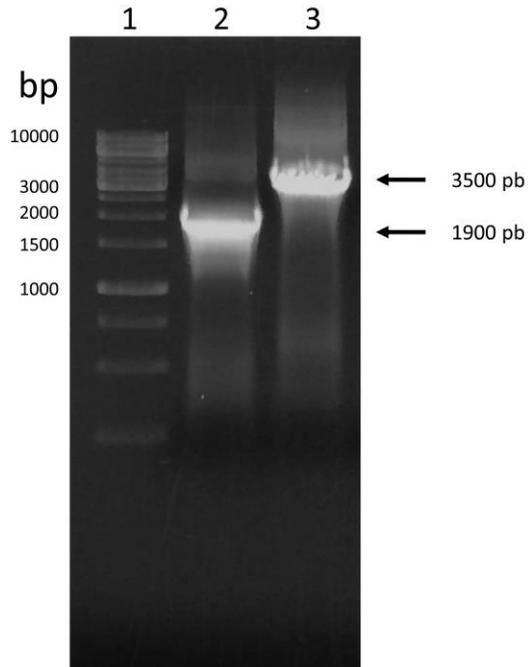


Figura 16. PCR del sitio de inserción. Carril 1, marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific); carril 2, *E. faecalis* F silvestre; carril 3, *E. faecalis* F EntA. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

Con estos resultados se puede decir que se logró con éxito la integración de la construcción para la producción de la enterocina A en el cromosoma de la cepa F de *E. faecalis*. Por lo que el siguiente paso fue la detección de la expresión y la actividad inhibitoria.

9.6 Detección del ARNm

Con el fin de determinar si el gen de interés se estaba expresando, se realizó una extracción de ARN total, para la posterior síntesis de ADNc a partir del mensajero. Además de las clonas que integraron el gen de la enterocina A, se utilizó como control negativo la cepa de *E. faecalis* F sin transformar.

El ARN total extraído fue de buena calidad para su posterior utilización en la síntesis de ADNc. Posteriormente, se realizó una reacción de amplificación para detectar el gen de la enterocina A con cebadores específicos. Para la cepa *E. faecalis* F entA (cepa recombinante), sí se observó el producto esperado de 264 pb (Figura 5, marcado con asteriscos), mientras que para la cepa de *E. faecalis* F silvestre no se observó amplicón (Figura 15, panel B). Para descartar que la amplificación se haya dado por la presencia de ADN acarreado durante la extracción de ARN, se corrió un control en el que se utilizaron cebadores universales para la amplificación del gen

ribosomal 16S, dando un resultado negativo (Figura 15, panel C), por lo que la banda observada sí corresponde a la presencia del ARN mensajero. Los resultados demostraron que el gen integrado se transcribía.

9.7 Detección de la actividad

La detección del ARNm indicó que el gen se estaba transcribiendo; sin embargo, eso no garantizaba que se tradujera a un péptido activo. La actividad se detectó mediante zimografía, utilizando el medio libre de células. Se utilizó la cepa silvestre como control negativo.

Se observó una banda clara, que demuestra la lisis de las células embebidas, con un peso aproximado de 6 kDa, similar a los 4.7 kDa del peso teórico. Sólo se observó dicha banda en sobrenadante de la cepa recombinante y no en el de la silvestre, lo que indicaría que la banda corresponde a la enterocina A. En la Figura 17 se muestra la actividad en contra de *L. monocytogenes*. Además, se observó la misma banda lítica en contra de *E. faecalis* V583, una cepa patógena (resultados no mostrados). La diferencia de tamaño que se observó entre la banda obtenida y la teórica se puede deber a que, a pesar de que se utilizaron geles de poliacrilamida con Tris-tricina y que son más precisos en rangos de 1 a 20 kDa que los de glicina, no son 100 % precisos. Sin embargo, tampoco se descarta la posibilidad de que la enterocina A haya sufrido alguna modificación postraduccional que le incrementara el peso. En otros estudios, se ha observado que *E. faecalis* F es capaz de glicosilar, acetilar y palmitoilar proteínas (García-Cano *et al.*, 2014; Serrano-Maldonado *et al.*, 2018), lo que provoca que las proteínas se observen en pesos mayores a los esperados. Además, se han reportado bacteriocinas, incluyendo las enterocinas F4-9 y 96, que presentan glicosilaciones (Maky *et al.*, 2015; Norris y Patchett, 2016). Para confirmar que la banda lítica observada corresponda a la enterocina A, es necesario identificarla por un método como LC-MS/MS, lo cual queda como una perspectiva del trabajo.

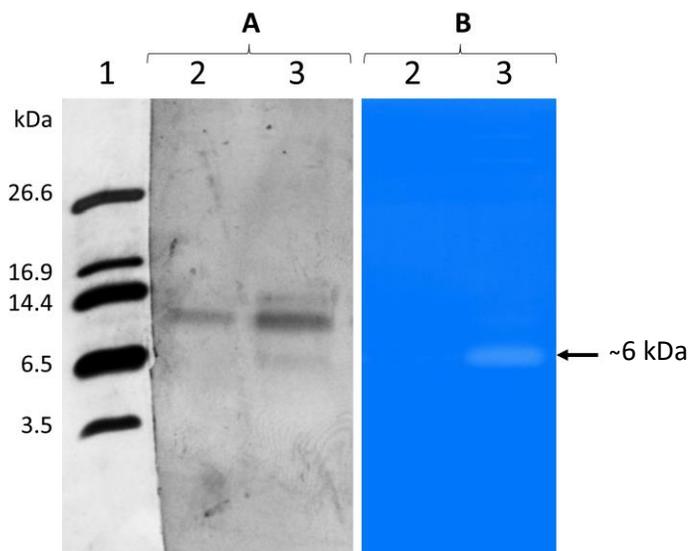


Figura 17. A) Perfil electroforético y B) zimograma contra *L. monocytogenes* de las muestras purificadas de: carril 2, *E. faecalis* F silvestre; carril 3, *E. faecalis* F EntA. Carril 1, marcador de peso molecular (polypeptide SDS-PAGE molecular weight standards, Bio-Rad). Tris-Tricina SDS-PAGE 16 %.

9.8 Espectro de actividad

Una vez que se confirmó la expresión de la enterocina A de forma activa, se determinó el espectro de actividad contra varios microorganismos por el método de difusión en agar. Se utilizó un extracto de las proteínas menores a 30 kDa para descartar el efecto de las peptidoglucano hidrolasas que produce la cepa (García-Cano *et al.*, 2014). Se utilizó la cepa silvestre como control para restar el efecto observado a la recombinante. La cepa productora de la enterocina A fue capaz de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *S. aureus*, *E. faecium* G, *E. faecalis* F silvestre, *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecalis* V583 (Figura 18). De esto, destaca la actividad en contra de *L. monocytogenes*, que es un patógeno de importancia en la industria de alimentos, así como la cepa de *E. faecalis* V583, que es un patógeno oportunista. En cambio, no fue capaz de inhibir el crecimiento de las cepas de BAL probióticas *L. rhamnosus* y *L. casei*, lo que podría resultar beneficioso en casos prácticos, ya que durante la maduración de alimentos participan muchos microorganismos que pueden pertenecer a este grupo y que su presencia es deseable. En la Tabla 10 se muestra una comparación de la actividad específica de la cepa recombinante con la cepa silvestre, en la que se puede observar una capacidad lítica mayor por parte de la primera. El sobrenadante no fue activo en contra de la cepa recombinante y sí en contra de la silvestre. Este es el resultado esperado, ya que la cepa silvestre no posee la proteína de inmunidad que la proteja de la acción de la enterocina A,

mientras que, en la cepa recombinante, la proteína de inmunidad sí se está expresando y llevando a cabo su función de manera correcta. Es importante señalar que en este ensayo no se observa la actividad lítica de la cepa silvestre porque las peptidoglucano hidrolasas fueron eliminadas por ultrafiltración, con el fin de poder observar con mayor claridad el efecto de la enterocina en la cepa recombinante. Estos resultados indican que la actividad inhibitoria se vio incrementada, ya que fue mayor por parte de la cepa recombinante que por la silvestre, a pesar de que en algunos casos ésta última también mostró actividad (contra *E. faecalis* V583 y *S. aureus*). Tal comparación de actividades sólo se pudo realizar de manera directa contra la cepa silvestre, ya que la forma en la que se midió la actividad (difusión en agar) no se pudo comparar contra otros ensayos reportados previamente en otros grupos de trabajo. Esto debido a que cambian las cepas utilizadas como indicadores y su sensibilidad a la enterocina A es diferente. Sin embargo, se puede decir que presenta un rango de actividad similar al de una cepa de *E. faecalis* (Y) productora de la misma bacteriocina (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006), ya que también fue necesario concentrar el extracto extracelular al menos 10 veces para poder observar la actividad. Caso contrario a lo reportado por Borrero y colaboradores (2011), quienes también clonaron la misma construcción para la expresión de la enterocina A en varias cepas, incluyendo una de *E. faecalis*. Esta cepa presentó una actividad antibacteriana elevada, al observarse un halo de inhibición muy claro a partir del medio extracelular sin concentrar. Sin embargo, hay que destacar que en ese estudio se empleó en el césped una cepa indicadora distinta (*E. faecium* P13) que seleccionaron por su sensibilidad a la enterocina A. Otra diferencia fue el método empleado para la clonación y expresión, ya que se realizó mediante el uso de un plásmido con alto número de copias, aumentando las copias del gen y, consecuentemente, los niveles de expresión. En este estudio, la cepa recombinante posee sólo dos copias del gen.

Tabla 10. Actividad específica de inhibición por parte de las cepas silvestre y recombinante de *E. faecalis* F determinado por difusión en agar.

Cepas	<i>E. faecalis</i> F silvestre (mm de halo/mg proteína)	<i>E. faecalis</i> F EntA (mm de halo/mg proteína)
<i>E. faecalis</i> F	0.0 ± 0.0	5.0 ± 1.0
<i>E. faecalis</i> F EntA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<i>E. faecalis</i> V583	26.0 ± 6.0	40.0 ± 0.0
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0.0 ± 0.0	12.0 ± 0.0
<i>E. faecium</i> G	0.0 ± 0.0	14.0 ± 2.0
<i>L. rhamnosus</i> R011	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<i>L. casei</i> R0215 ND	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	3.0 ± 0.0	5.0 ± 1.0
<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103	0.0 ± 0.0	16.0 ± 0.0
<i>Listeria innocua</i> CFQ-B-232	0.0 ± 0.0	12.0 ± 0.0

Se muestra el promedio ± la desviación estándar de tres experimentos independientes.

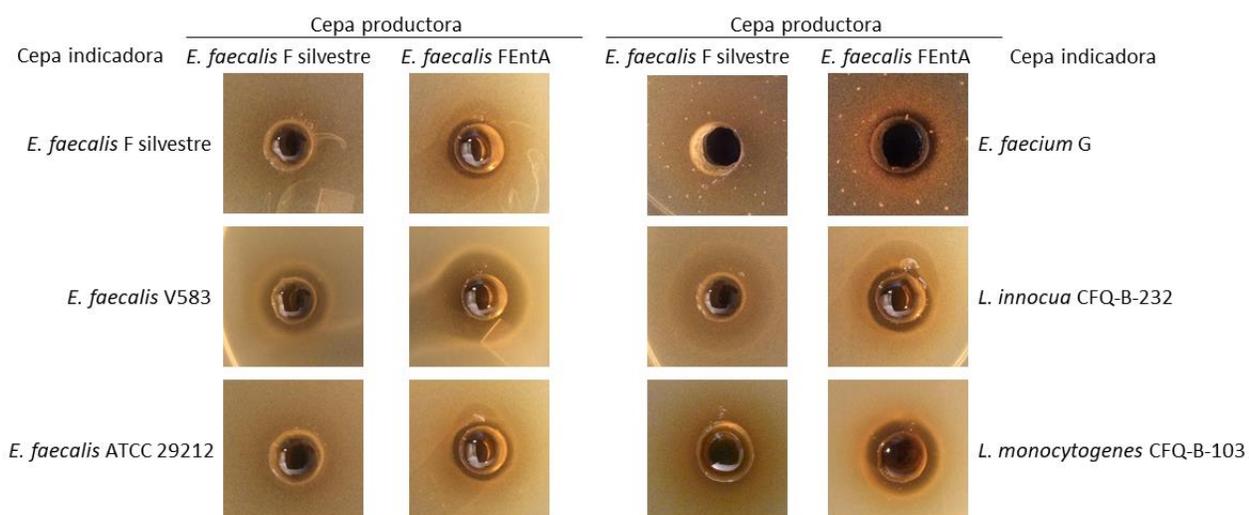


Figura 18. Espectro de inhibición de las cepas silvestre y recombinante determinado por difusión en agar.

9.9 Pruebas de inhibición de *L. monocytogenes* en co-cultivo con *E. faecalis* F EntA

Para determinar si la cepa recombinante era capaz de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* cuando se hacen crecer juntas, se realizó una cinética de crecimiento de ambas en medio líquido (BHI), con inóculos de 10^5 UFC/mL de las dos (relación 1:1). El mismo experimento se hizo también con la cepa silvestre, ya que, por sí misma, presenta una baja actividad antilisterial y puede haber competencia por el sustrato, por lo que habría una disminución en el crecimiento de *L. monocytogenes*. Las cuentas se realizaron en los medios diferenciales VJ y KAA, que permiten tener las cuentas de ambas bacterias por separado. En este ensayo se observa la actividad de todos los compuestos con actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano, incluyendo ácidos orgánicos, peptidoglucano hidrolasas y la enterocina A recombinante, a diferencia del ensayo anterior, en el que se eliminaron las peptidoglucano hidrolasas. Se observó una disminución en el crecimiento de *L. monocytogenes* cuando se puso a competir contra la cepa recombinante a partir de las 8 h, que se hizo más evidente tras 20 h, al observarse una disminución de 2 unidades logarítmicas (Figura 19). Después de este tiempo, también se observó una disminución cuando se hace crecer con la cepa silvestre, pero es menor, ya que es de menos de una unidad logarítmica. Con estos resultados se puede observar que la actividad inhibitoria de *E. faecalis* F se vio incrementada al insertar la construcción para la producción de la enterocina A.

La disminución en el crecimiento de *L. monocytogenes* no se debe a la disminución del pH del medio por parte de *E. faecalis*, ya que el pH al final de la fermentación presenta el mismo valor cuando se hace un cultivo de *L. monocytogenes* sola que cuando crecen ambas cepas en co-cultivo (Figura 20).

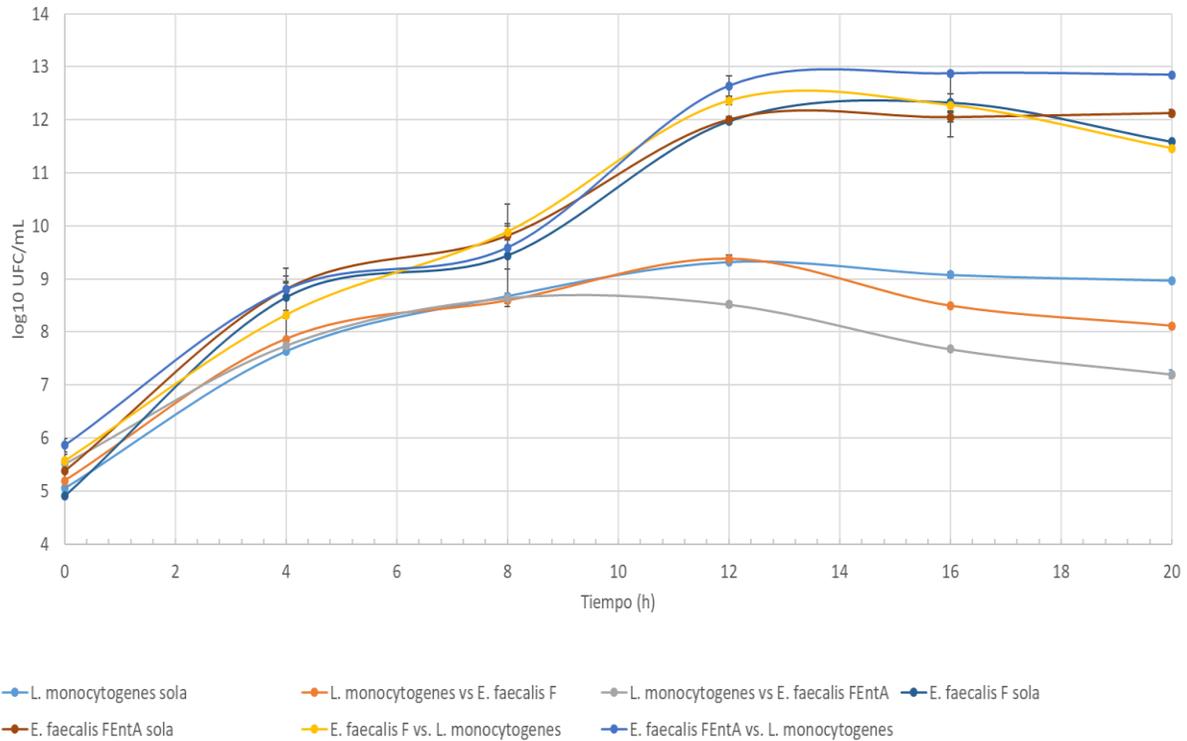


Figura 19. Cinética de crecimiento en co-cultivo de *L. monocytogenes* y *E. faecalis* silvestre y recombinante.

El crecimiento de las cepas *E. faecalis* F silvestre y recombinante fue muy similar (Figura 19). Esto indica que el crecimiento de la cepa recombinante no se vio afectado al insertar un gen en el cromosoma. Ésta es otra ventaja que presenta este método con respecto al uso de plásmidos de alto número de copia, ya que la síntesis de proteínas y la replicación del plásmido demanda una gran cantidad de energía y puede resultar en velocidades de crecimiento disminuidas.

A pesar de que la disminución en el crecimiento de *L. monocytogenes* se observa después de las 8 h de fermentación, es importante señalar que, en una situación práctica, el uso de la cepa recombinante sí podría funcionar, sobre todo en la elaboración de productos madurados, donde el proceso dura semanas e incluso meses. Aunque para asegurarlo, es necesario realizar ensayos de reto en quesos modelo y evaluar la actividad a lo largo de un periodo determinado. Además, la relación de inóculo entre el patógeno y la cepa productora de la enterocina fue de 1:1 (inóculo inicial de 10^5 UFC/mL), y en una situación real se espera que los productores sigan buenas prácticas de manufactura y no exista una carga inicial de *Listeria* tan alta.

Además, es posible que la inhibición de *L. monocytogenes* se haga evidente tras 8 h de fermentación debido a que en este tiempo la biomasa de *E. faecalis* es lo suficientemente alta

como para producir una mayor cantidad de enterocina. Es probable que la expresión de la bacteriocina no sea tan alta, pero al tener mayor número de bacterias produciéndola, sea suficiente para inhibir al patógeno.

Este cambio después de las 8 h se hace más evidente al calcular la velocidad específica de crecimiento desde el inicio de la fermentación hasta ese tiempo y lo que sucede después. Durante las primeras 8 h, la velocidad específica de crecimiento de *L. monocytogenes* sola fue de 0.45 h^{-1} ; cuando se hizo crecer junto con *E. faecalis* F silvestre, fue de 0.42 h^{-1} ; y cuando se puso a competir contra la cepa recombinante, fue de 0.39 h^{-1} . Se observa que la velocidad disminuye ligeramente, pero el cambio más evidente se observa después de las 8 h, ya que, pese a que *L. monocytogenes* sola entra en la fase estacionaria, aún presentó un ligero crecimiento, dando un valor de μ de 0.02 h^{-1} . En el caso en el que se puso en el mismo cultivo que *E. faecalis* F silvestre, la cantidad de biomasa disminuyó, arrojando una velocidad de muerte de 0.04 h^{-1} (o una μ de -0.04 h^{-1}). Finalmente, en competencia con la cepa productora de la bacteriocina, se observó una velocidad de muerte de 0.12 h^{-1} (o una μ de -0.12 h^{-1}). Con estos datos, podemos ratificar que la producción de la enterocina A sí tiene un efecto en el crecimiento de la cepa patógena.

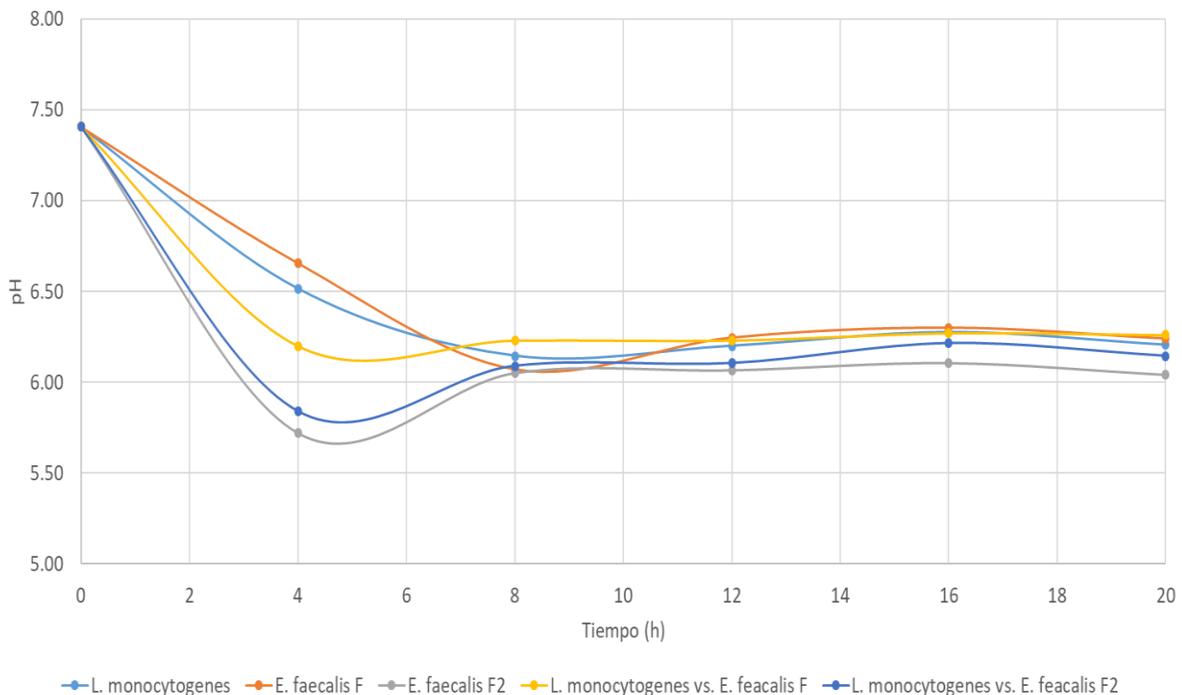


Figura 20. Monitoreo de pH durante la cinética de crecimiento de los cultivos.

Comparado con lo reportado por Liu y colaboradores (2008), en donde se clona y expresa la enterocina A en una cepa de *Lactococcus lactis*, la actividad obtenida por la cepa *E. faecalis* F recombinante fue más elevada. Cabe destacar que los medios empleados fueron diferentes. En el presente estudio, se pusieron a competir en caldo BHI, mientras que en el otro se inoculan en un queso tipo Cheddar. En ambos se utiliza una cepa de *L. monocytogenes* como microorganismo indicador. De los resultados obtenidos en el presente estudio, se observó una disminución máxima de 2 ciclos logarítmicos en las cuentas de *L. monocytogenes* a las 20 h de fermentación, mientras que en el caso de lo reportado para *L. lactis* (Liu *et al.*, 2008), la disminución máxima se observa después de 15 días en menos de 2 órdenes de magnitud.

Las ventajas de la utilización de este método para la expresión de una bacteriocina son que el gen se integra directamente en el cromosoma de la bacteria, por lo que no depende de la retención de un plásmido. Por la misma razón, no es necesario incluir un marcador de selección, evitando así la utilización de genes que confieran resistencia a antibióticos. Además, al utilizar un promotor constitutivo, no se requiere de inductores. Todo esto hace que la cepa recombinante tenga un potencial de aplicación en alimentos como un cultivo protector. El aprovechamiento de este tipo de actividades líticas producidas por bacterias ácido lácticas se puede hacer de diferentes maneras. Una de ellas es mediante la aplicación de la bacteriocina purificada (o un concentrado de ésta) directamente en alimentos, empaques, superficies, equipos, etc. Sin embargo, muchas veces los niveles de producción no son tan altos y los procesos de purificación pueden resultar complicados y elevan los costos, por lo que su aplicación no resulta práctica. Otra alternativa podría ser utilizar un extracto concentrado (sin purificar) del medio extracelular. Esta opción también depende de los niveles de producción de los compuestos antimicrobianos. En el caso particular de esta cepa recombinante, la ventaja que presenta es que no sólo produce la enterocina A clonada, sino que también produce otros compuestos como las peptidoglucano hidrolasas. Por lo que un concentrado del sobrenadante de fermentación incluiría todos estos compuestos. Además, este extracto podría tener aplicaciones en alimentos y también para la limpieza de instalaciones, equipos, superficies, etc. Pero el principal potencial de aplicación de esta cepa mejorada es como cultivo en alimentos. Se sabe que la cepa silvestre esta viable y presente a lo largo de la producción y maduración de un alimento fermentado como es el queso Cotija, por lo que, si la cepa recombinante fuera capaz de producir la bacteriocina a lo largo de este proceso, podría inhibir la presencia de algunos microorganismos indeseables. El género *Enterococcus* no se caracteriza por ser un buen acidificador, por lo que probablemente no resulte conveniente su utilización como cultivo iniciador, pero sí como un cultivo adyuvante que no solo puede ayudar a la inocuidad

microbiológica del producto, sino que también puede aportar a las características sensoriales mediante la generación de compuestos de aroma y sabor. Además, la cepa recombinante no inhibió el crecimiento de otras bacterias ácido lácticas, por lo que se pueden utilizar en conjunto sin problema. Esta cepa mejorada fue capaz de inhibir *L. monocytogenes*, un microorganismo de importancia en alimentos y en salud pública por su alto porcentaje de mortalidad y por su gran capacidad de resistir condiciones desfavorables para otras bacterias. *E. faecalis* F puede crecer en ambientes con condiciones de estrés similares a los de *L. monocytogenes*, por lo que se puede utilizar en alimentos con alto riesgo de contaminación por este patógeno. Otro aspecto relevante de esta cepa recombinante es que fue capaz de inhibir a otro patógeno, *E. faecalis* V583, cuyas infecciones son difíciles de tratar por su resistencia a antibióticos, incluso a la vancomicina. Pese a que no hay evidencia de que una cepa de *Enterococcus* patógena cause enfermedad por su consumo en alimentos, este resultado es importante ya que la aplicación de la cepa recombinante se puede ampliar a otros nichos, como agente de limpieza en ambientes nosocomiales.

10. Conclusiones

Al clonar y expresar la enterocina A en la cepa *E. faecalis* F, ésta presentó una actividad antibacteriana incrementada contra *Listeria monocytogenes* y la cepa patógena *E. faecalis* V583, pero no contra BAL probióticas, lo que la hace una cepa mejorada con potencial capacidad como cultivo protector.

11. Perspectivas

- Cortar la banda con actividad lítica observada por electroforesis y enviarla a identificar, con el fin de corroborar que se trata de la enterocina A.
- Evaluar la capacidad antibacteriana de la cepa recombinante en un alimento, como puede ser leche o queso.
- Tratar de incrementar la actividad antibacteriana de la cepa recombinante mediante la integración de un mayor número de copias de la construcción o con otro promotor más fuerte.

12. Bibliografía

1. Álvarez-Barajas R, Barragán-López E, Chombo-Morales P. 2005. Reglas de uso. Marca Colectiva. Queso Cotija Región de Origen. México. pp. 5-10.
2. Álvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D, Kuipers OP. 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied microbiology and biotechnology*. 100(7):2939-2951.
3. Amalaradjou MA, Bhunia AK. 2012. Modern approaches in probiotics research to control foodborne pathogens. *Advances in Food and Nutrition Research*. 67:185-239.
4. Andrighetto C, Knijff E, Lombardi A, Torriani S, Vancanneyt M, Kersters K, Swings J, Dellaglio F. 2001. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research*. 68:303– 316.
5. Borrero J, Jiménez JJ, Gútiez L, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE. 2011. Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*. 156:76-86.
6. Bravo-Mendoza A. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas del queso Cotija. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F. pp. 5-14, 46-72.
7. Bryan EM, Bae T, Kleerebezem M, Dunny GM. 2000. Improved vectors for nisin-controlled expression in gram-positive bacteria. *Plasmid*. 44:183–190.
8. Callewaert L, Walmagh M, Michiels CW, Lavigne R. 2011. Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology*. 22: 164–171.
9. Cebrián R, Baños A, Valdivia E, Pérez-Pulido R, Martínez-Bueno M, Maqueda M. 2012. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiology*. 30:59-67.
10. Cebrián R, Rodríguez-Ruano S, Martínez-Bueno M, Valdivia E, Maqueda M, Montalbán-López M. 2014. Analysis of the promoters involved in enterocin AS-48 expression. *PLoS One*. 9(3):e90603. doi: 10.1371.

11. Cervantes-Escoto F, Villegas-de Gante A, Cesin-Vargas A, Espinoza- Ortega A. 2008. Los Quesos Mexicanos Genuinos –Patrimonio cultural que debe rescatarse-. 1ª edición. Mundi-Prensa México. pp. 149-162.
12. Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*. 16(22):10881-10890.
13. Cotter PD1, Hill C, Ross RP. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature reviews. Microbiology*. 3(10):777-788.
14. Cotter PD, Ross RP, Hill C. 2013. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews. Microbiology*. 11(2):95-105.
15. DebRoy S, van der Hoeven R, Singh KV, Gao P, Harvey BR, Murray BE, Garsin DA. 2012. Development of a genomic site for gene integration and expression in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Microbiology Methods*. 90:1-8.
16. Dunny GM, Lee LN, LeBlanc DJ. 1991. Improved electroporation and cloning vector system for gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 57:1194–1201.
17. Escobar-Zepeda A, Sanchez-Flores A, Quirasco Baruch M. 2016. Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology*. 57:116-127.
18. Fernández M, Martínez-Bueno M, Martín MC, Valdivia E, Maqueda M. 2006. Heterologous expression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 102:1350-1361.
19. Foulquié-Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106:1-24.
20. Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiology*. 47:1 –24.
21. Franz CMAP, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. 2003. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 88:105-122.

22. Franz CMAP, van Belkum MJ, Holzapfel WH, Abriouel H, Gálvez A. 2007. Diversity of the enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews*. 31:293-310.
23. Franz CMAP, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*.151:125-140.
24. García-Cano I, Serrano-Maldonado CE, Olvera-García M, Delgado-Arciniega E, Peña-Montes C, Mendoza-Hernández G, Quirasco M. 2014. Antibacterial activity produced by *Enterococcus* spp. isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *LWT - Food Science and Technology*. 59: 26-34.
25. García-Cayuela T, de Cadiñanos LP, Mohedano ML, de Palencia PF, Boden D, Wells J, Peláez C, López P, Requena T. 2012. Fluorescent protein vectors for promoter analysis in lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*. 96(1):171-181.
26. Giraffa G. 1995. Enterococcal bacteriocins: their potential use as anti-Listeria factors in dairy technology. *Food Microbiology*. 12:551–556.
27. Giraffa G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 88:215-222.
28. Gray JA, Chandry PS, Kaur M, Kocharunchitt C, Bowman JP, Fox EM. 2018. Novel Biocontrol Methods for *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Production Facilities. *Frontiers in Microbiology*. 9:605.
29. Hasman H, Aarestrup FM, Dalsgaard A, Guardabassi L. 2006. Heterologous expression of glycopeptide resistance vanHAX gene clusters from soil bacteria in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57(4):648-53.
30. Jimenez-Corona ME. 2018. Enfermedades transmitidas por alimentos. Secretaría de Salud. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/334653/11._ETAS-Ma._Eugenia_Jim_nez-DGE.pdf
31. Khan H, Flint S, Yu PL. 2010. Enterocins in food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 141:1-10.

32. Kjos M, Borrero J, Opsata M, Birri DJ, Holo H, Cintas LM, Snipen L, Hernández PE, Nes IF, Diep DB. 2011. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology*. 157:3256-3267.
33. Kristich CJ, Chandler JR, Dunny GM. 2007a. Development of a host-genotype-independent counterselectable marker and a high-frequency conjugative delivery system and their use in genetic analysis of *Enterococcus faecalis*. *Plasmid*. 57(2): 131–144.
34. Kristich CJ, Wells CL, Dunny GM. 2007b. A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. *PNAS*. 104:3508–3513.
35. Lacks SA, Lopez P, Greenberg B, Espinosa M. 1986. Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1. *Journal of Molecular Biology*. 192:753–765.
36. Leclerc D, Asselin A. 1989. Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing gel electrophoresis. *Canadian Journal of Microbiology*. 35:749–753.
37. Liu L, O'Conner P, Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2008. Controlling *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*. *Journal of applied microbiology*. 104(4):1059-1066.
38. Maky MA, Ishibashi N, Zendo T, Perez RH, Doud JR, Karmi M, Sonomoto K. 2015. Enterocin F4-9, a novel O-linked glycosylated bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*. 81:4819–4826.
39. Martín-Platero AM, Maqueda M, Valdivia E, Purswani J, Martínez-Bueno M. 2009. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiology*. 26:294-304.
40. Martinović T, Andjelković U, Gajdošik MŠ, Rešetar D, Josić D. 2016. Foodborne pathogens and their toxins. *Journal of Proteomics*. 147:226-235.
41. Mesnage S, Chau F, Dubost L, Arthur M. 2008. Role of N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramidase activities in *Enterococcus faecalis* peptidoglycan metabolism. *The Journal of Biochemical Chemistry*. 283(28):19845-19853.

42. Monteagudo-Mera A, Caro I, Rodríguez-Aparicio LB, Rúa J, Ferrero MA, García-Armesto MR. 2011. Characterization of certain bacterial strains for potential use as starter or probiotic cultures in dairy products. *Journal of Food Protection*. 74(8):1379-1386.
43. Moraes PM, Perin LM, Todorov SD, Silva Jr A, Franco BDGM, Nero LA. 2012. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. *Journal of Applied Microbiology*. 113:318-328.
44. Muñoz A, Ananou S, Gálvez A, Martínez-Bueno M, Rodríguez A, Maqueda M, Valdivia E. 2006. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. *International Dairy Journal*. 17:760-769.
45. Muyzer G, de Waal E.C, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(3):695–700.
46. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Opsteegh M, Langelaar M, Threlfall J, Scheutz F, van der Giessen J, Kruse H. 2010. Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*. 139 Suppl 1:S3-15.
47. Nieto C, Espinosa M, Puyet A. 1997. The maltose/maltodextrin regulon of *Streptococcus pneumoniae*. Differential promoter regulation by the transcriptional repressor MalR. *Journal of Biological Chemistry*. 272(49):30860-30865.
48. Norris GE, Patchett ML. 2016. The glycocins: in a class of their own. *Current Opinion in Structural Biology*. 40:112-119.
49. O'Keeffe T, Hill C, Ross RP. 1999. Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(4):1506-1515.
50. Olvera-García M, Sanchez-Flores A, Quirasco Baruch M. 2018. Genomic and functional characterisation of two *Enterococcus* strains isolated from Cotija cheese and their potential role in ripening. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102(5):2251-2267.

51. Pessione A, Lamberti C, Cocolin L, Campolongo S, Grunau A, Giubergia S, Eberl L, Riedel K, Pessione E. 2012. Different protein expression profiles in cheese and clinical isolates of *Enterococcus faecalis* revealed by proteomic analysis. *Proteomics*. 12:431-447.
52. Peterbauer C, Maischberger T, Haltrich D. 2011. Food-grade gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnology Journal*. 6:1147-1161.
53. Radoshevich L, Cossart P. 2018. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature reviews. Microbiology*. 16(1):32-46.
54. de Ruyter PG, Kuipers OP, Meijer WC, de Vos WM. 1997. Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. *Nature Biotechnology*. 15(10):976-979.
55. Salminen, S. von Wright, A. Ouwehand, A. 2004. Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3ª edición. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos. pp. 375-398.
56. Sarantinopoulos P, Andrighetto C, Georgalaki MD, Rea MC, Lombardi A, Cogan TM, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E. 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*. 11:621– 647.
57. Schägger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. 166:368–379.
58. Serio A, Chaves-López C, Paparella A, Suzzi G. 2010. Evaluation of metabolic activities of enterococci isolated from Pecorino Abruzzese cheese. *International Dairy Journal*. 20: 459-464.
59. Serrano-Maldonado CE. 2010. Caracterización de la actividad antibacteriana producida por bacterias ácido lácticas aisladas de un alimento artesanal mexicano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
60. Serrano-Maldonado CE, García-Cano I, González-Canto A, Ruiz-May E, Elizalde-Contreras JM, Quirasco M. 2018 Cloning and Characterization of a Novel N-acetylglucosaminidase (AtID) from *Enterococcus faecalis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 28(1):14-27.

61. Suzzi G, Lombardi A, Lanorte MT, Caruso M, Andrighetto C, Gardini F. 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology*. 89:267– 274.
62. Tauer C, Heini S, Egger E, Heiss S, Grabherr R. 2014. Tuning constitutive recombinant gene expression in *Lactobacillus plantarum*. *Microbial cell factories*. 13:150.
63. du Toit M, Franz CM, Dicks LM, Holzapfel WH. 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *Journal of Applied Microbiology*. 88(3):482-494.
64. Vivant AL, Garmyn D, Piveteau P. 2013. *Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3:87.
65. Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. 2008. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*. 32(2): 259-86.
66. de Vos WM y Hugenholtz J. 2004. Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria. *TRENDS in Biotechnology*. 22(2):72-79.
67. van der Vossen JM, van der Lelie D, Venema G. 1987. Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(10):2452-2457.
68. De Vuyst L, Foulquié-Moreno MR, Revets H. 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*. 84:299-318.
69. Yang R, Johnson M, Ray B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:3355–3359.
70. Zúñiga-Bustos AB. 2009. Descripción e identificación de la comunidad bacteriana presente en el Cotija por métodos moleculares. Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. UNAM. México, D.F.
71. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Inocuidad de los alimentos. 31 de octubre de 2017. Acceso/Centro de prensa/Notas descriptivas/Detail. Organización Mundial de la Salud.

13. Productos de la investigación

Publicaciones:

Serrano-Maldonado CE, Quirasco M. 2018. Enhancement of the antibacterial activity of an *E. faecalis* strain by the heterologous expression of enterocin A. *Journal of Biotechnology*. 283:28-36. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.06.346.

Presentaciones en congresos:

Serrano-Maldonado CE, Quirasco M. El método de intercambio alélico como herramienta para la modificación de bacterias ácido lácticas de aplicación en alimentos. Presentación oral. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara, Jalisco, México, 2015.

Serrano-Maldonado CE, Quirasco M. Bacteriocin production by *Enterococcus* spp. strains isolated from Cotija cheese. Poster presentation. International Conference on Food Microbiology. Birmingham, Inglaterra, 2016.

Serrano-Maldonado CE, Olvera-García M, Quirasco M. Detección de bacteriocinas producidas por cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de queso Cotija. Presentación oral. XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco, México, 2017.

14. Anexo

Resultados de la secuenciación del gen clonado en la cepa *E. faecalis* F.

Secuenciación sentido directo (forward):

>171012-017_P17_F2_MPF.ab1 240

```
AAGTATTTAGTTTAGCTCTTATTGGAATATTTGGGTTAGTTGTGACAAAT
TTTGGTACAAAAGTTGATGCAACCACTCATAGTGGAAAATATTATGGAAA
TGGAGTGTATTGCACTAAAAATAAATGTACGGTCGATTGGGCCAAGGCAA
CTACTTGTATTGCAGGAATGTCTATAGGTGGTTTTTTAGGTGGAGCAATT
CCAGGGAAGTGCTAAAATGAAAAAATGGCCCTCGAGCGA
```

Secuenciación sentido inverso (reverse):

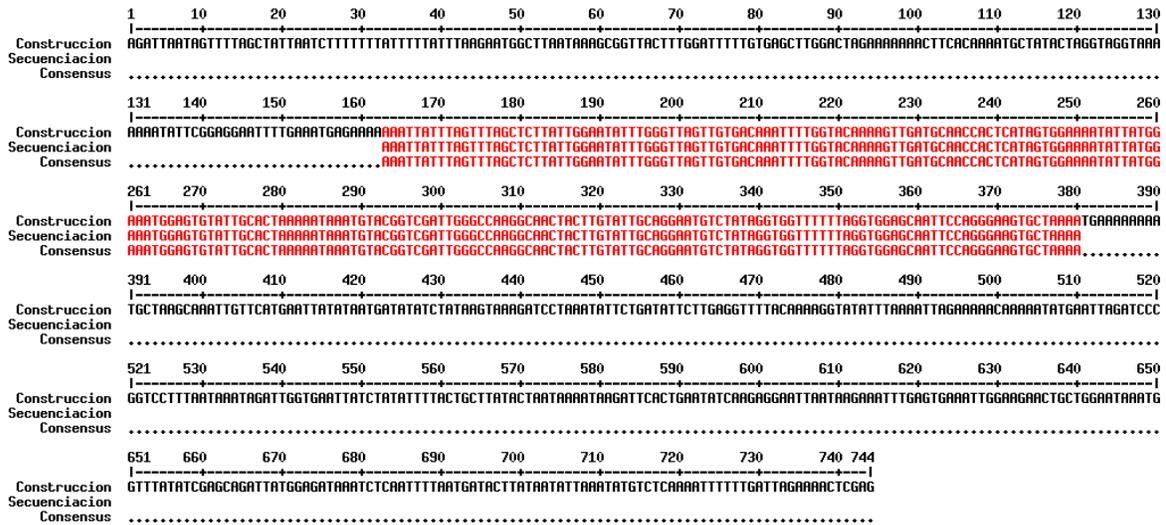
>171012-017_B19_F2_Alr.ab1 221

```
AGCTCACCTAAAAAACCACTATAGACATTCCTGCAATACAAGTAGTTGC
CTTGGCCCAATCGACCGTACATTTATTTTAGTGCAATACACTCCATTC
CATAATATTTCCACTATGAGTGGTTCATCAACTTTGTACCAAATTT
GTCACAATAACCCAAATATTCCAATAAGAGCTAAACTAAATAATTTTTT
TTCATTTTCAAAAATCCACA
```

Secuencia consenso:

```
AAATTATTTAGTTTAGCTCTTATTGGAATATTTGGGTTAGTTGTGACAAAT
TTTGGTACAAAAGTTGATGCAACCACTCATAGTGGAAAATATTATGGAAA
TGGAGTGTATTGCACTAAAAATAAATGTACGGTCGATTGGGCCAAGGCAA
CTACTTGTATTGCAGGAATGTCTATAGGTGGTTTTTTAGGTGGAGCAATT
CCAGGGAAGTGCTAAAA
```

Alineamiento múltiple de la secuencia obtenida experimentalmente comparada con la secuencia teórica:



MultAlin, servidor en línea, "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering", Corpet, 1988.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Biotechnology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jbiotec

Enhancement of the antibacterial activity of an *E. faecalis* strain by the heterologous expression of enterocin A

Carlos Eduardo Serrano-Maldonado, Maricarmen Quirasco*

Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Cd. México, 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Bacteriocin
Chromosome integration
Food protection
Antilisterial activity
Peptidoglycan hydrolase

ABSTRACT

The genus *Enterococcus* occurs as native microbiota of fermented products due to its broad environmental distribution and its resistance to salt concentrations. *Enterococcus faecalis* F, a non-pathogenic strain isolated from a ripened cheese, has demonstrated useful enzymatic capabilities, a probiotic behavior and antibacterial activity against some food-borne pathogens, mainly due to peptidoglycan hydrolase activity. Its use as a natural pathogen-control agent could be further enhanced through the production of a bacteriocin, e.g. Enterocin A, because of its remarkable antilisterial activity. In this work, a markerless allelic insertion method was used to obtain an enterococcal strain capable of producing a functional enterocin. Agar diffusion tests showed that the recombinant strain was active against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and the pathogenic strain *E. faecalis* V583. When grown in liquid culture together with *L. monocytogenes*, it attained a two-log reduction of the pathogen counts in lesser time relative to the native strain. Because the DNA construction is integrated into the chromosome, the improved strain avoids the use of antibiotics as selective pressure; besides, it does not require an inductor because of the inclusion of a constitutive promoter in the construction. Its technological and antibacterial capabilities make the improved *E. faecalis* strain a potential culture for use in the food industry.

1. Introduction

Bacteriocins are ribosomally synthesized, small, heat-stable antimicrobial peptides that are active against other bacteria than the producer strain. They could have a narrow activity (against the same species) or broad spectrum (activity against other genera), and the producer bacterium also synthesizes a protein that is part of an immunity mechanism to contend against its own bacteriocin (Cotter et al., 2005). Many lactic acid bacteria (LAB) produce bacteriocins, which are of interest in food preservation due to their specificity against pathogenic bacteria of relevance in industrialized products for its potential consumer appeal, as the use of synthetic preservatives as food additives is avoided (Cotter et al., 2005). The genus *Enterococcus*, which belongs to LAB, occurs in vegetables and animal-derived foods, contributing to the ripening and distinctive aroma of certain fermented products, i.e. cheeses, sausages, olives, kimchi, etc. (Franz et al., 2011). Its presence in this type of products is frequently due to its tolerance to high salt concentrations, heat and acidic conditions, and because of its ability to grow within a broad temperature range. Enterococci are commonly found in Mediterranean cheeses produced with raw or pasteurized milk, where they contribute to the organoleptic characteristics and quality properties due to their proteolytic and lipolytic activities along with the

production of metabolites like diacetyl (Nieto-Arribas et al., 2011). Besides, bacteriocin-producing *Enterococcus* strains have been isolated from fermented products, where they may potentially contribute to improve microbial safety (Ennahar and Deschamps, 2000; Ness et al., 2014).

Enterococcal bacteriocins – called enterocins – are active against *Listeria* spp., mainly those belonging to Class IIa (pediocin-like bacteriocins) (Franz et al., 2007). Enterocin A stands out within this subgroup for its potent activity against *L. monocytogenes*. The high antibacterial potency of this enterocin derives from the presence of two disulfide bridges (Ness et al., 2014). Its antibacterial spectrum includes species of *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, and *Listeria*. Enterocin A is produced mainly by *E. faecium* strains, including food isolates (Franz et al., 2007). Enterocin A has a molecular weight of 4829 Da and contains 47 amino acids; it is synthesized as a biologically inactive propeptide with an 18-amino acid leader peptide (Franz et al., 2007). In *E. faecium* strains, it is coded in the 10.5-kb *entAIFKRTD* operon that includes the enterocin A propeptide, the immunity protein, and its own regulatory and transporter systems (O'Keeffe et al., 1999). It has been expressed in its active form, by cloning *entAI* genes only, in a number of LAB like *Lactococcus lactis*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Lactobacillus sakei*, and *Pediococcus acidilactici* (Borrero et al., 2011). To avoid cloning the

* Corresponding author.

E-mail address: quirabma@unam.mx (M. Quirasco).

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.06.346>

Received 11 February 2018; Received in revised form 31 May 2018; Accepted 25 June 2018

Available online 10 July 2018

0168-1656/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

complete operon, the leader sequence of enterocin A has been replaced by the signal peptide of enterocin P. With this replacement, the enterocin is secreted by the Sec-dependent pathway (which is conserved in all bacteria), thus making genes *entT* and *entD* unnecessary. Furthermore, when a constitutive promoter is included, the regulatory system for the expression of gene *entA* is not required.

On the other hand, Kristich et al. (2007) developed a conjugative delivery system for the genetic modification of *E. faecalis*. The key advantages of this system are the host-genotype-independent counter-selectable marker to avoid the use of an antibiotic-resistance marker, and the integration of the gene of interest into the chromosome. Then, DebRoy et al. (2012) found a specific, highly-conserved intergenic region within *E. faecalis* strains that is useful for integrating heterologous genes.

Not all enterococcal strains are bacteriocin producers, yet these may still contribute to improve food safety. Such is the case of *E. faecalis* F, a strain isolated from Cotija cheese, an artisanal Mexican product (García-Cano et al., 2014). This strain is safe for human consumption due to the absence of virulence factors and its low antibiotic resistance (Olvera-García et al., 2018). Moreover, *E. faecalis* F shows antibacterial activity against some food-borne pathogens like *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica*, and *Pseudomonas aeruginosa*, mainly through the action of peptidoglycan hydrolases (García-Cano et al., 2014). The purpose of this work was the cloning and expression of enterocin A in *E. faecalis* F to further enhance its antibacterial activity, aimed at using the improved strain as a food-grade protective culture.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, media, and chemicals

The bacterial strains used in this study are listed in Table 1. *E. coli*

EC1000 was used as host for pCJK47-based plasmids, and *E. coli* DH5 α was used as host for pSD15-based plasmids. Both were cultured in Luria Bertani broth [Bacto tryptone 10 g/l (Becton, Dickinson and Company (BD), Sparks, MD, USA), yeast extract 5 g/l (BD), NaCl 10 g/l (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA), pH 7.5] at 37 °C. When needed, antibiotics were added at the following concentrations: erythromycin (Em; E5389) 300 μ g/ml; spectinomycin (Sp; S4014) 100 μ g/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). *E. faecalis* F (CFQ-B-254) was used as gene receptor and producer strain; it is deposited in the Culture Collection of the Faculty of Chemistry (CFQ) at the National Autonomous University of Mexico (WDCM No. 100). *Enterococcus* strains were propagated in Brain Heart Infusion broth (BHI; BD). For transformant selection, X-Gal 250 μ g/ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and *p*-Cl-phenylalanine 10 mM (C6506, Sigma-Aldrich) were added. All the strains used in the antibacterial spectrum were cultivated in BHI. For the selective enumeration of *L. monocytogenes*, Vogel-Johnson agar (VJ, Oxoid, Basingstoke, UK) spiked with 5 g/l LiCl (10 g/l total) (J.T. Baker) was used, while *E. faecalis* was counted in kanamycin aesculin azide agar (KAA, Oxoid) spiked with 20 mg/l kanamycin.

2.2. DNA manipulations, chimeric gene synthesis, and PCR primers

The chimera containing the enterocin P signal peptide (SP_{entP}) fused to mature EntA structural and immunity genes (*entAI*), as reported in Borrero et al. (2011), plus the constitutive promoter sequence P₃₂, were synthesized by Epoch Life Science Inc. (Sugar Land, TX, USA). The complete sequence of the chimera is shown in Fig. 1. Sequencing services were performed by MacroGen Inc. (Seoul, South Korea). All primers used were synthesized by Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, Iowa, USA) and are listed in Table 1. *Pfu* DNA polymerase (EP0501) was used for PCR reactions of short products (less than 1000 bp), and Long PCR Enzyme Mix (K0182) for longer fragments. The restriction enzymes *Pst*I (ER0611) and Fast Digest *Eco*RI (FD0247),

Table 1

Strains, plasmids and primers used in this study.

	Description	Source or reference
Strain		
<i>E. faecalis</i>		
F	Receptor and producer strain	García-Cano et al. (2014)
F EntA	<i>entA</i> recombinant strain	This study
V583 (ATCC 700802)	Pathogenic strain used for antibacterial spectrum	ATCC
ATCC 29212	Pathogenic strain used for antibacterial spectrum	ATCC
<i>E. faecium</i>		
G	Isolated from cheese, used for antibacterial spectrum	García-Cano et al. (2014)
<i>E. coli</i>		
EC1000	Host for pCJK47-based plasmids; provides RepA in <i>trans</i>	Kristich et al. (2007)
DH5 α	Cloning host for pSD15-based plasmids	Lab stock
<i>L. monocytogenes</i>		
CFQ-B-103	Used for antibacterial spectrum	Culture Collection School of Chemistry - UNAM (WDCM No. 100)
<i>L. innocua</i>		
CFQ-B-232	Used for antibacterial spectrum	Culture Collection School of Chemistry - UNAM (WDCM No. 100)
<i>S. aureus</i>		
ATCC 6538	Used for antibacterial spectrum	ATCC
<i>L. rhamnosus</i>		
R011	Probiotic used for antibacterial spectrum	Lallemand Health Solutions
<i>L. casei</i>		
R0215 ND	Probiotic used for antibacterial spectrum	Lallemand Health Solutions
Plasmids		
pCJK47	Plasmid for markerless exchange	Kristich et al. (2007)
pSD15	Plasmid for insertion site (pTOPOIC MCS)	DebRoy et al. (2012)
pUCP32	Plasmid containing chimeric gene with P ₃₂ promoter	Epoch Life Science Inc.
Primers		
338F	5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'	Muyzer et al. (1993)
518R	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'	Muyzer et al. (1993)
ES-MPf	5'-CCT GCA GTA AGG AGG ATT TTT GAA ATG AGA AAA A-3'	This study
ES-Ax	5'-CGC TCG AGG CAT TTT TTT TCA TTT TAG CAC TTC-3'	This study
Ef2238F	5'-GCA CCA TGG GAG AAG GAG GCA TTT AGA-3'	This study
Ef2239R	5'-GTC GGA TCC GCC CTT GGT AAA ACT AG-3'	DebRoy et al. (2012)

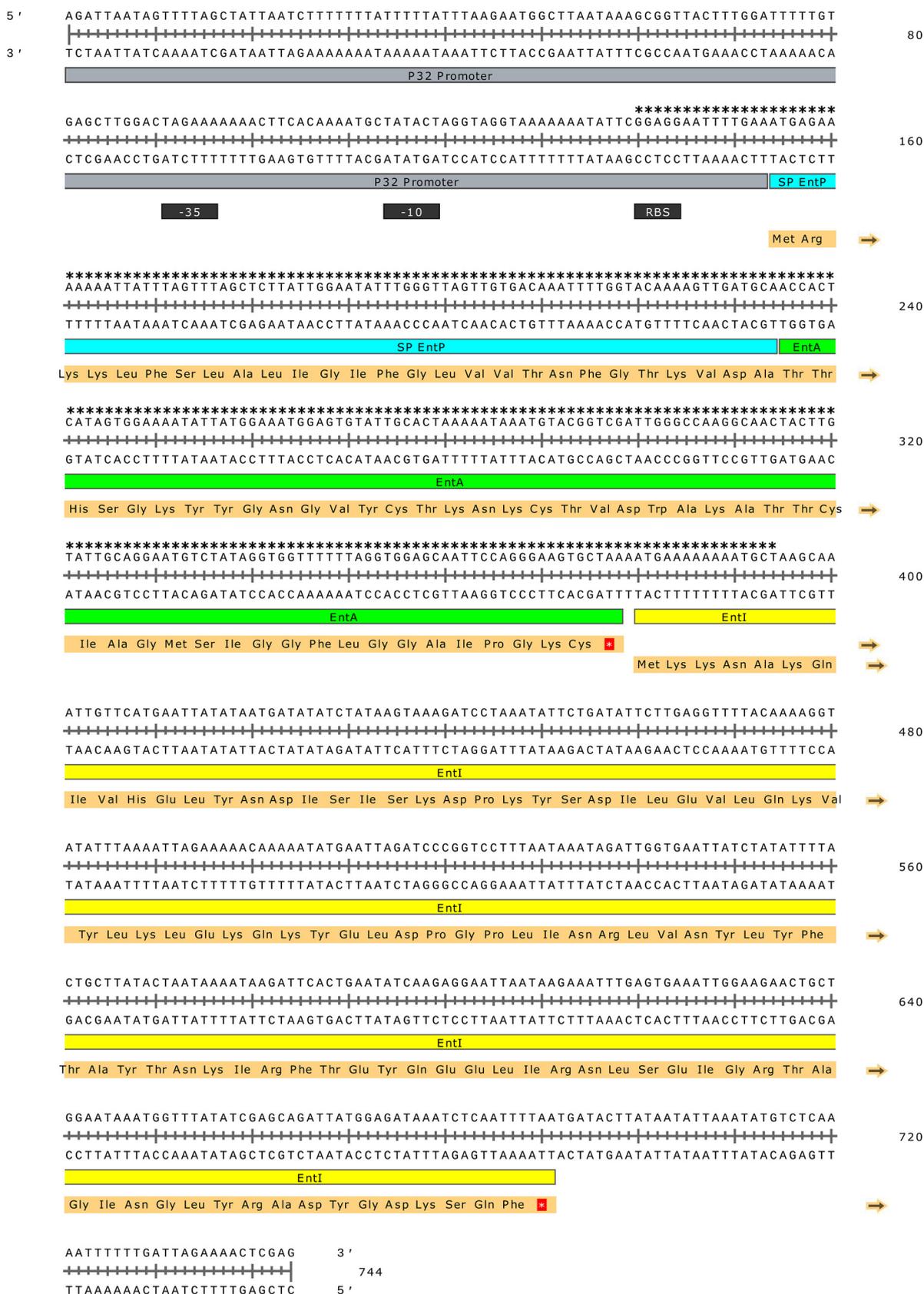


Fig. 1. Complete sequence of the synthesized gene construction. The P32 promoter (with -35, -10 and RBS sequences, in gray), enterocin P signal peptide (SP EntP, in cyan), enterocin A structural gene and immunity protein gene are shown. Arrows indicate a protein (EntA, in green; EntI, in yellow); the amino acids translation is included. The sequenced amplicon is highlighted with asterisks. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

along with T4 DNA Ligase (EL0011), were used following the manufacturer's instructions (all enzymes from Thermo Fisher Scientific).

2.2.1. Identification of *entA* and gene insertion verification

The presence of the gene of interest was detected in the constructed vectors and the recombinant strains by performing a PCR that amplified the enterocin P signal peptide and enterocin A gene, using the primer pair ES-MPf/ES-Ax (Table 1). PCRs were run in 25- μ l reaction mixtures containing 100 ng of DNA, 200 pmol of each primer and 1 U of *Pfu* DNA Polymerase. Mixtures were subjected to an initial denaturation cycle at 95 °C for 3 min; then 30 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 52 °C for 30 s and elongation at 72 °C for 1 min; then, a final extension step at 72 °C for 10 min; all PCRs were performed in a DNA thermal cycler (Axygen Maxygene II, Thermo Fisher Scientific). To confirm the presence of the chimera in the insertion site, another PCR was performed using primers Ef2238F and Ef2239R (Table 1); the amplicon included the contiguous genes used for the homologous recombination (*ef2238* and *ef2239*). The composition of all PCR mixtures was as described above, using the Long PCR Enzyme Mix. The PCR conditions consisted of an initial denaturation cycle at 94 °C for 3 min; then 10 cycles of denaturation at 94 °C for 20 s, annealing at 56 °C for 30 s and elongation at 68 °C for 4 min; then 20 cycles of denaturation at 94 °C for 20 s, annealing at 56 °C for 30 s, and elongation at 68 °C for 4 min + 2 s/cycle; then a final extension step at 72 °C for 10 min. The PCR products were analyzed by electrophoresis in 1% (w/v) agarose (R0491, TopVision Agarose, Thermo Fisher Scientific) gels stained with ethidium bromide 0.1% (w/v) and visualized in an UV transilluminator.

2.2.2. Plasmid construction

The plasmids used in this study are listed in Table 1. The chimeric genes were synthesized by Epoch Life Science Inc. and inserted into the pUC18 plasmid (named pUCP32). The gene of interest was digested from the vector using the restriction enzyme *Pst*I and ligated into a similarly digested pSD15 vector to yield pSD15*entA*32. The plasmid pSD15 contains the genomic insertion site for expression developed by DebRoy et al. (2012), which includes the region containing the genes *ef2238* and *ef2239* and the intergenic sequence named insertion cassette (IC) by the authors. The fragment inserted along with the IC was excised by *Eco*RI digestion and ligated into *Eco*RI-digested pCJK47, rendering pES*entA*32. Fig. 2 shows a schematic representation of the different plasmid constructions.

2.3. Transformation of *E. faecalis* F strain and chromosomal insertion

Because of the low conjugation rate observed, the plasmid pES*entA*32 was introduced directly into *E. faecalis* F without using *E. faecalis* CK111, which is the donor strain reported by Kristich et al. (2007). Instead, the transformation was performed through electroporation following the procedure proposed by Dunny et al. (1991). Briefly, cells were grown for 15 h in BYGT medium plus glycine (Bio-Rad) at 4% (w/v). The culture was diluted in 50 ml of fresh medium containing 4.5% glycine to bring OD_{660nm} within 0.05–0.08; it was incubated for 90 min at 37 °C and 200 rpm. Cells were treated as described by Dunny et al. (1991), resuspended in 500 μ l of electroporation solution, and dispensed in 80- μ l aliquots. Before use, cells were incubated on ice for at least 30 min. Three hundred nanograms of plasmid (pES*entA*32) were mixed with 80 μ l of cells in a 0.2-cm electroporation cuvette (Bio-Rad). Electroporation conditions were 25 μ F, 200 Ω and 25,000 mV/cm using a Gene Pulser Electroporation System (Bio-Rad). Then, cells were placed on ice for 2 min. Afterwards, 1 ml of BHI medium was added and the cells were incubated for 2 h at 37 °C and spread on BHI agar plates containing 0.25 M sucrose, 250 μ g/ml X-gal and 10 μ g/ml erythromycin (Em). Some blue colonies were screened to test their capacity to grow in the presence of *p*-Cl-Phe. Dilutions (10⁻² and 10⁻³) of an 18-h cell culture were plated in parallel, both in BYGT agar supplemented with 10 mM *p*-Cl-Phe and in BYGT agar. Plates were

incubated at 37 °C for 24 h. Blue colonies that were resistant to Em and showed growth deficiency in the presence of *p*-Cl-Phe were selected as recombinant strains that integrated the plasmid into the chromosomal insertion site. Positive colonies were analyzed by PCR to confirm the presence of the gene of interest using the primer pair ES-MPf/ES-Ax followed by sequencing.

Another recombination was needed to keep the chimera and excise the rest of the plasmid: 30 recombinants obtained from the previous step were cultured in BHI broth without Em at 37 °C for 12 h. White colonies were selected on BHI agar plates in the presence of X-gal and *p*-Cl-Phe, after five consecutive passes. Em-sensitive colonies were selected, indicating that the integrated plasmid had been excised. A PCR was performed to analyze the selected colonies for the presence of the chimera, as the complete plasmid (including the construction of interest) might have been lost, returning to the wild-type (WT) allele. A positive amplification indicated that the colony carried the inserted chimera. A second PCR was performed with both WT and the presuming mutants using the external primers Ef2238 F and Ef2239R to observe the increase in amplicon size.

2.4. mRNA detection

In order to determine if the inserted gene was expressed in the recombinant colonies selected, their mRNA was analyzed. Total RNA was extracted using the Direct-zol RNA Miniprep kit (Zymo Research, CA, USA). Afterwards, cDNA was synthesized using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific) following the supplier's instructions. The primer pair ES-MPf / ES-Ax was used to synthesize and detect the specific fragment under the conditions already described in Section 2.2.1. A control reaction to assess the absence of DNA in the RNA preparation was performed with primers 338F/518R; this primer pair amplifies 16S rDNA under the conditions described by Muyzer et al. (1993).

2.5. Bacteriocin semi-purification, tricine SDS-PAGE, and zymography

Enterocin A was semi-purified using a modified adsorption-desorption method (Yang et al., 1992). *E. faecalis* F and *E. faecalis* F EntA (mutants expressing Ent A) were cultured in BHI at 37 °C for 15 h and then heated at 70 °C for 30 min. The pH was adjusted to 5 with 1 N HCl and samples were incubated at 4 °C and 100 rpm for 4 h to trigger enterocin adsorption onto the cell membrane. Afterwards, cells were washed 3 times with 50 mM sodium phosphate (J. T. Baker) pH 6.5 and resuspended in 300 mM NaCl adjusting to pH 2 with phosphoric acid (J. T. Baker). Samples were incubated at 4 °C and 100 rpm for 12 h, centrifuged at 6400 \times g for 15 min at 4 °C, and lyophilized to concentrate. The dried samples were resuspended in 50 mM sodium phosphate pH 6.5. To identify enterocin A and the lytic activity, tricine SDS-PAGE and zymograms were performed according to Schagger and von Jagow (1987) using 16% polyacrylamide (Bio-Rad). Electrophoresis was carried out with a Mini-PROTEAN III cell unit (Bio-Rad) at 80 V for 6 h, staining with G-250 Coomassie blue (Bio-Rad) to visualize the protein pattern. In the case of zymograms, renaturing tricine SDS-PAGE was performed. Gels were prepared as previously described, but using *L. monocytogenes* CFQ-B-103 or *E. faecalis* V583 cells in the gel as substrate. Cells were obtained from an 18-h culture by centrifugation at 11,000 \times g for 15 min at 4 °C and washed three times with isotonic saline solution pH 7. The cell pellet was suspended in acrylamide solution prior to polymerization. After electrophoresis, gels were washed twice with deionized water for 30 min. Then, renaturing buffer [50 mM sodium phosphate pH 6.5, 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich)] was added, followed by incubation for 18 h under slight stirring. Gels were stained with 0.01% (w/v) KOH (J. T. Baker) and 0.1% (w/v) methylene blue for 30 min and then destained with distilled water (Leclerc and Asselin, 1989). Molecular masses were determined using Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards (161-0326, Bio-Rad) and

documented in a Gel-Doc system (Bio-Rad).

2.6. Bacteriocin activity assay

E. faecalis F and *E. faecalis* F EntA were cultured in BHI at 37 °C for 15 h (stationary growth phase) and the supernatant was collected by centrifugation at 6400 × g for 15 min at 4 °C. The pH was adjusted to 7.0 using 1 N NaOH and the supernatant was then filtered using a sterile 0.22 µm cutoff membrane (GVWP04700, Durapore Membrane Filters, Millipore, Massachusetts, USA). To eliminate proteins larger than 10 kDa, the sample was ultrafiltered with a 10 kDa cutoff membrane (PLGC07610, Ultrafiltration Discs, Millipore). The permeate was then concentrated by lyophilization and its antimicrobial activity was tested by agar well diffusion assays. Petri dishes were prepared with 30 ml of BHI agar (0.8 g agar per 100 ml) inoculated with 30 µl of a culture (OD_{600nm} = 0.4) of various target bacteria (*L. monocytogenes* CFQ-B-103, *L. innocua* CFQ-B-232, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *E. faecalis* V583, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* F, *E. faecalis* F EntA, *E. faecium* G, *Lactobacillus rhamnosus* R011, and *L. casei* R0215 ND (see Table 1 for strain information). Wells of 9 mm diameter were cut into the agar plates and the different samples were poured in, adjusting the amount of protein to 0.25 mg per well. Plates were incubated at 37 °C for 12 h and then examined for an inhibition zone surrounding the well. Specific activity was defined as mm of inhibition per mg of protein.

2.7. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in co-culture with *E. faecalis* F EntA

L. monocytogenes CFQ-B-103 and *E. faecalis* F EntA were grown in a mixed culture in BHI at 37 °C and 250 rpm, using an initial inoculum of 10⁵ CFU/ml and a 1:1 inoculum ratio, in a 250-ml flask with 50 ml of culture media. Samples were collected at 4-h intervals to perform bacterial counts of both strains. For selective enumerations of *L. monocytogenes* and *E. faecalis*, appropriate dilutions of cultures were made in VJ agar and KAA agar, respectively, followed by incubation at 37 °C for 24 h. *E. faecalis* F WT was used as negative control.

2.8. Protein assay

The protein concentration of samples was measured using the Bradford protein assay (Bio-Rad) with a bovine serum albumin curve as protein standard.

3. Results and discussion

3.1. Plasmid construction and genomic insertion

The enterocin A gene was integrated into *E. faecalis* F using a markerless genetic exchange system directly into the chromosome developed by Kristich et al. (2007) and the genomic insertion site reported by DebRoy et al. (2012). Therefore, we designed a construction of 750 bp, which includes the constitutive promoter P₃₂, the Sec-dependent pathway Ent P signal peptide, and genes *entA* and *entI*, the latter coding for the immunity protein needed to prevent the effect of enterocin on the producer strain. The complete sequence of the designed construction is shown in Fig. 1. With this strategy the use of a plasmid that requires a selection marker for its retention was avoided and, after the second recombination event, the receptor strain did not retain any selection marker (it was sensitive to erythromycin), which is appropriate for food applications because a food-grade vector should not contain antibiotic resistance markers to reduce the risk of transfer to the human intestinal microbiota (Peterbauer et al., 2011). The addition of the constitutive promoter P₃₂ in the chimera made unnecessary to include *entK* and *entR* genes, thereby reducing the size of the cloned fragment. Besides, the addition of a constitutive promoter avoided the need of an inducer, which would be impractical if the mutant strain is

intended for use in food fermentations. The replacement of the WT signal peptide by the enterocin P one allowed the production and secretion of enterocin A, thus avoiding the cloning of the complete operon with a size larger than 10 kbp.

The construction was synthesized in a tandem duplicate and inserted in pUC18. To add the genome insertion sequences, also called insertion cassette (IC), the chimeric construction was digested from pUC18 and ligated into pSD15 to render pSD15entA32 (Fig. 2). The IC is highly conserved in *E. faecalis* strains (DebRoy et al., 2012). The *E. faecalis* F genome was previously sequenced in our group (Olvera-García et al., 2018) (GenBank accession number: GCA_002006705.1) and the presence of the IC was verified.

Afterwards, the complete sequence including the IC was digested and ligated into pCJK47 to produce pESentA32 (Fig. 2), i.e. the plasmid inserted in *E. coli* EC1000 as host strain. The presence of gene *entA* was verified in each sub-cloning step by PCR; it was sequenced from *E. coli* EC1000 pESentA32 and no changes from the original construction were found (Fig. 1). Then, the plasmid was introduced directly into *E. faecalis* F by electroporation. Afterwards, the insertion of pESentA32 into the chromosome of the mutant strains was assessed by erythromycin resistance, β-galactosidase expression and a deficient growth in p-Cl-Phe. Subsequently, the deletion of the plasmid is achieved through a second recombination event. At the end of this process, the recombinant strain lacks any selection marker. The presence of the gene of interest was verified by PCR, using the primers pair ES-MPf / ES-Ax (Table 1), with an amplicon size of 264 bp, which includes the signal peptide sequence and the enterocin A gene (Fig. 3A, lane 4), along with the expected sequence (Fig. 1). Another PCR was performed on both the native and some recombinant strains using primers Ef2238F/Ef2239R, which are specific for the flanking regions of the IC. The difference in amplicon size (approximately 1500 bp) confirms the insertion of the chimeric construction (Fig. 4). The chimeric DNA integration into the chromosome was highly stable, as the genotype remained after several generations.

3.2. EntA expression and peptide detection by Tris-Tricine-SDS-PAGE and zymography

Some recombinant colonies carrying *entA* were tested to determine the expression of enterocin A by mRNA detection. Some colonies showed a positive amplification from chromosomal and complementary DNA, indicating that the gene had been transcribed. Fig. 3B shows the results corresponding to clone F EntA, which was selected for further analyses. The amplicon was obtained using the same specific primers (ES-MPf/ES-Ax) for the chimeric construction and the cDNA as template, indicating that the mRNA was transcribed from the *entA* gene. In Fig. 3C, a PCR with universal 16S rDNA primers (not related with *entA*), using the cDNA as template, is shown; confirming that the RNA extraction did not carry DNA, which could produce a fake positive result.

Afterwards, it was necessary to confirm that it was translated and correctly processed to yield an extracellular active enterocin. A lytic band with a molecular mass of approximately 5 kDa, like the one of enterocin A (4.7 kDa), was produced by *E. faecalis* F EntA. The band was detected in a Tris-Tricine-PAGE with silver staining (Fig. 5A) and its activity against *L. monocytogenes* (Fig. 5B) and *E. faecalis* V583 (not shown) was detected by zymography, *E. faecalis* F WT was used as a negative control for enterocin A production (Fig. 5, lanes 2). This led us to confirm that an extracellular active enterocin A had been produced.

3.3. Antibacterial activity

It is known that the native *E. faecalis* strain has an inhibitory effect on some of the target bacteria due to the lytic effect of peptidoglycan hydrolases (PGHs) of molecular mass above 60 kDa (García-Cano et al., 2014). To avoid this effect, only proteins of low molecular weight were tested for antibacterial activity, by agar diffusion tests. Results show

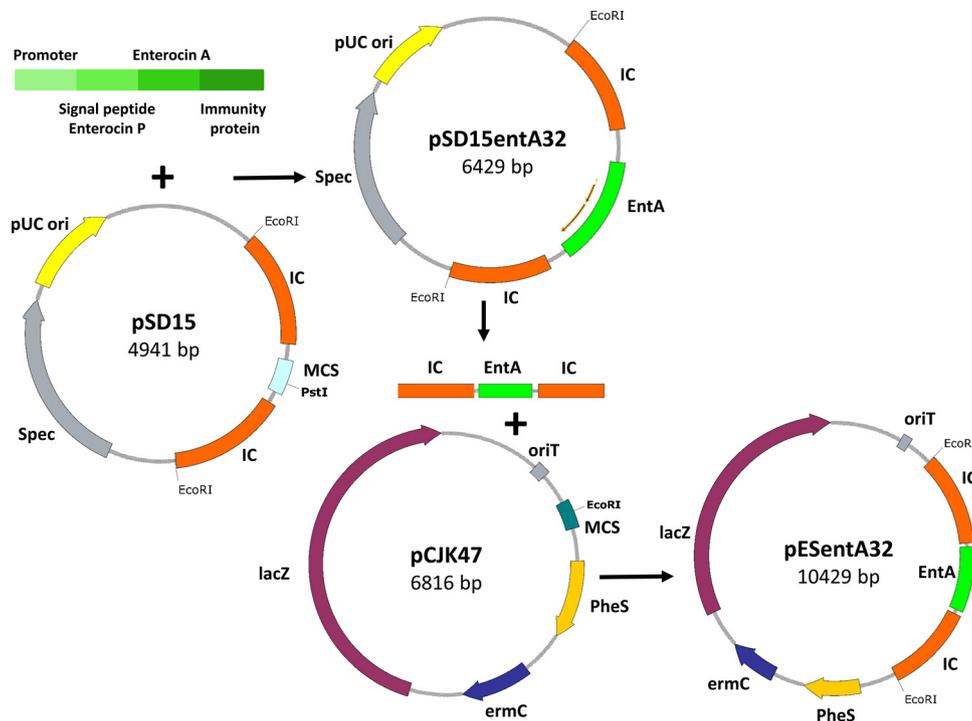


Fig. 2. Construction of plasmids used in this study. Plasmids are not drawn to scale.

that we obtained an *E. faecalis* recombinant strain capable of expressing the enterocin A active against *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *S. aureus*, *E. faecium* G, *E. faecalis* F WT, *E. faecalis* ATCC 29212 and *E. faecalis* V583 (Fig. 6); however, the halo observed for the latter was not clearly lytic. In contrast, it was not active against *E. faecalis* F EntA or the two probiotic lactobacilli tested (*L. rhamnosus* and *L. casei*). Table 2 compares the specific activity of the recombinant vs. the native strain, evidencing the increased lytic capability of the former. The concentrated extracellular preparation was not active against the producer strain, indicating that the immunity protein was expressed and that it performs its function effectively by blocking the pore formed by enterocin in the cell membrane (Kjos et al., 2011). Enterocin A belongs to Class-IIa bacteriocins, which are particularly active against *Listeria* spp., but its antibacterial spectrum may include other genera like *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, etc. (Franz et al., 2007). The aim of expressing this bacteriocin in a food-grade system was to use the recombinant strain in food fermentations to inhibit the development of pathogens

and food-spoiling bacteria. Therefore, the inhibition of *S. aureus*, both *Listeria* strains (*L. monocytogenes* and *L. innocua*), and the enterococcal pathogenic strain (*E. faecium* V583) is an encouraging result. *L. monocytogenes* is an important pathogen commonly found in the dairy industry because of its capacity to grow and withstand some conditions that are unfavorable for other species, like low temperature and pH, as well as high salt concentrations. Although the number of infections caused by *L. monocytogenes* is relatively low, the mortality rate among infected patients is high (20–30%), mainly in children, the elderly, immunocompromised individuals and pregnant women. For this reason, the elimination of *L. monocytogenes* is a key objective in the food industry (Cárdenas et al., 2016; Radosheвич and Cossart, 2017). In contrast, the recombinant strain was not able to inhibit the growth of *L. casei* and *L. rhamnosus*, which are desirable microorganisms in a food matrix as probiotics and starter cultures.

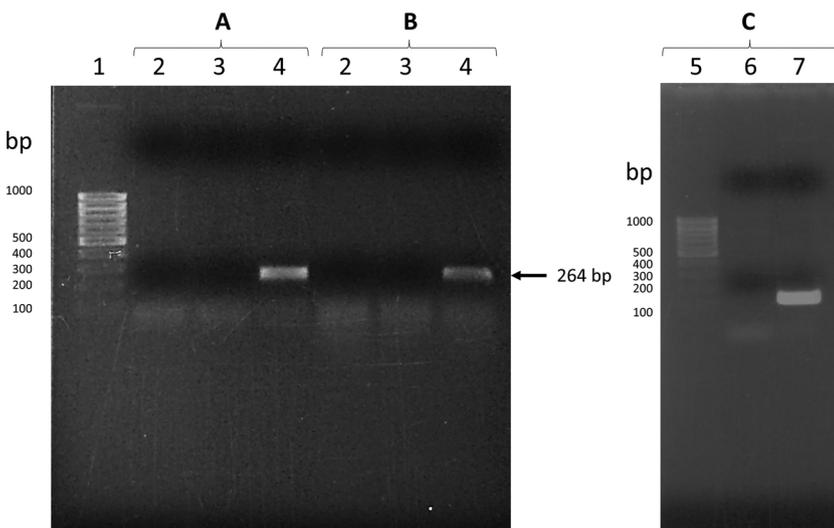


Fig. 3. Detection of *entA* in A) chromosomal DNA by PCR, B) mRNA by RT-PCR. Lane 1, MassRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); lanes 2, no template control; lanes 3, *E. faecalis* F WT; lanes 4, *E. faecalis* F EntA. And C) DNA free RNA extraction control. Lane 5, MassRuler Low Range DNA Ladder; PCR with rDNA V3 region specific primers of: cDNA of recombinant strain as template, lane 6, and, gDNA *E. faecalis* F as positive control, lane 7. 1% agarose gel stained with EtBr.

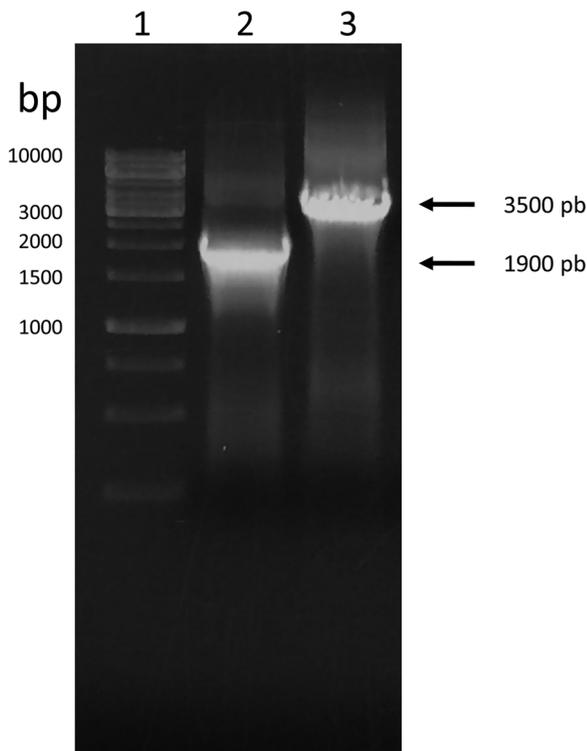


Fig. 4. PCR of the insertion cassette (IC). Lane 1, GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); lane 2, *E. faecalis* F WT; lane 3, *E. faecalis* F EntA. 1% agarose gel stained with EtBr.

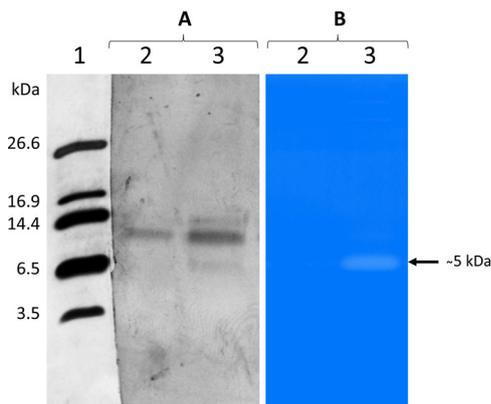


Fig. 5. A) Coomassie blue stain, B) zymogram of the semi-purified bacteriocin extract with *L. monocytogenes* as substrate. Lane 1, polypeptide SDS-PAGE molecular weight standards (Bio-Rad). Lanes 2, extract from *E. faecalis* F WT. Lanes 3, extract from *E. faecalis* F EntA. Tris-Tricine SDS-PAGE 16 %.

3.4. Inhibition of *L. monocytogenes* in co-culture with *E. faecalis* F EntA

E. faecalis F EntA was able to reduce the growth of *L. monocytogenes* when both were co-cultivated in BHI broth using an initial inoculum of 10^5 CFU/ml and a 1:1 inoculum ratio. A decreased growth rate was observed from 8 h of culture and attained almost two log units after 20 h. The growth of *E. faecalis* F EntA was similar to that of *Listeria*, reaching a stationary phase at around 12 h of culture. No reduction in *E. faecalis* F EntA counts was observed during up to 20 h of culture, as counts were higher than 10^{12} CFU/ml. The growth rates were similar between wild-type and recombinant *E. faecalis* strains (0.60 and 0.55 h^{-1} , respectively), indicating that the cloning method by chromosome integration did not affect the cellular growth rate, as reported by Kristich et al (2007). Another advantage of chromosome integration versus the use of plasmids for gene expression is that the synthesis of

heterologous proteins and the plasmid replication reduce the modified strain growth rate, they represent a high metabolic burden because they are high-energy-demanding processes (Flores et al., 2004). The inhibitory effect on *Listeria* was clear after 12 h of culture, likely due to the inhibitory compounds produced by the *Enterococcus* strain, including PGHs and the recombinant enterocin, the production of which is related to cell concentration. Accordingly, the inhibitory effect on *Listeria* is expected to be appreciated in the late exponential or stationary phases of enterococcal growth, when the concentrations of PGHs and enterocin are sufficiently high. To note, although the expression of enterocin A is regulated by a constitutive promoter, the number of copies of *entA* in the chromosome is low; hence, enterocin A production is expected to be lower vs. the one that could be achieved using an expression system based on a multi-copy plasmid. Also, worth mentioning is that the inhibition of *L. monocytogenes* was not caused by a lower culture pH; this parameter was measured during the kinetic study and it dropped to the same extent as in the culture of *L. monocytogenes* alone, from 7.4 to 6.1. The growth inhibition in presence of the enterocin A-producing strain was ten times as high as the one observed with the WT strain, where the effect was evident four hours later (Fig. 7). Even though the inhibitory activity was evident after 8 h of culture, the recombinant strain could still be useful as an efficient method to reduce the presence of pathogenic bacteria in ripened products, where the ripening period could last several days. The capacity of inhibition of the modified strain could be appropriate in practice, where it is expected that producers would keep good manufacturing practices and *L. monocytogenes* counts would be lower than the ones tested here.

In this study, the antimicrobial activity of a strain that previously showed an inhibitory effect through the production of PGHs (García-Cano et al., 2014) was increased by the production and secretion of a functional enterocin A. Despite belonging to the *Enterococcus* genus, the strain studied is interesting for the intended use because it is non-pathogenic; now that its genome has been sequenced, it is known that it lacks virulence factors and shows a low antibiotic resistance. In addition, its ability to colonize the intestine (Olvera-García et al., 2018) make it suitable as a probiotic culture, similar to other *Enterococcus* strains used as human probiotics, such as *E. faecalis* Symbioflor 1 (SymbioPharm). The cloning and expression of EntA in other LAB, e.g. *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Pediococcus*, was previously reported because of its potent antilisterial effect and the potential application of the modified strains in food industry (Borrero et al., 2011; Jiménez et al., 2015; Liu et al., 2008; Martínez et al., 2000). Additionally, no plasmids were used that could eventually be lost in the host strain in absence of selective pressure. Moreover, the expression of enterocin A in this recombinant strain is not mediated by an inducer, hence avoiding the use of an external additive in the fermentation process. Another aspect of interest in biotechnology regards the enzymatic capabilities of the *E. faecalis* F strain, given the proteolytic enzymes involved in casein degradation, and the lipases, esterases and other enzymes that contribute to aroma and flavor development in the final product (Olvera-García et al., 2018). Considering all these traits together, this improved strain is a potential candidate for use as a starter culture in fermented foods like cheeses and meat products.

Several methods have been developed for cloning and expression of proteins of interest in LAB, among the latter, antimicrobial compounds - as in the case of bacteriocins - in *Enterococcus* strains (Borrero et al., 2011; Jiménez et al., 2015). This method would allow modifying enterococcal strains by the insertion of genes to produce compounds of interest in the production of fermented food, like antimicrobials or flavor and aroma metabolites. On the other hand, it is also possible to use this approach to eliminate undesirable traits, like genes that could represent a risk for human health, i.e. antibiotic resistances or some related to biogenic amines synthesis.

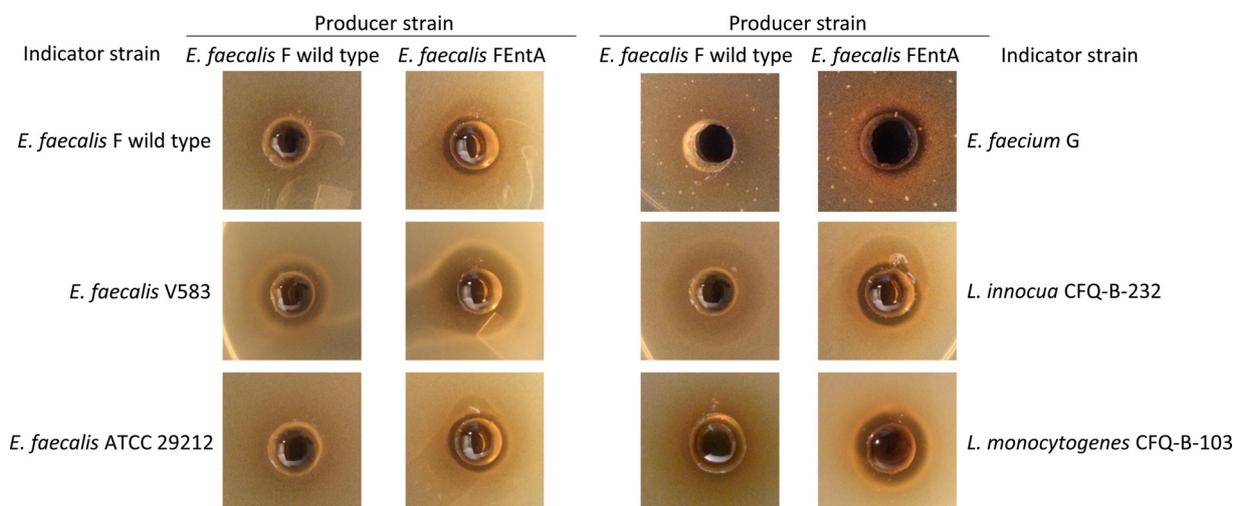


Fig. 6. Antibacterial activity tested by the agar diffusion assay of extracellular media concentrated by lyophilization of both WT and recombinant strains. 0.25 mg of protein per well.

Table 2

Antibacterial spectrum of wild-type and enterocin A-producing strains tested by the agar diffusion assay (extracellular media concentrated by lyophilization).

Strains	<i>E. faecalis</i> F WT (mm/ mg protein)	<i>E. faecalis</i> F EntA (mm/ mg protein)
<i>E. faecalis</i> F	0.0 ± 0.0	5.0 ± 1.0
<i>E. faecalis</i> F EntA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<i>E. faecalis</i> V583	26.0 ± 6.0	40.0 ± 0.0
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0.0 ± 0.0	12.0 ± 0.0
<i>E. faecium</i> G	0.0 ± 0.0	14.0 ± 2.0
<i>L. rhamnosus</i> R011	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<i>L. casei</i> R0215 ND	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	3.0 ± 0.0	5.0 ± 1.0
<i>L. monocytogenes</i> CFQ-B-103	0.0 ± 0.0	16.0 ± 0.0
<i>L. innocua</i> CFQ-B-232	0.0 ± 0.0	12.0 ± 0.0

Mean specific activity values ± standard deviation of three separate assays. Total protein per well = 0.25 mg.

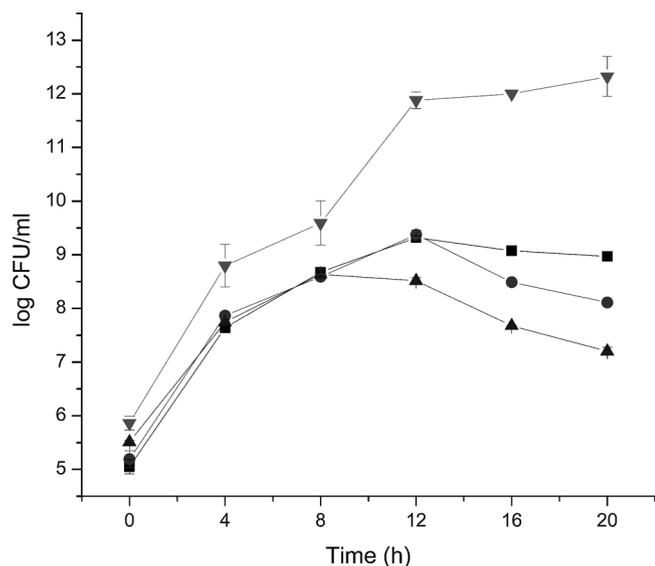


Fig. 7. Growth kinetics of co-culture between *L. monocytogenes* and the strains tested. Growth of *L. monocytogenes* (■) alone, (●) co-cultured with *E. faecalis* F WT, (▲) co-cultured with *E. faecalis* F EntA, and (▼) *E. faecalis* F EntA in co-culture.

4. Conclusion

Enterocin A was cloned and expressed in *E. faecalis* F, a strain isolated from a Mexican artisanal cheese, directly into the chromosome using the markerless allelic insertion method, making the modified strain capable of inhibiting the growth of pathogenic bacterial strains like *L. monocytogenes*, *S. aureus*, and *E. faecalis* V583. The enterocin A production and its activity were assessed by electrophoresis and zymography, respectively. In co-culture with *L. monocytogenes*, the modified strain exhibited an improved inhibitory activity as compared to the wild-type, displaying an important reduction of the pathogen count. This recombinant strain has the advantages of being a LAB with no virulence factors; besides, the cloning method did not add an antibiotic resistance marker, enterocin is produced in an active form, and it did not require the use of an inductor for its expression. Altogether, these positive traits make the developed strain a potential candidate to be used in food and feed; particularly to improve the microbial safety in natural fermentations, where the genus *Enterococcus* is usually found, i.e. kimchi, pickles, silage, salami and other fermented meat products, cheese and fermented milks.

Declarations of interest

None.

Acknowledgements

This project was funded by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica - Dirección General de Asuntos del Personal Académico - Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-DGAPA-UNAM)IN222115 and IN222717. C.E. Serrano-Maldonado was awarded a post-graduate scholarship from CONACYT. Special thanks to Christopher J. Kristich, Sruti DebRoy and Danielle A. Garsin for the donation of *E. coli* EC1000 and *E. faecalis* CK111 strains, and pCJK47 and pSD15 plasmids. María Elena Sánchez-Salazar edited the English manuscript.

References

- Borrero, J., Jiménez, J.J., Gútiérrez, L., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2011. Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 156, 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.07.038>.
- Cárdenas, N., Arroyo, R., Calzada, J., Peiróten, Á., Medina, M., Rodríguez, J.M., Fernández, L., 2016. Evaluation of technological properties of *Enterococcus faecium*

- CECT 8849, a strain isolated from human milk, for the dairy industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (17), 7665–7677. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7616-3>.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (10), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>.
- DebRoy, S., van der Hoeven, R., Singh, K.V., Gao, P., Harvey, B.R., Murray, B.E., Garsin, D.A., 2012. Development of a genomic site for gene integration and expression in *Enterococcus faecalis*. *J. Microbiol. Methods* 90, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.04.011>.
- Dunny, G.M., Lee, L.N., LeBlanc, D.J., 1991. Improved electroporation and cloning vector system for gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1194–1201.
- Ennahar, S., Deschamps, N., 2000. Anti-listeria effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 88, 449–457. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00985.x>.
- Flores, S., de Anda-Herrera, R., Gosset, G., Bolívar, F.G., 2004. Growth-rate recovery of *Escherichia coli* cultures carrying a multicopy plasmid, by engineering of the pentose-phosphate pathway. *Biotechnol. Bioeng.* 87 (4), 485–494.
- Franz, C.M., van Belkum, M.J., Holzapfel, W.H., Abriouel, H., Gálvez, A., 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31 (3), 293–310. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x>.
- Franz, C.M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Gálvez, A., 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151 (2), 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014>.
- García-Cano, I., Serrano-Maldonado, C.E., Olvera-García, M., Delgado-Arciniega, E., Peña-Montes, C., Mendoza-Hernández, G., Quirasco, M., 2014. Antibacterial activity produced by *Enterococcus* spp. isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *LWT—Food Sci. Technol.* 59, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.059>.
- Jiménez, J.J., Diep, D.B., Borrero, J., Gútiérrez, L., Arbulu, S., Nes, I.F., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2015. Cloning strategies for heterologous expression of the bacteriocin enterocin A by *Lactobacillus sakei* Lb790, *L. plantarum* NCS and *L. casei* CECT475. *Microb. Cell Fact.* 14, 166. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0346-x>.
- Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D.J., Holo, H., Cintas, L.M., Snipen, L., Hernández, P.E., Nes, I.F., Diep, D.B., 2011. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 157 (Pt. 12), 3256–3267. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052571-0>.
- Kristich, C.J., Chandler, J.R., Dunny, G.M., 2007. Development of a host-genotype-independent counterselectable marker and a high-frequency conjugative delivery system and their use in genetic analysis of *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* 57 (2), 131–144. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2006.08.003>.
- Leclerc, D., Asselin, A., 1989. Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing gel electrophoresis. *Can. J. Microbiol.* 35, 749–753.
- Liu, L., O’Conner, P., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2008. Controlling *Listeria monocytogenes* in cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Microbiol.* 104 (4), 1059–1066. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03640.x>.
- Martínez, J.M., Kok, J., Sanders, J.W., Hernández, P.E., 2000. Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (8), 3543–3549. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3543-3549.2000>.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (3), 695–700.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Ike, Y., 2014. Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control. In: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (Eds.), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Eye and Ear Infirmary, Boston, pp. 637–668.
- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J.M., Chicón, R., Cabezas, L., Palop, L., 2011. Enterococcus populations in artisanal Manchego cheese: biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiol.* 28 (5), 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.005>.
- O’Keeffe, T., Hill, C., Ross, R.P., 1999. Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (4), 1506–1515.
- Olvera-García, M., Sanchez-Flores, A., Quirasco Baruch, M., 2018. Genomic and functional characterisation of two *Enterococcus* strains isolated from Cotija cheese and their potential role in ripening. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8765-3>.
- Peterbauer, C., Maischberger, T., Haltrich, D., 2011. Food-grade gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnol. J.* 6, 1147–1161. <https://doi.org/10.1002/biot.201100034>.
- Radoshevich, L., Cossart, P., 2017. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.126>.
- Schägger, H., von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2).
- Yang, R., Johnson, M., Ray, B., 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3355–3359.