



## INTRODUCCION

*Staphylococcus aureus* es un importante patógeno asociado a intoxicaciones de tipo alimentario debido a su capacidad de producir enterotoxinas termorresistentes. Además, es uno de los principales agentes causantes de la mastitis en el ganado vacuno, por lo que puede contaminar la leche y los productos lácteos. La utilización de bioconservantes basados en bacteriófagos o en proteínas fágicas es una alternativa a los conservantes de síntesis química para inhibir el desarrollo de este patógeno en los alimentos. Los bacteriófagos actúan como agentes bactericidas induciendo la lisis de su hospedador durante su ciclo de vida, y poseen, además, proteínas (endolisinas y peptidoglucano hidrolasas) que tienen en sí mismas actividad antimicrobiana, degradando el peptidoglucano de la pared celular bacteriana en etapas distintas del ciclo lítico del fago (Fig. 1).

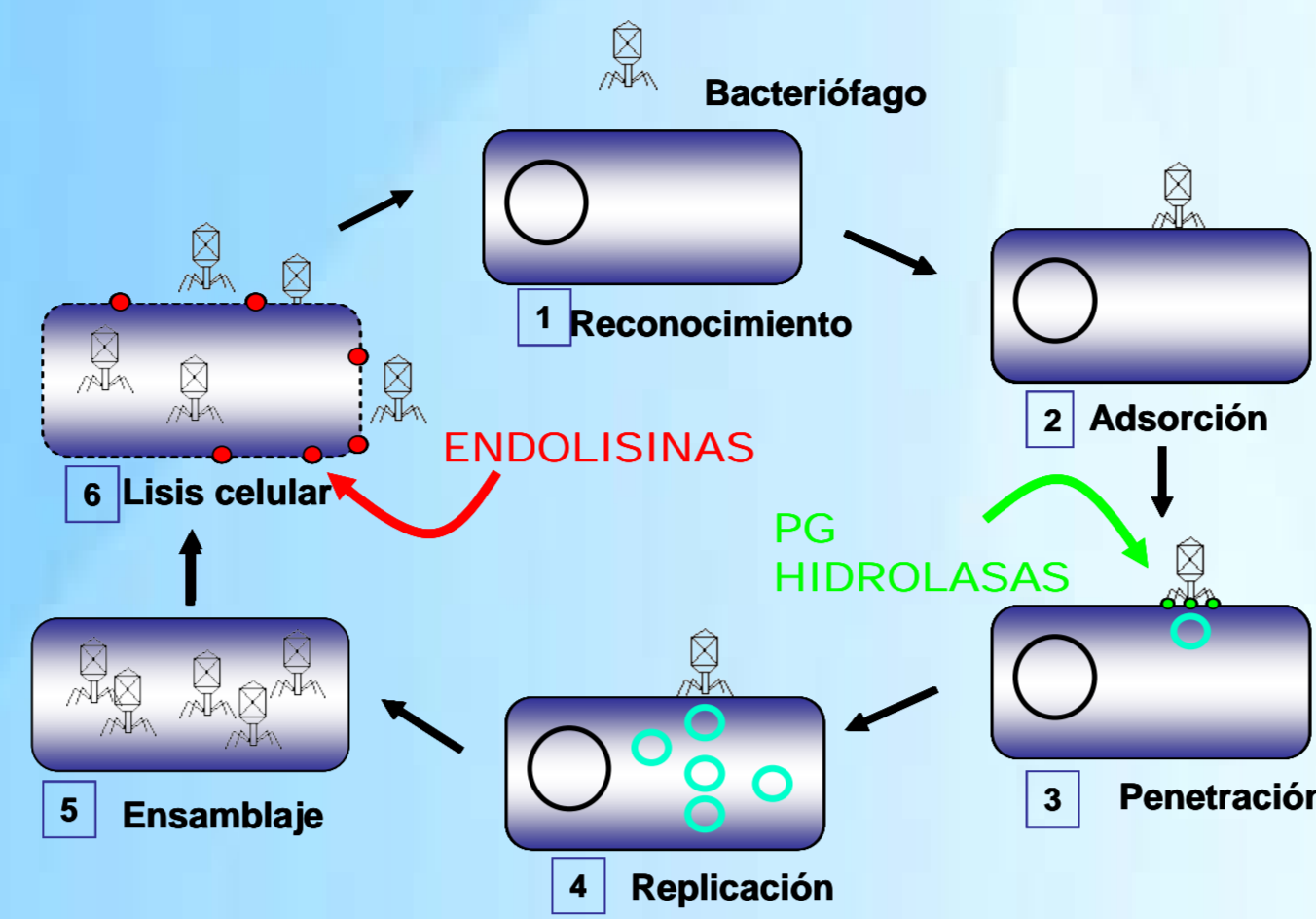


Figura 1. Ciclo lítico de un bacteriófago y actividades degradadoras de peptidoglucano

## ANTECEDENTES

A partir de muestras de leche y queso se aislaron fagos específicos frente a cepas de *S. aureus* que habitualmente contaminan este tipo de alimentos (García y col., 2009). Dos de estos fagos (ΦH5 y ΦA72) (Fig. 2) se seleccionaron en base a su rango de huésped, y de ellos se obtuvieron variantes líticas (phi-IPLA88 y phi-IPLA35). Éstas se diferencian de los fagos silvestres en una mutación en el gen del represor del ciclo lítico. Ambos fagos mostraron su eficacia como agentes antimicrobianos en leche (García y col., 2009), y en la elaboración de cuajada (García y col., 2007) y queso (Bueno y col., 2009).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. IDENTIFICACION DE GENES FÁGICOS CON CAPACIDAD ANTIMICROBIANA

La obtención de la secuencia completa del genoma del fago phi-IPLA88 y su análisis bioinformático permitió la identificación, por homología con las bases de datos, de dos genes (*orf58* y *orf61*) que codifican las proteínas peptidoglucano hidrolasa (HydH5) y endolisina (LysH5), respectivamente (Fig. 3).

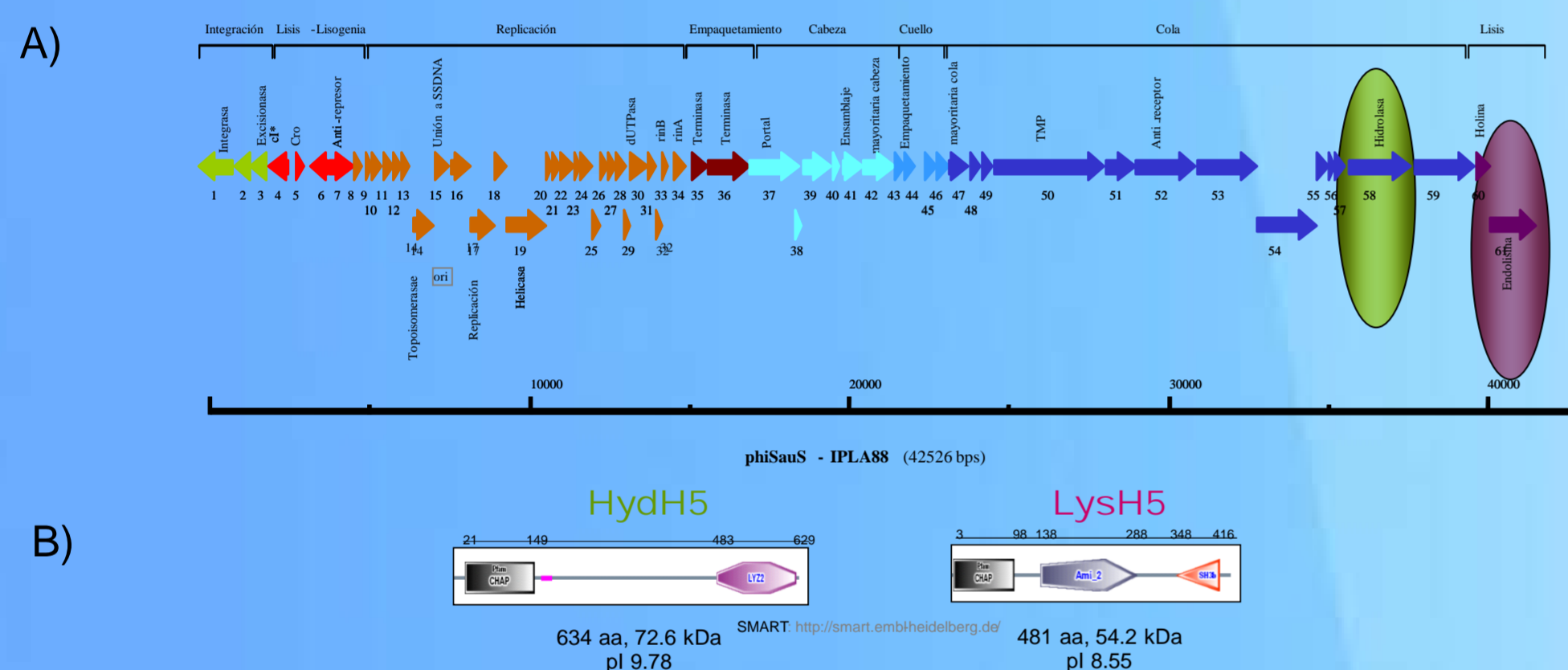


Figura 3. Identificación de genes con capacidad antimicrobiana frente a *S. aureus* en el fago phi-IPLA88. A) Mapa genómico del fago en el que se indican los genes *orf58* y *orf61*. B) Identificación de la secuencia de aminoácidos de los motivos catalíticos y de un sustrato de las proteínas HydH5 y LysH5. CHAP: endopeptidasa, Lyz: lisozima, Ami: amidasa, SH3b: unión al sustrato.

### 3. CLONACION Y EXPRESION DE LAS PROTEÍNAS HydH5 Y LysH5 EN *Lactococcus lactis*

Las proteínas con capacidad antimicrobiana HydH5 y LysH5 se expresaron en *Lactococcus lactis*, un microorganismo GRAS, que juega un papel muy importante en la producción de alimentos fermentados, especialmente en productos lácteos (Fig. 5). Los extractos que contienen estas proteínas mostraron actividad lítica frente a células de *S. aureus* (Fig. 5B), lo que se pone de manifiesto por un descenso en la DO<sub>600</sub> de suspensiones celulares. Además, se observó que la actividad específica de estos extractos es proporcional a la concentración de nisina y al tiempo de inducción (Fig. 5C). La optimización de las condiciones de expresión de estas proteínas nos permitirá su purificación para una futura aplicación como bioconservante alimentario.

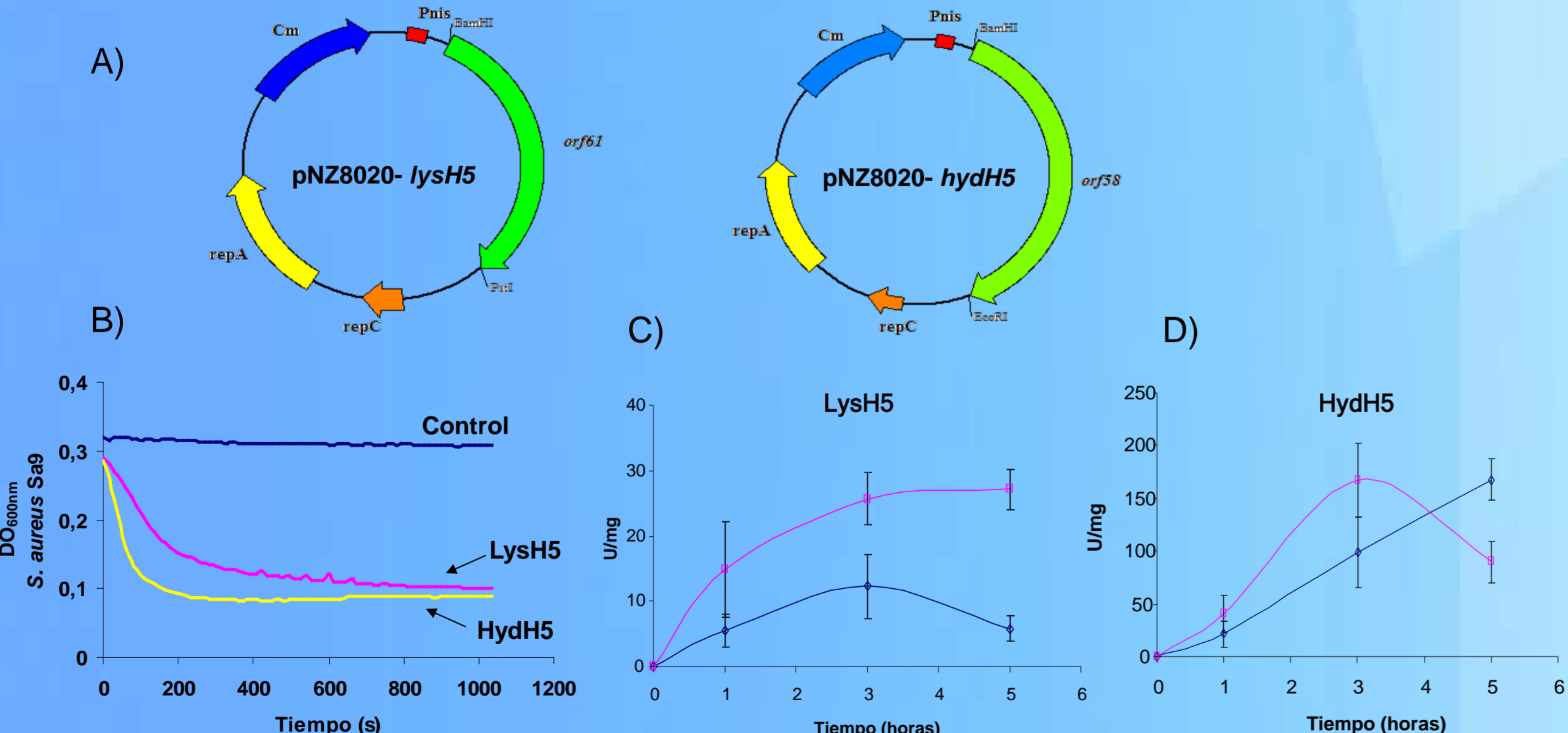


Figura 5. Expresión heteróloga de HydH5 y LysH5 en *L. lactis*. A) Mapa de los plásmidos derivados de pNZ8020 que expresan los genes mediante el sistema NICE. B) Descenso en la DO<sub>600</sub> de suspensiones de *S. aureus* en presencia de HydH5 y de LysH5. C) y D) Actividad específica (U/mg) de extractos de LysH5 y HydH5 en *L. lactis* inducidos con nisina 10 ng/ml (→) y 1 ng/ml (←).

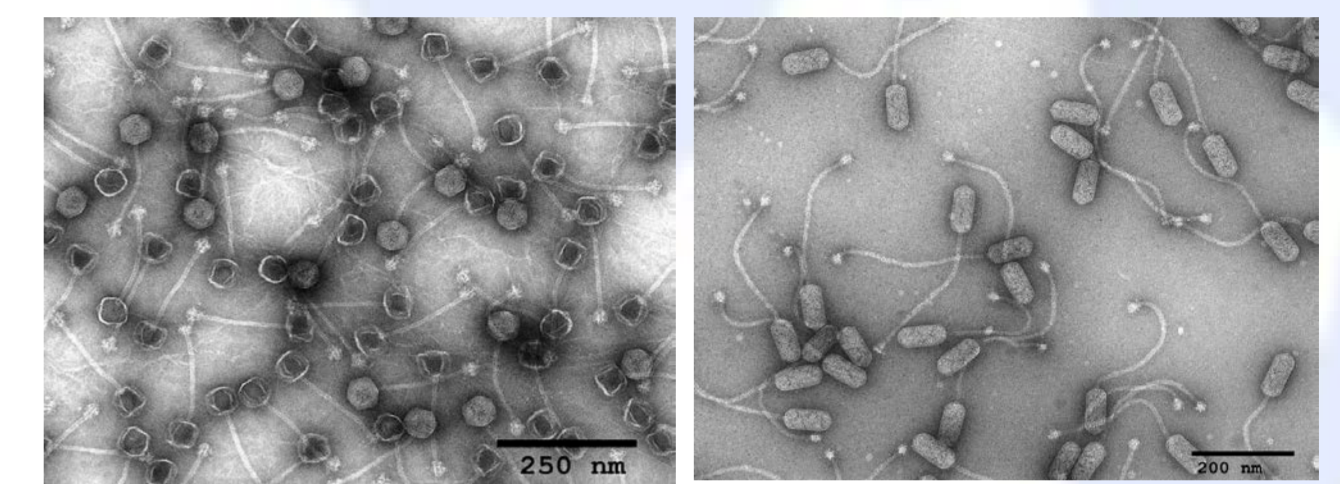
## AGRADECIMIENTOS

Trabajo subvencionado por el proyecto AGL2006-03659/ALI del Ministerio de Educación y Ciencia y por el Gobierno del Principado de Asturias con cargo a fondos provenientes del Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación del Principado de Asturias.

## OBJETIVOS

Obtener proteínas derivadas de bacteriófagos con actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*.

- Identificación de genes que codifiquen actividades degradadoras de peptidoglucano
- Análisis bioinformático de su secuencia
- Expresión en hospedadores heterólogos
- Determinación de la actividad enzimática
- Efecto sinérgico con la bacteriocina nisina



Φ H5  
φi-IPLA88  
Φ A72  
φi-IPLA35

Figura 2. Imagen al microscopio electrónico de los fagos ΦH5 y ΦA72.

### 2. CLONACION Y EXPRESION DE LAS PROTEÍNAS HydH5 Y LysH5 EN *Escherichia coli*

El gen que codifica la peptidoglucano hidrolasa HydH5 tiene un alto porcentaje de codones cuyos ARNt están en muy baja frecuencia en *E. coli*. Por ello fue necesario, para la expresión de la proteína, utilizar la cepa *E. coli* Rosetta DE3, la cual contiene los genes que codifican esos ARNt (Fig. 4). La expresión de la endolisina LysH5 se realizó en *E. coli* BL21 DE3 y se purificó mediante una columna de afinidad (Ni-agarosa).

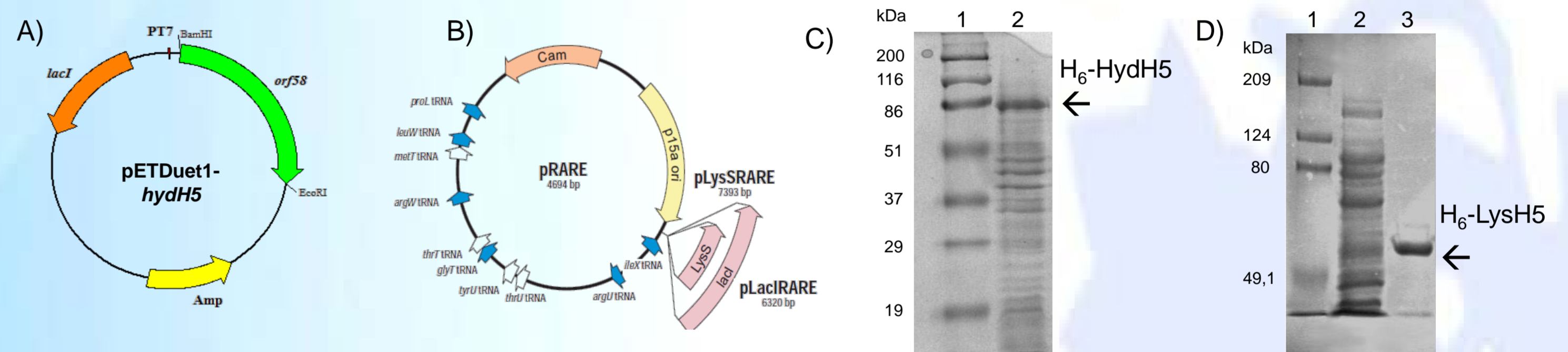


Figura 4. Expresión de las proteínas peptidoglucano hidrolasa HydH5 y endolisina LysH5 en *E. coli*. A) Mapa del plásmido pETDuet-1 utilizado para la clonación del gen y la sobreexpresión de la proteína HydH5. B) Mapa del plásmido pRARE incluido en la cepa *E. coli* Rosetta. C) Electroforesis de gel de poliacrilamida de extractos de *E. coli* Rosetta DE3 expresando HydH5. D) Electroforesis de gel de poliacrilamida de extractos de *E. coli* BL21 DE3 expresando LysH5. Calle 1: patrón de pesos moleculares. Calle 2: extractos de *E. coli* expresando las proteínas HydH5 y LysH5. Calle 3: LysH5 purificada

### 4. EFECTO SINERGICO ENTRE LA ENDOLISINA LysH5 Y LA NISINA

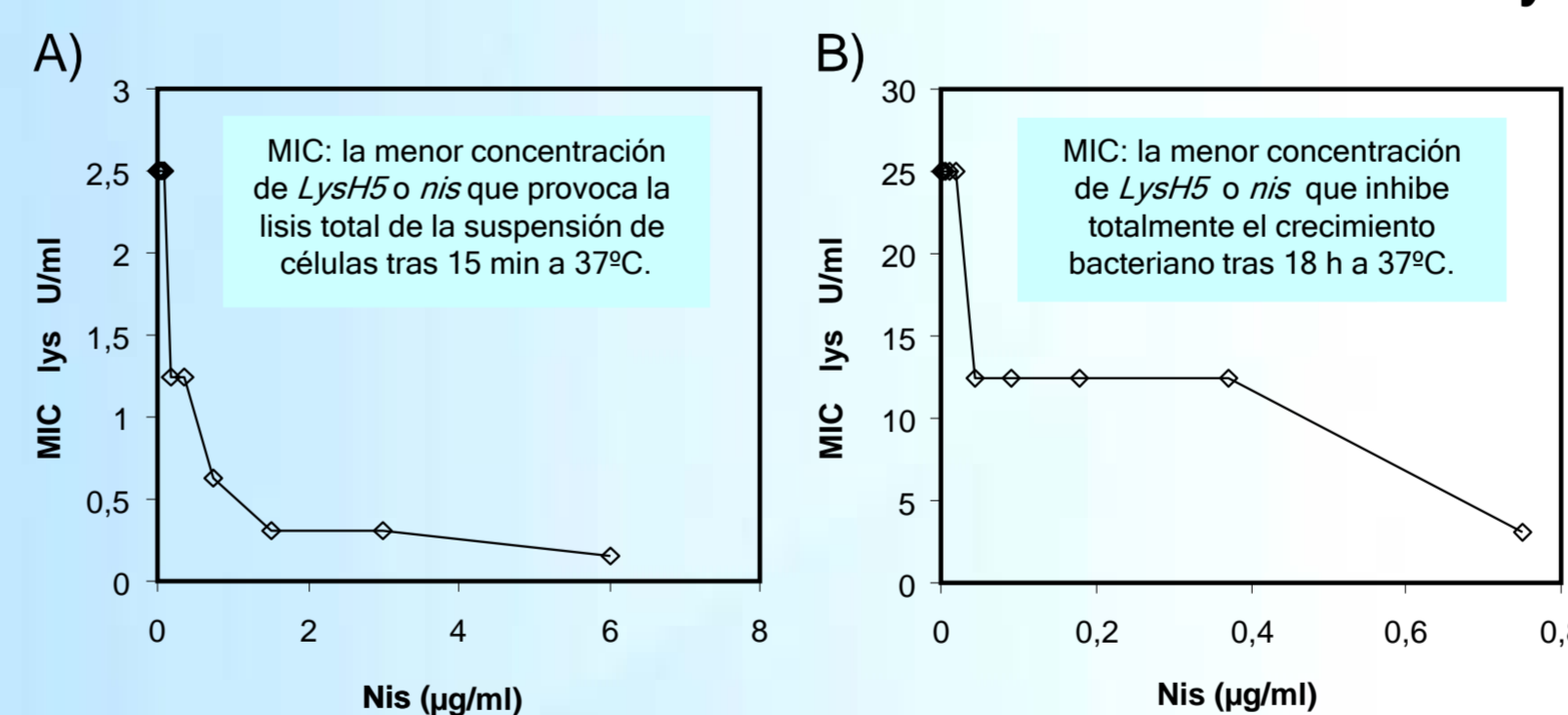


Figura 6. Efecto sinérgico entre la endolisina LysH5 y nisina frente a A) suspensiones celulares de *S. aureus* y B) células de *S. aureus* en crecimiento activo.

Con vistas a una aplicación de las proteínas fágicas como bioconservantes, se confirmó el efecto sinérgico entre los antimicrobianos endolisina LysH5 y nisina. Para ello, se determinaron las concentraciones inhibitorias de cada uno por separado, tanto en presencia de otro. Los ensayos se realizaron tanto frente a suspensiones de células de *S. aureus* en tampón fosfato (Fig. 6A) como frente a células de *S. aureus* en crecimiento activo en 2xTY (Fig. 6B).

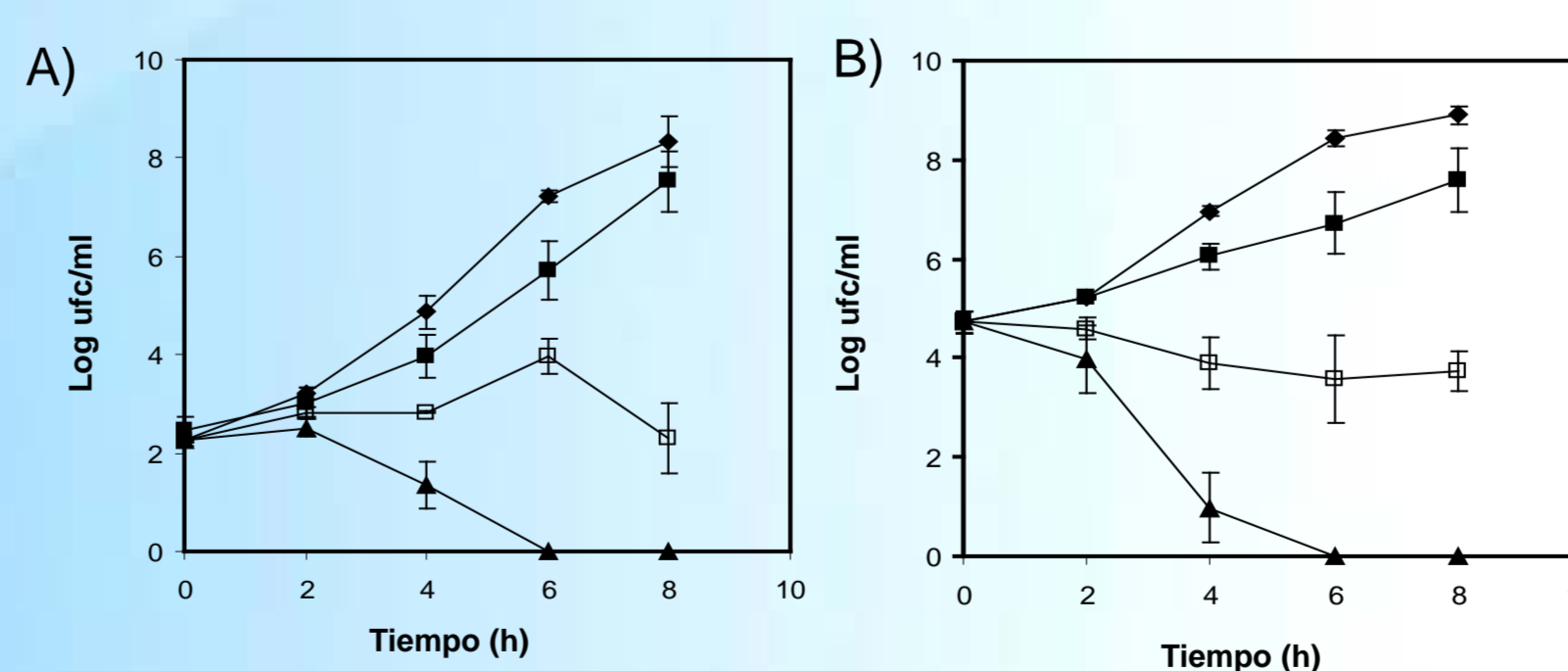


Figura 7. Ensayo de la capacidad antimicrobiana de la mezcla endolisina-nisina frente a *S. aureus*. A) Leche con bajo nivel de contaminación. (♦) Control. (◊) 0,37 µg/ml de nisina. (▲) 7,5 U LysH5 + 0,37 µg/ml nisina. B) Leche altamente contaminada. (♦) Control. (■) 15 U de nisina. (□) 0,75 µg/ml de nisina. (▲) 15 U LysH5 + 0,75 µg/ml nisina.

La efectividad de la mezcla endolisina LysH5 y nisina frente a *S. aureus* fue valorada en ensayos en leche pasteurizada contaminada deliberadamente. Se observó que la mezcla de los dos antimicrobianos es más efectiva como bioconservante que cada uno por separado, tanto en leche con un bajo nivel de contaminación (Fig. 7A) como en leche altamente contaminada (Fig. 7B).

## REFERENCIAS

- García, P., Madera, C., Martínez, B. and Rodríguez, A. (2007). Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *Int. Dairy J.* 17: 1232-1239.
- García, P., Madera, C., Martínez, B., Rodríguez, A. and Suárez, J.E. (2009). Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in Dairy samples and their potential as biocontrol agents. *J. Dairy Sci.* 92: 3019-3026.
- Bueno, E., García, P., Martínez, B. and Rodríguez, A. (2009). Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in acid-coagulated and semi-hard cheeses. En preparación.