

El operón *thnRDE* de *B. thuringiensis* le brinda inmunidad a *Lactococcus lactis* contra thurincina H

The *thnRDE* operon from *B. thuringiensis* provides immunity to *Lactococcus lactis* against thurincin H

José E. Barboza-Corona¹, Mario Alberto Núñez Valle¹, Gilberto Velázquez Juárez², Luz Edith Casados Vázquez^{1*}

¹Departamento de Alimentos. Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida. Universidad de Guanajuato. México

² Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara. México.

*Autor de correspondencia

Cátedra Conacyt

edith.casados@ugto.mx

Resumen

Lactococcus lactis es una bacteria ácido-láctica de gran importancia para la industria de los alimentos. Es una cepa segura, y por tanto se han diseñado sistemas para la expresión de proteínas recombinantes de interés biotecnológico. Dentro de las proteínas con importancia biotecnológica se encuentra la bacteriocina thurincina H, esta tiene muchas características favorables para ser empleada como bioconservador en alimentos. Se ha reportado que necesita al menos nueve genes para su biosíntesis, dentro de estos están los genes *thnRDE* que brindan inmunidad a la cepa productora nativa. El objetivo de este trabajo fue integrar estos tres genes a la cepa *L. lactis* para hacerla resistente a thurincina H y poder producirla en un futuro. Para lograrlo, se clonaron los marcos abiertos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) de los genes *thnRDE* en un vector para *L. lactis*, y se transformaron en la cepa sensible. Se logró obtener una cepa de *L. lactis* resistente a thurincina H que podrá ser empleada para su producción heteróloga segura.

Palabras clave: Inmunidad; thurincina H; *Lactococcus lactis*.

Abstract

Lactococcus lactis is a lactic acid bacterium of great importance for the food industry. Due to *L. lactis* safety status, systems have been designed for the expression of recombinant proteins of biotechnological interest. A peptide with biotechnological importance is the bacteriocin thurincin H, which has many favorable characteristics to be used as a bioconservative in food. It has been reported that it needs at least nine genes for its biosynthesis, within these, the *thnRDE* genes provide immunity to the native producer strain. The objective of this work was to integrate these genes into the *L. lactis* strain to make it resistant to thurincin H and to be able to produce it in the future. To achieve this, the *thnRDE* genes were cloned into a vector for *L. lactis* and transformed into the sensitive strain. It was possible to obtain a strain of *L. lactis* resistant to thurincin H that can be used for its safe heterologous production.

Keywords: Immunity; thurincin H; *Lactococcus lactis*.

Recibido: 20 de agosto de 2021

Aceptado: 10 de diciembre de 2021

Publicado: 25 de mayo de 2022

Cómo citar: Barboza Corona, J. E., Núñez Valle, M. A., Velázquez Juárez, G., & Casados Vázquez, L. E. (2022). El operón *thnRDE* de *B. thuringiensis* le brinda inmunidad a *Lactococcus lactis* contra thurincina H. *Acta Universitaria* 32, e3435. doi. http://doi.org/10.15174. au.2022.3435

Introducción

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un amplio y heterogéneo grupo de microorganismos que se han empleado para la conservación de los alimentos (Stiles *et al.*, 1997). El uso de estos microorganismos en los alimentos ha evolucionado, pasaron de ser utilizados en alimentos fermentados tradicionalmente a ser parte de procesos de fermentación controlada para la producción de metabolitos relevantes para la industria y su uso como probióticos que sirven como fábrica de metabolitos de interés biotecnológico (Rezac *et al.*, 2018). Dentro de este grupo heterogéneo de bacterias se encuentra *Lactococcus lactis*, una bacteria Gram positiva, anaeróbica facultativa y no formadora de esporas. *L. lactis* es la especie mesófila predominante en la acidificación, dado que imparte sabor a ciertos productos lácteos fermentados (Cavanagh *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2017). Se ha denominado cepa probiótica debido a que es una bacteria segura y a que se han realizado estudios que han mostrado su actividad inmunomoduladora, anticancerígena, antioxidante y antimicrobiana (Commane *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2013; Kimoto *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2011; Yerlikaya 2019).

Otra característica importante sobre *L. lactis* es que se ha empleado como cepa de expresión heteróloga de proteínas recombinantes (Jørgensen *et al.*, 2014; Morello *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2017). Uno de los sistemas empleados para la producción de estas proteínas es el sistema de expresión de genes controlado por nisina (NICE, por sus siglas en inglés), en donde utilizan los genes del sistema de censado de nisina y el promotor inducible con nisina (pNis) para lograr una sobreexpresión de las proteínas de interés (Kuipers *et al.*, 1995). Además, este sistema incluye vectores que tienen como marcador de selección de grado alimenticio como lactosa y D-alanina para que tales cepas y sus productos puedan ser usadas en la industria alimentaria (Platteeuw *et al.*, 1996). El empleo de estas cepas nos permite generar proteínas recombinantes con interés biotecnológico. Thurincina H es una bacteriocina producida por *Bacillus thuringiensis*, tiene muchas características favorables para ser considerada una proteína de interés; entre ellas destacan que tiene un amplio espectro de actividad contra diferentes bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, algunos de ellos contaminadores de alimentos; además, esta bacteriocina es activa en pH, que va de muy ácido hasta alcalino (pH 3.0-9.0), una ventaja con respecto a nisina, la cual actúa a pH ácido mayormente (Casados-Vázquez *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2009; Oros-Flores *et al.*, 2018). También es resistente a altas temperaturas (hasta 80 °C) y a la liofilización (datos no publicados). Sin embargo, aunque tenga todas estas ventajas, no se puede emplear en alimentos debido a que la cepa productora no es reconocida como segura, a diferencia de *L. lactis* productora de nisina. Para la biosíntesis de thurincina H se necesitan al menos nueve genes que se encuentran integrados en un clúster denominado ThurH (*thnP*, *thnE*, *thnD*, *thnR*, *thnA1*, *thnA2*, *thnA3*, *thnB*, *thnT*, *thnI*), el cual hemos caracterizado previamente en nuestro laboratorio. Dentro de este clúster genético hay un pequeño operón constituido por los genes *thnR*, *thnD* y *thnE*, este es el responsable de brindar inmunidad a la cepa productora (Casados-Vázquez *et al.*, 2018). Dado que nuestra proyección final es producir thurincina H en *L. lactis* -y esta cepa resultó ser sensible a ella-, es necesario buscar la manera de hacerla resistente. El objetivo de este trabajo fue generar una cepa de *L. lactis* resistente a thurincina H para que posteriormente podamos producir este péptido sin afectar a nuestra cepa heteróloga productora. Para conseguirlo, se generó una construcción donde se integraron los genes *thnR*, *thnD* y *thnE* en un vector con origen de replicación para *L. lactis* bajo el control del promotor pNis. La construcción generada brindó inmunidad a la cepa *L. lactis* incluso a concentraciones de 0.8 µg/ml; la cepa silvestre es sensible desde 0.2 µg/ml. Estos resultados son favorecedores porque se consiguió brindarle inmunidad a la cepa *L. lactis* contra thurincina H, y este hallazgo es importante dado que podría emplearse *L. lactis* resistente para la producción de thurincina H.

Materiales y métodos

Cepas y medios de cultivo

Lactococcus lactis NZ3900 es una cepa derivada de *L. lactis* subsp. *cremoris*. Esta cepa se creció a 30 °C sin agitación por 16 h en medio M17 suplementado con glucosa a una concentración final de 0.5% para fines de propagación y en medio Elliker (triptona 20 g/l, extracto de levadura 2.5 g/l, NaCl 4 g/l, acetato de sodio anhidro 0.5 g/l, ácido ascórbico 0.5 g/l) suplementado con lactosa a una concentración final de 0.5% para seleccionar las transformantes.

Bacillus cereus 183, *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* y *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* fueron crecidas en TSB (caldo soya tripticaseína) o TSA (agar soya tripticaseína) a 28 °C con agitación a 200 rpm durante 16 h.

Elaboración de construcciones

Para la clonación del clúster ThurH (integrado por los genes: *thnP*, *thnE*, *thnD*, *thnR*, *thnA1*, *thnA2*, *thnA3*, *thnB*, *thnT* y *thnI*), en el vector pNZ8149 se partió de la construcción pHT/ThurH, esta construcción contiene los 10 genes clonados en el vector pHT3101 (Oros-Flores *et al.*, 2018). Se amplificaron dichos genes (que corresponden al clúster completo) con los oligonucleótidos:

- ThnPFw/SpeI (5´ GACTAGTTTATTGGGAAATCGCTTTATAGACATC 3´)
- ThnIRv/SpeI (5´ GACTAGTCTATATTTCTGAAGTATACAA 3´)

Se utilizó una polimerasa de alta fidelidad de acuerdo con las especificaciones del proveedor. El fragmento amplificado de 8141 bp y el vector pNZ8149 se digirieron con la enzima SpeI (NEB). El vector, además de ser digerido, también se desfosforiló con CIP (Calf Intestinal Phosphatase, NEB). Los fragmentos se ligaron con la enzima T4 DNA ligasa (NEB) en proporción 1:2 vector, inserto. La reacción de ligación se transformó en *L. lactis* NZ3900 electrocompetentes, y se seleccionaron colonias crecidas en Elliker con lactosa 0.5%. Las colonias seleccionadas se crecieron en medio líquido Elliker con lactosa 0.5%, y se extrajo DNA plasmídico (Birnboim & Doly, 1979). El DNA fue digerido con la enzima SpeI para identificar a las clonas positivas que además se confirmaron por PCR; la construcción completa se nombró pNZ/ThurH. A partir de esta última se elaboró la construcción pNZ/RDEP, la cual contiene al operón *thnRDE* (tres genes implicados en la inmunidad) y al gen *thnP*; los cuatro genes fueron clonados en el vector pNZ8149 siguiendo el mismo procedimiento que para pNZ/ThurH. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación fueron:

- ThnRRv/PstI (5´ CAAAAGTGCAGTCATTTTTCATTCCTCCTC 3´)
- ThnPFw/PstI (5´ CAAAAGTGCAGTTATTGGGAAATCGCTTTAT 3´)

El amplicón de 3502 bp y el vector fueron digeridos con la enzima PstI (NEB), el vector además fue desfosforilado. La ligación se realizó en una proporción de 1:5 (vector, inserto), y las colonias positivas se verificaron por digestión con la misma enzima y por PCR. Las construcciones transformadas en la cepa *L. lactis* NZ3900 fueron conservadas en glicerol al 10% a -80 °C.

Concentración mínima inhibitoria de thurincina H contra cepas del género *Bacillus*

Antes de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra *L. lactis*, se determinó la CMI contra las cepas *Bacillus cereus* 183, *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* y *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry-B, esta última transformada con pHT/ThurH. Se dejaron precultivos de cada cepa a partir de una colonia individual en medio TSB, se cultivaron durante 16 h a 28 °C con 200 rpm de agitación. Al día siguiente, los precultivos se diluyeron a una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0.1 en un volumen de 200 µl y se les adicionaron 50 µl de thurincina H en concentraciones 0 µg/ml, 0.2 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.9 µg/ml, 1.9 µg/ml, 3.8 µg/ml, 7.5 µg/ml y 15 µg/ml. Las cepas se incubaron a 28 °C con agitación y se tomaron lecturas de DO₆₀₀ cada hora en un lector de placas (Synergy HTX, Biotek). El experimento se realizó por triplicado.

Concentración mínima inhibitoria de thurincina H contra *L. lactis* NZ3900

Una colonia de las cepas *L. lactis* NZ3900 silvestre, *L. lactis* transformada con pNZ8149 (vector vacío), pNZ/ThurH y pNZ/RDEP se sembraron en Elliker con lactosa 0.5%, y se incubaron sin agitación durante 16 h a 30 °C. Al día siguiente los precultivos se diluyeron a una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0.1 en un volumen de 200 µl y se les adicionaron 50 µl de thurincina H en concentraciones 0 µg/ml, 0.2 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.8 µg/ml. Las cepas se incubaron a 28 °C sin agitación en un lector de placas (Synergy HTX, Biotek) y se tomaron lecturas de DO₆₀₀ cada dos horas durante 24 horas. El experimento se realizó por triplicado. Es importante mencionar que el ensayo se realizó sin nisina como inductor.

Resultados

Se logró la clonación del clúster ThurH dentro del vector pNZ8149 entre sitios SpeI. El clúster ThurH quedó integrado por los genes *thnP*, *thnE*, *thnD*, *thnR*, *thnA1*, *thnA2*, *thnA3*, *thnB*, *thnT* y *thnI* (Figura 1A). Es importante mencionar que este es un clúster que contiene una región promotora divergente entre los genes *thnR* y *thnA1*, lo que significa que los genes *thnRDEP* están codificados en la cadena *menos* del DNA, regulados por el promotor pThnR, y los genes *thnA1A2A3BTI* están codificados en la cadena *más*, regulados por el promotor pThur. Puesto que estos genes se clonaron en el mismo orden en que se encuentran en *B. thuringiensis*, el promotor pNis del vector pNZ8149 no será funcional para esta construcción (Figura 1B). La construcción pNZ/RDEP sí quedó regulada bajo el promotor pNis, y el orden de los genes quedó en sentido transcripcional correcto (Figura 1C).

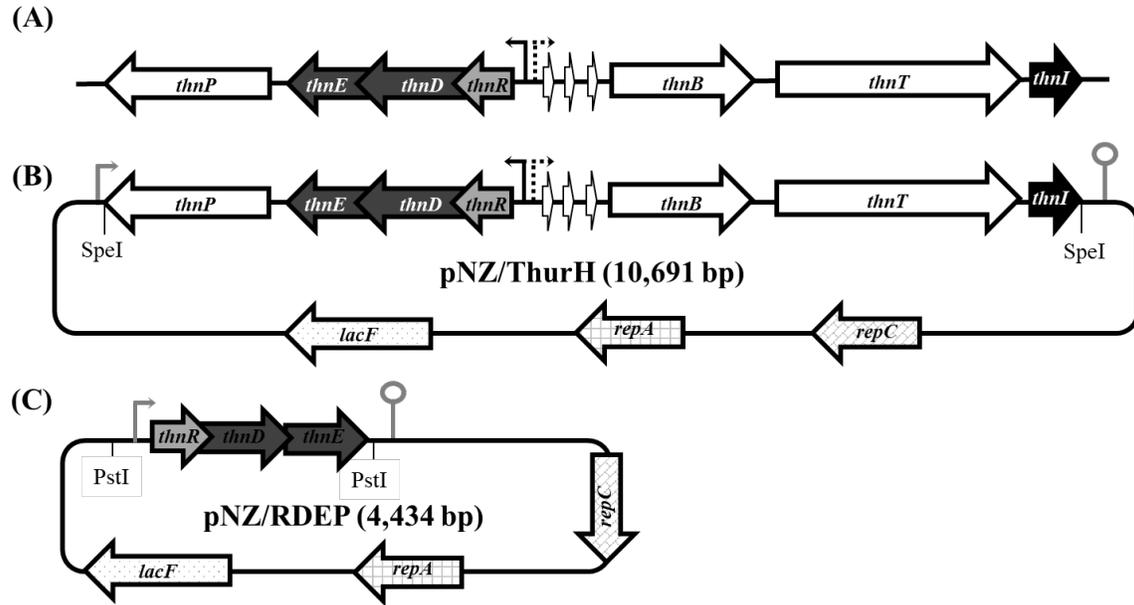


Figura 1. Esquema de las construcciones pNZ/ThurH y pNZ/RDEP. a) Orden de los genes del clúster ThurH en *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni*; b) Acomodo de los genes del clúster ThurH clonados en el vector pNZ8149; c) Acomodo de los genes *thnRDEP* en el vector pNZ8149. Las flechas dobladas indican los promotores, el gris corresponde a pNis, el negro a pThnR y el punteado a pThur. La paleta ilustra el terminador. Se indican los sitios usados para la clonación. Las flechas lacF, rep A y repC corresponden al marcador de selección de grado alimenticio, al gen de replicación A y C, respectivamente.

Fuente: Elaboración propia.

Antes de realizar las pruebas de inmunidad de la cepa *L. lactis* transformada, se decidió determinar la CMI para cepas del género *Bacillus*, con el propósito de establecer la cantidad de thurincina H, que se usará en el ensayo contra *L. lactis*. Se utilizaron *B. cereus* 183 por ser la cepa indicadora modelo, una cepa sensible que se usa cotidianamente para determinar actividad antimicrobiana de thurincina H. Por su parte, *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* es la cepa nativa productora de thurincina H, esta cepa contiene el clúster ThurH completo y es inmune a su bacteriocina. Además, se incluyó *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry-B (cepa curada de plásmidos naturales) transformada con pHT/ThurH, la cual también produce thurincina H y es inmune a esta porque la transformamos con la maquinaria completa; ya que, al estar en plásmido, contiene más copias que la cepa silvestre.

Para el ensayo se partió de una concentración de 15 µg/ml de thurincina H, y a partir de esta se hicieron diluciones seriadas hasta 0.2 µg/ml. Se observó que *B. cereus* 183 se inhibió completamente con 1.8 µg/ml (Figura 2a), ya que es una cepa muy sensible y se vio afectada incluso en concentraciones bajas como 0.23 µg/ml, 0.47µg/ml y 0.94 µg/ml. Aunque el efecto fue entre las horas 4 a 7, posterior a esto se recuperó el crecimiento y alcanzó la misma DO de la cepa silvestre. A excepción de la que tuvo el tratamiento a 0.94 µg/ml, esta alcanzó una DO de 0.48 ± 0.07 , mientras que la silvestre llegó a una DO de 0.65 ± 0.02 (Tabla 1).

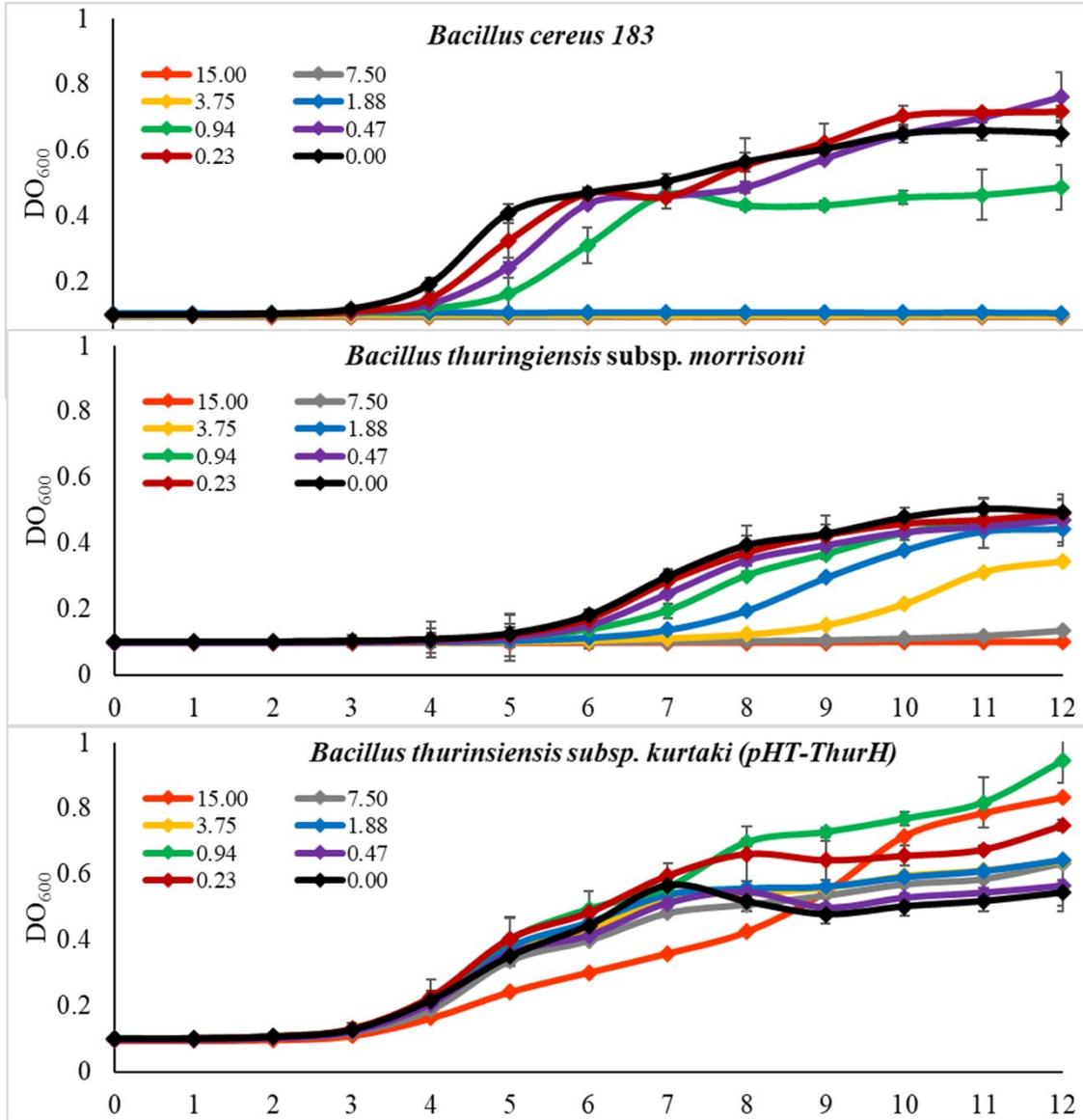


Figura 2. Gráficos de concentración mínima inhibitoria de thurincina H contra cepas del género *Bacillus*. *B. cereus* 183 es una cepa sensible a thurincina H; *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* es la cepa productora natural de thurincina H y *B. Thuringiensis* subsp. *kurstaki* está transformada con el clúster pThur. Las concentraciones de thurincina H se especifican en el inserto, están en µg/ml. Los ensayos se realizaron por triplicado.
Fuente: Elaboración propia.

Para el caso de la cepa silvestre *B. thuringiensis* subsp. *Morrisoni*, la CMI fue 7.5 µg/ml (Figura 2b), y la cepa de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* fue la más resistente, logrando crecer en todas las concentraciones, incluso con 15 µg/ml. Con esta concentración apenas disminuyó su crecimiento en un 50% con respecto al control sin thurincina H (Figura 2c). Con estos resultados se decidió usar tres concentraciones de thurincina H para calcular la CMI en *L. lactis* NZ3900. La cepa transformada con el vector vacío (pNZ8149) se inhibió completamente con la concentración de 0.4 µg/ml y resultó ser incluso más sensible a thurincina H que *B. cereus* 183 (Figura 3a). La cepa que contenía el operón de inmunidad (pNZ/RDEP) adquirió resistencia, soportó la concentración más alta probada (0.8 µg/ml) y su fase exponencial se alargó, comenzando a las 8 horas y a las 20 horas de crecimiento alcanzó casi la misma DO que la cepa sin thurincina H. A la cepa sin thurincina H le tomó 12 horas llegar a la fase estacionaria con una DO máxima de 0.7 ± 0.05 ; a la cepa tratada con 0.8 µg/ml le tomo 20 horas alcanzar la misma densidad óptica (Tabla 1). Esto indica que los genes de inmunidad están siendo reconocidos por la cepa y expresados sin inducción con nisina.

Tabla 1. Efecto de las diferentes concentraciones de thurincina H sobre *Bacillus thuringiensis* y *Lactococcus lactis*.

Cepa	Thur en µg/ml	15	7.5	3.75	1.88	0.94	0.47	0.23	0.0
<i>Bacillus cereus</i> 183		0.095 ± 0.001	0.098 ± 0.001	0.099 ± 0.001	0.1 ± 0.001	0.49 ± 0.07	0.76 ± 0.01	0.72 ± 0.01	0.7 ± 0.02
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>		0.1 ± 0.001	0.13 ± 0.002	0.34 ± 0.01	0.44 ± 0.006	0.47 ± 0.02	0.47 ± 0.01	0.49 ± 0.008	0.49 ± 0.03
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> Cry-B/ pHT-ThurH		0.83 ± 0.05	0.63 ± 0.03	0.64 ± 0.03	0.64 ± 0.03	0.94 ± 0.1	0.56 ± 0.01	0.74 ± 0.12	0.60 ± 0.02
Cepa	Thur en µg/ml	0.8		0.4		0.2		0.0	
<i>Lactococcus lactis</i> /pNZ8149		0.002 ± 0.001		0.01 ± 0.002		0.15 ± 0.04		0.60 ± 0.02	
<i>Lactococcus lactis</i> /pNZ-ThurH		0.009 ± 0.002		0.14 ± 0.05		0.60 ± 0.01		0.64 ± 0.03	
<i>Lactococcus lactis</i> /pNZ-RDEP		0.61 ± 0.04		0.60 ± 0.01		0.63 ± 0.01		0.69 ± 0.08	

Nota. Los datos están reportados en densidad óptica a 600 nm. Para las cepas de *Bacillus* se midieron a las 12 h y para *Lactococcus lactis* a las 24 h. Thur: Thurincina H.

Fuente: Elaboración propia.

Además del operón de inmunidad, utilizamos el clúster completo para ver si *L. lactis* reconocía el promotor de *B. thuringiensis* y adquiría inmunidad. Cabe destacar que ambas construcciones (pNZ/RDEP y pNZ/ThurH) contienen los genes de inmunidad *thnRDE* entre otros, la diferencia es que en pNZ/RDEP están regulados por el promotor pNis y en pNZ/ThurH por el promotor nativo de *B. thuringiensis*. Se encontró que la cepa de *L. lactis* con pNZ-ThurH puede soportar un poco más que la cepa sin genes de inmunidad. Con la concentración de 0.2 µg/ml alcanzó una DO de 0.55 ± 0.01 , mientras que la cepa sin thurincina H llegó a 0.65 ± 0.03 (Tabla 1). Al parecer *L. lactis* puede hacer uso del promotor de *B.*

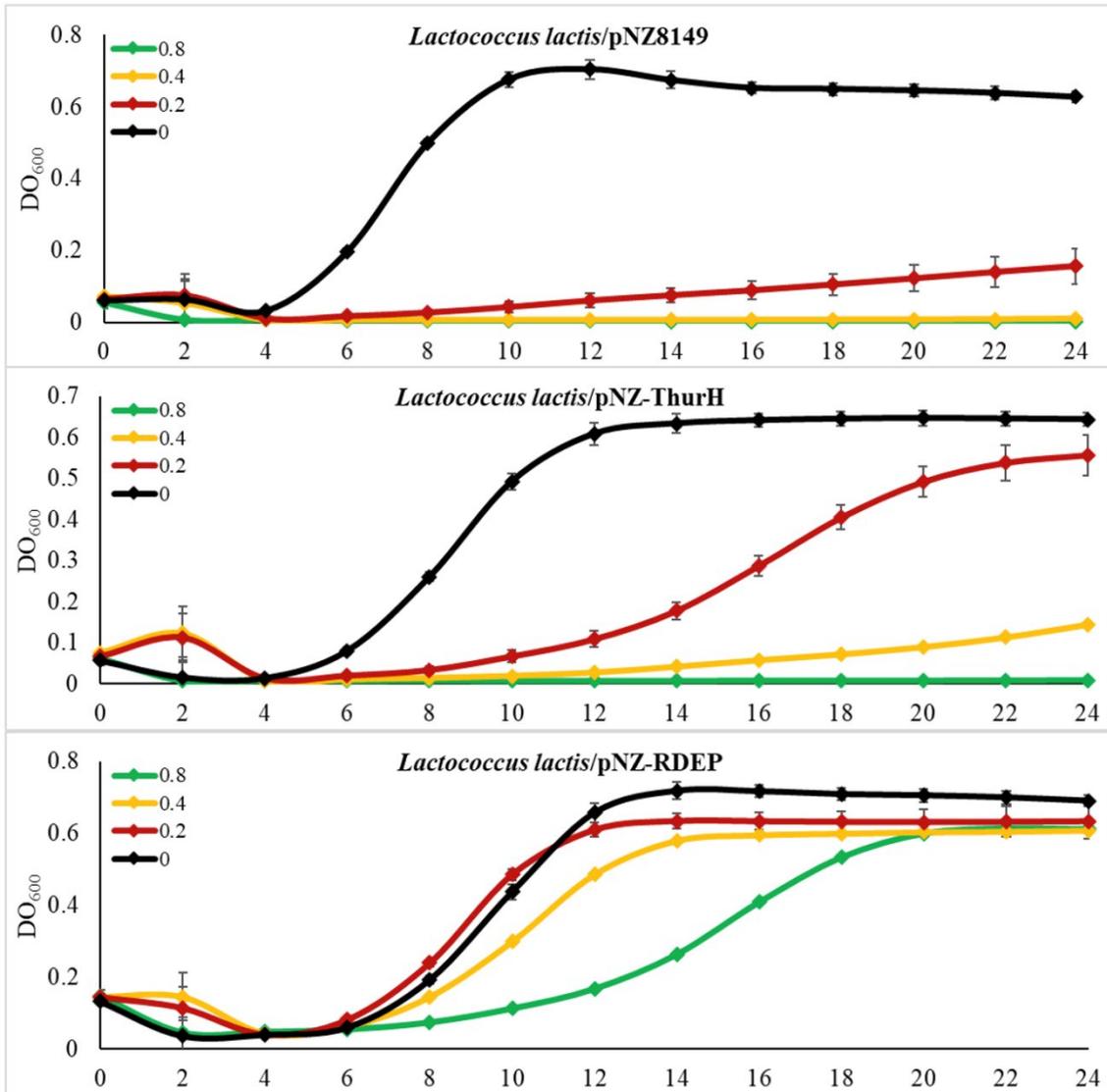


Figura 3. Gráficos de concentración mínima inhibitoria de thurincina H contra *L. lactis*. *L. lactis*/pNZ8149 es la cepa transformada con el vector vacío. *L. lactis* pNZ-ThurH está transformada con el clúster pThurH completo. *L. lactis* pNZ-RDEP esta transformada con los genes de inmunidad. Las concentraciones de thurincina H se especifican en el inserto, están en µg/ml. Los ensayos se realizaron por triplicado. Fuente: Elaboración propia.

Discusión

El clúster genético de thurincina H se encuentra dividido por un promotor divergente; en la cadena retardada del DNA tenemos a los genes *thnRDEP*, tres de ellos corresponden al operón de inmunidad (genes *thnRDE*), la regulación de estos genes la tiene el promotor pThnR (Figura 1a) (Casados-Vázquez *et al.*, 2018), la otra mitad de genes que corresponden a *thnA1A2A3BTI* se encuentran en la cadena más y están regulados bajo el promotor pThur (Figura 1a). Estos genes se clonaron en este mismo orden en el vector pNZ8149, y por la orientación de estos se perdió la funcionalidad del promotor pNis (Figura 1b). Se trabajó con esta construcción en *L. lactis* para probar si los promotores nativos de *B. thuringiensis* (pThnR y pThur) podían ser reconocidos por *L. lactis*.

Como se puede ver, en la Figura 1b están incluidos todos los genes necesarios para la biosíntesis de thurincina H; sin embargo, no se logró obtener actividad antimicrobiana cuando se utilizó esta cepa (datos no mostrados). Una explicación a esto sería que el promotor de *B. thuringiensis* no es reconocido por *L. lactis*. Para probar esto, se decidió someter a la cepa de *L. lactis* transformada con pNZ/ThurH a tratamiento con thurincina H. Si esta muestra resistencia a la bacteriocina, indicaría que reconoce el promotor de *B. thuringiensis*. Interesantemente, se encontró que sí ganó un poco de resistencia, lo que sugiere que los promotores de *B. thuringiensis* están siendo reconocidos por la maquinaria de transcripción de *L. lactis* y se están expresando los genes de inmunidad; aunque cabe señalar que la cepa tardó mucho tiempo en recuperarse, y esto puede atribuirse a que el promotor es débilmente reconocido y, en consecuencia, la cantidad de proteínas de inmunidad es baja. Esto justificaría por qué no logramos obtener thurincina H con esta construcción. La bacteria puede estar sintetizando thurincina H a tan bajas concentraciones que es difícil detectar actividad con los métodos empleados.

Otro hallazgo interesante fue que el promotor pNis funciona incluso sin nisina. Esto se descubrió al hacer el ensayo de inmunidad usando la construcción pNZ/RDEP, donde la cepa transformada con estos genes se sometió a tratamiento con thurincina H y resultó resistente a thurincina H en todas las concentraciones usadas. Este dato es interesante dado que el uso de nisina como inductor incrementa el costo de producción de las proteínas recombinantes, además de que muchas veces se necesita hacer una purificación para la eliminación de la nisina (Mierau & Kleerebezem, 2005). La generación de una cepa de *L. lactis* resistente a thurincina H sin adición del inductor nos da una ventaja en el camino hacia la producción de thurincina H recombinante en una cepa segura. Aunque los resultados en el ensayo de inmunidad nos sugieren que la cepa de *L. lactis* puede expresar los genes *thnRDE* sin inductor, debemos dejar claro que esa cantidad no es suficiente para obtener proteínas de interés biotecnológico en cantidades adecuadas, la inducción con nisina sería necesaria para incrementar la cantidad de proteína recombinante.

Se puede destacar lo siguiente: la fuga residual de la expresión de los genes *thnRDE* es suficiente para brindar inmunidad; sin embargo, si quisiéramos purificar estas proteínas con interés biotecnológico, lo adecuado sería usar el inductor para incrementar su expresión. Ahora, hablando específicamente de thurincina H, el poder producirla en *L. lactis* y sobre todo de manera inducida nos daría dos ventajas: 1) obtener thurincina H en un sistema seguro y 2) obtenerla en cantidades significativas. Un estudio de este tipo se realizó con nisina, Hansen *et al.* (2009) insertaron los genes de inmunidad *nisEFG* y *nisI* en una cepa de *B. subtilis* para hacerla resistente e incrementar el rendimiento de nisina. Estos hallazgos confirman el propósito de nuestro trabajo, ya que se buscó obtener una cepa resistente para la producción de thurincina H. El paso por seguir en este contexto sería clonar los genes *thnA1A2A3BT* en el mismo vector bajo la regulación del promotor de nisina. El resultado obtenido sugiere que una construcción así nos permitiría obtener thurincina H, incluso sin adición del inductor. Otra ventaja de usar una construcción en plásmido es que el número de copias en la célula es mayor que si lo tuviéramos en cromosoma, y esto favorece a tener mayor cantidad de la proteína recombinante. En el caso de *B. thuringiensis*, cuando una cepa sensible a thurincina H se transforma con el plásmido pHT/ThurH, esta adquiere mayor resistencia que la cepa silvestre (Figura 2a y 2b), lo que genera una ventaja a la hora de producir thurincina H, puesto que nuestra cepa recombinante podría resistir mayor cantidad de thurincina H y, por lo tanto, obtener mejores rendimientos. Este trabajo nos arrojó muchos resultados interesantes y también nos dio la pauta para continuar trabajando en búsqueda del objetivo final, que es obtener thurincina H en la cepa heteróloga *L. lactis*.

Conclusiones

Se generó una cepa de *Lactococcus lactis* resistente a thurincina H haciendo uso del operón *thnRDE* sin necesidad de inducir con nisina. Ahora contamos con una cepa inmune a thurincina H que puede ser modificada para expresar los genes *thnA1A2A3* con el propósito de obtener thurincina H recombinante en un sistema seguro.

Agradecimientos

Se agradece a la Universidad de Guanajuato por el apoyo financiero otorgado en la convocatoria institucional de investigación científica, con número de proyecto 156/2021. El estudiante Mario Alberto Núñez Valle es estudiante de posgrado en Biociencias apoyados por CONACYT, México. Luz Edith Casados-Vázquez es una Investigadora por México apoyada por la Beca 2069, 'Cátedra CONACYT', México.

Referencias

- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513-1523. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Casados-Vázquez, L. E., Bideshi, D. K., & Barboza-Corona, J. E. (2017). The *thnR* gene is a negative transcription regulator of the thurincin H genetic cassette in *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni*. *Archives of Microbiology*, 199, 385-390. doi: <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1298-1>
- Casados-Vázquez, L. E., Bideshi, D. K., & Barboza-Corona, J. E. (2018). Regulator ThnR and the ThnDE ABC transporter proteins confer autoimmunity to thurincin H in *Bacillus thuringiensis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111, 2349-2360. doi: <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1124-7>
- Cavanagh, D., Fitzgerald, G. F., & McAuliffe, O. (2015). From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food microbiology*, 47, 45-61. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.001>
- Commane, D., Hughes, R., Shortt, C., & Rowland, I. (2005). The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 591(1-2), 276-289. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.02.027>
- Han, E. J., Lee, N., Choi, S. Y., & Paik, H. (2013). Bacteriocin KC24 produced by *Lactococcus lactis* KC24 from kimchi and its antilisterial effect in UHT milk. *Journal of Dairy Science*, 96(1), 101-104. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5884>
- Hansen, M. E., Wangari, R., Hansen, E. B., Mijakovic, I., & Jensen, P. R. (2009). Engineering of *Bacillus subtilis* 168 for increased nisin resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6688-6695. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.00943-09>
- Jørgensen, C. M., Vrang, A., & Madsen, S. M. (2014). Recombinant protein expression in *Lactococcus lactis* using the P170 expression system. *FEMS Microbiology Letters*, 351(2), 170-178. doi: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12351>
- Kimoto, H., Mizumachi, K., Okamoto, T., & Kurisaki, J. (2004). New *Lactococcus* strain with immunomodulatory activity: Enhancement of Th1-type immune response. *Microbiology and Immunology*, 48(2), 75-82. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03490.x>
- Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., de Ruyter, P. G., Luesink, E. J., & de Vos, W. M. (1995). Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 27299-27304. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.27299>
- Lee, H., Churey, J. J., & Worobo, R. W. (2009). Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *FEMS Microbiology Letters*, 299(2), 205-213. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01749.x>

- Mierau, I., & Kleerebezem, M. (2005). 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *68*, 705-717. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0107-6>
- Morello, E., Bermudez-Humarán, L. G., Llull, D., Solé, V., Miraglio, N., Langella, P., & Poquet, I. (2008). *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *14*(1-3), 48-58. doi: <https://doi.org/10.1159/000106082>
- Oros-Flores, Z. S., Casados-Vázquez, L. E., Bideshi, D. K., Salcedo-Hernández, R., & Barboza-Corona, J. E. (2018). Co-synthesis of kenyanin 404 and heterologous thurincin H enhances the antibacterial activity of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters*, *40*, 1531-1540. doi: <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2601-9>
- Platteeuw, C., van Alen-Boerrigter, I., van Schalkwijk, S., & de Vos, W. M. (1996). Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(3), 1008-1013. doi: <https://doi.org/10.1128/aem.62.3.1008-1013.1996>
- Rezac, S., Kok, C. R., Heermann, M., & Hutkins, R. (2018). Fermented foods as a dietary source of live organisms. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 01785. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01785>
- Song, A. A., In, L. L. A., Lim, S. H. E., & Rahim, R. A. (2017). A review on *Lactococcus lactis*: From food to factory. *Microbial Cell Factories*, *16*(55), 1-15. doi: <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0669-x>
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, *36*(1), 1-29. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0)
- Yerlikaya, O. (2019). Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. *Journal of Dairy Science*, *102*(1), 124-134. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14983>
- Zhang, S., Liu, L., Su, Y., Li, H., Sun, Q., Liang, X., & Lv, J. (2011). Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt. *African Journal of Microbiology Research*, *5*(29), 5194-5201. doi: <https://doi.org/10.5897/AJMR11.997>