



# **Universidad Nacional de Rafaela**

Tesina presentada como requisito para obtener el grado  
de Licenciada en Industrias Alimentarias

## **"Obtención de bacteriocinas recombinantes con potencial actividad antimicrobiana frente a organismos productores de enfermedades transmitidas por alimentos."**

Estudiante: Chiaraviglio, Micaela

Directora de tesis: Camussone, Cecilia

Codirectora de tesis: Rivarosa, Florencia

Lugar de realización: Instituto de Investigación de la Cadena Láctea  
(INTA-CONICET). EEA Rafaela, INTA.

Año: 2025

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Universidad Nacional de Rafaela por brindarme las herramientas, los conocimientos y el espacio para formarme profesionalmente y al INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) por brindarme su establecimiento para la realización de mi tesis.

A mi directora Camussone Cecilia y a mi codirectora Rivarosa Florencia por acompañarme con tanta dedicación, paciencia y compromiso a lo largo de este proceso. Gracias por su constante orientación, por compartir sus conocimientos y por alentarme a dar siempre lo mejor de mí. Haber contado con su apoyo y confianza fue fundamental para poder concretar mi tesis.

A la directora de la carrera Gentinetta, Fabiana y a todo el equipo docente por estar presente en mi recorrido académico.

A mis amigos, por su comprensión, por sus palabras de aliento y por celebrar conmigo cada pequeño avance.

A mi pareja, por acompañarme con tanto amor y paciencia en este camino. Por entender mis momentos de cansancio, por alentarme y recordarme siempre todo lo que soy capaz de lograr.

A mi familia, mi pilar más grande. Gracias por su cariño, por enseñarme el valor de la constancia y el esfuerzo. A mis padres, por ser ejemplo de fortaleza y por brindarme siempre su apoyo incondicional.

A todos los que, de alguna manera, formaron parte de este recorrido, gracias por estar.

## ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Contaminaciones en industrias alimentarias	1
1.2. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)	1
1.3. Bacteriocinas	4
1.3.1. Clasificación	4
1.3.2. Bacteriocinas como preservantes de alimentos	5
1.4. Obtención de bacteriocinas recombinantes	5
1.5. Enterocina A	6
2. Objetivos	8
2.1. Objetivo general	8
2.2. Objetivos específicos	8
3. Materiales y métodos	9
3.1. Cepas y vectores plasmídicos	9
3.1.1. Cepas bacterianas: cultivos y preservación	9
3.1.2. Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	9
3.1.3. Vector plasmídico	9
3.2. Obtención de la secuencia codificante de EntA	10
3.2.1. Diseño y síntesis química	10
3.2.2. Amplificación por PCR	10
3.3. Análisis y purificación de la secuencia codificante	12

3.3.1. Clonado en <i>S. cerevisiae</i>	12
3.3.2. Transformación por electroporación	12
3.3.3. Confirmación del clonado	13
3.3.4. Secuenciación de la construcción	14
3.4. Obtención de Enterocina A recombinante	15
3.4.1. Expresión en cultivos de <i>S. cerevisiae</i>	15
3.4.2. Análisis de proteínas recombinantes	15
3.4.2.1. SDS-PAGE	15
3.4.2.2. Western blot	16
3.4.3. Purificación de proteínas	16
3.5. Ensayos de actividad antimicrobiana	16
3.5.1. Ensayo en estría	17
3.5.2. Ensayo de difusión en agar	17
3.6. Soluciones y medios de cultivo	18
4. Resultados y discusión	25
4.1. Obtención y evaluación de EntA	25
4.1.1. Clonado de secuencias codificantes	25
4.2. Expresión de EntA y EntA-TRX	26
4.2.1. Evaluación de medios de cultivo de inducción	27
4.2.2. Expresión de EntA y EntA-TRX en medio YPHSM	29

4.3. Actividad antimicrobiana de las bacteriocinas EntA y EntA-TRX	30
4.3.1. Ensayo de actividad antimicrobiana en estría	30
4.3.2. Ensayo de actividad antimicrobiana por difusión en agar	32
5. Conclusiones	34
6. Bibliografía	35

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Función, ventajas y riesgos de los conservantes químicos en industrias alimentarias	3
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y clonado de Enterocina A	11
<b>Tabla 3.</b> Reactivos y concentración para la amplificación de Enterocina A mediante PCR	11
<b>Tabla 4.</b> Perfil de ciclado para amplificación de Enterocina A	11
<b>Tabla 5.</b> Reactivos y concentración para reacción de PCR de colonia	13
<b>Tabla 6.</b> Perfil de ciclado para la reacción de PCR de colonia	13

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de las construcciones génicas usadas en el trabajo	10
<b>Figura 2.</b> Amplificación de la secuencia EntA	25
<b>Figura 3.</b> Confirmación del clonado del fragmento	26
<b>Figura 4.</b> Curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> EntA-TRX en los medios de cultivo YPHSM y SD-trp	27
<b>Figura 5.</b> Evaluación de la expresión de EntA-TRX en YPHSM y SD-trp en pellet celular mediante Western blot	28
<b>Figura 6.</b> Expresión citoplasmática (pellet) de las proteínas EntA y EntA-TRX en medio YPHSM	29
<b>Figura 7.</b> Expresión en sobrenadantes de EntA y EntA-TRX en medio YPHSM mediante Western blot	30
<b>Figura 8.</b> Imágenes representativas de los ensayos de actividad antimicrobiana en estría	31
<b>Figura 9.</b> Evaluación de actividad antimicrobiana por difusión en agar	33

## DECLARACIÓN

Declaro que el material incluido en esta TFLIA es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros) y que este material no lo he presentado en forma parcial en esta u otra institución.

Firma del estudiante

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Aclaración: Chiaraviglio, Micaela

## ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**ATCC:** del inglés *American Type Culture Collection*

**BAL:** Bacterias ácido-lácticas

**BHA:** Butilhidroxianisol

**BHT:** Butilhidroxitolueno

**c/u:** Cada uno

**DAB:** 3,3'-diaminobencidina

**DO:** Densidad óptica

**DO550nm / DO600nm:** Densidad óptica medida a 550 nm / 600 nm

***E. coli:*** *Escherichia coli*

***E. faecalis:*** *Enterococcus faecalis*

**EntA:** Enterocina A

**EntA-TRX:** Enterocina A fusionada con tioredoxina

**FBDs:** enfermedades transmitidas por alimentos (del inglés *Foodborne diseases*)

**FW / RV:** Oligonucleótido Sentido / Antisentido (*del inglés Forward / Reverse*)

**H<sub>2</sub>Omq:** Agua miliQ (agua ultrapura)

**IdICaL:** Instituto de Investigación de la Cadena Láctea

**kDa:** Kilodalton

**LB:** Luria-Bertani

**μL:** Microlitro

**μM:** Micromolar

**m/v:** Masa sobre volumen

**mg/ml:** Miligramo por mililitro

**nm:** Nanómetro

**pb:** Pares de bases

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*)

**PBS:** Solución salina tamponada con fosfato (del inglés *Phosphate Buffered Saline*)

**rpm:** Revoluciones por minuto

**S. aureus:** *Staphylococcus aureus*

**S. cerevisiae:** *Saccharomyces cerevisiae*

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

**SD-trp:** Medio sintético definido sin triptófano (del inglés *Synthetic Drop-Out (SD) Media*)

**UV:** Ultravioleta

**YNB:** Base de nitrógeno para levaduras (del inglés *yeast nitrogen base*)

**YPHSM:** Medio de Alta Estabilidad con Extracto de Levadura y Peptona (del inglés *Yeast extract Peptone High Stability Medium*)

**YPD:** Caldo extracto de levadura, peptona y dextrosa (del inglés *Yeast Extract Peptone Dextrose*)

## **"Obtención de bacteriocinas recombinantes con potencial actividad antimicrobiana frente a organismos productores de enfermedades transmitidas por alimentos"**

### **Resumen**

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) se encuentran ampliamente difundidas y generan problemas en la salud pública. Entre los agentes etiológicos de ETAs se encuentran bacterias, virus y parásitos. Una estrategia para prevenir alteraciones en los alimentos es el agregado de antimicrobianos de origen químico. El uso no controlado de estas sustancias puede ocasionar un riesgo para la salud de los consumidores. En consecuencia, los compuestos antibacterianos naturales han ganado importancia como preservantes en la industria alimenticia. Entre ellos, las bacteriocinas, que son péptidos antimicrobianos naturales producidos por bacterias ácido-lácticas, representan una alternativa prometedora a los conservantes químicos debido a su alta especificidad y baja toxicidad.

El presente trabajo tuvo como objetivo obtener una molécula recombinante de la bacteriocina Enterocina A (EntA) mediante clonado y expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae*, y evaluar su actividad antimicrobiana frente a microorganismos productores de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). Para ello, en este estudio se sintetizó la secuencia del gen de EntA con codones optimizados para su expresión en *Saccharomyces cerevisiae* y se clonó en el vector de secreción extracelular YEpFLAG-1 mediante recombinación homóloga. Además, se evaluó una construcción alternativa fusionada, EntA-TRX, disponible en el laboratorio. La expresión recombinante se analizó por SDS-PAGE y Western blot, detectándose la presencia de EntA-TRX, aunque no de EntA. Los ensayos de actividad antimicrobiana *in vitro*, realizados por métodos de difusión en agar y en estría frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Listeria innocua*, no mostraron inhibición del crecimiento bacteriano. No obstante, se logró estandarizar un sistema de expresión en *Saccharomyces cerevisiae* aplicable a futuras producciones de proteínas recombinantes seguras para uso alimentario.

**Palabras claves:** Enterocina A, bacteriocinas, *Saccharomyces cerevisiae*, enfermedades transmitidas por alimentos, expresión recombinante, actividad antimicrobiana.

## **“Production of recombinant bacteriocins with potential antimicrobial activity against foodborne disease-causing organisms”**

### **Abstract**

Foodborne diseases (FBDs) are widespread and represent a significant public health concern. The etiological agents responsible for FBDs include bacteria, viruses, and parasites. One strategy to prevent food contamination is the addition of antimicrobial compounds of chemical origin; however, their uncontrolled use may pose health risks to consumers. Consequently, natural antibacterial compounds have gained importance as preservatives in the food industry. Among them, bacteriocins—natural antimicrobial peptides produced by lactic acid bacteria—represent a promising alternative to chemical preservatives due to their high specificity and low toxicity.

This study aimed to obtain a recombinant molecule of the bacteriocin Enterocin A (EntA) through cloning and heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*, and to evaluate its antimicrobial activity against microorganisms associated with foodborne diseases. The EntA gene sequence was synthesized and codon optimized for *Saccharomyces cerevisiae* expression and cloned into the extracellular secretion vector YEpFLAG-1 via homologous recombination. Additionally, an alternative fused construct, EntA-TRX, available in our laboratory was evaluated. Recombinant expression was analyzed by SDS-PAGE and Western blot, confirming the presence of EntA-TRX but not EntA. In vitro antimicrobial assays, performed by agar diffusion and streak methods against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, and *Listeria innocua*, showed no inhibition of bacterial growth. Nevertheless, a standardized expression system in *S. cerevisiae* was successfully established, applicable to future production of recombinant proteins suitable for food-grade applications.

**Keywords:** Enterocin A, bacteriocins, *Saccharomyces cerevisiae*, foodborne diseases, recombinant expression, antimicrobial activity.

## **1. Introducción**

### **1.1. Contaminaciones en industrias alimentarias**

Las industrias alimentarias abarcan un conjunto de actividades industriales dirigidas al tratamiento, transformación, preparación, conservación y envasado de productos alimenticios. En las últimas décadas, las industrias alimentarias han atravesado un proceso de modernización y globalización caracterizado por una creciente industrialización, el uso intensivo de tecnologías emergentes, la estandarización de procesos y el desarrollo de productos altamente procesados. Este progreso ha generado importantes cuestionamientos en torno a la sostenibilidad ambiental, la calidad nutricional de los alimentos y la equidad en la cadena de valor. El cambio en los hábitos de consumo, impulsado por una mayor conciencia sobre la salud y el medio ambiente, ha generado nuevas exigencias, adoptando prácticas responsables e innovando en alimentos funcionales (Belitz et al., 2009).

Sin embargo, a lo largo de la cadena de producción, puede generarse una contaminación alimentaria, con presencia de sustancias, agentes o condiciones físicas, químicas o biológicas que alteran la inocuidad del producto y pueden representar un riesgo para la salud humana (FAO, 2020).

Existen tres grandes categorías de contaminación de alimentos:

Contaminación química: puede ocurrir en cualquier punto de la cadena productiva, incluye residuos de pesticidas, metales pesados (plomo, mercurio, cadmio), dioxinas, contaminantes industriales, aditivos no autorizados o residuos de medicamentos veterinarios.

Contaminación física: se refiere a la presencia de cuerpos extraños en los alimentos, como fragmentos de vidrio, plástico, metal, piedras o pelos. Aunque no siempre son tóxicos, estos elementos representan un riesgo físico directo para el consumidor.

Contaminación biológica: causada por microorganismos patógenos como bacterias (*Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli*), virus (*Norovirus*, *Hepatitis A virus*), parásitos y hongos. Es una de las formas más comunes y peligrosas, y suele estar relacionada con malas prácticas de higiene o almacenamiento. La contaminación biológica puede ser difícil de detectar ya que generalmente no se altera el sabor, el color o el aspecto del producto. Esta contaminación conlleva a un riesgo más grave para los consumidores ya que si los microorganismos sobreviven y se multiplican en el alimento, pueden causar enfermedades (Berkowitz et al., 2012).

### **1.2. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)**

Las ETAs son atribuidas a la ingesta de un alimento que sufrió contaminación durante su preparación o distribución. Estas patologías pueden ser debidas a infecciones, intoxicaciones o toxiinfecciones (Armendáriz et al., 2012). En el primer caso, las ETAs son generadas por infecciones resultantes de la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos patógenos vivos. En el segundo caso, la enfermedad resulta de la intoxicación con toxinas o venenos producidos por bacterias u hongos, los

cuales pueden estar presentes o no en el alimento ingerido. Por último, las toxiinfecciones son caracterizadas por implicar una infección y una intoxicación en simultáneo.

Los agentes etiológicos causantes de estas enfermedades son bacterias, virus y parásitos, siendo las más reportadas las de origen bacteriano. Entre las bacterias más frecuentes reconocidas como causantes de ETAs se encuentran *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*, así como *E. coli* O157:H7. A largo plazo, algunas de estas infecciones pueden causar complicaciones graves, como síndrome urémico hemolítico y trombocitopenia por *E. coli* O157:H7, artritis y septicemia por *Salmonella* o meningitis y abortos por *Listeria monocytogenes*, lo que representa un desafío para su control en alimentos listos para consumir (Puig Peña et al., 2013).

Las ETAs se encuentran ampliamente difundidas y son uno de los principales problemas que conciernen a la salud pública, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (WHO, 2025). Por este motivo es recurrente la utilización de sustancias químicas antimicrobianas para prevenir alteraciones y asegurar la calidad higiénica de muchos alimentos. Sin embargo, el uso no controlado de estas sustancias puede ocasionar un riesgo químico para los consumidores, a través de la generación de efectos secundarios agudos o crónicos y la aparición de enfermedades. En muchas ocasiones las sustancias químicas no tienen un efecto inmediato en el consumidor, sino que se acumulan en el organismo provocando efectos en la salud tras largos periodos de exposición (García, 2019).

Para la selección de una sustancia química antimicrobiana se deben tener en cuenta diferentes factores, entre ellos se encuentran las propiedades físicas y químicas de los agentes, composición del alimento a tratar, el sistema de conservación, coste y toxicidad del antimicrobiano, entre otros. En la actualidad podemos hallar diversas alternativas de conservación química en las industrias alimentarias (Tabla 1) (Davidson et al., 2013). Si bien los conservantes químicos presentan elevada eficacia en la prevención de contaminaciones biológicas, su consumo está asociado a potenciales riesgos sobre la salud de los consumidores así como la calidad de los alimentos.

**Tabla 1. Función, aplicaciones, ventajas y riesgos de los conservantes químicos en industrias alimentarias**

Conservante	Función principal	Aplicaciones comunes	Ventajas	Potenciales riesgos
Ácido sórbico y sorbatos	Antifúngico (moho, levaduras)	Quesos, panificados, bebidas, salsas	Alta eficacia contra hongos; estabilidad en amplio rango de pH	Sabor residual a altas dosis; degradación en almacenamiento prolongado
Ácido benzoico y benzoatos	Antimicrobiano en medios ácidos	Bebidas carbonatadas, jugos, aderezos, mermeladas	Eficaz contra bacterias y levaduras; bajo costo	Efecto reducido en pH neutro; sensibilidad en algunos consumidores
Ácido propiónico y propionatos	Antifúngico y antibacteriano	Panificados, productos de pastelería	Previene mohos durante almacenamiento; estable al calor	Sabor ácido perceptible en altas concentraciones
Nitratos y nitritos	Antibotulínico; estabilizador de color	Carnes curadas (jamón, salchichas)	Prevención de <i>Clostridium botulinum</i> ; mejora de color y sabor	Formación de nitrosaminas potencialmente cancerígenas si se excede la dosis
Sulfitos y dióxido de azufre	Antimicrobiano y antioxidante	Vinos, frutas secas, mariscos	Previene pardeamiento y crecimiento microbiano	Reacciones adversas en asmáticos y personas sensibles
BHA (butilhidroxianisol) y BHT (butilhidroxitolueno)	Antioxidante sintético	Snacks, aceites, cereales	Alta estabilidad térmica; prolonga vida útil de grasas	Posible efecto acumulativo; debate sobre seguridad a largo plazo
Galato de propilo (PG) y TBHQ	Antioxidante	Aceites vegetales, productos cárnicos	Protege contra rancidez oxidativa; dosis bajas efectivas	Toxicidad a altas dosis; restricciones regulatorias
Ácido acético y acetatos	Regulador de pH y antimicrobiano	Conservas vegetales, salsas, encurtidos	Amplia disponibilidad; bajo costo	Sabor fuerte que puede modificar el perfil sensorial
Ácido láctico y lactatos	Regulador de pH y antimicrobiano	Carnes procesadas, embutidos	Inhibe <i>Listeria monocytogenes</i> ; considerado seguro	Puede alterar textura en productos sensibles

En este contexto, la búsqueda y desarrollo de compuestos antibacterianos naturales han ganado importancia en la industria alimenticia en los últimos años. Un

ejemplo de ellos son las bacteriocinas, compuestos producidos principalmente por bacterias ácido-lácticas (BAL). Estas bacterias gram positivas han sido ampliamente evaluadas en procesos de fermentación, así como para la preservación de los alimentos tanto en sistemas de conservación tradicionales o ser parte de soluciones innovadoras, como recubrimientos activos o biopelículas antimicrobianas (Preciado, 2013, Johnson et al., 2018).

### 1.3. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos producidos por bacterias, que matan o inhiben otros microorganismos relacionados o no (Nes et al., 2007). A diferencia de los antibióticos, que son moléculas químicamente más diversas y producidas por diferentes grupos de microorganismos, las bacteriocinas son producidas mediante traducción ribosomal, lo que les confiere una mayor especificidad de acción y, en muchos casos, menores efectos secundarios (Cotter et al., 2005). Se caracterizan por su baja toxicidad, y alta estabilidad y especificidad (Guryanova, 2023). Actualmente son estudiadas debido a sus propiedades biopreservantes de diferentes alimentos de origen animal y vegetal presentando actividad inhibitoria contra un amplio rango de bacterias patógenas y alterantes presentes en los mismos (Galvez et al., 2008).

#### 1.3.1. Clasificación

Si bien no existe una clasificación universalmente adoptada, las bacteriocinas suelen clasificarse en bibliografía en tres categorías (I, II y III), según sus características biológicas, estructurales y genéticas (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

*1.3.1.1. Bacteriocinas de clase I*, conocidas como lantibióticos, son péptidos de bajo peso molecular que sufren modificaciones postraduccionales extensas. Estas modificaciones incluyen la formación de anillos de lanthionina y metillanthionina, que les confieren una estructura rígida y una gran estabilidad frente a condiciones adversas como el calor o el pH extremo (Field et al., 2010). El mecanismo de acción de los lantibióticos suele implicar la formación de poros en la membrana celular y la inhibición de la síntesis de pared celular bacteriana al unirse a lípidos esenciales, como el lípido II, un precursor del peptidoglicano. En esta clase se destaca la nisina, producida por *Lactococcus lactis* y ampliamente utilizada como conservante natural en alimentos procesados.

*1.3.1.2. Bacteriocinas de clase II*, péptidos pequeños (menores de 10 kDa), termoestables y que no presentan modificaciones postraduccionales complejas. Su mecanismo de acción se basa principalmente en la formación de poros en la membrana celular de bacterias sensibles, provocando la pérdida de potencial de membrana, salida de componentes intracelulares y lisis celular. Estas bacteriocinas son producidas principalmente por bacterias ácido-lácticas. Un ejemplo es la pediocina PA-1 producida por *Pediococcus acidilactici*, lo que ha facilitado su aplicación en alimentos fermentados y como herramientas en biotecnología.

*1.3.1.3. Bacteriocinas de clase III*, proteínas de gran tamaño (mayores de 30 kDa) y termosensibles, por esta razón su aplicación industrial es más limitada, aunque

pueden tener aplicaciones específicas en biocontrol bacteriano en entornos clínicos o de investigación. En este grupo se puede mencionar la lisostafina, que actúa degradando la pared celular de ciertas especies de *Staphylococcus*.

### 1.3.2. Bacteriocinas como preservantes de alimentos

El rol de estas moléculas como preservantes de alimentos, ha sido ampliamente reportado en bibliografía tanto de forma individual, como en combinación con otros métodos de preservación (Bali et al., 2016). En este sentido, las bacteriocinas pueden ser aplicadas en los alimentos de diferentes maneras: parcialmente purificadas, purificadas o puede incorporarse la bacteria productora de la bacteriocina como un cultivo iniciador. Sin embargo, el uso de bacteriocinas purificadas ha mostrado mayor efectividad como aditivo de alimentos en comparación con cultivos de bacterias productoras de las mismas (Faye et al., 2002). Asimismo, la incorporación de la bacteria productora tiene como desventaja que puede no ser compatible con otras bacterias requeridas para la fermentación del alimento o puede alterar características como el sabor de los mismos (Johnson et al., 2018). Debido a esto, el desarrollo de metodologías que permitan mejorar la producción y purificación de estas bacteriocinas permitiría generar un producto de interés para su posterior aplicación en la industria alimentaria.

La investigación sobre las bacteriocinas como conservantes naturales en la industria alimentaria ha evolucionado considerablemente, especialmente en los últimos años, con estudios que demuestran su efectividad (Putri et al., 2024). Sin embargo, en la actualidad, las alternativas comerciales de estos desarrollos son limitadas: sólo la nisina A (Nisaplin<sup>®</sup>, Danisco) y la pediocina PA-1 (Microgard<sup>™</sup>, Danisco; ALTA 2431, Quest International) han sido comercializadas hasta el momento como preservantes de alimentos (Putri et al., 2024). Particularmente la nisina A, descubierta en 1928, ha sido utilizada ampliamente debido a su capacidad para prevenir el crecimiento de microorganismos generadores de esporas como *Bacillus* y *Clostridium*. Además, tiene un amplio espectro de actividad frente a bacterias gram positivas como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus* (Sierra et al., 2013; Silva et al., 2018). Por su parte, la pediocina PA1 ha mostrado ser eficaz tanto contra patógenos gram positivos como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus*, como contra organismos gram negativos como *Pseudomonas* y *E. coli* (Silva et al., 2018)

### 1.4. Obtención de bacteriocinas recombinantes

La obtención de bacteriocinas purificadas a partir de las cepas productoras puede resultar laboriosa e ineficiente, mientras que la síntesis química sólo produce pequeñas cantidades de péptido (Alvarez-Sieiro et al., 2016). En las últimas décadas, el advenimiento de las técnicas de biología molecular proveyó nuevas herramientas para la utilización de bacterias y levaduras como “fábricas” para la expresión heteróloga de proteínas. La obtención de bacteriocinas mediante técnicas de ingeniería genética y expresión en organismos heterólogos permite obtener un producto estandarizado, en mayor cantidad y con un alto grado de pureza. En este sentido, entre todas las clases de bacteriocinas, las características estructurales de las bacteriocinas clase II, que no

presentan residuos modificados ni modificaciones postraduccionales (Alvarez-Sieiro et al., 2016), las coloca en una posición ventajosa para su correcta expresión en organismos heterólogos, garantizando su funcionalidad.

Entre todos los sistemas disponibles para la expresión de proteínas heterólogas, *E. coli* ha sido el microorganismo más utilizado debido a su rápido crecimiento, bajo costo, fácil manipulación genética y amplia disponibilidad de sistemas de clonado compatibles con dicha especie. Sin embargo, para el caso de proteínas destinadas a alimentos, la selección de la cepa utilizada para la expresión no sólo debe basarse en los rendimientos o factibilidad de producción, sino también en cuestiones regulatorias. En estos casos, las cepas seleccionadas para la expresión generalmente son aquellas que cumplen con el status GRAS (del inglés *Generally Recognized As Safe*) designado por la FDA (*American Food and Drug Administration*). Muchas especies del género Fungi cumplen con dicho estatus y están siendo actualmente utilizadas como hospedadoras para la producción a gran escala de proteínas recombinantes y metabolitos (Punt et al., 2002).

*Saccharomyces cerevisiae* es considerado organismo GRAS y es ampliamente utilizado en la industria de alimentos panificados, así como en la producción de proteínas farmacéuticas. Por este motivo se presenta como una alternativa adecuada para la producción de proteínas recombinantes destinadas a ser utilizadas como aditivos alimentarios. En cuanto a sus ventajas técnicas, esta levadura puede crecer rápidamente hasta elevadas densidades celulares y cuenta con un sistema de secreción de péptidos que facilita la recuperación de las proteínas en el medio extracelular evitando pasos de lisis y purificación posteriores. (Romanos et al., 1992, Becerra et al., 2001, Adrio 2003). Otra ventaja de *S. cerevisiae* para la producción de bacteriocinas es su resistencia intrínseca a los péptidos antimicrobianos, lo que evita problemas de toxicidad durante la expresión heteróloga.

Las cepas de *S. cerevisiae* se han utilizado ampliamente para producir proteínas y enzimas recombinantes biofarmacéuticas (Nielsen J., 2019) y específicamente, algunos grupos de investigación han reportado la expresión exitosa de diferentes bacteriocinas utilizando este sistema (Van Reenen et al., 2003; Basanta et al., 2009; Nguyen et al., 2020). En particular, la cepa *S. cerevisiae* BJ3505 es deficiente en proteasas, lo que reduce la probabilidad de degradación de proteínas recombinantes por proteasas extracelulares. Además, esta cepa puede emplearse con vectores que contienen marcadores de selección basados en auxotrofia para la síntesis de triptófano (Casado López et al., 2016).

## **1.5. Enterocina A**

La Enterocina A (EntA) es una bacteriocina de clase II que fue aislada y caracterizada por primera vez a partir de la cepa *Enterococcus faecium* CTC492 (Aymerich et al. 1996). Esta molécula es producida por cepas de *E. faecium*, una especie comúnmente encontrada en la microbiota intestinal de humanos y animales, así como en alimentos fermentados. Desde el punto de vista estructural, la EntA es un péptido pequeño, anfipático y termoestable. Estas propiedades le permiten mantener su

actividad en condiciones adversas, como altas temperaturas o diferentes rangos de pH, lo que la hace adecuada para su uso en la industria alimentaria (Gálvez et al., 2007). El gen de la EntA codifica para una secuencia líder de 17 aminoácidos en el extremo N-terminal, seguida del péptido maduro de 47 residuos (Aymerich et al. 1996). En cuanto a su expresión recombinante, se han reportado diversas plataformas para su expresión como ser *E. coli* (Ankaiah et al., 2017), bacterias lácticas (Borrero et al., 2011) y levaduras como *Pichia pastoris* y *Kluveromyces lactis* (Jiménez et al., 2014; Hu et al., 2014; Borrero et al., 2012). La EntA ha demostrado tener un elevado efecto inhibitorio frente a *Listeria* spp. y un amplio espectro de actividad antimicrobiana que incluye patógenos vinculados a alimentos como *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *E. coli*, *Salmonella* entérica, *E. faecalis*, entre otros (Hu et al., 2014; Jaouani et al., 2014; Ankaiah et al., 2017).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Obtener una molécula recombinante de la bacteriocina EntA mediante clonado y expresión heteróloga en *S. cerevisiae* y evaluar su actividad antimicrobiana frente a un panel de cepas indicadoras.

### 2.2. Objetivos específicos

- Obtener una secuencia optimizada de EntA para su expresión en *S. cerevisiae*.
- Establecer un sistema de expresión para EntA en *S. cerevisiae*.
- Evaluar *in vitro* la capacidad antimicrobiana de las moléculas obtenidas frente a un panel de bacterias indicadoras.

La hipótesis del trabajo es que, de obtenerse una molécula con actividad antimicrobiana frente a microorganismos de interés, se podría contar con un producto que pueda complementar o idealmente sustituir el empleo de preservantes químicos, mejorando la calidad de los alimentos tratados con la consiguiente repercusión en la Salud Pública y la industria elaboradora.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Obtención y clonado de la secuencia codificante de la bacteriocina de interés. Cepas y vectores plasmídicos

##### 3.1.1. Cepas bacterianas. Cultivos y preservación

Se utilizaron cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$ , *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 y *L. innocua* ATCC 33090. Los cultivos líquidos de las bacterias se realizaron en medio LB, a 37 °C y en agitación a 180 rpm. En caso de tratarse de *E. coli* transformadas, el medio se suplementó con el antibiótico correspondiente (Sambrook et al., 1989).

Para conservar las bacterias por cortos períodos se realizaron cultivos en estría en placas de Petri conteniendo medio LB-agar 2%, suplementado con antibiótico en caso de corresponder, y se conservaron a 4°C.

Para períodos más extensos de conservación se realizó un cultivo a partir de una colonia aislada en caldo LB, suplementado con antibiótico en caso de corresponder, durante toda una noche a 37°C. Se transfirieron 500  $\mu$ l del cultivo en criotubos de 1,8 ml que contenían un volumen igual de LB-glicerol 30 % (v/v). Se mezcló y conservó a -80 °C.

La cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  tiene alta eficiencia de transformación, es ampliamente utilizada para clonados y subclonados y posee mutado el gen *recA*, evitando modificaciones en la secuencia de los péptidos clonados.

##### 3.1.2. Cepas de *S. cerevisiae*

Se utilizó la cepa *S. cerevisiae* BJ3505, deficiente en proteasas BJ. Los cultivos líquidos se realizaron en medio YPD a 30 °C y en agitación a 200 rpm. Para periodos cortos de conservación se realizaron cultivos en estría en placas de Petri que contenían medio YPD agar 1,5% y se mantuvieron a 4 °C.

Para conservar la cepa durante periodos mayores de tiempo, se realizó un cultivo a partir de una colonia aislada en caldo YPD durante toda una noche a 37 °C. Se transfirieron 500  $\mu$ l del cultivo en criotubos de 1,8 ml que contenían un volumen igual de YPD-glicerol 30 % (v/v). Se mezcló y conservó a -80 °C. Para el caso de *S. cerevisiae* transformada con las construcciones de trabajo, se utilizó el medio de selección SD-trp tanto en cultivos en placas como para su criopreservación (SD-trp-glicerol 25%).

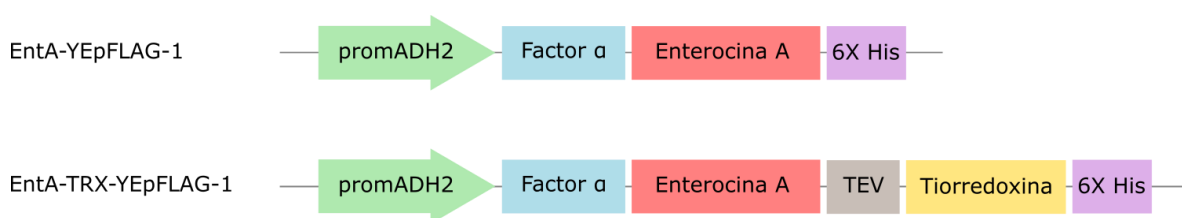
##### 3.1.3. Vector plasmídico

Se utilizó el plásmido YEpFLAG-1 (Sigma). El mismo permite la secreción extracelular de las proteínas recombinantes en *S. cerevisiae*. La transcripción se controla mediante el promotor inducible *ADH2*. YEpFLAG-1 también contiene un gen de resistencia a ampicilina para la selección de *E. coli* transformadas y *TRP1* para la selección de transformantes de levadura por reversión de auxotrofia del triptófano.

La expresión extracelular es dirigida por el péptido señal Factor  $\alpha$  (~9 KDa). La señal está compuesta por dos regiones: una secuencia señal N-terminal de 19

aminoácidos (~2,9 kDa), que dirige la translocación al retículo endoplasmático (RE), y una región pro de 66 aminoácidos (~6,1 kDa), responsable del empaquetamiento dependiente de receptores en vesículas derivadas del RE. En el lumen del RE, la secuencia señal es eliminada por una peptidasa, mientras que la región pro es escindida posteriormente por la proteasa Kex2 en el aparato de Golgi.

El diseño de las construcciones génicas incluyó una fusión C-terminal de una etiqueta de seis histidinas para facilitar su purificación e identificación (Figura 1). La construcción EntA-TRX-YEpFLAG-1, que permite la expresión de la bacteriocina como proteína de fusión a tiorredoxina (TRX), se encontraba disponible en el laboratorio.



**Figura 1. Esquema de las construcciones génicas usadas en el trabajo.** Ambas construcciones fueron clonadas en el vector YEpFLAG-1, con el objetivo de expresar de manera extracelular la Enterocina A.

### 3.2. Obtención de la secuencia codificante de EntA

#### 3.2.1. Diseño y síntesis química de la secuencia

La secuencia codificante del gen de EntA se obtuvo mediante síntesis química (gBlocks Gene Fragments, Integrated DNA Technologies). A partir de la secuencia AAD29132.1 (GenBank, NCBI), se optimizaron los codones para la expresión en *S. cerevisiae* (Codon Optimization Tool, Integrated DNA Technologies). Se sintetizó la secuencia que codifica para EntA madura, desde el aminoácido Tyr19 con la incorporación de una etiqueta de seis histidinas en el extremo C-terminal.

#### 3.2.2 Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La secuencia obtenida mediante síntesis química se utilizó como molde en una reacción de PCR. Se diseñaron oligonucleótidos con extremos homólogos al vector de expresión YEpFLAG-1 para su posterior clonado mediante recombinación homóloga en levaduras (Tabla 2). Para la reacción de amplificación se emplearon las condiciones detalladas en las Tablas 3 y 4. Como control negativo se utilizó agua bidestilada en reemplazo del ADN molde.

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y clonado de la secuencia codificante de Enterocina A.** La temperatura de hibridización (T<sub>m</sub>) informada incluye únicamente la secuencia que hibrida con el molde.

Nombre	Secuencia del oligonucleótido (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)
EntA FW	AAAGAAGAAGGGGTACCTTTGGATAAAAGAATGACTAC ACATTCAGGCA	54
EntA RV	TGGGACGCTCGACGGATCAGCGGCCGCTTAATGGTGGTG GTGGTGATG	56

**Tabla 3. Reactivos y concentración para la amplificación de Enterocina A mediante PCR.**

Reactivos	Volumen agregado	Concentración final
Buffer 10X (con MgCl <sub>2</sub> 20 mM)	2 µl	1X (MgCl <sub>2</sub> = 2 mM)
dNTPs (2,5 mM c/u)	1,6 µl	0,2 mM
Oligonucleótidos (10 µM)	0,6 µl c/u	0,3 µM
ADN molde	1 µl	-
ADN polimerasa DreamTaq (Thermofisher) (5U/ul)	0,15 µl	0,75 U
H <sub>2</sub> O <sub>mq</sub>	Completar hasta 20 µl	-

**Tabla 4. Perfil de ciclado para la amplificación de Enterocina A.**

N° de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1	95	60
10	95	30
	49	30
	72	30
20	95	30
	72	60
1	72	300

### 3.3. Análisis y purificación de la secuencia codificante

La reacción de amplificación de ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5%. Las muestras se sembraron en la proporción correspondiente de *buffer* de muestra 6X. Los geles fueron preparados en *buffer* TAE con el agregado de GelRed™, según indicaciones del fabricante (Biotium). Las corridas electroforéticas se realizaron en el mismo *buffer* a 70 V durante 60 minutos. Como marcador de tamaño molecular se utilizó un marcador comercial acorde a los tamaños esperados (50 pb ladder, PB-L Productos Bio-Lógicos®). Los geles se revelaron en un transiluminador de luz UV ( $\lambda_{255\text{nm}}$ ).

Una vez verificado el tamaño del amplicón, se realizó la purificación del mismo desde la mezcla de PCR. Se utilizó un kit comercial (Wizard SV Gel and PCRClean-Up System, Promega®), según instrucciones del fabricante.

#### 3.3.1. Clonado de EntA en sistema de expresión para *S. cerevisiae*

El clonado de la secuencia codificante del gen de EntA en el vector de expresión YEpFLAG-1 se realizó por recombinación homóloga en *S. cerevisiae*. Se empleó el vector YEpFLAG-1 previamente linealizado mediante corte con la enzima de restricción BamHI (ThermoFisher). La construcción obtenida, cuyos pasos para su obtención se detallan a continuación, se denominó EntA-YEpFLAG-1.

#### 3.3.2. Transformación de *S. cerevisiae* por electroporación

Para la transformación se partió de un cultivo en estría de *S. cerevisiae* BJ3505 en medio YPD agar 1,5% a 30°C durante 72 horas. A partir de una colonia aislada, se realizó un cultivo en suspensión en 5 ml de medio YPD a 30°C y agitación de 250 rpm durante toda la noche. En este paso se utilizó vortex para disgregar las células. Con este cultivo se inocularon 35 ml de YPD fresco en un Erlenmeyer de 125 ml de capacidad, en iguales condiciones de temperatura y agitación hasta obtener una  $\text{DO}_{550\text{nm}}=1$ .

Se concentraron las células mediante centrifugación a 8000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Se realizaron tres lavados del pellet celular con un volumen agua fría estéril y dos lavados con medio volumen de glicerol 10% frío estéril. Se retiró por volcado la solución de lavado y las células se resuspendieron en el volumen restante más 500  $\mu\text{l}$  de glicerol 10%.

Se tomaron 50  $\mu\text{l}$  de dicha suspensión y se incubaron en hielo durante 15 minutos con 1  $\mu\text{l}$  del plásmido linealizado y 6  $\mu\text{l}$  de la secuencia de EntA purificada. Las células se sometieron a un choque eléctrico (Gene Pulser™, Bio-Rad Laboratories Inc.) en cubetas de 2 mm (Bio-Rad Laboratories Inc.) en las condiciones de 1500 V, 25 $\mu\text{F}$  y 200 Ohm. Seguidamente, se agregó 1 ml de medio YPD y se incubó la suspensión a 30°C en agitación durante una hora. Las células se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos, se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de solución fisiológica y se sembraron en placas de Petri conteniendo medio de selección SD-trp agar 1,5%. Las placas se incubaron durante 3 días a 30°C. Además, se transformó un cultivo de *S. cerevisiae* BJ3505 con el vector YEpFLAG-1 vacío para usar como control negativo de expresión y actividad.

### 3.3.3. Confirmación de clones por PCR de colonia

El clonado por recombinación se confirmó, en primera instancia, mediante PCR de colonia (Tabla 5) empleando los cebadores de clonado (descritos en Tabla 2). Se tomaron colonias de la placa de transformación y se resuspendieron en 0,2 ml de PBS con el agregado de 4  $\mu$ l de NaOH 20mM. Las muestras se desnaturalizaron por incubación durante 10 minutos a 95°C y posteriormente 5 minutos a 20°C. Por último, se clarificaron mediante centrifugación durante 5 minutos a 6000 rpm y se agregaron 4  $\mu$ l del sobrenadante a la mezcla de reacción de PCR (Tabla 5). El perfil de ciclado se muestra en la Tabla 6. Como control negativo se utilizó agua bidestilada en reemplazo del ADN molde. La reacción de amplificación se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 2,5%.

**Tabla 5. Reactivos y concentración para reacción de PCR de colonia.**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen agregado</b>	<b>Concentración final</b>
Buffer de reacción 10x	2 $\mu$ l	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 $\mu$ l	2,5 mM
dNTPs (2,5 mM c/u)	1 $\mu$ l	0,25 mM
Oligonucleótidos (10 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ l c/u	0,3 $\mu$ M
Taq Polimerasa (5 U/ $\mu$ l)	0,3 $\mu$ l	1,5 U
ADN	2 $\mu$ l	-
H <sub>2</sub> Omq	Completar hasta 20 $\mu$ l	N/A

**Tabla 6. Perfil de ciclado para la reacción de PCR de colonia.**

<b>N° de ciclos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (s)</b>
1	95	120
35	95	30
	72	60
1	72	300

### 3.3.4. Secuenciación de la construcción

La identidad de la construcción EntA-YEpFLAG-1 se verificó mediante secuenciación del ADN por electroforesis capilar. La preparación del ADN plasmídico

se llevó a cabo en dos etapas con el fin de obtener la cantidad y calidad requerida para el análisis. En primer lugar, se realizó una extracción de ADN plasmídico desde los clones de *S. cerevisiae* que resultaron positivos en la PCR de colonia. Posteriormente, se transformó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  con el plásmido obtenido y se purificó nuevamente.

*3.3.4.1. Minipreparación desde S. cerevisiae:* Los clones positivos de *S. cerevisiae* identificados por PCR de colonia se cultivaron en 1,5 ml de medio selectivo SD-trp a 30°C durante toda la noche en agitación a 250 rpm. Seguidamente, se agregaron 3,5 ml de medio fresco SD-trp y se cultivaron durante 24 horas.

Para la minipreparación de ADN plasmídico se empleó un kit comercial (ADN PuriPrep-P, INBIO HIGHWAY), con una adaptación en la etapa de ruptura celular. Junto con la solución de lisis se incorporaron 100  $\mu$ l de bolas de vidrio de 500  $\mu$ m de diámetro previamente tratadas en HCl durante 16 horas. Las muestras se sometieron a agitación en vortex durante 30 segundos en tres etapas alternando con incubaciones en hielo. Luego, se continuó con el protocolo del kit comercial según instrucciones del fabricante.

*3.3.4.2. Transformación química de E. coli:* Con el ADN plasmídico obtenido en el paso anterior se transformaron células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se realizó un cultivo en suspensión de estas células a partir de una colonia aislada en medio LB a 37°C con agitación de 180 rpm. Se inoculó 1 ml de medio LB en una proporción de 1/100 y se incubaron en las mismas condiciones hasta una DO<sub>550</sub>= 0,5-0,6. Las células se colocaron en hielo durante 5 minutos y se centrifugaron a 5000 rpm a 4°C por el mismo tiempo. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500  $\mu$ L de Solución transformadora I. La suspensión se incubó en hielo durante 5 minutos, se centrifugó por 5 minutos a 5000 rpm a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 500  $\mu$ L de Solución transformadora II. Se repitió la incubación en hielo durante 20 minutos seguida del paso de centrifugación. El pellet celular se resuspendió en 100  $\mu$ L de Solución Transformadora II y se agregó 1  $\mu$ L del plásmido. Se incubó en hielo durante 30 minutos y luego a 42 °C durante 45 segundos. Se añadió 1 ml de medio SOC y se incubó a 37 °C durante 1 hora con agitación. Finalmente se centrifugó el cultivo a 5000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se descartó 1 ml del sobrenadante y se resuspendió en los 100  $\mu$ L restantes. Las células se sembraron en placas de Petri que contenían LB agar 1,5%, suplementadas con 0,1 mg/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C.

*3.3.4.3. Minipreparación desde E. coli y secuenciación:* Se cultivaron colonias aisladas de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con la construcción EntA-YEpFLAG-1 en 10 ml de medio LB en presencia de ampicilina a 37°C durante toda la noche. El cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. El ADN plasmídico se purificó a partir del pellet celular utilizando un kit comercial disponible (ADN PuriPrep-P, INBIO HIGHWAY) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN recuperado se almacenó a -20°C. Las muestras se analizaron en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología CICVyA de INTA por secuenciación del ADN

por electroforesis capilar en el secuenciador ABI 3500 (Applied Biosystems) con la química BigDye Terminator (Applied Biosystems), utilizando los oligonucleótidos EntA Fw y EntA Rv (Tabla 2).

### 3.4. Obtención de Enterocina A recombinante

Para la obtención de EntA recombinante se trabajó con la construcción EntA-YEpFLAG-1 obtenida en 3.2 y con el clon EntA-TRX-YEpFLAG-1 disponible en el laboratorio.

#### 3.4.1. Expresión en cultivos en suspensión de *S. cerevisiae*

Se evaluó la expresión recombinante de las proteínas en cultivos en suspensión en dos medios suplementados con 1,5% de glucosa y 3% de glicerol: YPHSM y SD-trp, a distintos tiempos durante un período de 7 días.

Para ello, los clones de *S. cerevisiae* portando las construcciones de interés se cultivaron en estría en SD-trp agar 1,5% a 30°C durante 72 horas. Luego, se tomó una colonia aislada de cada clon y se cultivó en 5 ml de caldo SD-trp a 30°C durante 72 horas con una agitación de 250 rpm, hasta llegar a una  $DO_{600nm}=9,50$ . A continuación, el cultivo se utilizó para inocular 25 ml de los medios de inducción hasta llegar a una  $DO_{600nm}$  inicial=0,1 y se incubaron a 30°C en agitación de 4 a 7 días. Diariamente, se tomaron muestras de los cultivos, los cuales se centrifugaron a 4500 rpm durante 15 minutos, obteniendo las fracciones pellet y sobrenadante. El pellet celular se resuspendió en PBS. Las muestras se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

Se empleó como control negativo la cepa transformada con el plásmido cerrado sin inserto.

#### 3.4.2. Análisis de las proteínas recombinantes

**3.4.2.1. SDS-PAGE:** La presencia de las proteínas de interés en las fracciones de pellet y sobrenadante obtenidas en 3.4.1 se evaluó mediante electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida (16%) en condiciones desnaturalizantes. Las muestras se trataron con un volumen de *buffer* de muestra para SDS-PAGE 4X. Se incubaron en baño de agua a ebullición durante 5 minutos y luego se sembraron 15 µl de cada una en el gel aplicando una diferencia de potencial de 150 V. Se utilizó el marcador de peso molecular *BLUltra Prestained Protein Ladder*.

La fijación y tinción de geles se realizó por inmersión en solución de azul de Coomassie G-250 y luego se decoloró con Soluciones Decolorantes I y II.

**3.4.2.2. Western Blot:** Las muestras se sometieron a electroforesis en las condiciones indicadas y luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a un voltaje constante de 100 V en Solución de Transferencia durante una hora.

Una vez finalizada la transferencia, las membranas se sometieron a dos lavados con PBS-Tween 20 0,05% y uno con PBS durante cinco minutos cada uno. Para evitar uniones inespecíficas, luego fueron bloqueadas con leche de cabra 5% m/v en PBS durante 45 minutos.

Posteriormente se incubaron en agitación durante una hora con el anticuerpo monoclonal anti-His tag (Invitrogen) en una dilución 1/2000 en PBS con leche de cabra 1% m/v. Se realizaron los lavados mencionados anteriormente y luego las membranas se incubaron en agitación durante una hora con el anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Jackson), diluido 1/2000 en PBS con leche de cabra 1%. La membrana se lavó nuevamente y finalmente la reacción se reveló utilizando Sustrato Cromogénico DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.4.3. Purificación de las proteínas recombinantes

Se colocaron 50 µL de esferas magnéticas (Dynabeads™ His-Tag Isolation & Pulldown, Invitrogen) en un tubo de microcentrífuga. Se colocó el tubo en un imán durante dos minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregó 700 µL de sobrenadantes (48, 73 y 96 hs) con las proteínas recombinantes (EntA y EntA-TRX) obtenidos en el 3.4.1, y se incubó durante 15 min en agitación a temperatura ambiente. Se empleó además el sobrenadante del cultivo de *Saccharomyces* transformada con YEpFLAG-1 vacío como control. Se colocó el tubo en un imán durante dos minutos y se descartó el sobrenadante. Se realizaron lavados resuspendiendo las esferas magnéticas en 300 µL de solución BL1, colocando el tubo en un imán durante dos minutos y descartando el sobrenadante, cuatro veces. Luego se agregaron 100 µL de solución BL3 y se incubó durante 5 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se colocó el tubo en un imán durante dos minutos y se recuperó el sobrenadante, donde deberían encontrarse las proteínas purificadas.

## 3.5. Ensayos de actividad antimicrobiana

Para la determinación de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas recombinantes se evaluaron dos metodologías en placas de cultivo agarizadas. La primera, ensayo en estría, consiste en un co-cultivo de clones de *S. cerevisiae* productores de las bacteriocinas con cepas indicadoras, seguido de la evaluación de zonas de inhibición.

El segundo protocolo, la técnica de difusión en agar, se basa en la inhibición del crecimiento de cepas indicadoras alrededor de pocillos que contienen soluciones con la bacteriocina de interés.

Como cepas indicadoras de actividad antimicrobiana se emplearon *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 y *L. innocua* ATCC-33090 (todas pertenecientes al cepario del IdICaL).

### 3.5.1. Ensayo en estría

Se realizó una siembra en estría de los clones de *S. cerevisiae* productores de EntA y EntA-TRX en medio YPHSM agar suplementado con 3% de glicerol y 1,5% de glucosa o con 4,5% de glicerol. Se incubaron a 30°C durante 24, 48 y 72 hs. Transcurrido cada período de tiempo, 15 ml de medio Mueller Hinton agar 1%, previamente inoculado con 100 µl (1x10<sup>7</sup> UFC/ml) de cultivos de las cepas indicadoras, se vertió sobre las placas y se incubó nuevamente por 16 hs a 30°C. Como control

negativo de actividad se utilizó un clon de *S. cerevisiae* transformado con el vector YEpFLAG-1 vacío. Se observó la presencia de zonas de inhibición alrededor de la estría de cada clon.

### 3.5.2. Ensayo de difusión en agar

Se realizó un cultivo de *L. innocua* ATCC 33090, *E. faecalis* ATCC 29212 y *S. aureus* ATCC 29213 en Tripteína Soya (TS) a 37°C en agitación a 200 rpm, hasta obtener una  $DO_{550nm} = 0,4$ . Luego, se efectuó una dilución de cada cultivo en solución fisiológica, hasta llegar a una concentración final de  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Cuarenta  $\mu$ L de esta dilución se utilizaron para inocular 15 ml de medio Müller Hinton agar 1,5%, el cual se vertió en placas de Petri. Sobre el agar se realizaron pocillos de aproximadamente 5 mm de diámetro, en donde se colocaron 25  $\mu$ L de los sobrenadantes de cultivos celulares productores de las bacteriocinas recombinantes antes (3.4.1) y después del paso de concentración por beads (3.4.3). Se utilizó el sobrenadante del cultivo de la cepa de *S. cerevisiae* transformada con el vector YEpFLAG-1 vacío como control negativo. Se evaluó la presencia de zonas de inhibición luego de la incubación por 24 h a 37 °C.

### 3.6. Soluciones y medios de cultivo

#### - Soluciones

<b>PBS</b>	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
	pH	7,4
<b>TAE</b>	Tris-acetato pH 8	40 mM
	EDTA	1 mM
<b>Solución fisiológica</b>	NaCl	0,9% (p/v)

#### Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

<b>Gel de apilamiento</b>	Tris-HCl pH 8,45	0,75 M
	SDS	0,075 % (p/v)
	Acrilamida/bisacrilamida (49,5%,3%)	4% (p/v)
	TEMED	0,1% (v/v)
	Persulfato de amonio	0,1% (p/v)
<b>Gel de separación 16%</b>	Tris-HCl pH 8,45	1 M
	SDS	0,1% (p/v)
	Acrilamida/Bisacrilamida (49,5%,3%)	16,5% (p/v)

	Glicerol	10% (v/v)
	TEMED	0,1% (v/v)
	Persulfato de amonio	0,1% (p/v)
<b>Buffer de muestra 4X</b>	Tris-HCl pH 6,8	200 mM
	Glicerol	20 % (v/v)
	SDS	8 % (p/v)
	$\beta$ -mercaptoetanol	4 % (v/v)
	Azul de bromofenol	0,04 % (p/v)
<b>Buffer de corrida (cátodo) pH 8,25</b>	Tris	SDS
	Tricina	0,1 M
	SDS	0,1 % (p/v)
<b>Buffer de corrida (ánodo) pH 8,9</b>	Tris-HCl	0,1 M

### Tinción con azul de Coomasie

<b>Solución colorante</b>	Azul de Coomasie G-250	0,125 % (p/v)
	Ácido acético	10 % (v/v)
	Etanol absoluto	45 % (v/v)
	Agua destilada	45 % (v/v)
<b>Solución decolorante 1</b>	Ácido acético	Agua destilada

	Etanol absoluto	45 % (v/v)
	Agua destilada	45 % (v/v)
<b>Solución decolorante 2</b>	Ácido acético	10 % (v/v)
	Etanol absoluto	10 % (v/v)
	Agua destilada	80 % (v/v)

### **Electroforesis en geles de agarosa**

<b>Buffer muestra 6X</b>	Azul de Bromofenol	0,25 % (p/v)
	Glicerol	30 % (v/v)

### **Western Blot**

<b>Buffer de transferencia</b>	Tris base	0,3 % (p/v)
	Glicina	1,88 % (p/v)
	Etanol	20 % (v/v)

<b>PBS-Tween</b>	Tween	0,03% (v/v)
	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
	pH	7,4

<b>Sustrato cromogénico</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vol	0,1 % (v/v)
-----------------------------	-----------------------------------	-------------

DAB	0,05 % (p/v)
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
pH	7,4

### Transformación química *E. coli*

<b>Solución transformadora 1</b>	Buffer Mops	0,223 % (p/v)
	KCl	0,074 % (p/v)
	pH	7 (ajustar con NaOH)

<b>Solución transformadora 2</b>	Buffer Mops	2,23 % (p/v)
	KCl	0,074 % (p/v)
	CaCl <sub>2</sub>	0,55% (p/v)
	pH	6,5

### Purificación de proteínas

<b>Buffer de resuspensión de células</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 8	50 mM
	NaCl	300 mM

<b>BL1</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 8	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	20 mM

<b>BL2</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 8	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	20 mM

<b>BL2</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 8	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM

**- Medios de cultivo**

<b>Medio LB</b>	Peptona	1% (p/v)
	Extracto de levadura	0,5% (p/v)
	NaCl	1% (p/v)
	pH	7,5

<b>LB-Agar</b>	Medio LB	
	Agar-agar	2% (p/v)

<b>Medio SOC</b>	Peptona	2% (p/v)
	Extracto de levadura	0,5% (p/v)
	NaCl	0,058% (p/v)
	KCl	0,0186% (p/v)
	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,2031% (p/v)
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2456% (p/v)
	Glucosa	0,36% (p/v)
	pH	7

<b>Medio Müller-Hinton (MH) agar</b>	Infusión de carne	2% (p/v)
	Peptona ácida de caseína	1,75 % (p/v)
	Almidón	0,15% (p/v)
	pH	7,3
	Agar	1% (p/v)
<b>Medio YPD</b>	Dextrosa	2 % (p/v)
	Extracto de levadura	1% (p/v)
	Peptona	2 % (p/v)
	pH	6,5
<b>Medio YPD-Agar</b>	Medio YPD	
	Agar-agar	2% (p/v)
<b>Medio YPHSM</b>	Glucosa	1,5 % (p/v)
	Glicerol	3% (p/v)
	Extracto de levadura	1% (p/v)
	Peptona	8 % (p/v)
<b>Medio YPHSM-Agar</b>	Medio YPHSM	
	Agar-agar	2% (p/v)
<b>Medio YPHSM 2</b>	Glicerol	4,5% (p/v)
	Extracto de levadura	1% (p/v)
	Peptona	8 % (p/v)

<b>Medio YPHSM2-Agar</b>	Medio YPHSM2	
	Agar-agar	2% (p/v)
<b>Medio Tripteína Soya (TS)</b>	Tripteína	1,7% (p/v)
	Peptona de Soya	0,3% (p/v)
	NaCl	0,5% (p/v)
	Fosfato dipotásico	0,25% (p/v)
	Glucosa	0,25% (p/v)
	pH	7,3
<b>Medio SD-trp</b>	<i>Drop out -trp</i>	1,97 g/L
	YNB	6,7 g/L
	Glucosa	2% (p/v)
<b>Medio SD-trp agar</b>	Medio SD-trp	
	Agar-agar	2% (p/v)
<b>Medio SD-trp para inducción</b>	<i>Drop out -trp</i>	1,97 g/L
	YNB	6,7 g/L
	Glucosa	1,5% (p/v)
	Glicerol	3% (p/v)

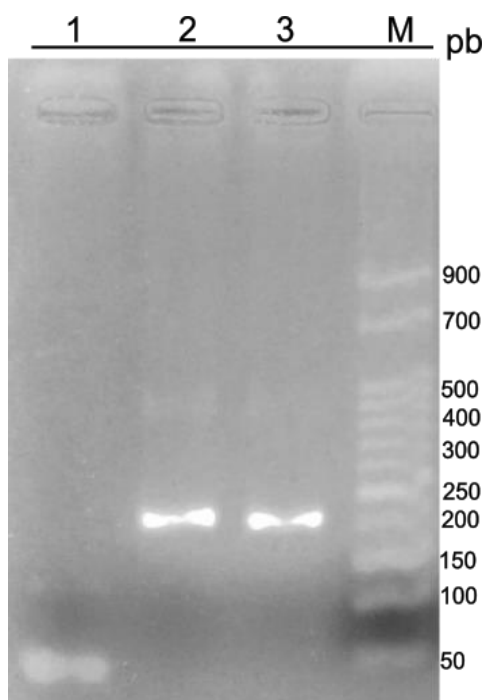
## **4. Resultados y Discusión**

### **4.1. Obtención y evaluación de EntA**

#### 4.1.1. Clonado de las secuencias codificantes

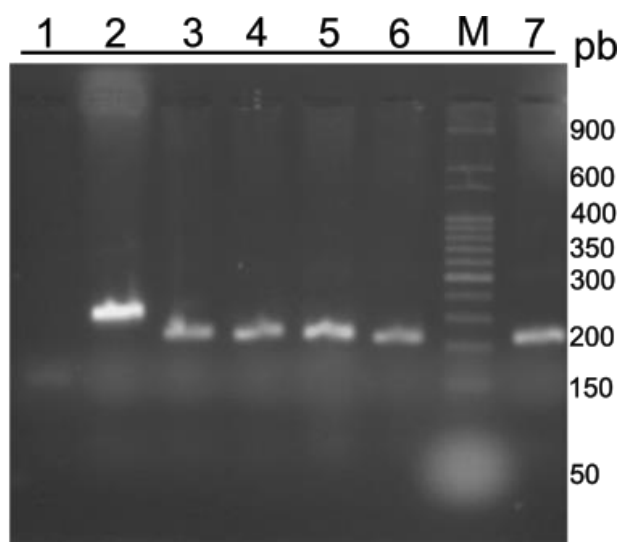
La secuencia codificante del gen de EntA (162 pb) se obtuvo mediante síntesis química, con optimización de codones para expresión en *S. cerevisiae*. La optimización de codones constituye una estrategia fundamental para maximizar la expresión de genes heterólogos, ya que diferentes organismos presentan preferencias específicas en el uso de codones sinónimos que pueden afectar significativamente los niveles de expresión proteica. La optimización de codones regula precisamente los niveles de expresión proteica mediante el control de la estabilidad del ARNm y la eficiencia traduccional (Presnyak et al., 2015).

A partir de la secuencia de EntA sintética se realizó una amplificación por PCR para la incorporación de los sitios necesarios para el posterior clonado por recombinación homóloga. La Figura 2 muestra la obtención de un amplicón compatible con el tamaño esperado (222 pb).



**Figura 2: Amplificación de la secuencia EntA.** Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% de los productos de PCR. Calles: (1) control negativo; (2) y (3) clones; (M) marcador de tamaño de fragmento (50 pb ladder, PB-L Productos Bio-Lógicos®).

El fragmento obtenido se clonó en el vector YEpFLAG-1 mediante recombinación homóloga en *S. cerevisiae*. El clonado se confirmó, en primera instancia, mediante la evaluación por PCR de 5 colonias transformantes. La reacción de amplificación se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 2,5%. La Figura 3 muestra que las colonias 2 a 5, amplificaron fragmentos de tamaño esperado (222 pb).



**Figura 3: Confirmación del clonado del fragmento.** Electroforesis en gel de agarosa al 2,5%. Calles: (1) blanco de reacción; (2-6) clones; (M) marcador de tamaño de fragmento (50 pb ladder, PB-L Productos Bio-Lógicos®); (7) control positivo.

La recombinación homóloga representa una de las principales ventajas del sistema de *S. cerevisiae* para el clonado molecular, ya que permite la construcción de vectores recombinantes *in vivo*, evitando pasos de restricción y ligación *in vitro*. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde el 80% de las colonias evaluadas presentaron el inserto correcto, coinciden con la alta eficiencia de clonado reportada para este método (Jozka et al., 2014).

Posteriormente, las colonias 2 y 3 se seleccionaron para una segunda confirmación, esta vez mediante secuenciación. Ambas colonias resultaron ser positivas, es decir, se confirmaron como portadoras de la construcción EntA-YEpFLAG-1. De ellas, se seleccionó a la colonia 2 confirmada como positiva para seguir trabajando.

#### 4.2. Expresión de EntA y EntA-TRX en *S. cerevisiae*

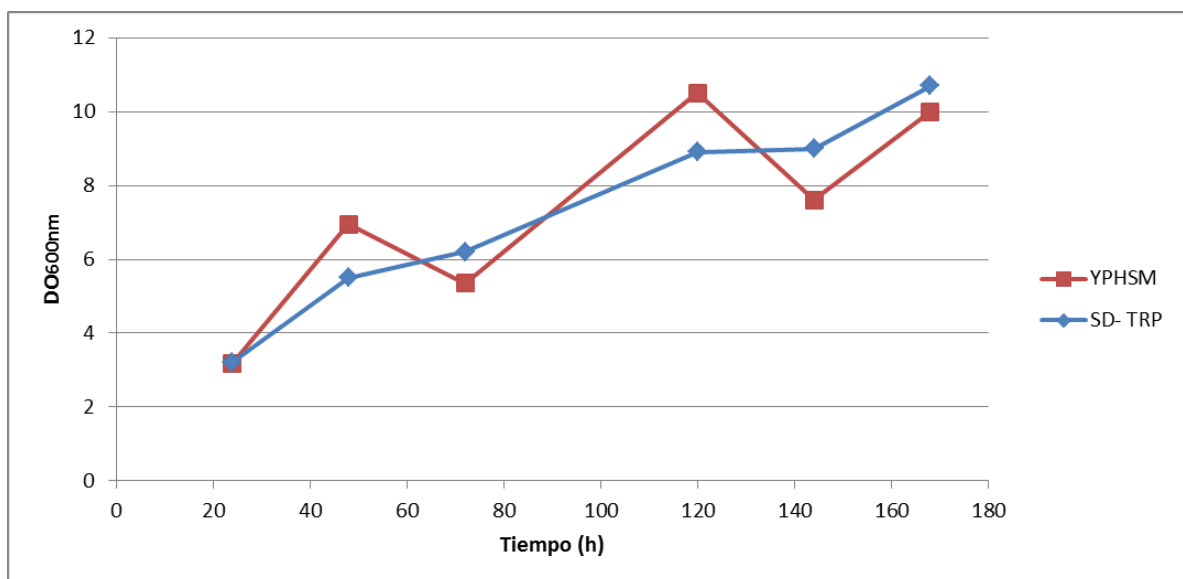
Tal como se describió en el apartado anterior, en una primera instancia de este trabajo se diseñó la construcción EntA-YEpFLAG-1, que permite la expresión de EntA con una etiqueta de histidina C-terminal. En trabajos previos de nuestro grupo se obtuvo además la construcción EntA-TRX-YEpFLAG-1, la cual permite la expresión de EntA como proteína de fusión a tiorredoxina (TRX) (Rivarosa et al., 2021). Sin embargo, su expresión en *S. cerevisiae* no había sido aún evaluada. Por esto, sumado a que EntA es un péptido de bajo peso molecular, y que experiencias previas en nuestro laboratorio mostraron mayores rendimientos en la expresión de bacteriocinas cuando se expresaron como proteína de fusión (Grazziotto, 2016), en este trabajo se decidió evaluar la expresión de EntA utilizando ambas construcciones.

#### 4.2.1. Evaluación de medios de cultivos de inducción

Para la puesta a punto de la expresión de las bacteriocinas, en una primera instancia se evaluó el crecimiento de *S. cerevisiae* en dos medios de cultivo diferentes: YPHSM y un medio de selección adaptado para la inducción, SD-trp. El objetivo de esta etapa fue comparar el crecimiento y la producción de bacteriocinas en condiciones con presión selectiva del plásmido frente a un medio sin capacidad de selección.

Además, ambos medios se suplementaron con 3% glicerol y 1,5% glucosa como fuentes de carbono. El promotor inducible *ADH2* del vector YEpFLAG-1, derivado del gen que codifica la enzima alcohol deshidrogenasa 2, se encuentra fuertemente reprimido en presencia de glucosa y se activa ante su agotamiento en presencia de etanol o glicerol como fuentes de carbono no fermentables (Michael Lee et al., 2005). La combinación de 1,5% de glucosa y 3% de glicerol favorece un crecimiento inicial vigoroso mientras que, la presencia simultánea de glicerol (3%) asegura que, una vez consumida la glucosa, el promotor *ADH2* se active para la expresión de las proteínas recombinantes.

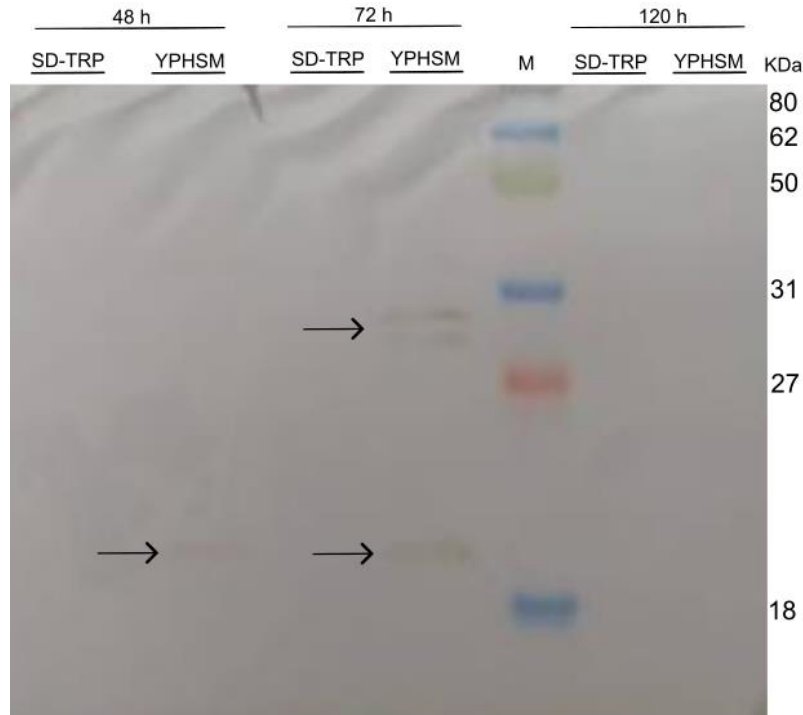
Se utilizó un clon portando la construcción EntA-TRX-YEpFLAG-1 como modelo. Para ello, las células se cultivaron durante 7 días; diariamente se tomaron muestras de estos cultivos y se midió la densidad óptica a 600 nm como monitoreo del crecimiento celular. La Figura 4 muestra que las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* resultaron similares para ambos medios de cultivo, alcanzando DO de saturación hacia las 120 hs de cultivo aproximadamente.



**Figura 4:** Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* EntA-TRX en los medios de cultivo YPHSM y SD-trp.

Se evaluó la presencia de EntA-TRX en pellet celular y sobrenadante mediante Western blot. La Figura 5 muestra la presencia de bandas compatibles con EntA-TRX (18,4 KDa) en pellets celulares obtenidos en el medio YPHSM, a las 48 y 72 h de

cultivo. Además, se observaron bandas de mayor tamaño (~27,4 KDa) correspondientes a la fusión con el péptido señal sin procesar (Factor  $\alpha$ -EntA-TRX). No se observaron bandas compatibles con EntA-TRX en muestras de sobrenadante con el medio YPHSM, ni en pellet o sobrenadante en el medio SD-trp.



**Figura 5:** Evaluación de la expresión de EntA-TRX en SD-trp e YPHSM en pellet celular mediante Western blot. Las flechas corresponden a la fusión EntA-TRX antes y después del procesamiento del péptido señal. M: marcador *BLUltra Prestained Protein Ladder*.

La elección del medio de cultivo es relevante para la expresión de proteínas recombinantes, ya que influye en el crecimiento celular y los niveles de producción de la proteína de interés. Los resultados de crecimiento de EntA-TRX en los medios complejos (YPHSM) y mínimos (SD-trp) fueron similares, lo que indica que no hubo diferencias en la capacidad de los medios para sostener la proliferación celular en el período evaluado.

Sin embargo, al analizar la expresión de EntA-TRX mediante Western blot, se detectaron bandas compatibles con la proteína de fusión únicamente en el pellet celular en los cultivos en medio YPHSM a las 48 y 72 horas. Esto sugiere que, a pesar de permitir un crecimiento celular comparable, el medio mínimo SD-trp no fue adecuado para la expresión de la bacteriocina bajo las condiciones estudiadas.

Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente para el promotor *ADH2*, el cual es funcional en medios sintéticos definidos, aunque se alcanzan mayores niveles de expresión en medios de crecimiento complejos como YPD (Michael Lee et al. 2005). Por su parte, el medio YPHSM, si bien no es selectivo, mantiene un 80% de

estabilidad del plásmido YEpFLAG-1 por 96 h (Álvarez-Cao et al., 2019), lo que favorece la expresión de proteínas en cultivos de varios días.

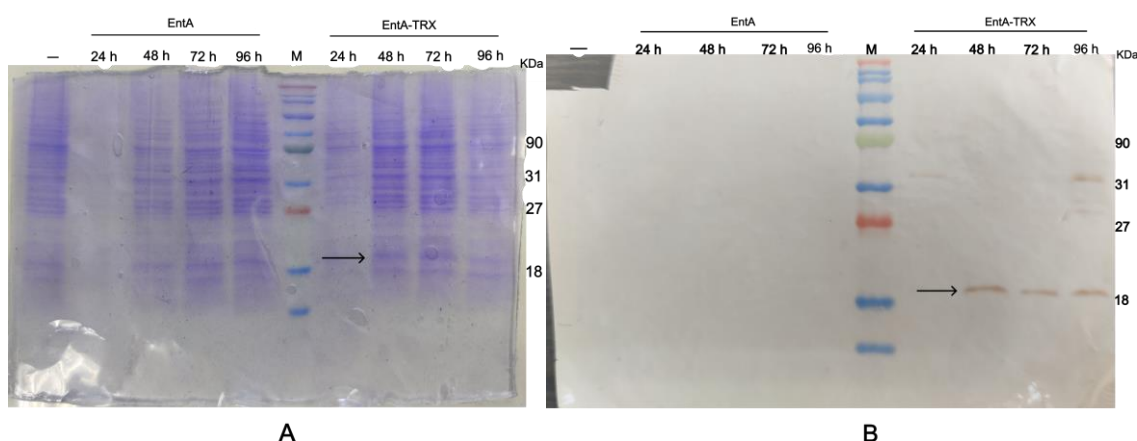
A partir de los resultados de esta evaluación, se seleccionó el medio YPHSM para continuar con la expresión de bacteriocinas.

#### 4.2.2 Expresión EntA y EntA-TRX en medio YPHSM

Se evaluó la expresión de EntA-TRX y de EntA en medio líquido YPHSM (1,5% glucosa, 3% glicerol). La presencia de EntA y EntA-TRX en sobrenadante y pellet celular obtenidos a diferentes tiempos de cultivo se evaluó mediante las técnicas de SDS-PAGE y Western blot, con anticuerpos anti His-tag. Un clon de *S. cerevisiae* transformado con el vector YEpFLAG-1 vacío fue empleado como control negativo de expresión.

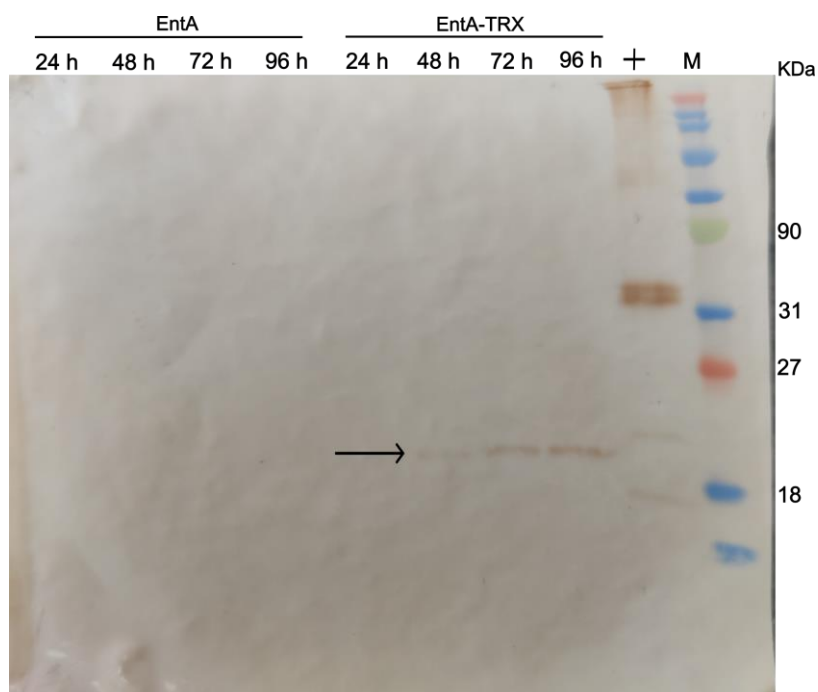
La Figura 6A muestra los resultados de la expresión en pellet de las proteínas EntA y EntA-TRX. Para el caso de EntA-TRX, se observan bandas compatibles con el tamaño de peso esperado (18,4 KDa) a las 48, 72 y 96 h de cultivo, las cuales fueron confirmadas mediante Western blot (Figura 6B). La detección de bandas de mayor tamaño correspondientes al péptido señal sin procesar (Factor  $\alpha$ -EntA-TRX) en el pellet de YPHSM, indica que el sistema de secreción puede haber tenido limitaciones en el procesamiento y liberación completa de la proteína al medio extracelular.

Con respecto a EntA, no se observaron bandas compatibles con el peso esperado en ninguna de las muestras de pellet evaluadas por SDS-PAGE y Western blot (Figura 6).



**Figura 6:** Expresión citoplasmática (pellet) de las proteínas EntA y EntA-TRX en medio YPHSM. A) Evaluación de la presencia de EntA y EntA-TRX mediante SDS-PAGE en pellet celular. B) Confirmación de identidad de las proteínas mediante Western blot. (-): colonia de *S. cerevisiae* transformada con el vector YEp-FLAG-1 vacío; M: *BLUltra Prestained Protein Ladder*.

Con respecto a la expresión extracelular de las proteínas, si bien no logró detectarse mediante SDS-PAGE, se observó la presencia de EntA-TRX a las 48, 72 y 96 h de cultivo mediante una técnica más sensible como Western blot (Figura 7). No se observaron bandas compatibles con EntA en los tiempos evaluados.



**Figura 7:** Expresión en sobrenadantes de EntA y EntA-TRX en medio YPHSM mediante Western blot. Se utilizó como control positivo (+) una proteína con etiqueta de histidinas disponible en el laboratorio y como marcador (M) marcador *BLUltra Prestained Protein Ladder*.

Los péptidos antimicrobianos suelen tener un alto contenido en aminoácidos básicos, lo que los hace susceptibles a la degradación proteolítica. La expresión de péptidos antimicrobianos como proteínas de fusión se ha propuesto como una estrategia para proteger a las células de la toxicidad y proteger a los péptidos de la proteólisis (Parachin et al., 2012). En el presente trabajo, la degradación proteolítica podría ser una de las causas de los niveles indetectables de EntA, en comparación con EntA-TRX. Además, los bajos o nulos niveles de proteínas detectados en sobrenadante podrían atribuirse a que la expresión extracelular implica una dilución de las proteínas secretadas en el medio, lo que dificulta la detección cuando no se alcanzan concentraciones elevadas.

#### 4.3. Actividad antimicrobiana de las bacteriocinas EntA y EntA-TRX

Con el objetivo de determinar el potencial antimicrobiano de las bacteriocinas, se emplearon dos metodologías experimentales: el ensayo de actividad en estría y el ensayo de difusión en agar.

##### 4.3.1. Ensayos de actividad antimicrobiana en estría

Dado que los cultivos en suspensión presentaron bajos niveles de expresión de ambas bacteriocinas, se propuso un protocolo basado en la inducción y co-cultivo con cepas indicadoras en medio agarizado. Esta técnica indica la presencia indirecta de la bacteriocina, mediante la detección de su actividad antimicrobiana a través de la

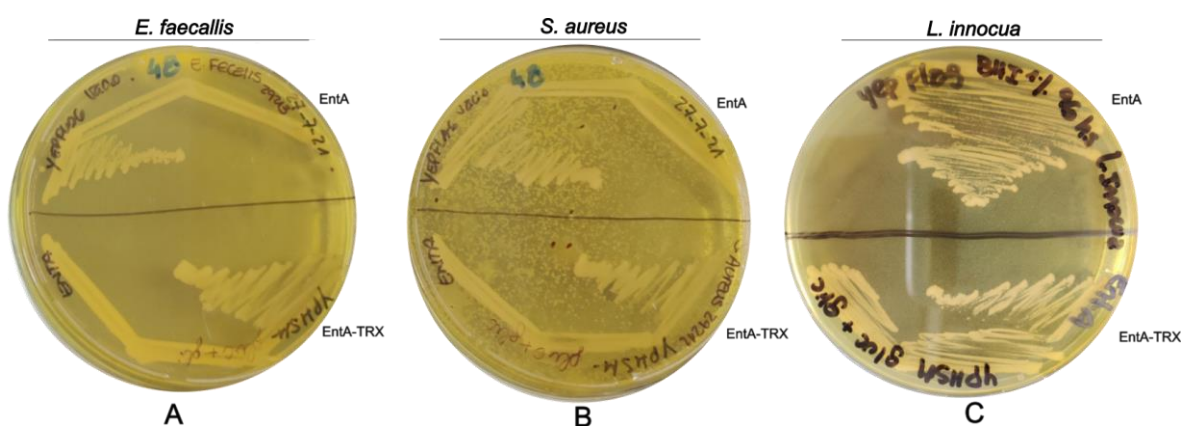
inhibición del crecimiento de cepas indicadoras. Para optimizar el procedimiento, se evaluaron distintas fuentes de carbono en el medio de inducción.

Se realizó la siembra en estría de los clones de *S. cerevisiae* portando las construcciones EntA-YEpFLAG-1 y EntA-TRX-YEpFLAG-1 en medios YPHSM agar suplementados con glicerol 4,5% o glucosa 1,5% + glicerol 3%. Para evaluar diferentes tiempos de expresión, se incubaron las placas a 24, 48 y 72 hs a 30°C.

El uso de glicerol como fuente de carbono se basa en las características del promotor *ADH2* presente en el vector YEpFLAG-1. Como mencionamos previamente, este promotor es reprimido por glucosa y se induce en presencia de etanol o glicerol. La condición glucosa 1,5% + glicerol 3%, permite un crecimiento celular inicial robusto y, posteriormente, la activación del promotor *ADH2* en presencia de glicerol. Por otro lado, el uso de glicerol como única fuente de carbono proporciona las condiciones de desrepresión necesarias para maximizar la expresión de las bacteriocinas, pero a expensas de un menor crecimiento celular (Price, 1997).

Sobre las estrías se cultivaron las cepas indicadoras *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 y *L. innocua* en medio Mueller-Hinton al 1%. Como control negativo de actividad antimicrobiana, se utilizó un clon de *S. cerevisiae* transformado con el vector YEpFLAG-1 vacío.

En ninguna de las condiciones evaluadas (medios de cultivo, tiempos de incubación) se observaron zonas de inhibición del crecimiento de las cepas indicadoras analizadas. En la Figura 8 se presentan imágenes representativas del ensayo para cada cepa estudiada.



**Figura 8.** Imágenes representativas de los ensayos de actividad antimicrobiana en estría. Se estudiaron las cepas A) *E. faecalis* ATCC 29212; B) *S. aureus* ATCC 29213; C) *L. innocua* ATCC 33090. Se co-cultivaron en estría clones de *S. cerevisiae* productores de EntA (mitad superior) y EntA-TRX (mitad inferior) y las cepas indicadoras.

En el caso de EntA, este resultado podría atribuirse principalmente a los bajos niveles de expresión, en concordancia con lo observado en los ensayos de inducción, donde no se detectaron señales compatibles con esta proteína. En un trabajo previo en el que se utilizó un sistema de expresión heteróloga en *S. cerevisiae* con un vector con un

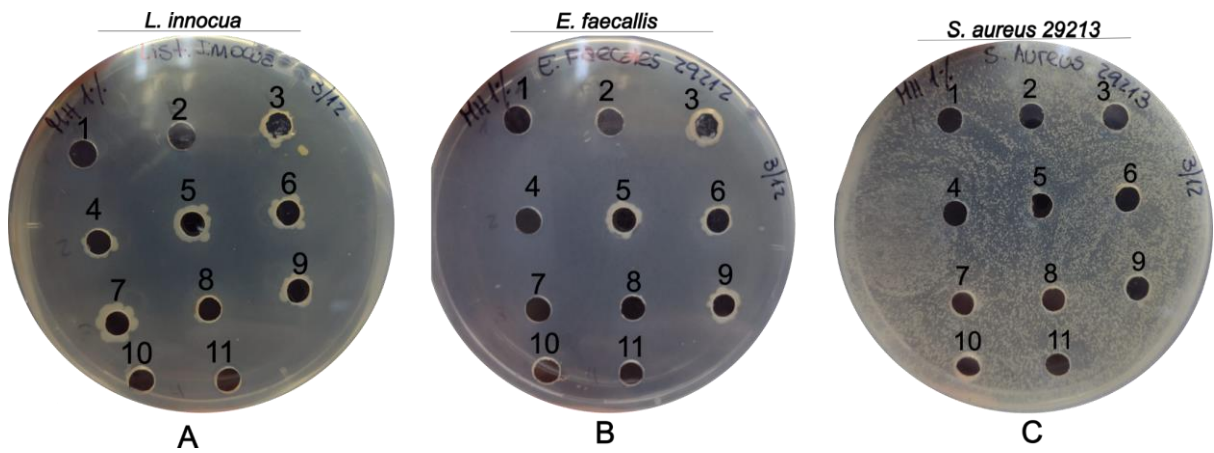
promotor constitutivo fuerte (GAPDH), se ha obtenido EntA secretada al sobrenadante con actividad antimicrobiana detectable (Rossouw et al., 2025). De manera similar, en *Pichia pastoris* se logró secretar EntA funcional bajo un promotor muy potente (AOX1) y con codones optimizados (Hu et al., 2014). Estos antecedentes podrían reforzar la hipótesis de que la ausencia de un efecto inhibitorio detectable en nuestros ensayos estaría más relacionada con limitaciones de la estrategia de expresión y secreción empleada que con una falta de actividad intrínseca de la bacteriocina.

En el caso de EntA-TRX, si bien en los experimentos de inducción se confirmó su expresión, la fusión con TRX podría haber afectado la conformación y, en consecuencia, la capacidad antimicrobiana de la bacteriocina. Este resultado coincide con lo reportado previamente en nuestro grupo, donde EntA-TRX producida en *E. coli* tampoco mostró inhibición significativa sobre cepas de *S. aureus* utilizadas como indicadoras (Grazziotto, 2016).

#### 4.3.2. Ensayos de actividad antimicrobiana por difusión en agar

En los ensayos de difusión en agar se evaluaron los sobrenadantes de cultivos productores de EntA y EntA-TRX a las 96 h de inducción (4.2.1), tanto en su forma cruda como luego de un paso de concentración mediante beads magnéticas (no mostrado). Dado que en los experimentos de inducción previos se observaron niveles muy bajos de expresión en el sobrenadante, o nulos en el caso de EntA, se incluyó esta estrategia de concentración con el objetivo de aumentar las chances de evidenciar actividad biológica. Como control negativo de actividad, se utilizó el sobrenadante de *S. cerevisiae* transformada con el vector YEpFLAG-1 vacío, mientras que como control positivo se empleó Nisina comercial.

No se observaron halos de inhibición de las cepas indicadoras *L. innocua*, *E. faecalis* y *S. aureus* en las muestras analizadas (Figura 9). Este resultado concuerda con lo previamente discutido: en el caso de EntA, la ausencia de actividad podría relacionarse con los bajos niveles de expresión alcanzados; mientras que en EntA-TRX, la fusión con TRX probablemente interfiere en la funcionalidad de la bacteriocina. Cabe señalar que en este experimento el control positivo con Nisina tampoco produjo halos de inhibición, por lo que la validez del ensayo queda limitada. Debido a las restricciones impuestas por la pandemia de COVID-19 (ASPO) mientras se ejecutaba este proyecto, no fue posible repetir este experimento para confirmar los resultados.



**Figura 9.** Evaluación de actividad antimicrobiana por difusión en agar. Se evaluaron las cepas (A) *L. innocua* ATCC 33090, (B) *E. faecalis* ATCC 29212 y (C) *S. aureus* ATCC 29213. Sobrenadantes concentrados purificados con beads: (1) YEp-FLAG-1; (2) EntA; (3) EntA-TRX. Sobrenadantes sin concentrar: (4) YEp-FLAG-1; (5) EntA; (6) EntA-TRX. (7-9) *flow through* EntA-TRX; (10-11): Nisina.

## 5. Conclusiones

- ❖ Se diseñó y sintetizó la secuencia de la Enterocina A optimizada para su expresión en *S. cerevisiae* con fusión a una etiqueta de histidina para facilitar su purificación e identificación.
- ❖ Se obtuvieron clones de *S. cerevisiae* positivos para la construcción EntA-YEpFLAG-1.
- ❖ Se logró expresar la proteína fusión EntA-TRX en niveles detectables dentro del pellet de cultivos de *S. cerevisiae* y su sobrenadante en el medio complejo YPHSM, pero no así para en caso de EntA.
- ❖ No se observó actividad antimicrobiana *in vitro* de EntA y EntA-TRX frente a las cepas indicadoras evaluadas.
- ❖ Se requieren ensayos adicionales para mejorar la estrategia de expresión y purificación de las bacteriocinas, para poder evaluar más fehacientemente el efecto antimicrobiano de las mismas.
- ❖ Se incorporó la metodología de clonado por recombinación homóloga en *S. cerevisiae*, la cual, más allá de los objetivos específicos de este trabajo, podrá ser aplicada en nuestro laboratorio en la producción de otras moléculas recombinantes, destinadas a diversas finalidades.

## **6. Bibliografía**

Adrio, JL, Demain, AL Biotecnología fúngica. *Int Microbiol* 6 , 191-199 (2003).  
<https://doi.org/10.1007/s10123-003-0133-0>

Álvarez-Cao, ME., Cerdán, ME., González-Siso, MI. (2019). Optimización de la producción de  $\alpha$ -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* y su aplicación en la degradación de oligosacáridos de la familia de la rafinosa. *Microb Cell Fact* 18. doi: 10.1186/s12934-019-1222.

Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(7), 2939-2951. doi: 10.1007/s00253-016-7343-9

Ankaiah, D., Esakkiraj, P., Perumal, V., Ayyanna, R., & Venkatesan, A. (2017). Probiotic characterization of *Enterococcus faecium por1*: cloning, over expression of Enterocin-A and evaluation of antibacterial, anti-cancer properties. *Journal of Functional Foods*, 38, 280-292. doi:10.1016/j.jff.2017.09.034

Armendáriz, C., Amores, E. M., & Zhunio, B. (2012). Análisis de las tres enfermedades más comunes producidas por la mala manipulación de alimentos en el sector de Cotacollao. *RICIT: Revista Turismo, Desarrollo y Buen Vivir*, (4), 45-57.

Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L. S., Hugas, M., Garriga, M., & Nes, I. F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1676-1682. doi: 10.1128/aem.62.5.1676-1682.1996

Bali, V., Panesar, PS, Bera, MB y Kennedy, JF (2016). Bacteriocins: Recent Trends and Potential Applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56 (5), 817-834. doi: 10.1080/10408398.2012.729231

Basanta, A., Herranz, C., Gutiérrez, J., Criado, R., Hernández, P. E., & Cintas, L. M. (2009). Development of bacteriocinogenic strains of *Saccharomyces cerevisiae* heterologously expressing and secreting the leaderless enterocin L50 peptides L50A and L50B from *Enterococcus faecium* L50. *Applied and environmental microbiology*, 75(8), 2382-2392. doi:10.1128/AEM.01476-08

Becerra, M., Díaz Prado, S., Cerdán, E. et al. Secreción heteróloga de  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* por mutantes supersecretorios de *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* 23 , 33-40 (2001).  
<https://doi.org/10.1023/A:1026795706520>

Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry* (4th ed.). Springer.

Berkowitz, D. E., Malagié, M., Jensen, G., Smith, J. G. D. L., Svagr, J. J., Spiegel, J., & Pant, N. M. (2012). *Industria alimentaria*. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT).

Borrero, J., Jiménez, J. J., Gútiéz, 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. *Journal of biotechnology*, 156(1), 76-86. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.07.038

Borrero, J., Kunze, G., Jiménez, J. J., Böer, E., Gútiéz, L., Herranz, C., ... & Hernández, P. E. (2012). Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, and *Arxula adeninivorans*. *Applied and environmental microbiology*, 78(16), 5956-5961. doi: 10.1128/AEM.00530-12

Casado López, S., Sietiö, O. M., Hildén, K., de Vries, R. P., & Mäkelä, M. R. (2016). Homologous and heterologous expression of basidiomycete genes related to plant biomass degradation. In *Gene expression systems in fungi: advancements and applications* (pp. 119-160). Cham: Springer International Publishing. Doi: 10.1007/978-3-319-27951-0\_5

Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777–788. doi: 10.1038/nrmicro1273

Davidson, P. M., Taylor, T. M., & Schmidt, S. E. (2013). *Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds*. In M. P. Doyle & R. L. Buchanan (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (4th ed., pp. 765-801). Doi:10.1128/9781555818463.ch30

FAO. (2020). Food safety and quality. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/food-safety>

Faye, T., Brede, D. A., Langsrud, T., Nes, I. F., & Holo, H. (2002). An antimicrobial peptide is produced by extracellular processing of a protein from *Propionibacterium jensenii*. *Journal of bacteriology*, 184(13), 3649-3656. doi: 10.1128/JB.184.13.3649-3656.2002

Field, D., Hill, C., Cotter, P. D., & Ross, R. P. (2010). The dawning of a ‘Golden era’ in lantibiotic bioengineering. *Molecular microbiology*, 78(5), 1077-1087. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07406.x

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1–2), 51–70. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001

Gálvez, A., López, R. L., Abriouel, H., Valdivia, E., & Omar, N. B. (2008). Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical reviews in biotechnology*, 28(2), 125-152. DOI: [10.1080/07388550802107202](https://doi.org/10.1080/07388550802107202)

García. (2019). GM Consulting: Los riesgos químicos en la cadena alimentaria. Sevilla, España. Recuperado de <https://www.gmconsulting.pro/categoria-industria-alimentaria/los-riesgos-quimicos-en-la-cadena-alimentaria>.

Grazziotto, L. (2016). Expresión heteróloga de Enterocina A en *Escherichia coli* [Tesina de grado, Universidad Nacional del Litoral]. Repositorio Institucional UNL.

Guryanova, S. V. (2023). Bacteriocins and their potential applications in food and medicine. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 59(3), 245–258. doi: [10.3390/life13071521](https://doi.org/10.3390/life13071521)

Hu, X., Mao, R., Zhang, Y., Teng, D., Wang, X., Xi, D., ... & Wang, J. (2014). Biotechnical paving of recombinant enterocin A as the candidate of anti-*Listeria* agent. *BMC microbiology*, 14(1), 1-11. DOI: [10.1186/s12866-014-0220-8](https://doi.org/10.1186/s12866-014-0220-8)

Jaouani, I., Abbassi, M. S., Alessandria, V., Bouraoui, J., Ben Salem, R., Kilani, H., & Cocolin, L. (2014). High inhibition of *Paenibacillus larvae* and *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus* isolated from different sources in Tunisia and identification of their bacteriocin genes. *Letters in applied microbiology*, 59(1), 17-25. doi: [10.1111/lam.12239](https://doi.org/10.1111/lam.12239)

Jiménez, J. J., Borrero, J., Gútiérrez, L., Arbulu, S., Herranz, C., Cintas, L. M., & Hernández, P. E. (2014). Use of synthetic genes for cloning, production and functional expression of the bacteriocins enterocin A and bacteriocin E 50-52 by *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *Molecular biotechnology*, 56(6), 571-583. doi: [10.1007/s12033-014-9731-7](https://doi.org/10.1007/s12033-014-9731-7)

Johnson, E. M., Jung, D. Y. G., Jin, D. Y. Y., Jayabalan, D. R., Yang, D. S. H., & Suh, J. W. (2018). Bacteriocins as food preservatives: Challenges and emerging horizons. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(16), 2743-2767. doi: [10.1080/10408398.2017.1340870](https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1340870)

Joska, T. M., Mashruwala, A., Boyd, J. M., & Belden, W. J. (2014). A universal cloning method based on yeast homologous recombination that is simple, efficient, and versatile. *Journal of microbiological methods*, 100, 46-51. doi: [10.1016/j.mimet.2013.11.013](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.11.013)

Michael Lee, K., & DaSilva, N. A. (2005). Evaluation of the *Saccharomyces cerevisiae* ADH2 promoter for protein synthesis. *Yeast*, 22(6), 431-440. doi: [10.1002/yea.1221](https://doi.org/10.1002/yea.1221).

Nguyen, TPA, Nguyen, TTM, Nguyen, NH et al. Aplicación del sistema de presentación en superficie de levadura en la expresión de la pediocin PA-1

recombinante en *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol* 65, 955–961 (2020).  
<https://doi.org/10.1007/s12223-020-00804-6>

Nes, I. F., Yoon, S. S., & Diep, D. B. (2007). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. *Food Science and Biotechnology*, 16(5), 675-690.

Nielsen, J. (2019). Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory. *Biotechnol J*, 14(9):e1800421. doi: 10.1002/biot.201800421.

Parachin NS, Mulder KC, Viana AA, Dias SC, Franco OL. (2012) Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides*. 38(2):446-56. doi: 10.1016/j.peptides.2012.09.020

Preciado, G. M., Escalante Minakata, P., Castro, J. A. O., Junquera, V. I., Chávez, J. A. M., González, C. N. A., & Herrera, R. R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 21(59), 64-70.  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67430113008>

Presnyak V, Alhusaini N, Chen YH, Martin S, Morris N, Kline N, Olson S, Weinberg D, Baker KE, Graveley BR, Collier J. Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell*. (2015) Mar 12;160(6):1111-24. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.029.

Price, V.L. (1997). Inducible Expression Cassettes in Yeast: ADH2. In: Tuan, R.S. (eds) Recombinant Gene Expression Protocols. *Methods in Molecular Biology*, vol 62. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-480-1:149>

Puig Peña, Y., Leyva Castillo, V., Robert Maceo, B. A., & Pérez Muñoz, Y. (2013). Agentes bacterianos asociados a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en La Habana, 2006-2010. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 51(1), 74-83. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223227554008>

Punt, P. J., van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J., & van den Hondel, C. (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology*, 20(5), 200–206. doi: 10.1016/s0167-7799(02)01933-9.

Putri, D. A., Lei, J., Rossiana, N., & Syaputri, Y. (2024). Biopreservation of food using bacteriocins from lactic acid bacteria: Classification, mechanisms, and commercial applications. *International Journal of Microbiology*, 2024(1), 8723968. <https://doi.org/10.1155/ijm/8723968>

Rivarosa, F., Chiaraviglio, M., Eberhardt MF., Zbrun MV., Camussone, C. (2021). Informe final del proyecto “Obtención de bacteriocinas recombinantes en *Saccharomyces cerevisiae* y evaluación de su actividad frente a organismos productores de Enfermedades Transmitidas por Alimentos.” [Informe final no publicado]. Universidad Nacional de Rafaela

- Romanos, M. A., Scorer, C. A., & Clare, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 8(6), 423–488. doi: 10.1002/yea.320080602.
- Rossouw, M., Coetzee, G., Cripwell, R.A. et al. Expression of Enterocin A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Probiotics & Antimicro. Prot.* (2025). <https://doi.org/10.1007/s12602-025-10686-0>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sierra, L., Montoya, O., & Ciro, H. J. (2013). Evaluación de la nisina como sustancia inactivadora de *Bacillus licheniformis* en el extracto líquido de café. *Revista MVZ Córdoba*, 18(supl), 3715-3721. doi: 10.21897/rmvz.139
- Silva, C. C., Silva, S. P., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in microbiology*, 9, 594. doi: 10.3389/fmicb.2018.00594
- Van Reenen, C. A., Chikindas, M. L., Zyl, W. H., & Dicks, L. M. T. (2003). Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol*, 81(1), 29-40. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00164-2
- WHO. (2025). Foodborne diseases burden epidemiology reference group. World Health Organization. <https://www.who.int>