



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias en Bioprocesos

Producción de las bacteriocinas E-760 y AS-48 en microalgas

Tesis que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Presenta:

González Pablo Antonio

Director de Tesis:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

FECHA: (Julio y 2024)



UASLP-Sistema de Bibliotecas
Repositorio Institucional Tesis digitales Restricciones de uso
DERECHOS RESERVADOS
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

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

Producción de las bacteriocinas E-760 y AS-48 en microalgas © 2024 por Pablo Antonio Gonzalez tiene licencia [CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Este proyecto se realizó en el laboratorio de Biotecnología Molecular de células vegetales de la Unidad de Biotecnología de Plantas adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en el periodo comprendido entre enero 2022 y junio 2024, bajo la dirección de Dra. Ruth Elena Soria Guerra.

El programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del CONAHCYT, registro 000588. Número de la beca otorgada por CONAHCYT: 831734. Número de CVU 1230113.

Los datos del trabajo titulado Producción de las bacteriocinas E-760 y AS-48 en microalgas se encuentran bajo el resguardo de la Facultad de Ciencias Químicas y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS
Tel: 826-23-00 ext. 6542

San Luis Potosí, S.L.P.
mayo 24, 2024

UASLP

Dra. Ruth Elena Soria Guerra
Profesor Investigador

Facultad de Ciencias Químicas/ UASLP
Presente. _

Estimada Dra. Ruth Elena Soria Guerra


En base a su solicitud emitida a esta coordinación donde solicita la autorización para cambiar el tema de tesis actual del trabajo de investigación realizado por la estudiante de maestría **Pablo Antonio González** cuyo título original es: "Producción de la bacteriocina E760 en tres especies de microalgas".

Esta coordinación a mi cargo, y en común acuerdo con el Comité Académico del Posgrado (CAP), le comunica lo siguiente:

Ha sido **APROBADO** el cambio de tema de tesis del estudiante de maestría **Pablo Antonio González**, quedando registrado de la siguiente manera: "Producción de las Bacteriocinas E-760 y AS-48 en microalgas".

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

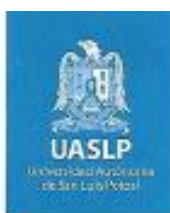
ATENTAMENTE


Dr. Jaime David Pérez Martínez
Coordinador del Posgrado en Ciencias en Bioprocesos
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP



www.uaslp.mx

Av. Dr. Manuel Hinojosa 6
Zona Universitaria - CP 78710
San Luis Potosí, S.L.P.
Tel: (441) 826 24 40 al 46
Tel: (441) 826 2372



Comité de Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas
Registro Número CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20190726

23 de noviembre de 2022

DRA. RUTH ELENA SORIA GUERRA
PROFESORA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS.
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ.
PRESENTE.

Con relación a su solicitud de revisión del protocolo titulado **"Producción y caracterización de la bacteriocina E-760 en *Senedesmus acutus*, *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis oculata*"**, se le comunica que éste fue evaluado en la sesión del 23 de noviembre del año en curso por el Comité Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas (CEID-FCQ) (registro CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20190726) y dictaminado como:

APROBADO

Su protocolo tiene la clave **CEID2022-05**.

Conforme al Reglamento del CEID-FCQ, todo protocolo registrado y aprobado queda sujeto al seguimiento señalado en el Art. 13, en particular al apartado 13.2.2:

El profesor o investigador responsable deberá entregar al CEID-FCQ un informe al término del proyecto, ante la suspensión prematura del estudio o cuando le sea requerido. Si el proyecto no ha sido terminado en el lapso de un año deberá entregarse un **informe anual** que señale el grado de avance. Para la entrega de este informe se considerará un año transcurrido desde la fecha de emisión del dictamen de aprobación y un lapso no mayor de 10 días hábiles. El incumplimiento de lo anterior impedirá la revisión de un nuevo protocolo del investigador solicitante. El informe se enviará al CEID-FCQ con una carta de presentación dirigida al Presidente, así como el respectivo informe.

ATENTAMENTE

Dra. Silvia Romano Moreno
Presidente del CEID-FCQ

Ccp. Archivo

UASLP



www.uaslp.mx

Av. Dr. Manuel H. Rodríguez s/n
Zona Universitaria s/n 76210
San Luis Potosí, S.L.P.
tel: (441) 326 20 00 ext. 46
fax: (441) 326 2152



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias en Bioprocesos

**Producción de las bacteriocinas E-760 y AS-48 en
microalgas**

Tesis que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Presenta:

González Pablo Antonio

SINODALES:

Presidente:

**Dra. María del Carmen González
Castillo**

Secretario:

Dra. Ana Erika Ochoa Alfaro

Vocal:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

FECHA: (Julio y 2024)

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO

Dra. Ruth Elena Soria Guerra: Directora de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. María del Carmen González Castillo: Sinodal de tesis. Adscrita al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Ana Erika Ochoa Alfaro: Sinodal de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias en Bioprocesos
Programa de Maestría
Formato M5

Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí SLP a mes/ día /año

En la ciudad de San Luis Potosí el día 10 del mes de julio del año 2024 El que suscribe Pablo Antonio González Alumno(a) del programa de posgrado Ciencias en Bioprocesos adscrito a Facultad de Ciencias Químicas manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dra. Ruth Elena Soria Guerra y cede los derechos del trabajo titulado Producción de bacteriocinas E-760 y AS-48 en microalgas a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo sin el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección pab.gonz150@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Pablo Antonio González



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias en Bioprocesos
Programa de Maestría
Formato M28

Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a 07/ 09 /2024

L.B. María Zita Acosta Nava
Biblioteca de Posgrado FCQ

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada Título de la Tesis presentada por el autor Pablo Antonio González. La tesis es requisito para obtener el grado de Maestría en el Posgrado en Ciencias en Bioprocesos. El análisis reveló un porcentaje de similitud de 14% excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Coordinador Académico del Posgrado
en Ciencias en Bioprocesos

Agradecimientos

Este trabajo está dedicado especialmente para mi mama una de las personas más cariñosas, especiales y trabajadoras en mi vida. Todos los días aspiro a ser como ella, espero darle orgullo y todo mi trabajo futuro será dedicado en su memoria. Gracias mama por todo, te amo.

Agradezco el apoyo y cariño de mi novia Alejandra.

Gracias a mi familia por el apoyo.

Mi más cordial reconocimiento y agradecimiento a cada uno de mis profesores de la facultad que me brindaron con sus conocimientos y experiencia durante el transcurso de mis estudios.

Mi agradecimiento a la Dra. Ruth Soria Guerra por funcionar como mi directora en este proyecto y guiarme con su amplia gama de conocimientos ya que aprendí muchas cosas tanto en lo académico como en lo personal.

Muchas gracias a mis sinodales por participar en la tesis con sus aportaciones y sugerencias incluso por sus consejos en el transcurso de mi carrera.

También agradezco al grupo de trabajo del laboratorio de biotecnología molecular de células vegetales por su ayuda y amistad.

Resumen

El creciente problema de la resistencia microbiana en todo el mundo ha recalcado la necesidad de nuevos tratamientos para las infecciones causadas por bacterias resistentes. Los péptidos antimicrobianos (PAM) se perfilan como alternativas prometedoras debido a sus diversos mecanismos de acción, que los hacen eficaces contra cepas resistentes. En este contexto, los PAMs AS-48 y E-760 derivados del género *Enterococcus* surgen como buenas alternativas debido a sus propiedades antibacterianas.

Este proyecto se centró en producir el péptido AS-48 recombinante en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* y la bacteriocina E-760 en las microalgas *Scenedesmus acutus*, *Nannochloropsis oculata* y *Chlorella vulgaris*. Se logró la transformación genética de *C. reinhardtii* con el gen codificante para el péptido AS-48 y se identificó una línea transplastómica, sin embargo, no se lograron líneas transgénicas con el transgén E-760. La presencia y cantidad del péptido AS-48 se confirmó mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), obteniendo concentraciones máximas de 0,044 µg/µL de AS-48 en *C. reinhardtii* que pueden ser consideradas relativamente bajas a las reportadas en la literatura.

La actividad antimicrobiana de la proteína total soluble (PTS) de la cepa de *C. reinhardtii* transplastómica y de una cepa sin transformar se probó frente a una bacteria Gram positiva. Los resultados mostraron que la PTS de *C. reinhardtii* transplastómica exhibe actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 19118. Estos resultados sugieren que las microalgas se pueden utilizar eficazmente para producir péptidos antimicrobianos como el AS-48. Este enfoque tiene potencial para desarrollar nuevas estrategias para combatir las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos, lo que proporciona una vía prometedora para futuras investigaciones y aplicaciones en biotecnología.

Palabras clave: péptidos antimicrobianos, AS-48, E-760 y *Listeria monocytogenes*.

Abstract

The increasing issue of microbial resistance worldwide has highlighted the need for new treatments for infections caused by resistant bacteria. Antimicrobial peptides (AMP) are emerging as promising alternatives due to their diverse mechanisms of action, which make them effective against resistant strains. In this context, AMPs AS-48 and E-760 derived from *Enterococcus* genus, emerge due to their antibacterial properties.

This project focused on producing the recombinant AS-48 peptide using the microalgae species *Chlamydomonas reinhardtii* and producing E-760 in *Scenedesmus acutus*, *Nannochloropsis oculata*, and *Chlorella vulgaris*. Genetic transformation of *C. reinhardtii* was successfully achieved with the gene encoding the AS-48 peptide, and a transplastomic line was identified; however, transgenic lines of E-760 gene were not achieved. The presence and quantity of the AS-48 peptide were confirmed through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), obtaining maximum concentrations of 0.044 µg/µL in *C. reinhardtii* which can be considered relatively low than those reported in the literature.

The antimicrobial activity of the total soluble protein (TSP) of the transplastomic *C. reinhardtii* strain and that of an untransformed strain was tested against a Gram positive bacterium. The results showed that transplastomic *C. reinhardtii* TSP exhibits antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* ATCC 19118. These results suggest that microalgae can be effectively used to produce antimicrobial peptides like AS-48. This approach has the potential to develop new strategies to combat infections caused by antibiotic-resistant bacteria, providing a promising avenue for future research and application in biotechnology.

Key words: antimicrobial peptides, AS-48, E-760 and *Listeria monocytogenes*.

Índice	
1. Índice	13
2. Introducción	15
3. Antecedentes	16
3.1 Péptidos antimicrobianos.....	16
3.2 Mecanismos de acción.....	16
3.3 Bacteriocina E-760	19
3.4 Bacteriocina AS-48.....	19
3.5 Proteínas recombinantes y otras plataformas de expresión	21
3.6 Microalgas como plataformas de expresión	21
3.7 Aplicación de los péptidos antimicrobianos.....	23
3.8 <i>Listeria monocytogenes</i> : patogenicidad e importancia clínica	24
3.9 Antecedentes directos	25
4. Justificación	28
5. Hipótesis	28
6. Objetivos	28
6.1 General.....	28
6.2 Específicos.....	28
7. Metodología	30
7.1 Evaluación de la presencia del gen que codifica para la bacteriocina E-760 y AS-48 en la construcción pChlamy-E760 y p463-AS48	30
7.1.1 Extracción de ADN plasmídico	30
7.1.2 Diseño de oligonucleótidos específicos para amplificación del gen de las bacteriocinas AS-48 y E-760.....	30
7.1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa para confirmar presencia del transgén en las construcciones pChlamy-E760 y p463-AS48.....	31
7.2 Transformación vía nuclear de <i>C. vulgaris</i> , <i>S. acutus</i> y <i>N. oculata</i>	32
7.3 Transformación vía cloroplasto de <i>C. reinhardtii</i> con micropartículas de oro	33
7.4 Extracción de ADN genómico.....	34
7.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa para confirmar transformación genética de las microalgas.....	35
7.6 Análisis de identificación de la proteína recombinante (PR)	36
7.6.1 Extracción de proteínas de microalgas	36
7.6.2 Cuantificación de proteína total.....	36
7.6.3 Ensayo de ELISA	36
7.7 Ensayos antimicrobianos de la PTS transplastómica contra <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118	37
8. Resultados	38
8.1 Confirmación del transgén en la construcción pChlamy-E760 en <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
8.2 Confirmación del transgén en la construcción p463-AS48 en <i>E. coli</i>	39
8.3 Transformación vía nuclear de <i>C. vulgaris</i> , <i>S. acutus</i> y <i>N. oculata</i>	39
8.4 Transformación por balística de la microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 137 (+)	40
8.5 Identificación del gen AS-48 en las microalgas transgénicas	41
8.6 Detección del péptido AS-48 en <i>C. reinhardtii</i>	41
8.7 Ensayos antimicrobianos de la PTS transplastómica contra <i>Listeria monocytogenes</i> 19118.....	42
9. Discusión	43

10. Conclusiones	46
11. Bibliografía	47
12. Resumen del reporte de similitud.....	55
13. Anexos	56

2. Introducción

En la constante batalla contra los patógenos, la naturaleza ha proporcionado a los organismos una serie de mecanismos de defensa, entre los que destacan los péptidos antimicrobianos (PAM) como armas versátiles y potentes (Hancock y Sahl, 2006). Estos pequeños péptidos generalmente son catiónicos, aunque también pueden ser aniónicos y constituyen una parte del sistema inmunológico innato, mostrando una eficacia notable contra un amplio espectro de agentes infecciosos que incluyen bacterias, hongos, virus e incluso parásitos (Zasloff, 2002). Sus mecanismos de acción multifacéticos, que abarcan la alteración de la membrana, disrupción de funciones intracelulares y las actividades inmunomoduladoras, subrayan su importancia como candidatos prometedores para combatir la creciente amenaza de la resistencia a los antimicrobianos (Mahlapuu et al., 2016).

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos es un problema a nivel mundial que ha sido reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y considerado como el informe más completo sobre la resistencia a los antibióticos a escala mundial, el cual aborda el origen y como generar terapias efectivas, particularmente para cepas resistentes a múltiples fármacos (WHO, 2014). Es bien sabido que los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas; la resistencia a los antibióticos se da cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de los mismos. Una de las soluciones prometedoras es el uso de péptidos antimicrobianos, naturales o sintéticos, que pueden usarse como modelo para diseñar y crear nuevos fármacos o antibióticos de nueva generación (Rima et al., 2021).

En la búsqueda de fuentes sostenibles y escalables de péptidos antimicrobianos, las microalgas han surgido como una opción prometedora. Las microalgas, debido a sus rápidas tasas de crecimiento y su capacidad para prosperar en diversas condiciones ambientales, constituyen una plataforma atractiva para la producción de compuestos bioactivos, incluidos los PAM (Guzman et al., 2019). Se ha reportado que las microalgas pueden ser utilizadas como una gran herramienta biotecnológica para producir los PAM con potente actividad antimicrobiana contra

diversos patógenos, lo que presenta una alternativa sostenible a los métodos tradicionales de síntesis de péptidos.

3. Antecedentes

3.1 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos son componentes de los mecanismos de defensa innatos de los seres vivos; son oligopéptidos entre 2 y 9 kDa y una longitud de 10 a 50 aminoácidos; algunas de las características generales de los PAM es que su estructura es helicoidal y entre sus propiedades fisicoquímicas se encuentra su naturaleza catiónica y anfipática, lo cual facilita su interacción con la membrana celular de diversas bacterias Gram positivas y negativas, dañándola y provocando así la muerte celular (Line et al., 2008). Los PAM producidos por bacterias son llamados bacteriocinas; son metabolitos secundarios de algunas bacterias Gram positivas y Gram negativas que presentan efecto bactericida frente a diversas cepas. Los PAM ofrecen varias ventajas sobre los antibióticos convencionales, incluida una rápida actividad bactericida, una eficacia de amplio espectro y una baja propensión al desarrollo de resistencia (Zasloff, 2002). Además, los PAM exhiben propiedades inmunomoduladoras, mejorando las respuestas inmunes del huésped a las infecciones y promoviendo la cicatrización de heridas (Bowdish et al., 2005). Además, su capacidad para penetrar biopelículas, que son barreras protectoras formadas por comunidades microbianas, los hace particularmente eficaces contra infecciones crónicas y persistentes (Mansour et al., 2015).

3.2 Mecanismos de acción

Los péptidos antimicrobianos son moléculas pequeñas que juegan un papel crucial en la inmunidad innata contra una amplia gama de patógenos, incluyendo bacterias, hongos, virus e incluso parásitos. Los PAM que son de naturaleza catiónica interaccionan con la membrana bacteriana cargada negativamente y así causar afectaciones en la permeabilidad, estabilidad, osmolaridad de la bicapa lipídica que podrá resultar en la lisis de la membrana o liberación del contenido celular. Las

interacciones principales para las bacterias Gram negativas se dan entre los lipopolisacáridos de las bacterias y los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de las Gram positivas (Rajagopal et al., 2017; Baek et al., 2016).

Se han reportado distintos mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos y se pueden clasificar en 2 tipos:

- Modelo de membrana (Figura 1)
 - Modelo de barril: Los PAM se orientan inicialmente paralelos a la membrana, pero eventualmente se insertan perpendicularmente en la membrana. Esto durante el proceso de penetración que promueve las interacciones entre las regiones hidrofóbicas de los péptidos y de la membrana, de manera similar las regiones hidrofílicas de los péptidos forman el lumen del canal (Kumar et al., 2018).
 - Modelo de poro toroidal: este modelo es parecido al de barril solo que las hélices peptídicas se insertan en la membrana y se unen a los lípidos para formar complejos de poros toroidales cuando se encuentra en altas concentraciones (Kumar et al., 2018).
 - Modelo de alfombra: este mecanismo involucra grandes concentraciones de proteína necesario para la formación de micelas en la membrana bacteriana que provoca un efecto tipo detergente lisando completa o parcialmente la bicapa lipídica (Lee et al., 2015).
 - Modelo agregado: En este modelo los PAM se unen a la membrana aniónica que forma un complejo de péptidos-lípidos-agua. A diferencia del modelo de alfombra en este se presentan canales que permiten que el contenido intracelular se filtre provocando la muerte celular (Hale et al., 2007).

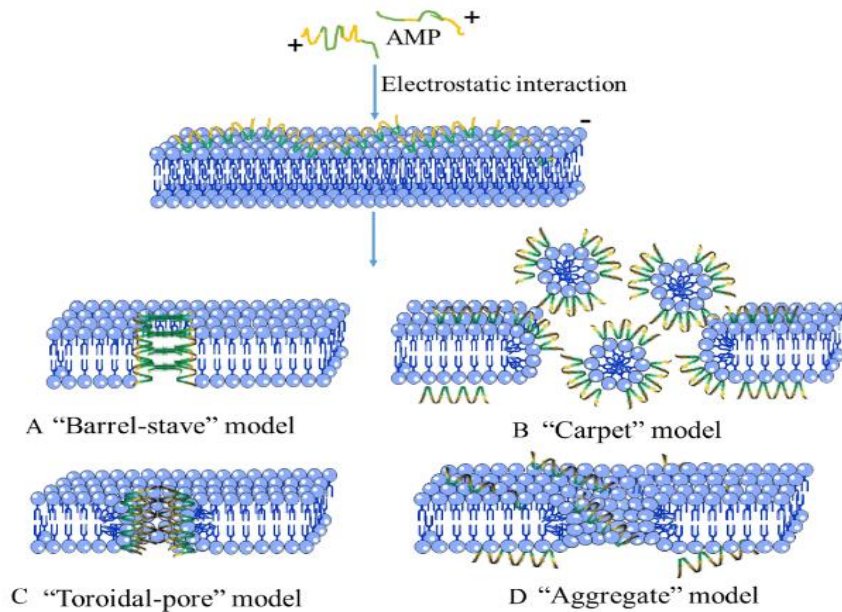


Figura. 1 Mecanismos de acción asociados a membrana. A) Modelo de barril B) Modelo de alfombra C) Modelo de poro toroidal D) Modelo de agregado (Dong et al., 2024)

- Mecanismos de acción intracelular
 - Interacción con ácidos nucleicos: Ejemplos de péptidos antimicrobianos con este mecanismo de acción presentan secuencias de aminoácidos homólogos con la proteína encargada del enrollamiento del ADN, la histona H2A (Cardoso et al., 2019). Esta interacción directa con el ADN además de dañarlo también puede inhibir la replicación o transcripción (Cardoso et al., 2019).
 - Intervención con la síntesis de proteínas: este tipo de interacción involucran péptidos ricos en residuos de prolina y arginina, estos pueden unirse a los orgánulos encargados de la producción de proteínas como lo son los ribosomas interrumpiendo la traducción en las fases iniciales y de elongación (Graf et al., 2017).
 - Intervención en la actividad enzimática: se han descubierto PAM que pueden inhibir enzimas importantes involucradas en la transcripción, estos péptidos inhiben la actividad de la ARN polimerasa al bloquear el correcto plegamiento de esta enzima (Braffman et al., 2019).

- Intervención con la síntesis de la pared celular: la eixobactina es un ejemplo de PAM que inhibe la síntesis de la pared celular al unirse a un motivo altamente conservado de lípido II y lípido III (precursores del ácido teicoico de la pared celular) (Ling et al., 2015).

3.3 Bacteriocina E-760

La bacteriocina conocida como Enterocina E-760 (Figura 2a) es un PAM aislado y purificado por diversos métodos bioquímicos y químicos a partir del género *Enterococcus*, dicha bacteria fue encontrada en el tracto gastrointestinal de aves de corral (Line et al., 2008). Sus mecanismos de acción pueden ser diversos, ya sea afectando la permeabilidad de la membrana plasmática con la formación de porinas o bien interviniendo en mecanismos moleculares como la síntesis, translocación y plegamiento de proteína (Téllez, 2010).

La bacteriocina E-760 se conforma por 62 residuos de aminoácidos, tiene un peso de 5.362 kDa, es estable a pH de 5.0 a 8.7, tiene un punto isoeléctrico de 8.7 e incluso demostró termoestabilidad al retener la actividad después de 5 minutos a 100°C. Se ha reportado su acción antimicrobiana tanto contra bacterias Gram negativas (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*) y bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes*) (Line et al., 2008). Hoang y colaboradores (2011) reportaron que el uso del PAM E-760 en aves de corral contra la bacteria Gram negativa *Campylobacter jejuni* muestra altos niveles de inhibición del crecimiento bacteriano e incluso demostraron la capacidad de este patógeno de generar resistencia a E-760; sin embargo, esta resistencia resultó inestable, con tendencia a perderse. Una explicación a esta resistencia puede estar dada por la bomba de expulsión CmeABC (bomba de expulsión de múltiples fármacos de *Campylobacter*) perteneciente a la familia de transportadores de expulsión de la división de adaptación de resistencia, ya que la inactivación de CmeABC aumentó la susceptibilidad de las cepas resistentes a E-760 de 8 a 32 veces.

3.4 Bacteriocina AS-48

La bacteriocina AS-48 (Figura 2b) es un PAM compuesto de 70 aminoácidos, tiene

un peso molecular de 7.14 kDa y un punto isoelectrico de 10.09 (Grande Burgos et al., 2014). Una de las características que distinguen a este PAM es su estructura circular compuesto por un enlace peptídico de cabeza a cola que lo categoriza como un compuesto activo de gran estabilidad y actividad bactericida.

El péptido AS-48 es producido e inicialmente aislado de una cepa de *Enterococcus faecalis* (Gálvez et al., 1986); sin embargo, se han descubierto bacteriocinas muy similares de varias cepas de *E. faecalis* con orígenes tanto clínicos como de los alimentos (Maqueda et al., 1998). Este péptido posee un amplio espectro de actividad bactericida en contra de bacterias Gram positivas y Gram negativas. En el caso de las bacterias Gram positivas (*E. faecium* CECT 410, *S. durans* CECT 411 y *S. pneumoniae* ATCC 695) demostraron sensibilidad hacia la bacteriocina AS-48 en donde se observó reducción en el crecimiento y además una disminución constante de la viabilidad celular en cuestión de unas horas (Gálvez et al., 1989). Sin embargo, las cepas Gram negativas fueron 10 veces menos sensibles a AS-48 que las bacterias Gram positivas cuando se probaron en un medio sólido, esto puede ser debido a la distinta composición en su membrana celular. Las especies más sensibles fueron cepas de *Escherichia coli*, *Myxococcus* y *Rhizobium*, mientras que bacterias como *Agrobacterium*, *Pseudomonas* y *Klebsiella* requirieron de concentraciones mayores de 100 µg/mL para su inhibición (Gálvez et al., 1989).

En cuanto a su mecanismo de acción se ha reportado que puede inducir la formación de diferentes tipos de poros como uno de tipo toroidal, esto se demostró mediante simulaciones del autoensamblaje del péptido AS-48 (Cruz et al., 2013). Cebrian y colaboradores en el 2015 reportaron que el efecto bactericida de este péptido está dado por dímeros inactivos que son solubles en agua que interactúan con la bicapa lipídica mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, esto conlleva a la desestabilización de la membrana provocando la muerte celular.

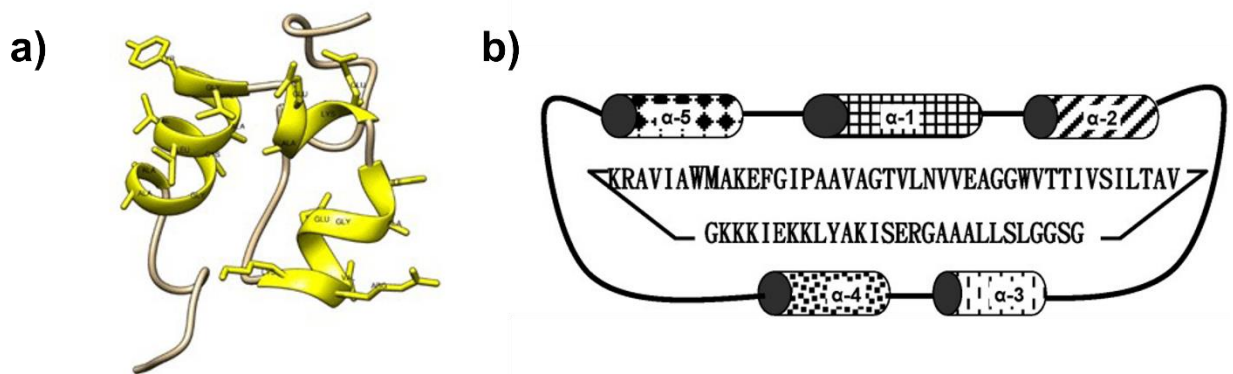


Figura 2. a) Estructura tridimensional de la bacteriocina E-760. b) Estructura de AS-48 α -hélice del péptido circular maduro (Tomada de: JJ et al., 2019 y Burgos et al., 2014).

3.5 Proteínas recombinantes y otras plataformas de expresión

Las proteínas recombinantes son aquellas que se obtienen al expresar un gen en un organismo modelo o una línea celular distinta a la célula original, modificadas genéticamente por tecnología de ADN recombinante y con características definidas en cuanto a crecimiento, rendimiento proteico, facilidad de manipulación y costos de producción; por lo que usarlas conlleva ventajas y desventajas inherentes a las mismas.

Se han explorado diversas plataformas de expresión para la producción de PAM, como bacterias, levaduras, plantas y síntesis de péptidos sintéticos. Estas plataformas ofrecen su propio conjunto de ventajas y desafíos. Los sistemas de bacterias y levaduras, por ejemplo, proporcionan altos rendimientos de expresión y son susceptibles de manipulación genética para optimizar la producción de péptidos (Parachin et al., 2012). Los sistemas de expresión basados en plantas, por otro lado, ofrecen ventajas en términos de modificaciones postraduccionales y escalabilidad (Hefferon, 2012). La síntesis de péptidos sintéticos permite un control preciso sobre la secuencia y las modificaciones de los péptidos, pero puede tener una escala y una rentabilidad más limitada para la producción a gran escala.

3.6 Microalgas como plataformas de expresión

Las microalgas eucariontes como sistemas de expresión de proteínas recombinantes (Figura 3) ofrecen beneficios en su uso, como una tasa de crecimiento rápido y cultivos económicos, ya que sólo requieren de algunos minerales en comparación con los cultivos celulares; también permiten una transformación genética en periodos de tiempo cortos y un alto rendimiento en las proteínas recombinantes que expresan, además, no contienen toxinas ni son afectadas por patógenos humanos; aunado a esto son reconocidas como microorganismos “GRAS” (Generally Regarded As Safe).

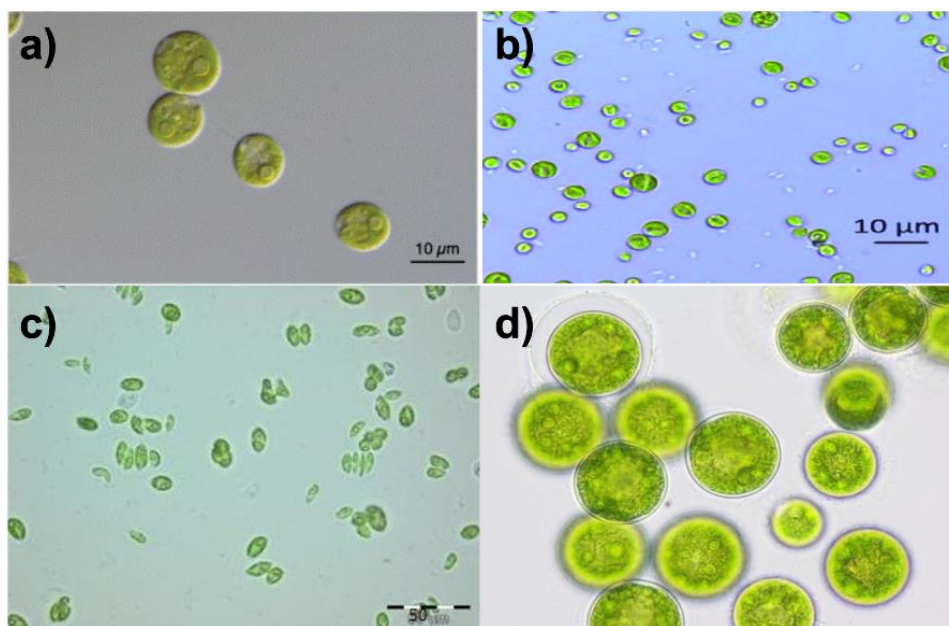


Figura 3. Microalgas utilizadas como organismo modelo. a) *Chlamydomonas reinhardtii* b) *Chlorella vulgaris* c) *Scenedesmus acutus* d) *Nannochloropsis oculata* (Craig et al., 2021; Detrell., 2021; Kabaivanova et al., 2020; Galina et al., 2018).

La microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii* cuenta con tres de sus genomas secuenciados. Uno de los usos biotecnológicos de esta microalga es la producción de proteínas recombinantes por medio de transformación genética y esta es posible en dos diferentes vías: nuclear y vía cloroplástica (Kindle et al., 1994). Por vía nuclear se presentan ventajas como la realización de modificaciones postraduccionales que permite que las proteínas tengan funcionabilidad como en su organismo de origen y la posibilidad de que los productos sean secretados al

medio; en cambio la vía cloroplástica resulta novedosa debido a que la microalga cuenta únicamente con un cloroplasto que ocupa más de la mitad del volumen celular, y cuyo genoma tiene aproximadamente 200 Kb en el cual es posible integrar el gen de interés por medio de recombinación homóloga, lo cual provee ventajas como mayor nivel de expresión transgénica que da como resultado mayores acumulaciones de proteínas recombinantes (Adem et al., 2017).

En el 2013, Koo y colaboradores reportaron el uso de *Chlorella vulgaris* para la producción del péptido antimicrobiano lactoferrina, expresado de manera estable bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S. La lactoferrina expresada de manera heteróloga en la microalga mostró actividad antimicrobiana significativa contra *E. coli*, sin embargo, no se mencionó el rendimiento de la lactoferrina. Otro ejemplo es el reportado por Chen y colaboradores (2001) en donde se transformó genéticamente a *Chlorella ellipsoidea* para expresar transitoriamente a una defensina de conejo (péptido neutrófilo de conejo-1), de igual manera se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* contra las bacterias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y contra el hongo *Fusarium oxysporum*; los resultados demostraron un efecto inhibitorio significativo contra ambas bacterias y el hongo. Los ejemplos anteriores permiten visualizar a las microalgas como sistemas de expresión de proteínas recombinantes como una opción atractiva para la generación de PAM para uso farmacéutico.

3.7 Aplicación de los péptidos antimicrobianos

Los PAM han despertado un gran interés debido a sus diversas aplicaciones en diversos campos, desde la industria farmacéutica hasta la agropecuaria. Estos péptidos ofrecen gran versatilidad y los convierte en candidatos prometedores para combatir enfermedades infecciosas y abordar el desafío de la resistencia a los antimicrobianos, que se ha convertido en un problema de salud mundial. En medicina, los PAM tienen un inmenso potencial como terapias novedosas para el tratamiento de infecciones bacterianas. Estos péptidos pueden atacar las membranas microbianas, alterando su integridad y provocando la muerte celular, lo que los hace eficaces contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Brogden,

2005). Más allá de la medicina, los PAM encuentran aplicaciones en diversas industrias, incluidas la agricultura, la conservación de alimentos y la cosmética. En la agricultura, los PAM muestran potencial como alternativas a los pesticidas convencionales para controlar patógenos vegetales y mejorar el rendimiento de los cultivos (Pina-Pérez et al., 2017). En la industria alimentaria, el péptido mayormente reportado es la nisina que se puede utilizar como conservante natural para inhibir el crecimiento de microorganismos perjudiciales y patógenos transmitidos por los alimentos, extendiendo así la vida de anaquel de los productos (Gharsallaoui et al., 2016). Además, se están explorando los PAM por sus propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias en productos para el cuidado de la piel, lo que ofrece beneficios potenciales para el tratamiento del acné (Harder et al., 2013). A pesar de sus aplicaciones prometedoras, los PAM enfrentan desafíos relacionados con la estabilidad, la toxicidad y la escalabilidad de la fabricación. Abordar estos obstáculos requiere estrategias innovadoras como la ingeniería de péptidos, la optimización de la formulación y el diseño del sistema de administración para mejorar sus perfiles de eficacia y seguridad (Mishra et al., 2017).

3.8 *Listeria monocytogenes*: patogenicidad e importancia clínica

Listeria monocytogenes es una bacteria que causa enfermedades humanas y animales, a menudo transmitida por el consumo de productos lácteos, carnes y alimentos contaminados. Esta bacteria transmitida por los alimentos que se encuentra en diversas fuentes, incluido el agua, el suelo y diferentes productos alimenticios e incluso centros médicos, así como en humanos y animales. A nivel mundial, *L. monocytogenes* debido a su etiología da lugar a tasas altas de hospitalización y mortalidad (Liu et al., 2005), por lo que es de gran importancia investigar la prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos en patógenos transmitidos por los alimentos como *L. monocytogenes* ya que nos sirve como una herramienta valiosa para prevenir la aparición de enfermedades y mejorar las prácticas de manejo de infecciones. Actualmente, el tratamiento principal para la listeriosis humana implica una combinación de ampicilina o amoxicilina con gentamicina. Sin embargo, el uso excesivo de antibióticos en la alimentación animal puede provocar un aumento de la resistencia antimicrobiana en estas bacterias,

haciendo que el tratamiento sea menos eficaz (Troxler et al., 2000).

Estudios realizados en los últimos 20 años han documentado que *L. monocytogenes* muestra resistencia a varios agentes antimicrobianos, incluidos penicilina, ampicilina, tetraciclina, estreptomicina, clindamicina, oxacilina y vancomicina (Troxler et al., 2000; Conter et al., 2009). Esta resistencia a múltiples antibióticos plantea un importante desafío para la salud pública, ya que la prevalencia de infecciones por *L. monocytogenes* continúa aumentando a pesar de los avances en los procesos de producción e inocuidad de alimentos y leche (Nilsson et al., 2002).

3.9 Antecedentes directos

En trabajos previos realizados en el laboratorio de Biotecnología Molecular se generaron las construcciones pChlamy-E760 y p463-AS48. El vector de expresión pChlamy_1 (Figura 4b) contiene los siguientes elementos: promotor Hsp70A-Rbc S2, el cual es un promotor quimérico constitutivo formado por la proteína de choque térmico 70A y la subunidad pequeña de la enzima RuBisCO, también incluye el intrón Int-1 Rbc S2 que es el primer intrón de la subunidad pequeña de RuBisCO (*rbcS2*) necesaria para mantener la alta expresión del gen de interés, además del gen de la β 2-tubulina que es un fuerte promotor que impulsa la expresión del gen *Aph7*. *Aph7* es el gen aminoglucósido-O- fosfotransferasa de *Streptomyces hygrosopicus*, lo que confiere resistencia a la higromicina, que es un antibiótico que actúa contra bacterias, hongos y células eucariotas superiores. Su mecanismo de acción implica su unión a la subunidad ribosomal pequeña (30S) del ribosoma 70S e induce un cambio conformacional (Borovinskaya et al., 2008). Para obtener la construcción pChlamy-E760 el gen de interés (Figura 4a) se liberó del vector de clonación pUC-E760 mediante una digestión con las enzimas *Xba*I y *Nde*I, para posteriormente subclonarlo en el vector de expresión pChlamy_1 linealizado con las mismas enzimas (Figura 4b). Después de la ligación se transformaron células competentes de *E. coli* TOP 10 mediante choque térmico y crecieron en medio LB (Luria-Bertani) sólido con ampicilina a 37°C durante toda la noche. Las clonas transformadas se analizaron y confirmaron mediante análisis de restricción y

secuenciación (Pérez-Juárez., 2023).

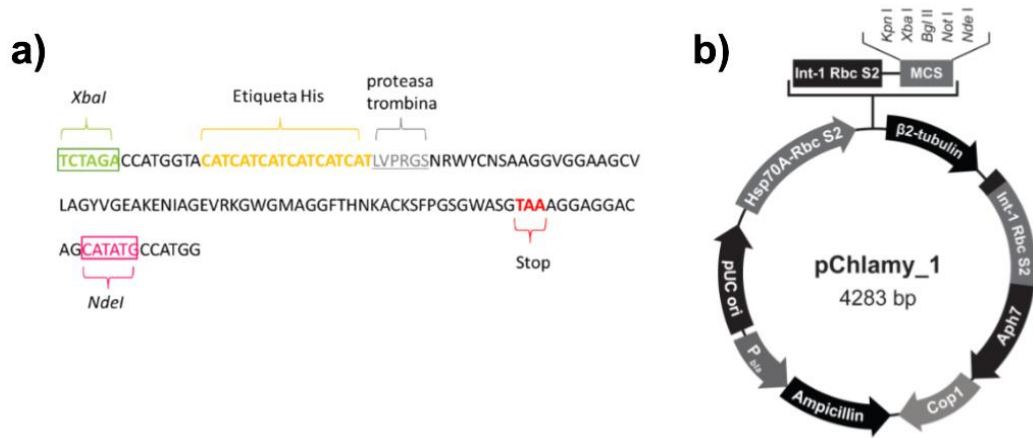


Figura 4. a) Secuencia del gen E-760 y b) vector pChlamy_1.

El vector de expresión p463-AS48 (Figura 5) fue construido ligando el inserto (gen AS48) liberado del plásmido pUC57-AS48 con el vector p463 linealizado. La construcción p463-AS48 está diseñada para la expresión del péptido antimicrobiano AS-48 en el cloroplasto del alga verde *C. reinhardtii*. Esta construcción incluye varios elementos críticos para garantizar la integración y expresión adecuadas dentro del genoma del cloroplasto. La región *tscA* actúa como un sitio para la recombinación homóloga, facilitando la integración de la construcción en el ADN del cloroplasto. Río arriba del gen de interés, la región *atpA* 5' sirve como promotor bicistrónico, que impulsa la transcripción tanto del gen *aadA* como del gen de la enterocina. El gen *aadA* codifica una enzima que confiere resistencia al antibiótico espectinomomicina, proporcionando un marcador seleccionable para identificar transformantes exitosos. Finalmente, la región *rbcL3'* funciona como un terminador de la transcripción, asegurando la terminación y estabilidad adecuadas del ARNm transcrito. La transformación fue confirmada mediante PCR y finalmente se realizó un stock de glicerol de los cultivos, el cual fue almacenado a -60 °C para su conservación y posterior uso (Alegría-Mancilla., 2021).

Vector p463 (6.1 kb)

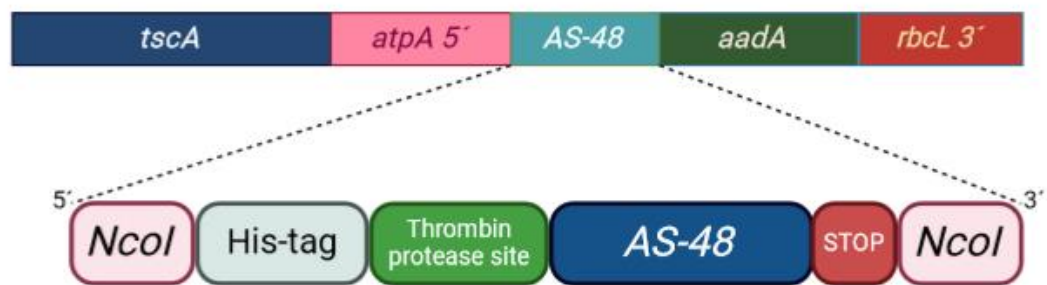


Figura 5. Vector de transformación de cloroplasto p463. El gen sintético AS-48 consta de 168 nucleótidos, hacia al extremo 5' tiene una etiqueta de histidinas (6x), un sitio de restricción proteasa trombina y la secuencia del péptido AS-48; en el extremo 3' se encuentra el codón de paro y la secuencia esta flanqueada por 2 sitios de restricción *NcoI* en ambos extremos.

Ambos vectores fueron utilizados para el desarrollo de este proyecto.

4. Justificación

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema de salud a nivel mundial. El uso de péptidos antimicrobianos (PAM) sintetizados por bacterias (bacteriocinas) son una solución atractiva para combatir cepas bacterianas multirresistentes. La producción de PAM por medio de las microalgas *S. acutus*, *C. vulgaris*, *N. oculata* y *C. reinhardtii* es una opción viable debido a sus cortos tiempos de crecimiento, bajos costos de producción, y su capacidad para realizar un correcto plegamiento de la proteína, estos factores son propicios para su producción masiva.

5. Hipótesis

Las microalgas *Scenedesmus acutus*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* y *Chlamydomonas reinhardtii* son un sistema de expresión eficiente y estable para la producción de los péptidos E-760 y AS-48.

6. Objetivos

6.1 General

Expresar las bacteriocinas E-760 y AS-48 de forma recombinante en microalgas y evaluar su actividad antimicrobiana.

6.2 Específicos

- a) Confirmar la presencia de los transgenes en el vector de expresión p463-AS48 y pChlamy-E760.

- b) Transformar genéticamente la microalga *S. acutus*, *C. vulgaris*, *N. oculata* y *C. reinhardtii*.

- c) Determinar la presencia del gen sintético AS-48 y E-760 en cepas de microalgas transformadas.

- d) Identificar el péptido recombinante en las cepas transformadas.

- e) Evaluar actividad antimicrobiana del péptido recombinante.

7. Metodología

7.1 Evaluación de la presencia del gen que codifica para la bacteriocina E-760 y AS-48 en la construcción pChlamy-E760 y p463-AS48

7.1.1 Extracción de ADN plasmídico

La construcción p463-AS48 y pChlamy-E760 se crecieron en medio LB con ampicilina (100 mg/mL). De ambos cultivos se extrajo el ADN plasmídico siguiendo el método de Birnboim-Dolly (Sambrook et al., 2001). Para esto, primero se cosechó la biomasa a 12000 rpm durante 3 min, la pastilla fue resuspendida en las soluciones BDI (Tris base 0.25M pH=8, EDTA 10 mM y Glucosa 10 mM), BDII (NaOH 0.2M y SDS 1%) y BDIII (Acetato de sodio 3M pH=4.8) con el fin de lisar la membrana celular y eliminar las proteínas; se centrifugó, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C con isopropanol para precipitar el ADN, las pastillas resultantes se lavaron con etanol al 70%, y se dejaron secando a temperatura ambiente; se resuspendieron en 30 mL de agua destilada estéril y se almacenaron a -20°C. Para la evaluación de la integridad del ADN plasmídico extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, el gel se corrió a 100 V durante 20 min. Finalmente, el gel se visualizó bajo luz UV.

7.1.2 Diseño de oligonucleótidos específicos para amplificación del gen de las bacteriocinas AS-48 y E-760

Para confirmar la presencia del gen E-760 y AS-48 en las construcciones pChlamy-E760 y p463-AS48, respectivamente, se diseñaron cuatro oligonucleótidos específicos (Tabla 1). Para el caso de la construcción p463-AS48, debido a que el gen de interés se encuentra flanqueado por dos sitios de restricción *NcoI* fue necesario confirmar que el gen se encontrará en dirección 5' a 3', por lo que se diseñó un oligonucleótido adicional que alinea en el gen *aadA* del vector de expresión.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos que amplifican el gen AS-48 y E-760		
Oligonucleótido	Secuencia	Longitud del amplicón

AS48-F	5'ATGGCTAAGGAGTTCGGGAT3'	168 pb
AS48-R	5'CTTGAGGTACGCCTTAATGC3'	
E760-F	5'GGTGCAGCAGGTTGTGTTTT3'	139 pb
E760-R	5'CCCAACCACTACCAGGGAAT3'	
AS48-F	5'ATGGCTAAGGAGTTCGGGAT 3'	978 pb
aadA-R	5'CATTGCCAGTCGGCAGC3'	

7.1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa para confirmar presencia del transgén en las construcciones pChlamy-E760 y p463-AS48

Una vez extraído el ADN plasmídico tal como se indicó en la sección (7.1.1) y con los oligonucleótidos diseñados como se describió anteriormente, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los reactivos descritos a continuación (Tabla 2):

Tabla 2. Composición de la mezcla de PCR	
Reactivo	Volumen (µL)
Buffer 10X sin MgCl ₂	2.5
dNTP's 10mM	0.5
Oligonucleótido Reverse 10mM	0.5
Oligonucleótido Forward 10mM	0.5
MgCl ₂ 50mM	1
Taq polimerasa	0.5
ADN (100 ng)	1
Agua estéril	Hasta 25

Volumen total	25
---------------	----

Se configuró el termociclador según las condiciones descritas en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de la PCR			
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	0.5	35
Alineamiento	Para AS-48: 55 Para E-760: 62	0.5	35
Extensión	72	0.5	35
Extensión final	72	3	1

Al finalizar la PCR se analizaron los productos obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, corriendo el gel a 75V durante 30 minutos; y con ayuda de un marcador molecular de 100 pares de bases se visualizó la banda correspondiente al amplicón de interés.

7.2 Transformación vía nuclear de *C. vulgaris*, *S. acutus* y *N. oculata*

La transformación genética de *S. acutus* UTEX 72, *C. vulgaris* OW-01 y *N. oculata* CCAP 849/7 con el gen sintético que codifica para la bacteriocina E-760 se realizó utilizando *A. tumefaciens* portadora de la construcción pChlmy-E760 siguiendo el protocolo descrito por Kumar et al., (2004), el cual consistió en crecer un preinóculo de las microalgas en 10 mL de medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato; Tris base, sales TAP, KPO₄ 1M, solución de metales TAP) líquido durante un periodo de 5 a 7 días en agitación; a la par, se creció un preinóculo de *A. tumefaciens* en medio YM (Yeast and Mold; Extracto de levadura, manitol, NaCl, MgSO₄, NaH₂PO₄) con ampicilina (100 mg/mL), hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 595 nm. Pasados los 5 días, el cultivo de cada una de las microalgas se centrifugó a 2,500

rpm por 3 min, con el fin de recuperar suficiente biomasa, la cual se sembró en medio TAP sólido con acetosiringona 100 μ M, adicionalmente se añadieron 200 μ L del cultivo de *A. tumefaciens* con acetosiringona 100 μ M encima de las microalgas sembradas. Las cajas se incubaron durante 48 h a 25°C en la oscuridad. Pasado este tiempo, se hicieron lavados con medio TAP líquido, para esto, se adicionó 1.5 mL de medio TAP líquido para despegar las células del medio, estas se recolectaron en un tubo de 1.5 mL y se centrifugaron a 2,500 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con 1 mL de medio TAP líquido con cefotaxima (500 mg/L), que es un antibiótico utilizado para eliminar la presencia de *A. tumefaciens*. Finalmente, las células se sembraron en medio TAP sólido con 10 mg/L higromicina y 250 mg/L de cefotaxima. Las células se resembraron cada dos semanas, cuando se observaron colonias aisladas, la presión selectiva de higromicina B fue aumentando hasta alcanzar una concentración de 30 mg/L, mientras que la concentración de cefotaxima fue disminuyendo en cada paso de resiembra, retirándola en el momento que la bacteria fue eliminada por completo del medio.

7.3 Transformación vía cloroplasto de *C. reinhardtii* con micropartículas de oro

Las micropartículas de oro que actúan como portadores del ADN que se entregará a las células diana, para recubrir con el ADN plasmídico extraído de la construcción p463-AS48, se agregaron 10 μ g del material genético a 50 μ L de la suspensión de partículas preparada previamente, la mezcla se agitó en vórtex durante 5 min, posteriormente se añadieron 50 μ L de CaCl₂ 2 M estéril más 20 μ L de espermidina 0.1 M y se mezcló nuevamente por espacio de 20 minutos manteniendo las micropartículas en hielo, posteriormente se agregaron 200 μ L de etanol absoluto a temperatura ambiente, se agitó por 5 s y finalmente se centrifugó por 30 s a 10000 rpm. Este procedimiento se repitió 4 veces descartando el sobrenadante en cada uno de ellos. Por último, el pellet formado se resuspendió en 30 μ L de etanol al 100 % y se mantuvo en hielo hasta su uso.

Para realizar la correcta transformación del cloroplasto de microalgas en el

protocolo de biobalística se utilizó un sistema de entrega de partículas biolísticas PDS-1000/He (BIO-RAD, S.A.). Las partículas de oro previamente preparadas se utilizaron para realizar 3 disparos a una distancia de 9 cm y otros 3 disparos a una distancia de 11 cm, cada uno de los disparos se realizó a una caja de medio TAP sólido con la microalga *C. reinhardtii*, siguiendo los parámetros indicados en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones para la transformación de <i>C. reinhardtii</i> mediante balística	
Parámetro	Unidades
Distancia de disparo	9 y 11 cm
Vacío de Hg	15 pulgadas
presión de He	1000-1100 psi
Diámetro de micropartículas	1 μm

Posterior al disparo, las cajas se sellaron y se incubaron durante 48 horas a 25 °C, transcurrido este tiempo, se añadió 1 mL de medio TAP sólido a cada caja para recuperar las células, las cuales fueron resembradas en medio TAP sólido adicionado con 100 mg/L de espectinomicina como agente de selección. Las cajas se mantuvieron en incubación a 25 °C. Las resiembras subsecuentes se realizaron cada 15 días en medio TAP sólido dejando la presión selectiva a 100 mg/L de espectinomicina y añadiendo un control de una cepa sin transformar (WT) al medio selectivo. Al cumplirse tres rondas de selección, las colonias resistentes al antibiótico se resembraron en medio TAP líquido más espectinomicina (100 mg/L).

7.4 Extracción de ADN genómico

Con la finalidad de confirmar la presencia del gen codificante de las bacteriocinas AS-48 y E-760 en las microalgas, se realizó una extracción del ADN genómico de cultivos de *S. acutus*, *C. vulgaris*, *N. oculata* y *C. reinhardtii* que se crecieron en agitación constante a 25°C, con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Partiendo del cultivo en medio TAP líquido más espectinomicina para la construcción p463-AS48 e higromicina para pChlamy-E760 a concentraciones de

100 mg/mL y 15 mg/mL respectivamente, se tomaron 1.5mL del mismo, y se centrifugaron a 12000 rpm durante 3 minutos; se decantó el sobrenadante y las pastillas de células se resuspendieron en vórtex con 500 µL de solución de buffer TEN (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 10 mM y NaCl 150 mM) y se centrifugaron por 30 segundos a 13000 rpm descartando el sobrenadante; posteriormente, se añadieron 150 µL de agua estéril además de 300 µL de buffer SDS-EB (SDS 2%, NaCl 400 mM, EDTA 40 mM y Tris-HCl 10 mM pH 8) para resuspenderlos nuevamente por medio de vortex y añadir 350 µL de fenol/cloroformo para homogeneizar en vortex, se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min. Al término de este paso, se recuperó la fase acuosa con ayuda de una micropipeta; posteriormente se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubaron por 30 minutos en hielo. Se centrifugaron por 2 minutos a 13000 rpm y se decantó el sobrenadante subsecuentemente se lavaron las pastillas con 200 µL de etanol al 70% y se dejaron secando hasta que no hubo residuos de etanol. Se añadieron 40 µL de agua estéril para resuspender las pastillas y recuperar el ADN extraído.

Para confirmar la integridad del ADN genómico extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, cargando 5µL de ADN más el buffer de carga, el gel se corrió a 120V durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo, se observó el gel en el transiluminador y se visualizó la banda correspondiente al ADN extraído, el tubo con la extracción se almacenó a -20°C para los experimentos posteriores.

7.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa para confirmar transformación genética de las microalgas

Una vez extraído el ADN genómico de las posibles cepas transformadas de cada especie y con los oligonucleótidos previamente diseñados, se realizó una PCR con las mismas condiciones descritas anteriormente (Tabla 2 y 3) a fin de comprobar que el gen de interés se encontrara en las microalgas analizadas.

Al finalizar la PCR se analizaron los productos obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, corriendo el gel a 75V durante 30 minutos y con ayuda de un marcador molecular de 100 pares de bases se visualizó la banda

correspondiente al amplicón de interés.

7.6 Análisis de identificación de la proteína recombinante (PR)

7.6.1 Extracción de proteínas de microalgas

El procedimiento que se detalla a continuación se realizó siempre manteniendo las muestras en hielo.

A partir de un cultivo líquido de las microalgas transformadas y un cultivo sin transformar (WT), se obtuvo el extracto de proteína soluble e insoluble a partir de 400 mL de un cultivo líquido. Primeramente, se cosechó la biomasa mediante centrifugación por 15 minutos a 5,000 rpm, se descartó el sobrenadante y a la pastilla obtenida se le añadió 500 µL de buffer de extracción (Tris-HCl 20 mM, pH 8) y 0.1 mM de inhibidor de proteasas para posteriormente sonicar a una potencia de 45%, 8 veces por 10 s, entre cada sonicación se dejó reposar 1 minuto en hielo. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 2 minutos a 4°C, se recuperó la proteína total soluble (PTS) y se almacenó a -20°C. A la pastilla restante se le añadió 200 µL de buffer de urea (Urea 8 M, NaPO₄ 20 mM pH 7.4 y NaCl 500 mM) y se centrifugó a temperatura ambiente durante 2 minutos a 10000 rpm, el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo y se obtuvo la proteína total insoluble (PTI), la cual se almacenó a -20°C.

7.6.2 Cuantificación de proteína total

Después de la extracción de la PTS y PTI de las líneas transformadas y de una cepa WT de *C. reinhardtii*, las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford por triplicado, colocando 1 µL de cada extracto más 100 µL del reactivo de Bradford en una placa de 96 pozos para finalmente medir la absorbancia a 600 nm. Se utilizó una curva estándar con distintas concentraciones de BSA para interpolar las lecturas de absorbancia registradas de los extractos proteicos.

7.6.3 Ensayo de ELISA

Para el ensayo de ELISA, se utilizó una placa de microtitulación, la cual se

almacenó durante toda la noche a 4°C con la PTS y PTI de la cepa transformada y de la cepa silvestre a una concentración de 150 µg/µL y se mezcló con el buffer de carbonatos (100mM NaHCO₃, 100mM Na₂CO₃, pH 9.6), esto se realizó por triplicado; los pocillos se lavaron con buffer Tris Salino-Tween 20 (TBST), posteriormente se bloqueó la placa con leche descremada Svelty de Nestle® Total Move al 5% con PBS, y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados con TBST, después se incubó la placa durante 2 h a 37°C con un anticuerpo primario dirigido contra la etiqueta de histidinas a una dilución 1:1000 y se incubó toda la noche a 4°C, posteriormente se realizaron 3 lavados con TBST y se añadió el anticuerpo secundario a una concentración de 1:2000 (anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina) y se incubó durante 2 h a 37°C para su posterior lavado con TBST, finalmente se añadió la solución de revelado (3 mM p-nitrofenilfosfato diluido en buffer de sustrato: 10mM dietanolamina, 0.5 mM MgCl₂, pH 9.8). Posteriormente se realizó la lectura de absorbancia de las placas a una longitud de onda de 450 nm utilizando un espectrómetro. Se realizó una prueba de ANOVA (p<0.05) comparando la cepa silvestre con la PTS y PTI de la cepa transformada; las lecturas de absorbancia del blanco (ELISA sin proteína) fueron restadas de las absorbancias obtenidas por la cepa silvestre y transformadas.

7.7 Ensayos antimicrobianos de la PTS transplastómica contra *Listeria monocytogenes* ATCC 19118

Para este experimento se utilizó la PTS de *C. reinhardtii* transplastómica donde se confirmó la presencia del péptido AS-48, además de PTS de la cepa silvestre (WT). El ensayo antimicrobiano se realizó utilizando el método de conteo de unidades formadoras de colonia (UFC), para ello se ajustó la densidad bacteriana a 0.5 en la escala de McFarland (aproximadamente 1.0×10^8 UFC/mL) en 1 mL de amortiguador HEPES (1% dextrosa, 10 mM HEPES, pH 5.4) de cultivos bacterianos de *L. monocytogenes* ATCC 19118, para lo cual se realizó una dilución 1:1000 para obtener una concentración de 1.0×10^5 UFC/mL, se incubaron tubos que contenían la PTS de la línea transplastómica de *C. reinhardtii*, PTS de la cepa WT, 5 µg nisina como control negativo de crecimiento y la bacteria sin tratamiento como control positivo de crecimiento. Los tubos se incubaron a 37 °C y se tomaron alícuotas a los 0, 30, 60, 90 y 120 min. En cada tiempo se realizaron diluciones 1:10 hasta

llegar a la concentración de 1.0×10^3 UFC/mL, se sembraron alícuotas de 10 μ L en placas de agar Luria-Bertani (LB) para realizar el conteo de colonias (Figura 6). Las placas se incubaron durante 16 h a 37 °C, se realizó el conteo de colonias transcurrido este tiempo y se graficó en función logarítmica base 10. La bacteria *L. monocytogenes* ATCC 19118 se analizó expuesta a distintas concentraciones de PTS de la microalga transplastómica y de *C. reinhardtii*. silvestre (500, 750 y 1500 μ g). La PTS silvestre (WT) se utilizó como tratamiento con la finalidad de comparar la actividad antimicrobiana con la de la PTS de la línea transplastómica y así identificar la actividad derivada del péptido AS-48 contenido en la PTS transplastómica. Todos los experimentos se realizaron por triplicado biológico y técnico en un volumen final de 1 mL (Figura 6).

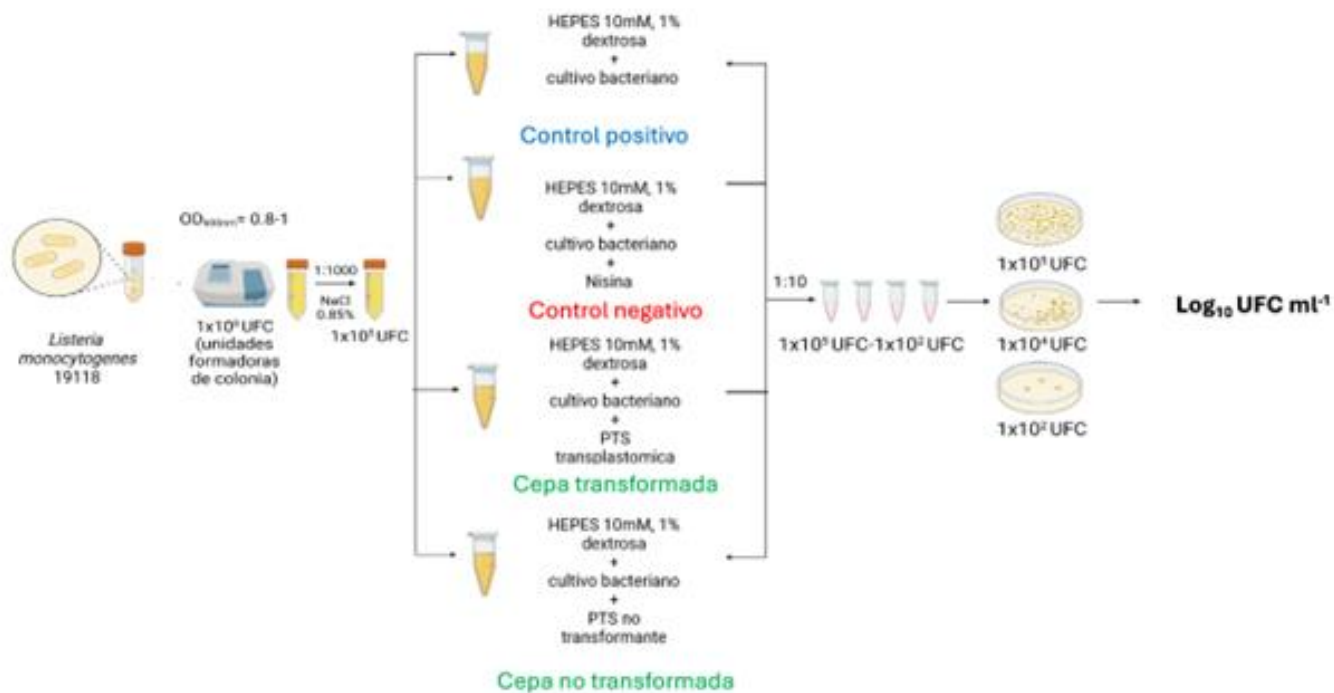


Figura 6. Esquema de ensayo antimicrobiano.

8. Resultados

8.1 Confirmación del transgén en la construcción pChlamy-E760 en *Agrobacterium tumefaciens*

Para confirmar que la construcción pChlamy-E760 mantuviera el gen de interés se realizó una PCR con los oligonucleótidos específicos para el gen sintético y se corrió un gel de agarosa al 2 %. En la Figura 7 se puede observar el amplicón deseado con un tamaño de 139 pb.

Figura 7. Confirmación de gen *E-760* por PCR en la construcción pChlamy-E760. 1) Marcador de peso molecular (100 pb). 2) Amplificación del gen *E-760* en *Agrobacterium tumefaciens* (139 pb). 3) Amplificación del gen *E-760* en *E. coli* (139 pb).

8.2 Confirmación del transgén en la construcción p463-AS48 en *E. coli*

Para confirmar que la construcción p463-AS48 mantuviera el gen de interés se realizó una PCR con los oligonucleótidos específicos para el gen sintético y se corrió un gel de agarosa al 2 %. En la Figura 8 se puede observar el amplicón deseado con un tamaño de 168 pb. Lo que indica que la construcción p463-AS48 contiene el gen de interés, también se puede observar una banda de aproximadamente 978 pb en los carriles 4 y 5, lo que indica que el gen se encuentra clonado en sentido 5'-3'.

Figura 8. Confirmación del gen *AS-48* por PCR en la construcción p463-AS48. 1) Marcador de peso molecular (100 pb). 2) Gen *AS-48* (Replica 1). 3) Gen *AS-48* (Replica 2). 4) Orientación gen *AS-48* (Replica 1). 5) Orientación gen *AS-48* (Replica 2).

Se confirmó la presencia del gen *AS-48* y su orientación en la construcción p463-AS48, debido a que el gen se encontraba flanqueado por 2 sitios de restricción *NcoI* era necesario comprobar la orientación correcta, esto se realizó sustituyendo el oligonucleótido R-AS48 por el oligonucleótido R-aadA (Tabla 1).

8.3 Transformación vía nuclear de *C. vulgaris*, *S. acutus* y *N. oculata*

En el protocolo por transformación vía nuclear se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* GV3103 portadora del gen *E-760* a una densidad óptica de 0.65 a 595 nm y cultivos de 5 días de *S. acutus* UTEX 72, *C. vulgaris* OW-01 y *N. oculata* CCAP 849/7. Después del periodo de co-cultivo, células de las 3 especies de microalgas se sembraron en medio TAP con higromicina (10 mg/L) y se dejaron crecer por 2 semanas. En la Figura 9 se observa crecimiento de las tres diferentes microalgas en medio selectivo, indicando que estas son resistentes a higromicina, suponiendo hasta el momento que son portadoras de la construcción pChlamy-E760.

Figura 9. Microalgas transformantes en medio TAP sólido con higromicina (30 mg/L). a) *Scenedesmus acutus* UTEX 72. b) *Chlorella vulgaris* OW-01. c) *Nannochloropsis oculata* CCAP 849/7.

Después de la transformación se realizaron pruebas moleculares por PCR, se analizaron 10 colonias de las microalgas posiblemente transformadas y no se logró demostrar que estas microalgas estuvieran transformadas y presentaran el gen de interés. Se probaron distintas condiciones de PCR para la amplificación del gen *E-760*, incluyendo distintos protocolos de extracción de ADN para obtener una mejor calidad. Sin embargo, se obtuvieron resultados negativos en las colonias analizadas por lo tanto se decidió enfocar el trabajo en *C. reinhardtii* que fue transformada vía cloroplasto.

8.4 Transformación por balística de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* 137 (+)

El procedimiento de balística fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del IPICYT; tras el cual, las cajas con los cultivos transformados se mantuvieron en incubación a 25 °C en el cuarto de cultivo del Laboratorio de Biotecnología Molecular de Células Vegetales. Dos días después del disparo con las micropartículas recubiertas, los cultivos se cambiaron a medio selectivo (TAP sólido más espectinomicina 100 mg/L) y a partir de ahí se sembraron cada 15 días continuando la presión selectiva a 100 mg/L de espectinomicina.

Después de tres rondas de selección con espectinomicina, se seleccionaron colonias y se inocularon en medio líquido TAP más espectinomicina (100 mg/L), las cuales han crecido en el medio de selección a diferencia de las colonias sin transformar (WT) que se tornaron amarillas después de las rondas de selección, lo que puede indicar que son portadoras de la construcción p463-AS48 (Figura 10).

Figura 10. *Chlamydomonas reinhardtii* en medio TAP sólido con espectinomicina (100 mg/mL). a y b) Colonias sin transformar (WT) y posibles colonias transformadas señaladas en los círculos azules.

Sin embargo, fue necesario confirmar mediante una prueba de PCR la presencia del gen AS-48 en las microalgas transformadas.

8.5 Identificación del gen AS-48 en las microalgas transgénicas

Se analizaron las microalgas transformadas con la construcción p463-AS48 (Figura 11) para confirmar la presencia del gen AS-48 en *C. reinhardtii*. Se analizaron 4 colonias resistentes a espectinomicina obteniendo 1 positivo, en este trabajo se muestran imágenes representativas del análisis por PCR de las 4 líneas transformantes.

Figura 11. Confirmación de gen AS-48 por PCR en *Chlamydomonas reinhardtii*. 1) Marcador de peso molecular. 2) Blanco. 3) Control negativo (cepa silvestre). 4) Línea transformada 5.1. 5) Línea 5.2. 6) Línea 5.3. 7) Línea 5.4. 8) Control positivo (p463-AS48).

8.6 Detección del péptido AS-48 en *C. reinhardtii*

Después de realizar la extracción de proteína total soluble e insoluble, para detectar a la bacteriocina AS-48 se realizó una prueba de ELISA incluyendo a la fracción soluble e insoluble de las microalgas transformadas y de una cepa WT. Como se observa en la Figura 12, se presentó una diferencia significativa entre la cepa silvestre y la cepa transformada, en ambas fracciones, indicando la presencia del péptido AS-48.

Figura 12. Detección de bacteriocina AS-48 por ELISA en la fracción soluble y fracción insoluble tanto de proteínas extraídas de microalgas transformadas (AS-48) como de no transformadas (WT). ANOVA $p < 0.05$; las barras con asterisco (*) sobre ellas son estadísticamente diferentes a su control (WT); $p < 0.05$ las barras de error muestran desviación estándar.

Se utilizó una curva estándar previamente realizada en el laboratorio con el péptido Flo purificado (ProteoGenix), ya que este péptido presenta características similares con AS-48 como lo es su naturaleza catiónica, pesos moleculares similares y cantidad de aminoácidos que componen el péptido. La ecuación de la recta obtenida (Fig. supp 1) fue utilizada para cuantificar la línea 5.1 transplastómica de *C. reinhardtii*, la absorbancia obtenida fue restada de la obtenida por la cepa WT (Figura 13). La concentración máxima obtenida del péptido AS-48 fue de 0.044 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Esta línea celular demostró mayor concentración de péptido AS-48 en la fracción soluble que la insoluble, por lo que se usó la PTS para ensayos antimicrobianos.

Figura 13. Cuantificación del péptido AS-48 en la fracción soluble de las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* las barras con asterisco (*) sobre ellas son estadísticamente diferentes a su control (WT); $p < 0.05$ las barras de error muestran desviación estándar.

8.7 Ensayos antimicrobianos de la PTS transplastómica contra *Listeria monocytogenes* 19118

La actividad antimicrobiana de la PTS transplastómica de la línea 5.1 y la cepa WT de *C. reinhardtii* fueron comparadas usando el método de conteo de unidades formadoras de colonia. Se utilizó nisina A de Sigma como control negativo de crecimiento (5 μg) contra la bacteria *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 y como control positivo de crecimiento se utilizó la cepa bacteriana sin tratamientos.

Figura 14. Inhibición de la bacteria Gram positiva *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 por extractos de la microalga *C. reinhardtii*, transplastómica y silvestre. Se utilizó nisina como control negativo de crecimiento y el control positivo de crecimiento fue la cepa bacteriana sin tratamientos. a) Utilizando 500 µg de PTS transplastómica y silvestre, b) Utilizando 750 µg de PTS transplastómica, c) Utilizando 1500 µg de PTS transplastómica.

Como se puede observar en la figura 14, *L. monocytogenes* mostró inhibición a los 90 min utilizando tanto 750 µg (Aprox. 8.7 µg de AS-48) y 1500 µg (Aprox. 17.5 µg de AS-48) de la PTS transplastómica de *C. reinhardtii* (Figura 14 b y c), sin embargo, a los 500 µg solo se observa una ligera actividad bactericida a las 2 h de exposición al PAM AS-48 (Figura 14 a), mientras que nisina inhibe a los 60 min a una concentración de 5 µg.

9. Discusión

La preocupación por la escasez de tratamientos eficaces para las infecciones provocadas por bacterias resistentes está generando interés en el uso de péptidos antimicrobianos como alternativas. La Organización Mundial de la Salud ha llamado la atención sobre el hecho de que las bacterias están desarrollando nuevos mecanismos de resistencia, poniendo en peligro nuestra capacidad para tratar una gama cada vez mayor de infecciones, como la neumonía, la tuberculosis y las enfermedades transmitidas por los alimentos. Estas infecciones son cada vez más complicadas y, en algunos casos, casi imposibles de tratar a medida que los antibióticos pierden su eficacia (OMS, 2021). Las enfermedades relacionadas con patógenos transmitidos por los alimentos se encuentran entre los problemas de salud pública más peligrosos y costosos. Dado que los alimentos pueden contaminarse externamente en cualquier punto desde su producción hasta que llegan al consumidor, a pesar de las prácticas de control de calidad e higiene a lo largo de toda la cadena alimentaria.

Debido a sus diversos modos de acción y capacidad para combatir

microorganismos patógenos resistentes y disminuir la resistencia microbiana, los PAM presentan un sustituto prometedor. Sin embargo, debido a su posible citotoxicidad y altos costos de producción, su uso ha sido restringido. Afortunadamente en los últimos años la tecnología de ADN recombinante para la producción de proteínas ha avanzado significativamente, siendo las microalgas organismos modelos que dan soluciones a estas problemáticas (Arias et al., 2023). En este estudio, se confirmaron exitosamente dos construcciones, pChlamy-E760 y p463-AS48, mediante PCR y análisis de gel de agarosa. La transformación nuclear de *S. acutus*, *C. vulgaris* y *N. oculata* no fue exitosa, a pesar del crecimiento de varias colonias en medio selectivo con higromicina. Este resultado puede deberse a que el vector pChlamy_1 se encuentra optimizado para su uso en la microalga *C. reinhardtii*, además de otros factores, como la falta de un protocolo adaptado para la transformación genética de estas microalgas, la expresión transitoria del gen de resistencia, o la integración incompleta del transgén (Kim et al., 2014). Por otro lado, la transformación cloroplástica de *C. reinhardtii* resultó en la integración exitosa del gen AS-48, confirmada por PCR. La mayor eficiencia observada en la transformación cloroplástica puede deberse a la naturaleza más estable y eficiente de este método en comparación con la transformación nuclear en microalgas que pueden presentar problemas únicos como la integración aleatoria que puede ocasionar efectos de posición y silenciamiento de genes, la transformación nuclear no tiene alta ploidía y produce una menor expresión y acumulación de proteínas foráneas (Bock., 2007; Daniell et al., 2016). Este estudio aporta evidencia adicional sobre la viabilidad de las transformaciones cloroplásticas para la producción de proteínas recombinantes en microalgas. La confirmación de la integración y expresión del gen AS-48 en *C. reinhardtii* refuerza la hipótesis de que el cloroplasto es un sitio adecuado para la expresión de péptidos antimicrobianos, debido a su capacidad para producir proteínas en grandes cantidades sin efecto negativo sobre la célula huésped.

La detección del péptido AS-48 en las microalgas transplastómicas mediante ELISA mostró una diferencia significativa en comparación con las cepas silvestres. La concentración de 0.044 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ obtenida en la fracción soluble de la línea 5.1 sugiere una producción relativamente baja del péptido. Este resultado no es consistente

con estudios previos que indican que las transformaciones cloroplásticas pueden resultar en altos niveles de expresión de proteínas recombinantes en microalgas debido a que la mayoría de los rendimientos son iguales o inferiores al 5% de PTS (Manuell et al., 2007), esto también fue observado en estudios previos realizados en nuestro laboratorio donde se obtuvieron rendimientos de 0.21% en la PTS (Dávalos-Guzmán., 2019), el nivel de expresión de proteínas más alto reportado en los cloroplastos es de poco más del 10% de PTS (Surzycki et al., 2009). Las limitaciones principales del estudio incluyen la baja eficiencia de transformación cloroplástica ya que solo se pudo confirmar una línea transplastómica, ineficiencia en la transformación nuclear y la falta de detección del transgén en las microalgas inicialmente transformadas. Además, la cuantificación del péptido AS-48 se basó en un ensayo de ELISA, que, aunque es sensible, podría beneficiarse de confirmaciones adicionales mediante técnicas como western blot para asegurar la identidad del péptido.

Suárez et al. (2021) purificaron el péptido AS-48 a partir de cultivos de la cepa *Enterococcus faecalis* UGRA10 por medio de cromatografía líquida de fase reversa y reportaron ensayos de concentración mínima inhibitoria (CMI) en los que se requirieron 32 µg/mL para la inhibición de biopelículas *S. aureus* resistente a meticilina. Este es un ejemplo de cómo se ha estudiado ampliamente la actividad antimicrobiana del péptido AS-48 y se ha demostrado que tiene actividad contra bacterias Gram positivas. En otro estudio, Ananou et al., 2009, demostraron que el péptido AS-48, obtenido a partir de cultivos de *E. faecalis* A-48-32 por medio de cromatografía de intercambio catiónico y luego secado por aspersion provoca la actividad bactericida en *Listeria monocytogenes* CECT 4032 a concentraciones de 0.1 µg/mL.

Estos resultados son prometedores para el desarrollo de agentes antimicrobianos basados en microalgas transgénicas sin necesidad de depender de procesos de purificación como la cromatografía líquida de alta eficacia o el uso de tecnologías como el secado por aspersion que son herramientas costosas y que pueden presentar dificultades a la hora de obtener compuestos bioactivos de interés. La menor eficacia observada a 500 µg sugiere una relación dosis-respuesta que podría

optimizarse en futuros estudios.

El PAM AS-48 demuestra un robusto mecanismo de acción principalmente a través de la alteración de las membranas celulares bacterianas. Una vez integrado, AS48 forma poros de tipo toroidal en la membrana (Cruz et al., 2013), lo que provoca la salida de contenidos intracelulares esenciales y, en última instancia, provoca la muerte celular. A diferencia de los antibióticos que inhiben procesos celulares específicos, como la síntesis de proteínas o la replicación del ADN, es menos probable que la acción disruptiva de la membrana de AS-48 sea eludida por los mecanismos típicos de resistencia bacteriana. La potente actividad de AS-48 contra *L. monocytogenes* subraya su potencial como biopreservador eficaz en la industria alimentaria. Los estudios demostrados en este proyecto afirman que AS-48 puede inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en concentraciones inferiores a las requeridas para muchos conservadores tradicionales, destacando su eficacia (Montalbán-López et al., 2011).

Los resultados sugieren que las microalgas transformadas pueden ser utilizadas como biorreactores para la producción de péptidos antimicrobianos. Esto tiene importantes aplicaciones en la biotecnología y la industria farmacéutica, donde la producción sostenible y escalable de compuestos bioactivos es de gran interés. La capacidad de inhibir patógenos como *Listeria monocytogenes* destaca el potencial de estos sistemas para aplicaciones en seguridad alimentaria y salud pública.

10. Conclusiones

- Se confirmó la presencia de los genes *AS-48* y *E-760* en las construcciones p463-AS48 y pChlamy-E760.
- Se desarrollaron líneas transplastómicas capaces de crecer en medio selectivo a través de la transformación por balística de *C. reinhardtii* 137(+) con la construcción p463-AS48.
- Se generaron líneas transformadas de tipo nuclear capaces de crecer en medio selectivo a través de la transformación por *Agrobacterium tumefaciens* de *S. acutus* UTEX 72, *C. vulgaris* OW-01 y *N. oculata* CCAP 849/7 con la construcción pChlamy-E760.
- Se generó solo una línea transplastómica (Línea 5.1) donde fue posible

confirmar la presencia del gen AS-48 en *C. reinhardtii*.

- Fue posible la cuantificación e identificación del péptido AS-48 producido en la cepa transformada con la construcción p463-AS48 de *C. reinhardtii* utilizando el ensayo de ELISA.
- Se comprobó la actividad bactericida del péptido AS-48 en contra de *Listeria monocytogenes* con una concentración mínima de 750 µg de PTS a los 90 min de exposición.

11. Bibliografía

- Adem, M., Beyene, D., & Feyissa, T. (2017). Recent achievements obtained by chloroplast transformation. *Plant Methods*, 13(1), 1-12.
<https://doi.org/10.1186/s13007-017-0179-1>
- Alberto Téllez, G., Castaño, J., & Peptides, A. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55–67. <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14n1/v14n1a07.pdf>
- Alegria-Mancilla, F. M. (2021). Producción del péptido antimicrobiano E-760 en *Chlamydomonas reinhardtii* [Tesis maestría, Universidad Autónoma de San Luis Potosí]. Repositorio biblioteca UASLP.
- Ananou, S., Muñoz, A., Martínez-Bueno, M., González-Tello, P., Gálvez, A., Maqueda, M., & Valdivia, E. (2010). Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying. *Food Microbiology*, 27(1), 58–63.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.08.002>
- Arias, C. A. D., Oliveira, C. F. M. de, Molino, J. V. D., Ferreira-Camargo, L. S., Matsudo, M. C., & Carvalho, J. C. M. de. (2023). Production of Recombinant Biopharmaceuticals in *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Plant Biology*, 14(1), 39–52. <https://doi.org/10.3390/ijpb14010004>
- Baek, M.-H., Kamiya, M., Takahiro Kushibiki, Taichi Nakazumi, Satoshi Tomisawa, Abe, C., Yasuhiro Kumaki, Takashi Kikukawa, Makoto Demura, Kawano, K., & Aizawa,

- T. (2016). Lipopolysaccharide-bound structure of the antimicrobial peptide cecropin P1 determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Peptide Science*, 22(4), 214–221. <https://doi.org/10.1002/psc.2865>
- Bock, R. (2007). Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.12.001>
- Borovinskaya, M. A., Shoji, S., Fredrick, K., & Cate, J. H. D. (2008). Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. *RNA*, 14(8), 1590–1599. <https://doi.org/10.1261/rna.1076908>
- Bowdish, D. M. E., Davidson, D. J., & Hancock, R. E. W. (2020). Immunomodulatory Properties of Defensins and Cathelicidins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1(303), 27–66. https://doi.org/10.1007/3-540-29916-5_2
- Braffman, N. R., Piscotta, F. J., Hauver, J., Campbell, E. A., Link, A. J., & Darst, S. A. (2019). Structural mechanism of transcription inhibition by lasso peptides microcin J25 and capistruin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(4), 1273–1278. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817352116>
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Cardoso, M. H., Meneguetti, B. T., Costa, B. O., Buccini, D. F., Oshiro, K. G. N., Preza, S. L. E., Carvalho, C. M. E., Migliolo, L., & Franco, O. L. (2019). Non-Lytic Antibacterial Peptides That Translocate Through Bacterial Membranes to Act on Intracellular Targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4877. <https://doi.org/10.3390/ijms20194877>
- Cebrián, R., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Albert, A., Maqueda, M., & Sánchez-Barrena, M. J. (2015). The bacteriocin AS-48 requires dimer dissociation followed by hydrophobic interactions with the membrane for antibacterial activity. *Journal of*

- Structural Biology*, 190(2), 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.03.006>
- Chen, Y., Wang, Y., Sun, Y., Zhang, L., & Li, W. (2001). Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in *Chlorella ellipsoidea* cells. *Current Genetics*, 39(5-6), 365–370. <https://doi.org/10.1007/s002940100205>
- Conter, M., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara, A., & Ianieri, A. (2009). Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 128(3), 497–500. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.018>
- Cruz, V. L., Ramos, J., Melo, M. N., & Martinez-Salazar, J. (2013). Bacteriocin AS-48 binding to model membranes and pore formation as revealed by coarse-grained simulations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828(11), 2524–2531. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.036>
- Daniell, H., Lin, C.-S., Yu, M., & Chang, W.-J. (2016). Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1004-2>
- Dávalos-Guzmán, S. D. (2023). Caracterización del péptido flo producido en microalgas y evaluación de la actividad antimicrobiana y citotóxica en *Nannochloropsis oculata*. [Tesis doctorado, Universidad Autónoma de San Luis Potosí]. Repositorio biblioteca UASLP. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/8385>
- Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., & Valdivia, E. (1989). Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms. *Research in Microbiology*, 140(1), 57–68. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(89\)90060-0](https://doi.org/10.1016/0923-2508(89)90060-0)
- Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Quesada, A., & Montoya, E. (1986). Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 32(10), 765–771. <https://doi.org/10.1139/m86-141>

- Garcidueñas-Piña, C., Medina-Ramírez, I., Plinio Guzmán, Rico-Martínez, R., José Francisco Morales-Domínguez, & Isidoro Rubio-Franchini. (2016). Evaluation of the Antimicrobial Activity of Nanostructured Materials of Titanium Dioxide Doped with Silver and/or Copper and Their Effects on *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Photoenergy*, 2016(1), 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/8060847>
- Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C., & Degraeve, P. (2015). Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8), 1262–1274. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.763765>
- Graf, M., Mardirossian, M., Nguyen, F., Seefeldt, A. C., Guichard, G., Scocchi, M., Innis, C. A., & Wilson, D. N. (2017). Proline-rich antimicrobial peptides targeting protein synthesis. *Natural Product Reports*, 34(7), 702–711. <https://doi.org/10.1039/c7np00020k>
- Grande Burgos, M. J., Pérez Pulido, R., López Aguayo, M. del C., Gálvez, A., & Lucas, R. (2014). The Cyclic Antibacterial Peptide Enterocin AS-48: Isolation, Mode of Action, and Possible Food Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22706–22727. <https://doi.org/10.3390/ijms151222706>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2014). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Guzmán, F., Wong, G., Román, T., Cárdenas, C., Álvarez, C., Schmitt, P., Albericio, F., & Rojas, V. (2019). Identification of Antimicrobial Peptides from the Microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher and Bactericidal Activity Improvement. *Marine Drugs*, 17(8). <https://doi.org/10.3390/md17080453>
- Hale, J. D., & Hancock, R. E. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 5(6), 951–959. <https://doi.org/10.1586/14787210.5.6.951>
- Hancock, R. E. W., & Sahl, H.-G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new

- anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24(12), 1551–1557.
<https://doi.org/10.1038/nbt1267>
- Harder, J., Tsuruta, D., Murakami, M., & Kurokawa, I. (2013). What is the role of antimicrobial peptides (AMP) in acne vulgaris? *Experimental Dermatology*, 22(6), 386–391. <https://doi.org/10.1111/exd.12159>
- Hefferon, K. L. (2012). Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins. *Virology*, 433(1), 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.06.012>
- Hoang, K. V., Stern, N. J., Saxton, A. M., Xu, F., Zeng, X., & Lin, J. (2011). Prevalence, Development, and Molecular Mechanisms of Bacteriocin Resistance in *Campylobacter*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2309–2316.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02094-10>
- JJ, Q.-R., Soria-Guerra, R., Perez-Juarez, F., Martinez-Gonzalez, L., Valdes-Rodriguez, S., Vasco-Mendez, N., & Morales-Dominguez, J. (2019). Heterologous expression of bacteriocin E-760 in *Chlamydomonas reinhardtii* and functional analysis. *Phyton*, 88(1), 25–35. <https://doi.org/10.32604/phyton.2019.04549>
- Kim, S., Lee, Y.-C., Cho, D.-H., Lee, H. U., Huh, Y. S., Kim, G.-J., & Kim, H.-S. (2014). A Simple and Non-Invasive Method for Nuclear Transformation of Intact-walled *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS ONE*, 9(7), e101018.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101018>
- Kindle, K. L., & Sodeinde, O. A. (1994). Nuclear and chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*: Strategies for genetic manipulation and gene expression. *Journal of Applied Phycology*, 6(2), 231–238.
<https://doi.org/10.1007/bf02186076>
- Koo, J., Park, D., & Kim, H. (2013). Expression of bovine lactoferrin N-lobe by the green alga, *Chlorella vulgaris*. *Algae*, 28(4), 379–387. <https://www.e-algae.org/journal/view.php?number=2711>

- Kumar, P., Kizhakkedathu, J., & Straus, S. (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
- Kumar, S. V., Misquitta, R. W., Reddy, V. S., Rao, B. J., & Rajam, M. V. (2004). Genetic transformation of the green alga—*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, 166(3), 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.012>
- Lee, T.-H., N. Hall, K., & Aguilar, M.-I. (2015). Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(1), 25–39. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150703121700>
- Line, J. E., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Perelygin, V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Levchuk, V. P., Svetoch Olga E, Seal, B. S., Siragusa, G., & Stern, N. J. (2008). Isolation and Purification of Enterocin E-760 with Broad Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(3), 1094–1100. <https://doi.org/10.1128/aac.01569-06>
- Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., Mueller, A., Schäberle, T. F., Hughes, D. E., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V. A., Cohen, D. R., Felix, C. R., Fetterman, K. A., Millett, W. P., Nitti, A. G., Zullo, A. M., & Chen, C. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517(7535), 455–459. <https://doi.org/10.1038/nature14098>
- Liu, D., Lawrence, M. L., Ainsworth, A. J., & Austin, F. W. (2005). Isolation and PCR amplification of a species-specific oxidoreductase-coding gene region in *Listeria grayi*. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(1), 95–98. <https://doi.org/10.1139/w04-108>
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An

- Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(194), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
- Mansour, S. C., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. W. (2014). Peptide IDR-1018: modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections. *Journal of Peptide Science*, 21(5), 323–329. <https://doi.org/10.1002/psc.2708>
- Manuell, A. L., Beligni, M. V., Elder, J. H., Siefker, D. T., Tran, M., Weber, A., McDonald, T. L., & Mayfield, S. P. (2007). Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant Biotechnology Journal*, 5(3), 402–412. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00249.x>
- Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., & Valdivia, E. (1998). Widespread production of AS-48-like bacteriocins in strains of *Enterococcus faecalis*? *Molecular Microbiology*, 29(5), 1318–1319. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01020.x>
- Merrifield, R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. the Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14), 2149–2154. <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>
- Mishra, B., Reiling, S., Zarena, D., & Wang, G. (2017). Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies. *Current Opinion in Chemical Biology*, 38(2017), 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.014>
- Montalban-Lopez, M., Sanchez-Hidalgo, M., Valdivia, E., Martinez-Bueno, M., & Maqueda, M. (2011). Are Bacteriocins Underexploited? NOVEL Applications for OLD Antimicrobials. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(8), 1205–1220. <https://doi.org/10.2174/138920111796117364>
- Nilsson, L., & Gram, L. (2002). *Improving the control of pathogens in fish products* (H. A. Bremner, Ed.). Welcome to DTU Research Database; Woodhead Publishing. <https://orbit.dtu.dk/en/publications/improving-the-control-of-pathogens-in-fish->

products

Organización Mundial de la Salud. (2020, October 13). *Resistencia a los antimicrobianos*.

Www.who.int. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Parachin, N. S., Mulder, K. C., Viana, A. A. B., Dias, S. C., & Franco, O. L. (2012).

Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides.

Peptides, 38(2), 446–456. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.020>

Pérez-Juárez, F. S. (2023). Producción del péptido antimicrobiano E-760 en

Chlamydomonas reinhardtii [Tesis licenciatura, Universidad Autónoma de San Luis Potosí]. Repositorio biblioteca UASLP.

Pina-Pérez, M. C., Rivas, A., Martínez, A., & Rodrigo, D. (2017). Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food.

Food Chemistry, 235(2017), 34–44.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.033>

Rajagopal, M., & Walker, S. (2017). Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria.

Current Topics in Microbiology and Immunology, 404(2017), 1–44.

https://doi.org/10.1007/82_2015_5021

Rima, M., Rima, M., Fajloun, Z., Sabatier, J.-M., Bechinger, B., & Naas, T. (2021).

Antimicrobial Peptides: A Potent Alternative to Antibiotics. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1095. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091095>

Surzycki, R., Greenham, K., Kitayama, K., Dibal, F., Wagner, R., Rochaix, J.-D., Ajam, T., & Surzycki, S. (2009). Factors effecting expression of vaccines in microalgae.

Biologicals, 37(3), 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.02.005>

Troxler, R., von Graevenitz, A., Funke, G., Wiedemann, B., & Stock, I. (2000). Natural

antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L.*

monocytogenes, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clinical Microbiology and*

Infection, 6(10), 525–535. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00168.x>

- Velázquez-Suárez, C., Rubén Cebrián, Gasca-Capote, C., Sorlózano-Puerto, A., José Gutiérrez-Fernández, Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., & Valdivia, E. (2021). Antimicrobial Activity of the Circular Bacteriocin AS-48 against Clinical Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, *10*(8), 925–925. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080925>
- WHO. (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. [Www.who.int](http://www.who.int). <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748>
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, *415*(6870), 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>

12. Resumen del reporte de similitud

Producción de las bacteriocinas E-760 y AS-48 en microalgas

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%

ÍNDICE DE SIMILITUD

13. Anexos

Curva estándar péptido Flo

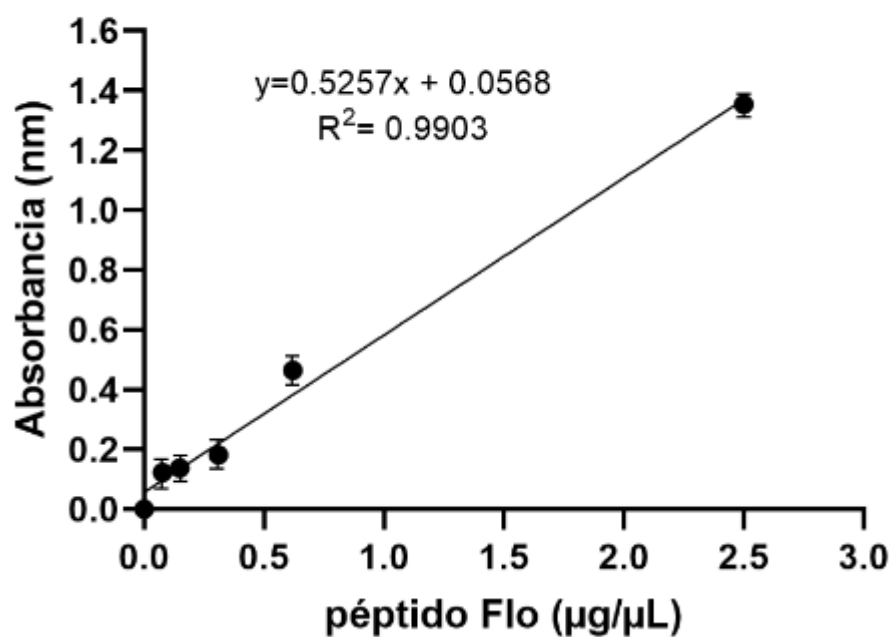


Figura suplementaria 1. Curva estándar para la cuantificación del péptido Flo contenido en la PTS de las microalgas transplastómicas, realizada a partir del péptido purificado obtenido por síntesis química.