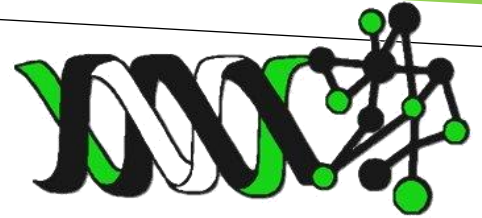




Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

TESIS

**“Efecto del medio de cultivo sobre la expresión de proteínas antimicrobianos y su actividad conjunta con las especies reactivas de oxígeno en *Lactiplantibacillus paraplantarum*”.**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

**M. en B. JESSICA JOSEFINA HURTADO RÍOS**

Matrícula: 2173801826

yyias.yomi@gmail.com / j.j.hurtado@xanum.uam.mx

Directora: Dra. Edith Ponce Alquicira.

JURADO:

Presidenta: Dra. María de Lourdes Pérez Chabela

Secretario: Dr. Ulises Carrasco Navarro.

Vocal: Dr. Julio César Almanza Pérez.

Vocal: Dr. Israel García Cano.

Iztapalapa, Ciudad de México a 26 de julio 2024

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Efecto del medio de cultivo sobre la expresión de péptidos antimicrobianos y su actividad conjunta con las especies reactivas de oxígeno en *Lactiplantibacillus paraplantarum*.**

que presentó:

**M. en B. Jessica Josefina Hurtado Ríos**

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesor: Dr. Ulises Carrasco Navarro.

Asesor: Dr. Julio César Almanza Pérez.

**Sinodales:**

Presidenta

Dra. Ma. De Lourdes Pérez Chabela  
*Biotecnología UAM-Iztapalapa*

\_\_\_\_\_

Secretario

Dr. Ulises Carrasco Navarro  
*Biotecnología UAM-Iztapalapa*

\_\_\_\_\_

Vocal

Dr. Julio César Almanza Pérez  
*Biología Experimental UAM-Iztapalapa*

\_\_\_\_\_

Vocal

Dr. Israel García Cano  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

\_\_\_\_\_

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Sistema Nacional de Posgrado (SNP, antes Programa Nacional de Posgrados de Calidad o PNPC) del CONAHCYT, con la referencia 001465 en el nivel internacional.”

# DEDICATORIAS.

Queridos Padres,

No encuentro palabras suficientes para expresar mi profundo agradecimiento por todo lo que han hecho por mí a lo largo de los años. Ustedes han creado un hogar lleno de amor, confianza y apoyo, y estoy infinitamente agradecida por formar parte de esta familia. Ustedes son lo más importante en el mundo y han sido un ejemplo de valores y fortaleza.

Gracias por mostrarme el verdadero significado de la familia unida y por estar siempre a mi lado, ayudándome a construir mi camino hacia el futuro. Aunque me haya desviado en algunos momentos y algunos de esos bloques se hayan quebrado en otros, sé que siempre podré contar con su ayuda para volver a armarlos.

Siempre estarán a mi lado, sin importar las circunstancias. Incluso si la vida nos lleva por caminos separados, quiero que sepan que siempre los llevaré en mi corazón y en mis pensamientos. El amor que compartimos es inquebrantable, y sé que siempre estaremos juntos, pase lo que pase.

Mamá, admiro tu fuerza, tu dedicación y tu amor incondicional. Gracias por ser mi amiga, por ser la luz de mis ojos (literal) y por ser un ejemplo a seguir en cada paso que doy. Prometo que nuestra conexión nunca se perderá, y siempre estaré aquí cuando me necesites, al igual que tú siempre has estado para mí.

Papá, mi héroe desde el primer día. Admiro tu valentía, tu trabajo duro y tu sabiduría. Gracias por enseñarme a luchar por mis sueños, a ser la mejor versión de mí misma en todo momento. Nunca olvidaré tus abrazos reconfortantes, tus consejos sabios y tus historias inspiradoras.

A la familia Hurtado y Ríos, mi abuelita Carmelita y mi tía Socorro.

A Sac Nicté (mi ardillis), mi compañera y amiga desde la licenciatura y que se ha ganado el título de hermana. Gracias por estar en esta nueva etapa de mi vida, anécdotas que contar, gracias por haber estado a mi lado para ayudarme, escucharme, aconsejarme y en muchas ocasiones guiarme.

A MaFer baby, si algo hermoso me ha dejado el regreso al laboratorio después de la pandemia, fue conocerte. Te convertiste en una amiga muy querida. Tus consejos personales y profesionales reflejan el gran ser humano que eres y la inteligencia que posees. Infinitas gracias por tu amistad. Siempre seremos Pinky y Cerebro. Extrañaré esos días interminables trabajando en la Universidad, y nunca olvidaré nuestra pijamada en diciembre, haciendo experimentos de tiempo real y durmiendo en el laboratorio.

A Marianita bebé, me has enseñado tantas cosas en tan poco tiempo, como que una amistad verdadera no se mide por la duración, sino por el amor, la empatía y el apoyo. Te agradezco inmensamente tu amistad y te ofrezco lo mejor de mí como amiga.

A Ana Cristina, mi Cachetitos, muchas gracias por tu amistad y apoyo. Aunque nuestros tiempos no siempre coinciden, sabes que siempre estaré ahí gracias a la tecnología. Te admiro y te quiero mucho, al igual que a mi sobrina Regina, a quien también dedico este trabajo.

A mis amigos Sac Nicté (bebé), Yeye, Zelick quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento, alegrías y tristezas.

Para Frida y Anahí, mis primeras alumnas a las que tuve el honor de asesorar. El Dr. Uli me dijo una vez: "A veces los alumnos nos salvan", y aprendí mucho de ustedes. Gracias por su apoyo en el laboratorio y por sus risas. Valoro enormemente su dedicación para seguir aprendiendo y estoy segura de que tienen todo lo necesario para triunfar.

A mis compañeros de laboratorio, los que se quedan y los que ya se han ido, por su apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio.

A W-002, en especial Gerry, mi hermanito menor científico. Así como a la Dra. Wyl: agradezco profundamente su apoyo y sus consejos académicos. Usted es un gran ejemplo a seguir y una académica excepcional. Su amistad, calidez y compañerismo han sido un gran aliento y motivación para mí. Asimismo, quiero expresar mi sincero agradecimiento a la Dra. Hypatia por su amistad y apoyo durante este proceso. Gracias por estar siempre dispuesta a escuchar y ofrecer su valiosa guía.

A Goya, has sido mi compañera fiel y constante durante todo este proceso. En los momentos de estrés y agotamiento, tu presencia amorosa y juguetona me brindaron la tranquilidad y el ánimo necesarios para seguir adelante. Tus paseos diarios fueron un recordatorio de la importancia de cuidar tanto del cuerpo como de la mente. Gracias por tus ojos llenos de comprensión, por estar siempre a mi lado, y por llenar mis días de alegría y compañía al irnos a vivir solas.

A ti, quiero expresar mi más profundo agradecimiento por todo el cariño y apoyo que me brindaste durante este viaje, así como por proporcionarme herramientas como el Kindle y los proyectores que mejoraron mi trabajo. Aunque ahora tu presencia sea lejana, agradezco cada palabra de aliento, cada momento de comprensión y por creer en mí.

**A la huella de tu vida que quedó grabada en mi alma eternamente.**

## AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Edith Ponce Alquicira, quiero expresar mi más profundo agradecimiento por su guía, apoyo y dedicación a lo largo de este viaje académico. Su paciencia, sabiduría y constante motivación han sido fundamentales para la realización de este trabajo. Agradezco enormemente el tiempo que ha invertido en revisar mis avances, sus valiosos comentarios y su compromiso con mi desarrollo profesional. Su confianza en mis capacidades y su inspiración han sido pilares esenciales para alcanzar mis objetivos. Estoy profundamente agradecida por todo lo que he aprendido bajo su dirección y por el privilegio de haber trabajado con usted. Gracias por ser una mentora excepcional y por su incansable apoyo en cada paso de este camino.

Al Dr. Ulises Carrasco Navarro: no existen palabras suficientes para expresar mi gratitud por todo su apoyo en este trabajo. Agradezco profundamente sus consejos académicos, su guía, y especialmente su apoyo en esta etapa final al invitarme a participar en un proyecto. Gracias por brindarme la oportunidad de expandir mis conocimientos junto a otros compañeros del posgrado, por impulsarme y ofrecerme siempre palabras de aliento al regresar después de la pandemia y retomar mis experimentos. Su confianza y generosidad al abrirme las puertas de su laboratorio han sido invaluable.

A mi asesor Dr. Julio César por sus comentarios y apoyo en esta investigación.

A los sinodales de tesis por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y por el interés mostrado para mejorarla.

A la Bióloga Mónica Rincón Guevara por su apoyo brindado como responsable del Laboratorio Divisional de Espectrometría de Masas.

# ÍNDICE GENERAL.

<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>1</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>2</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Bacterias Ácido Lácticas .....</b>	<b>6</b>
1.1.1 Ecología, hábitats y biotecnología. ....	6
1.1.2 Requerimientos nutricionales. ....	7
1.1.3 Importancia de las BAL en alimentos. ....	8
1.1.4 <i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i> .....	9
<b>1.2 Compuestos con actividad antimicrobiana producidos por BAL.....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Peptidoglucano hidrolasas (PGHs). ....	11
1.2.2 Proteínas ribosomales (RP). ....	14
<b>1.3 PCR cuantitativa (qPCR) y RT-qPCR. ....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). ....</b>	<b>19</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>21</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>22</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>22</b>
<b>5. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>22</b>
<b>6. METODOLOGÍA .....</b>	<b>23</b>
<b>6.1 Metodología general. ....</b>	<b>23</b>
<b>6.2 Condiciones de crecimiento de la cepa.....</b>	<b>23</b>
<b>6.3 Identificación de cepa.....</b>	<b>24</b>
6.3.1 Identificación de cepa por espectrometría de masas. ....	24
6.3.2 Identificación por el gen <i>recA</i> . ....	25
<b>6.4 Identificación de proteína de alto peso molecular con actividad antimicrobiana. ....</b>	<b>28</b>
6.4.1 Análisis de datos de espectrometría de masas. ....	28

6.4.2	Diseño de oligonucleótidos para amplificación proteína de alto peso molecular. ....	29
<b>6.5</b>	<b>Evaluación de la expresión del gen <i>mupG</i> y <i>RP uL14</i>.</b> .....	<b>32</b>
6.5.1	Extracción y purificación de ARN total. ....	32
6.5.2	Cuantificación de ARN total. ....	34
6.5.3	Síntesis de ADNc. ....	34
6.5.4	Comprobación de síntesis de ADNc. ....	35
6.5.5	PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). ....	36
6.5.6	Cuantificación relativa por el método CT comparativo. ....	37
<b>6.6</b>	<b>Clonación del gen <i>RP uL14</i>.</b> .....	<b>37</b>
6.6.1	Obtención del inserto codificante a la <i>RP uL14</i> . ....	38
6.6.2	Digestión inserto ( <i>NdeI</i> / <i>RPuL14</i> / <i>XhoI</i> ) y vector pTWIN1.....	40
6.6.3	Ligación inserto ( <i>NdeI</i> / <i>RPuL14</i> / <i>XhoI</i> ) y vector pTWIN1. ....	40
6.6.4	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> TOP10. ....	41
6.6.5	Transformación. ....	41
6.6.6	TENS-Mini Prep. ....	42
6.6.7	Confirmación construcción pTWIN1-bRPuL14. ....	42
6.6.7.1	PCR punto final. ....	43
6.6.7.2	Secuenciación.....	44
<b>6.7</b>	<b>Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS).</b> .....	<b>45</b>
<b>6.8</b>	<b>Análisis estadístico.</b> .....	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE ANÁLISIS.....</b>	<b>47</b>
<b>7.1</b>	<b>Identificación de cepa.</b> .....	<b>47</b>
7.1.1	Identificación de cepa por espectrometría de masas. ....	47
7.1.2	Identificación de cepa por gen <i>recA</i> . ....	48
<b>7.2</b>	<b>Identificación de proteína antimicrobiana de alto peso molecular.</b> .....	<b>50</b>
<b>7.3</b>	<b>Efecto del carbono y nitrógeno en el medio de cultivo sobre la expresión de proteínas con actividad antimicrobiana.</b> .....	<b>53</b>
7.3.1	Peptidoglucano hidrolasa, MupG. ....	56
7.3.2	Proteína ribosomal, RP uL14. ....	58
<b>7.4</b>	<b>Clonación de <i>RP uL14</i> y construcción de plásmido <i>pTwin1-bRPuL14</i>.</b> .....	<b>61</b>
7.4.1	Amplificación del gen <i>RP uL14</i> y vector de expresión.....	61
7.4.2	Ligación del inserto y el vector de construcción. ....	63
7.4.3	Secuenciación del inserto ( <i>NdeI</i> / <i>RPuL14</i> / <i>XhoI</i> ).....	66
<b>7.5</b>	<b>Efecto de RP uL14 en la producción de ROS.</b> .....	<b>67</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>71</b>
<b>9.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>72</b>
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>73</b>



**ANEXO A. Medios y soluciones para transformación *E.coli* TOP10.....85**

**Artículo publicado.....86**

**Cursos y congresos.....87**

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Oligonucleótidos para amplificación el gen <i>recA</i> . .....	26
Tabla 2. Componentes de la reacción de PCR con enzima Platinum™Taq ADN polimerasa para amplificación gen <i>recA</i> .....	27
Tabla 3. Condiciones de PCR para amplificación el gen <i>recA</i> . .....	28
Tabla 4. Oligonucleótidos para amplificación el gen <i>mupG</i> . .....	32
Tabla 5. Concentración de carbono y nitrógeno proporcionada por cada medio de cultivo (CGB). .....	33
Tabla 6. Oligonucleótidos para amplificación el gen <i>RP uL14</i> y <i>mupG</i> .....	35
Tabla 7. Componentes de la reacción de qPCR. ....	36
Tabla 8. Oligonucleótidos para amplificación inserto ( <i>NdeI</i> / <i>RPuL14</i> / <i>XhoI</i> ). .....	39
Tabla 9. Componentes de la reacción de PCR con enzima Platinum™Taq ADN polimerasa para obtención de inserto ( <i>NdeI</i> / <i>RPuL14</i> / <i>XhoI</i> ).....	39
Tabla 10. Condiciones de PCR para obtención de inserto ( <i>NdeI</i> / <i>RPuL14</i> / <i>XhoI</i> ). .....	40
Tabla 11. Componentes para reacción de ligación.....	41
Tabla 12. Oligonucleótidos para confirmación de construcción pTWIN1-bRPuL14.....	43
Tabla 13. Componentes de la reacción de PCR con enzima DreamTaq Hot Start PCR Master Mix para confirmación de construcción. ....	44
Tabla 14. Condiciones de PCR para obtención de inserto ( <i>NdeI</i> / <i>RPuL14</i> / <i>XhoI</i> ). .....	44

# ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Representación esquemática de la pared celular de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Adaptado de Razew et al., 2022).....	12
Figura 2. Representación esquemática del peptidoglicano de bacterias Gram-positivas y especificidad de sustrato de las diferentes PGH (Adaptado de Layec et al., 2008).....	13
Figura 3. Representación del funcionamiento de diferentes fluoróforos. A) Colorante de unión. Se intercala en ADN de doble cadena para poder emitir fluorescencia. B) Sondas de hidrólisis, una vez alineadas en la región del ADN de interés son hidrolizadas por la Taq polimerasa logrando emisión de fluorescencia (Adaptado de Fuentes, 2023). .....	17
Figura 4. Diferentes etapas en PCR tiempo real (Adaptado de Wong y Medrano, 2005). .....	18
Figura 5. Esquema general de trabajo. ....	23
Figura 6. Vector de clonación pTWIN1 (New England Biolabs, Inc., Beijing, China). ....	38
Figura 7. Resultado y significado del valor de puntuación MALDI Biotyper para una colonia aislada de salami. ....	48
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del ADN extraído y purificado. Carril 1: cepa aislada del salami. Carril 2: cepa control <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> UNAM. Marcador: GeneRule 1kb ADN (Thermo Scientific). ....	49
Figura 9. Amplificación del gen <i>recA</i> de cepa aislada de salami mediante PCR en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: amplificación con oligonucleótido directo paraF ( <i>Lacp. paraplantarum</i> ). Carril 2: amplificación con oligonucleótido directo planF. Carril 3: amplificación con oligonucleótido directo pentF. Carril 4: amplificación con oligonucleótido directo planF del control positivo ( <i>Lacp. plantarum</i> ). Marcador: 100 pb ADN (Promega) .....	50
Figura 10. Resultados obtenidos del análisis de los espectros de masas adquiridos mediante LC-MS/MS por ionización por electrospray utilizando el software MaxQuant (versión 2.5.2.0) y las bases de datos de UniProt e InterPro. ....	52
Figura 11. Integridad del ARN total extraído de <i>Lacp. paraplantarum</i> en gel de agarosa al 0.8% de agarosa. Carril 1 y 2: condición C3 y N3 a las 18 h de crecimiento, ambos a mayor concentración de carbono y nitrógeno, respectivamente. Carril 3 y 4: condición C1 y N1 a las 24 h de crecimiento, ambos a menor concentración de carbono y nitrógeno, respectivamente .....	54
Figura 12. Amplificación del gen <i>mupG</i> a partir de ADNc de <i>Lacp. paraplantarum</i> a las 18 h de crecimiento en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1 al 3: condición N1 (menor concentración de nitrógeno). Carril 4 al 6: condición C1 (menor concentración de carbono). Carril 7: condición N3 (mayor concentración de nitrógeno). Marcador: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). .....	55
Figura 13. Amplificación del gen <i>RP uL14</i> a partir de ADNc de <i>Lacp. paraplantarum</i> a las 18 h de crecimiento en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1 al 3: condición N3 (mayor concentración de nitrógeno). Carril: 5 al 7: condición N1 (menor concentración de nitrógeno). Marcador: 100 pb ADN (Promega). .....	55
Figura 14. Curvas de disociación de ADNc de <i>Lacp. paraplantarum</i> para la condición con menor concentración de carbono en el medio de cultivo (C1) a las 18 h para el gen <i>RP uL14</i> (verde) y	

el gen referencia ( <i>recA</i> , morado). Cada reacción se llevó a cabo por triplicado biológico y duplicado técnico.....	56
Figura 15. Expresión relativa del gen <i>mupG</i> en medios de cultivo con diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno. Control CGB, medio sin modificación de carbono y nitrógeno. Medios modificados: C1 y N1, menor concentración de carbono y nitrógeno, respectivamente. C3 y N3 mayor concentración de carbono y nitrógeno, respectivamente. Todos los resultados de expresión se normalizaron en relación al gen <i>recA</i> mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Las barras verticales representan el SEM. Letras desiguales indican que hay diferencia significativa. ..	58
Figura 16. Expresión relativa del gen <i>RP uL14</i> en medios de cultivo con diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno. Control CGB, medio sin modificación de carbono y nitrógeno. Medios modificados: C1 y N1, menor concentración de carbono y nitrógeno, respectivamente. C3 y N3 mayor concentración de carbono y nitrógeno, respectivamente. Todos los resultados de expresión se normalizaron en relación al gen <i>recA</i> mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Las barras verticales representan el SEM. Letras desiguales indican que hay diferencia significativa. ..	60
Figura 17. Amplicon del gen <i>RP uL14</i> con extremos de enzimas de restricción <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i> en gel de agarosa al 0.8%. Marcador: Quick-load purple 100 bp DNA (New England BioLabs). .....	62
Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. A) Digestión del inserto ( <i>NdeI</i> / <i>RPuL14</i> / <i>XhoI</i> ). B) Carril 1: vector de expresión pTWIN1 sin digerir. Carril 2: digestión del vector de expresión pTWIN1. Ambas digestiones realizadas con enzimas de restricción: <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i> . Marcador: Quick-load purple 100 bp DNA (New England BioLabs). .....	63
Figura 19. Construcción del plásmido (pTWIN1-bRPuL14). Mapa circular del plásmido mostrando la ubicación de sitios de corte <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i> . Gen <i>RP uL14</i> (verde). Imagen obtenida utilizando SnapGene (GLS Biotech., Estados Unidos). .....	64
Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: ADN plasmídico de células transformadas de <i>E. coli</i> TOP10 con inserto (construcción: <i>NdeI</i> / <i>RPuL14</i> / <i>XhoI</i> ). Carril 2: vector de expresión pTWIN1 sin inserto. Marcador: GeneRule 1kb ADN (Thermo Scientific). ..	65
Figura 21. Productos amplificados por PCR para la comprobación del inserto ( <i>NdeI</i> / <i>RPuL14</i> / <i>XhoI</i> ) en ADN plasmídico de células transformadas de <i>E. coli</i> TOP10 en gel de agarosa al 0.8%. A) Amplicon de 473 pb con oligonucleótidos que amplifican el inserto y una parte del plásmido. B) Amplicon de 378 pb con oligonucleótidos que amplifican inserto ( <i>NdeI</i> / <i>RPuL14</i> / <i>XhoI</i> ). Marcador: Quick-load purple 100 pb DNA (New England BioLabs). .....	66
Figura 22. Resultado de BLASTx en la base de datos NCBI para el gen <i>RP uL14</i> para la cepa <i>Lacp. paraplantarum</i> . .....	67
Figura 23. Efecto de sp-RP uL14 en los niveles intracelulares de <i>S. aureus</i> (A), <i>L. monocytogenes</i> (B), <i>E. faecium</i> (C), <i>E. faecalis</i> (D), <i>S. Typhi</i> (E) y <i>E. coli</i> (F). Control positivo, bacterias inoculadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 500 μM. Blanco, bacterias no fueron expuestas a sp-RP uL14 ni a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Las barras verticales representan el SEM. Letras desiguales indican que hay diferencia significativa. ....	69

## RESUMEN

El empleo de proteínas y péptidos antimicrobianos se presenta como una alternativa prometedora a los antibióticos tradicionales, que enfrentan crecientes desafíos por la resistencia de los patógenos. En las últimas décadas, se ha documentado que las bacterias ácido lácticas (BAL) sintetizan compuestos proteicos con propiedades antimicrobianas, como bacteriocinas, peptidoglucano hidrolasas (PGHs) y, recientemente algunas proteínas ribosomales (RP). Los géneros de BAL conocidos por producir estos compuestos se encuentran *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus*. El origen de este proyecto se remonta al hallazgo en el grupo de investigación dirigido por la Dra. Edith Ponce Alquicira (UAM-Iztapalapa) de dos compuestos con actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos como *Listeria innocua*, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*, así mismo *Weissella viridescens*, un microorganismo catalogado como de deterioro de alimentos. Estos compuestos, con pesos moleculares de 13 y 66.2 kDa, fueron identificados como una proteína 50S ribosomal uL14 (RP uL14) y una proteína con actividad de muramidasa, respectivamente. Ambos producidos por *Lacp. paraplantarum*, aislada de un producto cárnico (salami). Además, se observó el efecto de la concentración de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo sobre su crecimiento y actividad antimicrobiana, siendo mayor en ambos casos al incrementar la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo (CGB).

En este trabajo, mediante la técnica de ionización por electrospray LC-MS/MS (OrbitrapTher), se identificó una proteína antimicrobiana de 66.2 kDa, previamente asociada con actividad de muramidasa, como *N*-acetilmuramidasa o MupG. Esta proteína pertenece al grupo de las peptidoglucano hidrolasa (PGHs) y es responsable de catalizar la hidrólisis del peptidoglucano (PG) ubicado en la pared celular bacteriana. Posteriormente, se realizó el análisis de expresión génica de las proteínas con actividad antimicrobiana en diversas concentraciones de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo, observando un efecto de la concentración de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo sobre su expresión. Se construyó el vector pTWIN1-bRPuL14, que incorpora la proteína ribosomal (RP uL14) en el vector pTWIN1. Esta construcción será esencial para futuras investigaciones, ya que permitirá expresar la proteína en su forma nativa, lo que facilita la realización de experimentos destinados a comprender su mecanismo de acción antimicrobiana aún no definido. Finalmente, el efecto antimicrobiano de RP uL14 podría atribuirse a su influencia en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales ocasiona daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), lípidos y proteínas del microorganismo objetivo, conduciendo a su muerte celular.

## ABSTRACT

The use of antimicrobial proteins and peptides presents a promising alternative to traditional antibiotics, which face increasing challenges due to pathogen resistance. In recent decades, it has been documented that lactic acid bacteria (LAB) synthesize protein compounds with antimicrobial properties, such as bacteriocins, peptidoglycan hydrolases (PGHs), and recently some ribosomal proteins (RP). The LAB genera known to produce these compounds include *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, and *Enterococcus*. This project originated from the discovery by the research group led by PhD Edith Ponce Alquicira (UAM-Iztapalapa) of two compounds with antimicrobial activity against pathogenic microorganisms such as *Listeria innocua*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli*, as well as *Weissella viridescens*, a microorganism classified as a food spoilage agent. These compounds, with molecular weights of 13 and 66.2 kDa, were identified as a 50S ribosomal protein uL14 (RP uL14) and a protein with muramidase activity, respectively. Both were produced by *Lacp. paraplantarum*, isolated from a meat product (salami). Additionally, the effect of carbon and nitrogen concentration in the culture medium on its growth and antimicrobial activity was observed, with higher levels in both cases when the nitrogen concentration in the culture medium (CGB) was increased.

In this work, using the electrospray ionization LC-MS/MS technique (OrbitrapTher), a 66.2 kDa antimicrobial protein, previously associated with muramidase activity, was identified as *N*-acetylmuramidase or MupG. This protein belongs to the peptidoglycan hydrolase (PGHs) group and is responsible for catalyzing the hydrolysis of peptidoglycan (PG) located in the bacterial cell wall. Subsequently, the gene expression analysis of proteins with antimicrobial activity was carried out at various carbon and nitrogen concentrations in the culture medium, observing an effect of the carbon and nitrogen concentration on their expression. The pTWIN1-bRPuL14 vector, incorporating the ribosomal protein (RP uL14) into the pTWIN1 vector, was constructed. This construct will be essential for future research, as it will allow the expression of the protein in its native form, facilitating experiments aimed at understanding its yet undefined antimicrobial mechanism of action. Finally, the antimicrobial effect of RP uL14 could be attributed to its influence on the generation of reactive oxygen species (ROS), which cause damage to the target microorganism's DNA, RNA, lipids, and proteins, leading to cell death.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Bacterias Ácido Lácticas

Desde una perspectiva microbiológica, las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un conjunto de microorganismos Gram-positivos que no forman esporas, son inmóviles, dan negativo en la prueba de catalasa, tienen capacidad anaerobia facultativa, y típicamente exhiben una morfología de cocos o bacilos, además de mostrar una alta resistencia a pH bajos. Su característica distintiva radica en su habilidad para generar ácido láctico como producto final de la fermentación de carbohidratos. Estas bacterias son notables por su versatilidad, adaptándose a diversos entornos que abarcan desde alimentos como lácteos, carnes, vegetales, pan y vino, hasta las superficies mucosas humanas como la cavidad bucal, vaginal y el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, forman una población bacteriana heterogénea que se encuentra de manera natural en alimentos, el tracto gastrointestinal tanto humano como animal, así como en el agua y el suelo (Ayivi et al., 2020; Wang et al., 2021; Leska et al., 2022). Este conjunto diverso de BAL abarca más de 60 géneros, donde algunos, como *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y ciertas cepas de *Streptococcus*, son considerados como seguros para el consumo humano bajo la designación GRAS (Generally Recognized as Safe) (Coelho et al., 2022). Entre los géneros más comunes encontrados en procesos de fermentación alimentaria se incluyen *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Weisella*, entre otros (Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010; Wang y Wang, 2014; Wang et al., 2021).

### 1.1.1 Ecología, hábitats y biotecnología.

Según el tipo de metabolismo de fermentación de carbohidratos que exhiben las BAL, se clasifican en dos grupos: homofermentativas y heterofermentativas. Las bacterias homofermentativas utilizan glucosa y, a través de la glucólisis, producen piruvato que se convierte en ácido láctico mediante la acción de la enzima lactato deshidrogenasa. Por otro lado, las bacterias ácido lácticas heterofermentativas, al fermentar la glucosa, generan ácido láctico, etanol y CO<sub>2</sub>. En este tipo de fermentación, también se sintetizan otros ácidos orgánicos como ácido acético y ácido fórmico (Monroy y Fernández, 2009; Carr et al., 2002; Liu et al., 2021). Como se ha mencionado previamente, las BAL constituyen un conjunto diverso de bacterias que desempeñan un papel crucial en diversos procesos de fermentación de alimentos. La fermentación de carbohidratos presentes en los alimentos conduce principalmente a la producción de ácido láctico. Además, la degradación de proteínas y lípidos, así como la síntesis

de varios alcoholes, aldehídos, ácidos, ésteres y compuestos de azufre, contribuyen al desarrollo de sabores en distintos productos alimenticios fermentados (Bintsis, 2018).

La característica distintiva del metabolismo de las BAL es su capacidad para producir predominantemente ácido láctico, aunque también pueden generar otros metabolitos como ácidos orgánicos, bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas. Estos últimos tres componentes inhiben el crecimiento de microorganismos de diversas maneras; por ejemplo, la producción de ácido láctico conduce a la acidificación del medio, lo que impide el crecimiento de otras bacterias y prolonga la vida útil de los alimentos fermentados (Wang et al., 2021; Liu et al., 2021). La producción de componentes con actividad antimicrobiana se ven afectados por el metabolismo de las BAL que los producen, influenciado por las condiciones químicas y físicas del entorno, donde factores como la temperatura, el pH, la disponibilidad de agua, el oxígeno y la concentración de nutrientes desempeñan roles fundamentales. Para su desarrollo, las bacterias requieren un conjunto mínimo de nutrientes, que incluyen una fuente de carbono, una de nitrógeno, algunos minerales y agua. A través de diversos procesos, los microorganismos adquieren del medio las sustancias necesarias para su crecimiento, algunas utilizadas para la construcción de macromoléculas y estructuras celulares, mientras que otras se emplean exclusivamente para la producción de energía (Saeed y Salam, 2013).

### 1.1.2 Requerimientos nutricionales.

Las fuentes de carbono son fundamentales para el crecimiento celular y la producción de metabolitos, siendo los carbohidratos una fuente de energía para las bacterias. Por ejemplo, *Lactiplantibacillus plantarum* muestra una capacidad notable para utilizar una amplia gama de carbohidratos, debido a que posee un gran número de genes relacionados con la absorción y metabolismo de azúcares, lo que le confiere una adaptabilidad versátil en diversos entornos. Además de su capacidad para fermentar carbohidratos tradicionales como la glucosa, celobiosa, manosa, D-ribosa y L-fructosa, esta especie puede fermentar prebióticos como fructooligosacáridos y galactooligosacáridos (Saeed y Salam, 2013; Cui et al., 2021).

El catabolismo de aminoácidos también desempeña un papel crucial en la obtención de energía por parte de las BAL en entornos con recursos nutricionales limitados. Si bien los carbohidratos son la principal fuente de carbono y energía para estas bacterias, también pueden obtener carbono y energía a partir de proteínas, aminoácidos y glicerol. Los aminoácidos y péptidos se pueden adquirir mediante la acción de proteasas o proteólisis, y posteriormente metabolizarse



para su uso. El crecimiento de las BAL depende en gran medida de los aminoácidos derivados de fuentes de nitrógeno orgánico, dado que estas bacterias tienen una capacidad limitada para sintetizar aminoácidos a partir de fuentes inorgánicas de nitrógeno. Los requerimientos de aminoácidos varían entre cepas, por ejemplo, *Lactiplantibacillus plantarum* solo requiere 3 aminoácidos, mientras que *Lactiplantibacillus acidophilus* necesita 14, lo que implica una diferencia en la complejidad nutricional de los medios de cultivo requeridos (Saeed y Salam, 2013).

En lo que respecta a las fuentes de nitrógeno orgánico, éstas son proporcionadas por aminoácidos y péptidos que se encuentran en la leche desnatada digerida con papaína, extracto de levadura, triptona (caseína tratada con tripsina), peptonas de soja, peptonas de origen animal, extracto de carne de res, licor de maíz, extractos de hígado, suero, e hidrolizados de proteínas, entre otros. Sin embargo, la peptona, el extracto de carne y el extracto de levadura se utilizan con mayor frecuencia como fuentes de nitrógeno, y son adecuados para el crecimiento de las BAL. Estos ingredientes no solo proporcionan nitrógeno, sino también carbono, minerales y vitaminas esenciales (Saeed y Salam, 2013).

### 1.1.3 Importancia de las BAL en alimentos.

Actualmente, las BAL son ampliamente empleadas como cultivos iniciadores en la industria de alimentos fermentados, abarcando una amplia gama de productos que incluyen quesos, yogures, leches fermentadas, así como carnes, pescados, frutas, verduras y cereales (Bintsis, 2018). Estas bacterias son seleccionadas por sus características metabólicas, las cuales mejoran el sabor, el aroma y el valor nutricional de los alimentos, al tiempo que prolongan su vida útil y se emplean como probióticos (Heredia-Castro et al., 2017; Behera et al., 2018; Ayivi et al., 2020; Wang et al., 2021). En las últimas décadas, se ha investigado ampliamente el potencial de las BAL como bioconservadores naturales debido a su capacidad para producir diversos metabolitos, como ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), bacteriocinas, PGHs y recientemente proteínas ribosomales con actividad antimicrobiana (Heredia-Castro et al., 2017; Bintsis, 2018; Hurtado-Rios et al., 2022).

El empleo de BAL en la conservación de alimentos, conocido como bioconservación, representa un enfoque natural que aprovecha la microbiota como una alternativa para prolongar la vida útil y conservar los alimentos. Los metabolitos producidos por las BAL, especialmente las bacteriocinas (como nisina, enterocina, plantaricina, pediocina, pentocina, neumociclina y

sakacina), son de particular interés para industrias lácteas, cárnicas y otras ramas alimentarias como agentes bioconservadores (Bhattacharya et al., 2022; Trabelsi et al., 2019; Ayivi et al., 2020). Otro metabolito de ampliamente utilizado en la industria alimentaria como bioconservador es la lisozima de clara de huevo de gallina, una enzima de la clase de las PGHs, que ha sido aprobada en Estados Unidos de América (E.U.A.) y en otros países. Su principal objetivo es inhibir *Clostridium tyrobutyricum* en quesos madurados y controlar el crecimiento de bacterias no deseables en vino, leche en polvo, frutas, embutidos, carnes y pescados. Además de tener aplicaciones en cosméticos y en la industria farmacéutica (García-Cano et al., 2020; Nakimbugwe et al., 2006; Maidment et al., 2009).

En el ámbito de la industria cárnica, el género *Lactobacillus* es comúnmente empleado como cultivo iniciador en la fermentación de estos alimentos y como agente bioconservador debido su capacidad de producir metabolitos antimicrobianos, como el ácido láctico y bacteriocinas, como la nisina. Estos metabolitos no solo inhiben el crecimiento de bacterias patógenas, sino que también exhiben actividad antifúngica contra *Aspergillus fumigatus*. La acción antifúngica de las especies de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* y *Lactobacillus pentosus* se debe a la capacidad de la bacteria para degradar compuestos tóxicos mediante los metabolitos antimicrobianos liberados en el medio, impidiendo así la liberación de toxinas del cuerpo fúngico (Bhattacharya et al., 2022).

#### 1.1.4 *Lactiplantibacillus paraplantarum*.

El género *Lactobacillus*, integrante del grupo de las BAL, destaca como uno de los géneros más prominentes y versátiles dentro de este conjunto. Una de sus especies más estudiadas y ampliamente empleadas en la industria alimentaria como probiótico y/o cultivo iniciador en numerosos productos alimenticios fermentados es *Lactiplantibacillus plantarum*, anteriormente conocida como *Lactobacillus plantarum*, que forma parte del taxón *Lacp. plantarum* junto con especies como *Lactiplantibacillus paraplantarum* y *Lacp. pentosus*, las cuales muestran una heterogeneidad fenotípica y genómica (Curk et al., 1996). Esta especie ha sido catalogada como GRAS y posee una destacada capacidad para sobrevivir en el tracto gastrointestinal y adherirse a las células epiteliales (Behera et al., 2018).

La cepa *Lacp. plantarum* se origina principalmente en sistemas alimentarios fermentados, como encurtidos, aceitunas en salmuera, masa madre, frutas y verduras fermentadas, así como en algunos quesos, salchichas fermentadas y pescados secos. Su aplicación ofrece una valiosa oportunidad para mejorar diversos aspectos en la industria alimentaria, tales como la

composición nutricional, la vida útil, la actividad antioxidante, las propiedades de sabor y las actividades antimicrobianas. Una de las características más estudiadas de *Lacp. plantarum* es su capacidad para producir bacteriocinas (plantaricinas) y péptidos antimicrobianos, los cuales se emplean en diversas matrices alimentarias para reducir la presencia de bacterias patógenas transmitidas por alimentos o para combatir microorganismos responsables del deterioro de los alimentos (Behera et al., 2018; Yilmaz et al., 2022). Además, al igual que otras BAL, *Lacp. plantarum* presenta requerimientos nutricionales complejos, que van más allá de una simple fuente de energía y carbono (carbohidratos), incluyendo nucleótidos, aminoácidos y vitaminas para su óptimo crecimiento y producción de compuestos antimicrobianos (Morishita et al., 1974; De Angelis y Gobbetti, 2016).

## 1.2 Compuestos con actividad antimicrobiana producidos por BAL.

Las BAL exhiben la notable capacidad de inhibir patógenos y microorganismos responsables de la descomposición de alimentos, logrando este efecto a través de productos sintetizados durante su metabolismo, tales como ácidos orgánicos y compuestos de naturaleza proteica con actividad antimicrobiana, como las bacteriocinas y las sustancias inhibidoras similares a las bacteriocinas (BLIS: bacteriocin-like inhibitory substances) (Heredia-Castro et al., 2017; Bintsis, 2018; Ayivi et al., 2020; Hurtado-Rios et al., 2022).

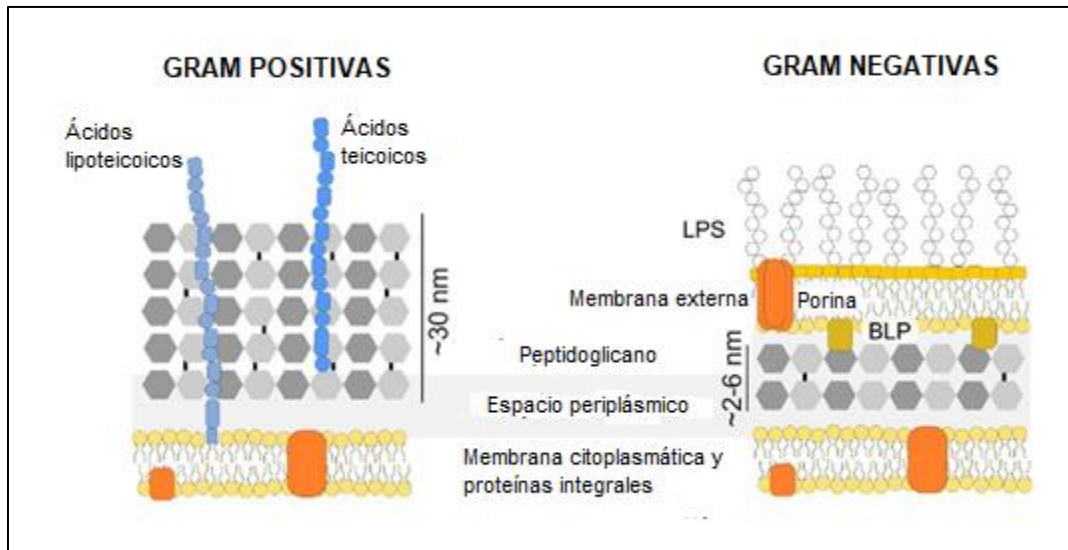
Las bacteriocinas, por ejemplo, son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente que muestran un gran potencial para combatir diversos patógenos. Por ejemplo, la nisina, secretada por *Lactococcus lactis*, ha demostrado ser un conservante eficaz contra ciertas bacterias Gram-positivas en alimentos. En términos generales, las bacteriocinas inducen la muerte celular al inhibir la biosíntesis de la pared celular o al alterar la membrana citoplasmática mediante la formación de poros (Wang et al., 2021; Liu et al., 2021; Bintsis, 2018). En cuanto a las BLIS, son péptidos o proteínas antimicrobianas aún no completamente caracterizados, que presentan efectos bactericidas o bacteriostáticos contra bacterias Gram-positivas y/o Gram-negativas, y son inocuas para la cepa productora. Estos compuestos suelen tener estructuras química diversas y contienen aminoácidos inusuales. Algunos autores sugieren que el término BLIS se use para referirse a cualquier bacteriocina recién descubierta, hasta que se conozcan los detalles de sus secuencias de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos del gen estructural correspondiente (Kim et al., 2024). Sin embargo, su aplicación enfrenta algunas limitaciones, como la sensibilidad a la proteólisis y la posible interacción con otros compuestos en sistemas complejos. Se ha reportado la producción en géneros como *Pediococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* (Sadeghi et al., 2023). Además de las bacteriocinas y BLIS, otras

proteínas antimicrobianas sintetizadas por las BAL, como las peptidoglucano hidrolasas (PGHs) y proteínas ribosomales (RP), también desempeñan un papel crucial en la inhibición de microorganismos.

### 1.2.1 Peptidoglucano hidrolasas (PGHs).

Las PGHs constituyen un conjunto de enzimas con pesos moleculares que oscilan entre los 14 kDa y los 137 kDa, y su función principal radica en la hidrólisis del peptidoglucano (PG), componente estructural fundamental de la pared celular tanto de bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (López-Arvizu et al., 2019). Entre las principales funciones de las PGHs se destaca su participación en procesos cruciales como la maduración, rotación y reciclaje del PG durante el crecimiento y la división celular. Además, desempeñan un papel vital en el metabolismo de la pared celular, las PGHs han exhibido actividad antimicrobiana al ser capaces de eliminar a competidores bacterianos que cohabitan en el mismo entorno ecológico. Y es gracias a su actividad lítica contra bacterias, incluidas cepas resistentes a los antibióticos que las PGHs emergen como una alternativa prometedora a los antimicrobianos convencionales (Razew et al., 2022).

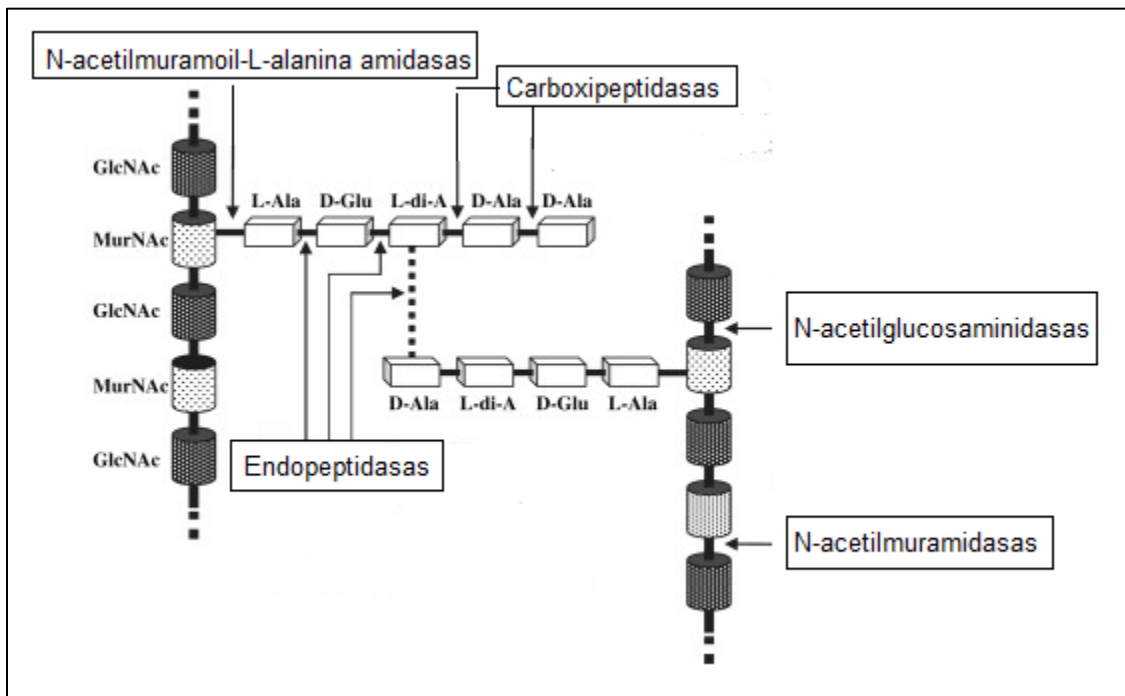
El peptidoglucano (PG), componente esencial de la pared celular bacteriana, conforma una estructura tipo andamio que rodea la membrana citoplasmática de las bacterias. Su función principal reside en resistir la presión osmótica interna, manteniendo la forma y la integridad celular, y proporcionando protección contra factores ambientales adversos. Además, sirve como anclaje para otros componentes de la envoltura celular, como proteínas y ácidos teicoicos, y otorga flexibilidad a las bacterias, permitiéndoles moverse, crecer y dividirse (Razew et al., 2022; Garde et al., 2021; Vollmer et al., 2008). El PG se compone de cadenas lineales de glicanos entrecruzadas covalentemente mediante cadenas peptídicas cortas, cada una de las cuales contiene residuos de ácido *N*-acetilmurámico y *N*-acetilglucosamina. Estas hebras de glicano son polímeros largos de disacáridos unidos por enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 (Garde et al., 2021). La estructura del PG es la base de la clasificación de Gram, que distingue entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Figura 1). Las bacterias Gram-positivas exhiben un PG multicapa, con un grosor de 30 a 50 nm, expuesto en el exterior celular y con uniones covalentes con compuestos de la pared como los ácidos teicoicos y lipoteicoicos. Por el contrario, las bacterias Gram-negativas poseen un PG más delgado, con un grosor de 1.5 a 15 nm, predominantemente monocapa, ubicado en el periplasma, rodeado por una membrana interna y externa rica en lipopolisacáridos (Razew et al., 2022; Garde et al., 2021).



**Figura 1. Representación esquemática de la pared celular de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Adaptado de Razew et al., 2022).**

La Figura 2 ilustra los diversos sitios de acción de las PGHs, donde cada enlace del peptidoglicano cuenta con una PGH capaz de escindirlo. La clasificación de las PGHs se relaciona con la presencia de dominios catalíticos conservados asociados a diferentes actividades enzimáticas, que incluyen amidasas, glicosidasas y peptidasas (Vermassen et al., 2019). Las amidasas de la pared celular (CWA) corresponden a *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasas (NALAA), también llamadas peptidoglucano amidasas (PGA) o simplemente amidasas. Estas enzimas hidrolizan el enlace amida entre los residuos MurNAc y L-alanina. En bacterias, se han identificado tres tipos de dominios catalíticos que son responsables de la actividad NALAA, i) *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa tipo 2 (NALAA-2): escinde rápidamente los enlaces 1,6-anhidro-MurNAc-L-Ala en MurNAc-tri y tetrapéptidos, la catálisis depende del zinc ( $Zn^{2+}$ ) y ocurre en una cavidad en forma de L, ii) *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa tipo 3 (NALAA-3): da como resultado la liberación del tripéptido L-Ala-D-Glu-mDAP y del tetrapéptido L-Ala-D-Glu-mDAP-D-Ala. Al igual que NALAA-2, NALAA-3 es una amidasa dependiente de zinc y iii) *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa tipo 5: el dominio NALAA-5 tiene alrededor de 140 aminoácidos de longitud, requiere colina para una actividad enzimática completa. Este dominio enzimático escinde el enlace amida entre el *N*-acetilmuramoil y los L-aminoácidos en las paredes celulares bacterianas (preferentemente: D-lactil-L-Ala), sin embargo, todavía no hay información estructural disponible para esta familia de CWA (Vermassen et al., 2019; Do et al., 2020).

Las glicosidasas de la pared celular (CWG) catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico (unido a O, N y S), conduce a la formación de un hemiacetal o hemicetal glúcido. A este tipo de enzimas también se les conoce como glucósidos o glicosilhidrolasas, se dividen en i) *N*-acetilglucosaminidasas: escinden el enlace  $\beta$ -1,4-glicosídico entre GlcNAc y MurNAc y ii) lisozimas también conocidas como *N*-acetilmuramidasa: escinde el enlace  $\beta$ 1,4-glicosídico entre MurNAc y GlcNAc. Se clasifican en cinco clases diferentes: C, G, P, F y B. En bacterias se reconocen tres dominios conservados, es decir, la (i) familia de glicosilhidrolasa 22: corresponden a lisozimas tipo C, se encuentran casi exclusivamente en especies del reino Eukaryota, sin embargo, se han identificado secuencias homólogas en bacterias, (ii) familia de glicosilhidrolasa 24: corresponde a lisozimas de fagos (tipo P), su función y actividad en bacterias aún espera ser investigada y (iii) familia de glicosilhidrolasa 25: corresponde a las lisozimas tipo B. Por otro lado, las peptidasas de la pared celular (CWP) hidrolizan los enlaces amida entre los aminoácidos en el PG. Se pueden dividir dependiendo de su especificidad de sustrato en: endopeptidasas y carboxipeptidasas, las primeras escinden enlaces dentro del PG y las segundas hidrolizan los aminoácidos (Vermassen et al., 2019; Do et al., 2020).



**Figura 2. Representación esquemática del peptidoglicano de bacterias Gram-positivas y especificidad de sustrato de las diferentes PGH (Adaptado de Layec et al., 2008).**

Algunos ejemplos de PGHs utilizadas en la industria alimentaria incluyen la lisozima de huevo, esta enzima actúa contra bacterias Gram-positivas, desintegrando la pared celular al hidrolizar

el enlace  $\beta$  1-4 entre el ácido *N*-acetil-murámico y la *N*-acetilglucosamina del peptidoglucano, lo que resulta en la debilitación de la pared celular y la subsiguiente lisis celular (Nakimbugwe et al., 2006; Maidment et al., 2009). Otro ejemplo, es la lisostafina, sin embargo, esta enzima no ha sido aprobada por instituciones reguladoras debido a que proviene del género *Staphylococcus* spp., el cual no está reconocido como GRAS. Por otro lado, la Zoocina A, producida por *Streptococcus zooepidemicus* 4881, es una PGH similar a la lisostafina, que ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus*. Además, inhibe el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus zooepidemicus* (Beukes et al., 2000; Fedorov et al., 2003; Turner et al., 2007; Domenech et al., 2011; Szweda et al., 2012; Serrano-Maldonado et al., 2018). Como se mencionó anteriormente, además de las proteínas antimicrobianas como las bacteriocinas, las BLIS y las PGHs provenientes de BAL, recientemente se han identificado algunas RP con actividad antimicrobiana.

### 1.2.2 Proteínas ribosomales (RP).

El ribosoma, un orgánulo central en la síntesis proteica, se encuentra presente en el citoplasma de células tanto procariontas como eucariotas. Su función primordial radica en la traducción del ARN mensajero (ARNm) en proteínas, un proceso esencial para la vida celular. Tanto en células procariontas como eucariotas, los ribosomas están constituidos por dos subunidades, una grande y otra pequeña, cada una compuesta por ARN ribosomal (ARNr) y proteínas ribosomales. En procariontas, estas subunidades se denominan 30S y 50S, mientras que en eucariotas se conocen como 40S y 60S (Hurtado-Rios et al., 2022; Baozhen et al., 2020).

Además de su función convencional en la síntesis proteica y el ensamblaje de ribosomas, se ha descubierto que las proteínas ribosomales participan en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la neurodegeneración asociada al Parkinson, la tumorigénesis, la señalización celular y el desarrollo inmunológico. Interesantemente, algunas de estas proteínas ribosomales han mostrado actividad antimicrobiana, lo que les ha valido el nombre de "proteínas moonlighting" (MLP). Este término hace referencia a proteínas que desempeñan dos o más funciones no relacionadas en una misma célula u organismo. Se ha observado que algunas MLP pueden cambiar de función debido a cambios conformacionales o transiciones entre dominios intrínsecamente desplegados y múltiples estructuras plegadas, lo que permite que una misma proteína pueda llevar a cabo diferentes funciones según su conformación (Baozhen et al., 2020; Hurtado-Rios et al., 2022). Hasta la fecha, la comprensión del mecanismo de acción de las proteínas ribosomales en su actividad antimicrobiana es limitada. Sin embargo, se ha

propuesto que esta actividad pudiera estar relacionada con un incremento intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células, lo que eventualmente podría afectar la integridad de la membrana citoplasmática, conduciendo a su degradación y, en última instancia, a la muerte celular. Así mismo, probando un daño en componentes esenciales de la célula como ADN, ARN, lípidos y proteínas (Hurtado-Rios et al., 2022).

Un ejemplo de una proteína ribosomal con actividad antimicrobiana es la proteína RP uS15, producida por el anfioxo *Branchiostoma japonicum*, que ha demostrado no solo actividad antimicrobiana, sino también la capacidad de inducir la producción de ROS intracelulares (Baozhen et al., 2020). Además, dentro de las proteínas ribosomales con actividad antimicrobiana producidas por BAL, se encuentra la 30S bS21 (RP bS21) de *Lactobacillus sakei*, aislada de un producto cárnico brasileño, la cual ha mostrado actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, un patógeno alimentario que causa listeriosis infecciosa grave (de Carvalho et al., 2010). Otras proteínas ribosomales antimicrobianas de interés son las RP eL27 y eL30 del ribosoma 50S, reportadas por Pidutti y colaboradores (2018). Estas proteínas, producidas por *Lactobacillus salivarius* exhibieron actividad antimicrobiana contra *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* y *Enterococcus faecium*, siendo estos microorganismos patógenos asociados con infecciones leves o potencialmente mortales, lo que resalta la importancia de estas proteínas en la defensa antimicrobiana. Recientemente, en 2019, García-Cano y colaboradores identificaron la proteína RP bL36 producida por *Pediococcus acidilactici*, aislada del queso Gouda, la cual exhibió actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *L. innocua*, ambos considerados patógenos alimentarios de importancia significativa.

La reciente identificación de estas proteínas ribosomales con actividad antimicrobiana ofrece una posible alternativa a los antibióticos tradicionales, especialmente frente a la creciente resistencia bacteriana desarrollada contra varias clases de antibióticos. Además, estudios han evidenciado que diversas proteínas antimicrobianas son más estables y tienden a generar menos resistencia en el sistema inmunológico innato. Por tanto, su aplicación podría ser fundamental en áreas como la medicina, la industria alimentaria, entre otras. Sin embargo, su complejo proceso de extracción y el bajo rendimiento en su producción han limitado sus aplicaciones potenciales y la investigación científica en este campo (Hurtado-Rios et al., 2022).

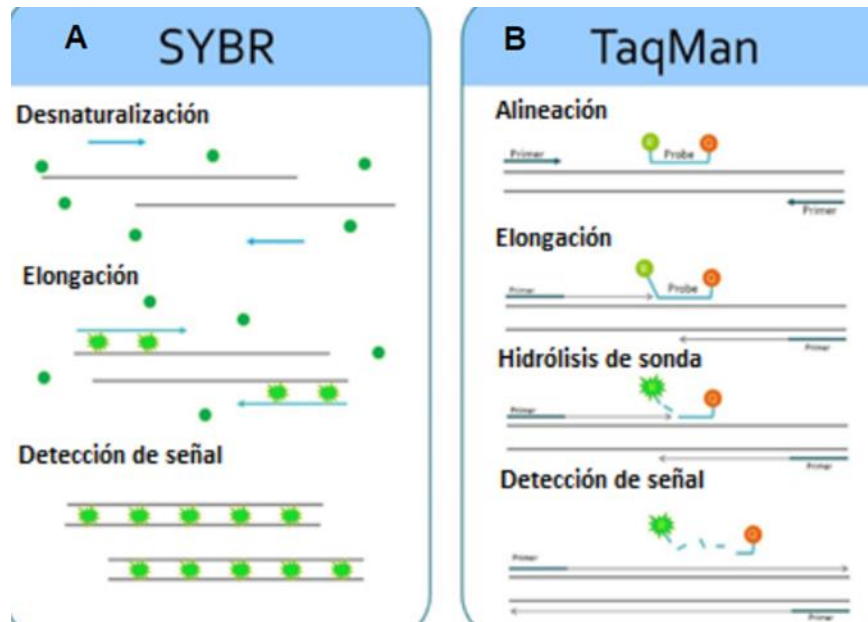


### 1.3 PCR cuantitativa (qPCR) y RT-qPCR.

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), también conocida como PCR en tiempo real o PCR cuantitativa en tiempo real, permite la cuantificación precisa de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) en la muestra en cuestión, a diferencia de la PCR convencional, donde solo se detecta la presencia o ausencia del producto amplificado. Esta característica constituye una ventaja significativa de la qPCR, ya que el producto de amplificación se monitoriza en tiempo real durante la reacción sin necesidad de ser analizado posteriormente en un gel de agarosa. Es importante destacar que el término qPCR se emplea cuando se parte de ADN genómico (ADNg) como muestra inicial, mientras que si se parte de ARN y se requiere su conversión a ADN complementario (ADNc) mediante la enzima transcriptasa reversa, se denomina RT-qPCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa). Esta última técnica utiliza la enzima retrotranscriptasa para generar ADNc a partir del ARN (Bustin et al, 2005; Allard et al., 2024).

La detección de los productos amplificados se realiza mediante fluorescencia, donde la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Para ello, se emplean moléculas fluorescentes específicas en la reacción, que se clasifican principalmente en dos tipos (Figura 3) (Tamay de Dios et al., 2013):

1. Colorantes de unión al ADN: Estos colorantes, como el SYBR Green, no son específicos ya que se intercalan en cualquier ADN de doble cadena. Al unirse al surco menor del ADN, generan fluorescencia.
2. Sondas de hidrólisis: Estas sondas, como las sondas TaqMan, son específicas y siguen el principio de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET). Las sondas TaqMan son oligonucleótidos pequeños con un fluoróforo en un extremo y un quencher en el otro. Cuando hibridan con el objetivo, la hidrólisis de la sonda separa el fluoróforo del quencher, lo que permite la emisión de fluorescencia.

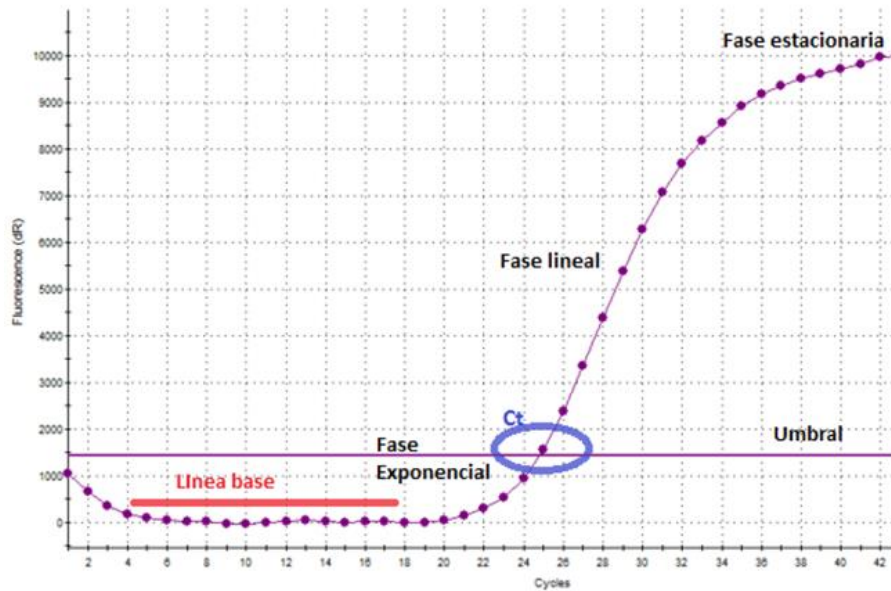


**Figura 3. Representación del funcionamiento de diferentes fluoróforos. A) Colorante de unión. Se intercala en ADN de doble cadena para poder emitir fluorescencia. B) Sondas de hidrólisis, una vez alineadas en la región del ADN de interés son hidrolizadas por la Taq polimerasa logrando emisión de fluorescencia (Adaptado de Fuentes, 2023).**

En la técnica de qPCR, el software registra el aumento de fluorescencia en cada ciclo, el cual es proporcional al incremento de ADN. Esta información se representa gráficamente mediante curvas de cinética de la reacción para cada muestra y control analizados. Las curvas obtenidas se dividen en cuatro fases principales (Figura 4) (Wong y Medrano, 2005):

1. Fase inicial o base: En esta fase, los primeros ciclos (aproximadamente 10 a 15) muestran una fluorescencia mínima que no supera la señal del medio circundante. Aquí se calcula la línea base, donde todo valor por debajo de esta línea se considera inferior al nivel de detección del equipo de qPCR.
2. Fase exponencial temprana: Durante esta etapa, la fluorescencia producida por el producto de PCR supera el umbral definido por el equipo o el investigador. Este punto, conocido como Cycle Threshold (Ct) o Ciclo Umbral, indica el ciclo en el cual la fluorescencia ha alcanzado el umbral definido. El valor de Ct es inversamente proporcional al número de copias del ADN templado en la reacción y se utiliza para cálculos posteriores al comparar los valores de Ct de la muestra con una curva estándar para inferir su concentración inicial de ADN.
3. Fase lineal: En esta fase, se alcanza un estado de amplificación óptima, donde la cantidad de producto de PCR se duplica en cada ciclo.

4. Fase estacionaria: Es el punto en el cual el equipo y los reactivos alcanzan el límite de detección, y la reacción llega a su finalización.



**Figura 4. Diferentes etapas en PCR tiempo real (Adaptado de Wong y Medrano, 2005).**

El análisis de los datos obtenidos en una reacción de qPCR puede realizarse de dos maneras: mediante la determinación de niveles absolutos del número de copias de un gen o a través de niveles relativos para comparar la expresión génica de un gen específico entre diferentes muestras (VanGuilder et al., 2008). Estas estrategias se conocen como cuantificación absoluta y cuantificación relativa, respectivamente. En la cuantificación absoluta, se determina el número total de copias del gen de interés transcrito a ADNc mediante la extrapolación de su valor de Ct obtenido en la reacción qPCR. Esto se realiza en relación con una curva estándar previamente generada a partir de valores estandarizados (Livak y Schmittgen, 2001). La validez de estas curvas debe ser precisa, ya que la cuantificación de la expresión génica depende de la precisión de los estándares utilizados (Pfaffl, 2001). Según el criterio establecido por Fredlund et al. (2008), la pendiente de la curva estándar debe oscilar entre -3.1 y -3.6, lo que corresponde a eficiencias entre el 80% y el 110%. Además, el valor del coeficiente de correlación ( $R^2$ ) debe ser igual o superior a 0.98.

Por otro lado, en la cuantificación relativa se evalúa la magnitud de los cambios fisiológicos (como temperatura,  $a_w$ , pH, etc.) en los niveles de expresión génica de un gen en estudio, llamado "gen diana", en comparación con uno o más genes de referencia, conocidos como "controles endógenos" o "genes housekeeping" (Pfaffl, 2001). También es necesario contar con

un "calibrador", que es una muestra no sometida a ninguna variación fisiológica y se utiliza como control. Los genes de referencia deben tener una expresión constante en todas las cepas analizadas, por lo que generalmente se seleccionan secuencias de genes estructurales para este propósito (Ambion Biosystem, 2008).

La qPCR se destaca por su alta sensibilidad, especificidad y versatilidad, permitiendo la detección simultánea de múltiples secuencias de ADN. Sus resultados son rápidos, generándose en cuestión de horas en comparación con los métodos tradicionales que pueden llevar días o semanas. Sin embargo, a pesar de sus ventajas, la qPCR presenta limitaciones a considerar. Principalmente, su elevado costo debido al equipo necesario, como los termocicladores en tiempo real y otros dispositivos auxiliares. Además, requiere reactivos especializados, incluyendo cebadores, sondas, enzimas y moléculas fluorescentes. La ejecución del ensayo demanda un alto nivel de destreza técnica y experiencia para evitar posibles errores, lo que resalta la necesidad de personal altamente capacitado desde la preparación de la muestra hasta el análisis final de qPCR (Allard et al., 2024).

## 1.4 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).

El oxígeno es un componente abundante y desempeña un papel crucial en la generación de ROS, ya que acepta electrones para formar derivados inestables. Entre estos se incluyen el radical superóxido ( $O_2^-$ ), el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $HO\bullet$ ). Esta generación de ROS conlleva un riesgo significativo, ya que pueden modificar químicamente las macromoléculas como ARN, ADN, proteínas y lípidos a través de procesos de oxidación. Dichas modificaciones pueden alterar la estructura y, en consecuencia, la función de estas macromoléculas, lo que a menudo resulta en la muerte celular (Seixas et al., 2022).

El ARN es particularmente susceptible a este daño. La oxidación del ARN provoca la formación de roturas de hebras, eliminación de bases o inserción de lesiones mutagénicas en las bases nitrogenadas. La modificación más común es la 8-hidroxiguanosina (8-oxo-G), una forma oxidada de guanosina. La estructura y función de prácticamente todas las especies de ARN como el ARN mensajero (ARNm), ARN ribosomal (ARNr), ARN de transferencia (ARNt) y ARN pequeños (ARNs) pueden verse afectadas por la oxidación, lo que provoca defectos de traducción con consecuencias perjudiciales para la supervivencia celular (Li et al., 2021; Seixas et al., 2022). En cuanto a los ácidos nucleicos, estos son altamente susceptibles al daño químico debido a la reactividad de los átomos de nitrógeno

y oxígeno en las bases nitrogenadas. Entre las cuatro bases nitrogenadas del ADN, la guanina es la más propensa a la oxidación debido a su menor potencial de reducción, y su oxidación puede interferir con el metabolismo del ADN, como la transcripción y la replicación (Seixas et al., 2022).

En las proteínas, la mayoría de las modificaciones oxidativas ocurren en las cadenas laterales de los aminoácidos, como la oxidación de tioles y la formación de grupos carbonilo que afectan la estructura, conformación y función de las proteínas. La cisteína y la metionina son los aminoácidos más susceptibles a la oxidación debido a sus átomos de azufre reactivos. Con respecto a los lípidos, cuando las ROS atacan a estos, los productos de esta oxidación son peróxidos lipídicos que afectan principalmente a los ácidos grasos poliinsaturados, componentes críticos de las membranas celulares. La acumulación de peróxidos lipídicos produce cambios en la permeabilidad y fluidez de la membrana, lo que puede afectar los canales iónicos, inactivar las proteínas transportadoras de la membrana, alterar la homeostasis y afectar las vías de señalización (Li et al., 2021; Seixas et al., 2022).

Las células poseen mecanismos para contrarrestar la oxidación y puedan tolerar niveles bajos de ROS. De hecho, en concentraciones bajas, las ROS pueden actuar como moléculas de señalización que regulan diversos procesos celulares, como la detección de quórum, la formación de biopelículas y la autodestrucción bacteriana. Sin embargo, cuando hay un desequilibrio entre la cantidad de ROS y la capacidad de eliminarlas, las células experimentan estrés oxidativo (Seixas et al., 2022). La desintoxicación de ROS es un proceso esencial en todas las formas de vida. Para satisfacer esta necesidad y mantener un equilibrio entre la producción y la eliminación de ROS, han evolucionado diversos mecanismos de defensa. Las bacterias contienen enzimas especializadas, como catalasas, superóxido dismutasas (SOD) y peroxidasas, para protegerse contra el estrés oxidativo inducido por las ROS. Las superóxido dismutasas catalizan la dismutación de dos aniones superóxido ( $2O_2^-$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno ( $O_2$ ) con la participación de dos protones ( $2H^+$ ) como cosustrato. La descomposición de  $H_2O_2$  es generalmente llevada a cabo por catalasas o peroxidasas. Las catalasas catalizan la dismutación o desproporción de dos moléculas de  $H_2O_2$  en dos moléculas de agua ( $H_2O$ ) y una de oxígeno ( $O_2$ ). Las peroxidasas catalizan la reducción de  $H_2O_2$  (y/o hidroperóxidos orgánicos) mediante una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos que actúan como donadores de electrones (Borisov et al., 2021; Zhang et al., 2024).

## 2. JUSTIFICACIÓN

En años recientes, ha incrementado el interés en la identificación de nuevas sustancias antimicrobianas y su potencial aplicación como bioconservador en alimentos, ya sea en forma de sustancias purificadas o mediante el uso directo del microorganismo productor como cultivo iniciador. Esto se debe al creciente problema de resistencia a los antimicrobianos (RAM), considerado una amenaza global para la salud pública y catalogado como una pandemia silenciosa debido a su constante aumento, lo que exige la adopción de medidas inmediatas. Por tanto, es crucial caracterizar adecuadamente las nuevas sustancias antimicrobianas antes de emplearlas en alimentos, ya que sus propiedades fisicoquímicas y condiciones de producción determinarán su viabilidad como bioconservadores.

La caracterización de estas sustancias se puede realizar desde dos enfoques principales: molecular y bioquímico. La primera implica la evaluación de aspectos como la expresión génica, secreción y resistencia, que son cruciales para su manipulación con el fin de aumentar su producción. Por otro lado, la caracterización bioquímica se centra en estudiar las propiedades fisicoquímicas y las condiciones óptimas de producción de los compuestos antimicrobianos. En este contexto, se realizó la caracterización molecular y bioquímica de las sustancias antimicrobianas, la proteína ribosomal (RP uL149) y la *N*-acetilmuramidasa (MupG), ambas producidas por *Lact. paraplantarum* a partir de una muestra de salami comercial (Murgati, S.A. de C.V.). Este estudio se enfocará en determinar la posible relación entre la expresión génica de estos compuestos y la variación en su actividad al modificar las concentraciones de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo. Además, es fundamental comprender el mecanismo de acción antimicrobiano de RP uL14, que podría mediado por su capacidad para inducir un aumento en las ROS en los microorganismos objetivo. Para ello, se cuantificaron los niveles de ROS en diferentes microorganismos objetivos. Finalmente, es importante destacar que la caracterización de estas sustancias antimicrobianas es esencial para futuras aplicaciones en la conservación de alimentos, debido que han sido reconocidas como nuevos compuestos antimicrobianos.

### 3. HIPÓTESIS

La expresión de los genes que codifican proteínas antimicrobianas, específicamente RP uL14 y MupG, producidas por *Lacp. paraplantarum* se verá afectada por las diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo. En particular, el efecto antimicrobiano de RP uL14 podría deberse al incremento intracelular de ROS en las células sensibles.

### 4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la concentración de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo sobre la expresión del gen que codifica para las proteínas antimicrobianas, RP uL14 y MupG. Probar el efecto inductor de RP uL14 en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

### 5. OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Identificar las proteínas responsables de la actividad antimicrobiana de *Lacp. paraplantarum*.
- ◆ Detectar mediante qPCR el cambio en expresión de los genes *RP uL14* y la *mupG* con actividad antimicrobiana producida por *Lacp. paraplantarum*, bajo diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno en medios de cultivo.
- ◆ Obtener cepas transformantes con la construcción que contiene el inserto del gen *RP uL14* para posteriormente sobreexpresar la proteína de forma nativa y evaluar sus propiedades fisicoquímicas, así como su mecanismo de acción antimicrobiano.
- ◆ Evaluar el efecto de RP uL14 en la producción de ROS en microorganismos objetivo.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Metodología general.

El plan experimental se presenta gráficamente en la Figura 5. Inicialmente, se confirmó la identificación de *Lacp. paraplantarum*. Posteriormente, se llevó a cabo la secuenciación de la proteína de alto peso molecular con actividad antimicrobiana, previamente identificada como una muramidasa del grupo de las PGHs (Hurtado, 2019). A continuación, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno sobre la expresión de los genes que codifican para una posible muramidasa y una proteína de bajo peso molecular, previamente identificada como RP uL14 por Hurtado (2019), ambas con actividad antimicrobiana. Además, se llevó a cabo la construcción de un plásmido que incorpora el inserto de la RP uL14, con el objetivo de su futura expresión, purificación y utilización como proteína nativa en estudios posteriores. Finalmente, se investigó la existe una inducción de las ROS por parte de RP uL14 en microorganismos objetivo.

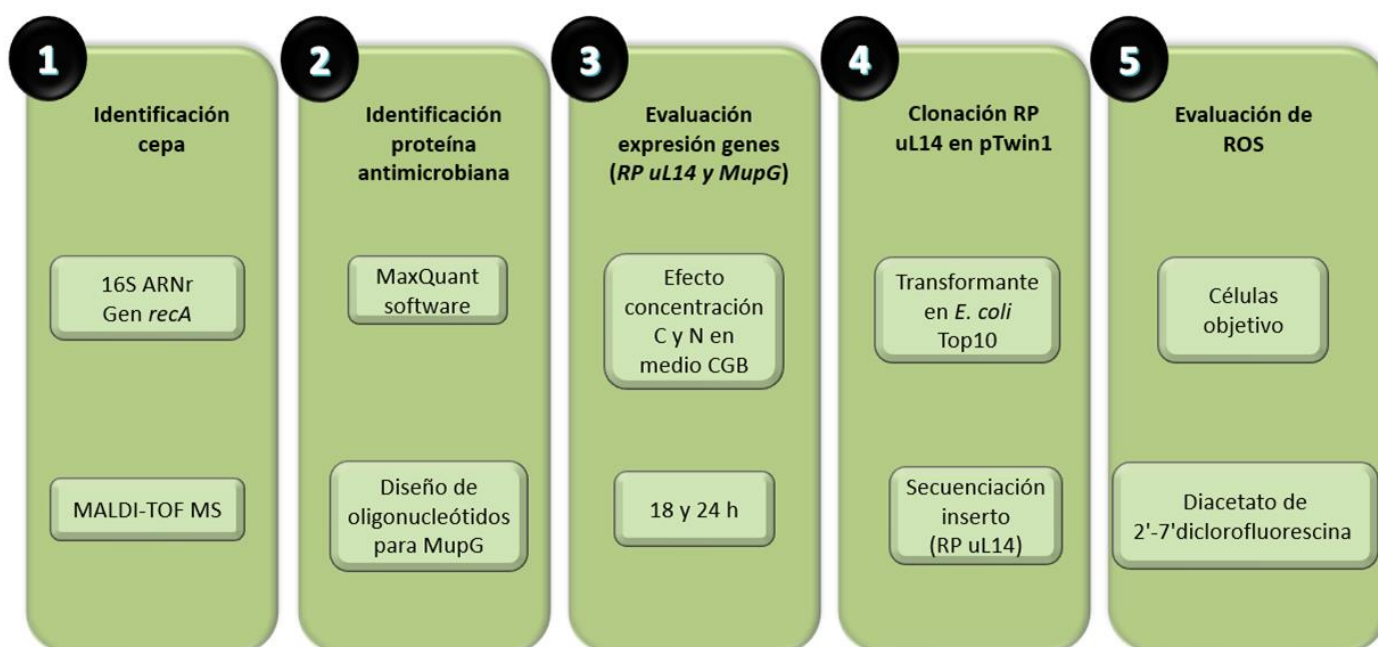


Figura 5. Esquema general de trabajo.

### 6.2 Condiciones de crecimiento de la cepa.

La cepa aislada de una muestra de salami comercial (Murgati, S.A. de C.V.) fue reactivada con un 1% (v/v) de inóculo en medio CGB pH 6.8. La composición del medio fue la siguiente: peptona



biotriptasa 20 g/L (Bioxon, México), glucosa 10 g/L (Bioxon, México), extracto de levadura 5 g/L (DIBICO S.A. de C.V.), citrato de amonio 2 g/L (J.T.Baker, México), fosfato disódico 2 g/L (J.T. Baker, México), sulfato de magnesio 0.1 g/L (J.T. Baker, México), sulfato de manganeso 0.05 g/L (J.T. Baker, México) y tween 80 al 0.01% (Hycel, México). La incubación se llevó a cabo durante 24 h a 29 °C (Guzmán, 1999). Posteriormente, se realizó una resiembra de la cepa reactivada (1% v/v de inóculo) en medio CGB a pH 6.8 y se incubó a 29°C durante 18 h.

## 6.3 Identificación de cepa.

### 6.3.1 Identificación de cepa por espectrometría de masas.

Como método rápido y confiable para la identificación bacteriana, se utilizó la espectrometría de masas para corroborar la identidad de la cepa (Litterio et al., 2024). Este proceso se llevó a cabo en el laboratorio divisional de espectrometría de masas en la UAM-Iztapalapa, utilizando la técnica MALDI-TOF MS (Autoflex Speed, Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania), La identificación se realizó mediante la técnica de extracción con etanol/ácido fórmico, como se describe en el trabajo de Kouadri et al. (2023). Se emplearon colonias aisladas de la cepa en agar De Man-Rogosa-Sharp (MRS) (DIFCO, Cuautitlán Izcalli, México), después de 18 h de resiembra por estriado a 29°C. La colonia de interés fue resuspendida en agua Milli-Q® y etanol. Posteriormente, se añadió ácido fórmico al 70% y la misma cantidad de acetonitrilo para la disrupción de la pared celular. Una vez que la muestra fue centrifugada, se recolectó 1 µL del sobrenadante y se depositó en una placa de metal pulido. Después, se recubrió con 1 µL de la matriz (ácido alfaciano-4-hidroxicinámico), se dejó secar a temperatura ambiente y se procedió a su análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Finalmente, se obtuvo un espectro de masas que se comparó con la base de datos (Bruker Daltonic MALDI Biotyper®, versión 4.1.60 (PYTH) 28 2016-04-18\_11-26-19), donde el *software* proporcionó una identificación y un valor que indicaba la fiabilidad de dicha identificación. En el caso de Biotyper, este valor se encuentra en un intervalo que va de 0 a 3; un valor en el intervalo de 2.0 a 3.0 indica una identificación fiable a nivel de especie, un valor entre 1.70 a 1.99 indica una identificación fiable a nivel de género, mientras que un valor inferior a 1.69 indica una identificación no posible.

Para calibrar y optimizar el espectro de masas Bruker MALDI-TOF-MS, se utilizó el Bacterial Test Standard (BTS), reconocido como estándar (Sibińska et al., 2024). Este estándar contiene un extracto de *Escherichia coli* DH5α, que exhibe un perfil característico de péptidos y proteínas en los espectros de masas MALDI-TOF. Además del extracto de *E. coli* DH5α, el BTS ha sido

modificado con dos proteína adicionales para ampliar el límite superior del rango de masas cubiertas. El rango general de masa cubierto por el BTS va de 3.6 a 17 kDa.

### 6.3.2 Identificación por el gen *recA*.

En primer lugar, se realizó la extracción de ADN total a partir del pellet obtenido de 1 mL de cultivo de la cepa aislada del salami, incubado durante 18 h. Se utilizó el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, E.U.A.), siguiendo las instrucciones del proveedor. El cultivo se sometió a centrifugar a 14,000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente, siendo en el pellet donde se encuentra el ADN.

La integridad del ADN fue verificada mediante un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (Bio-Rad, 0.001%), utilizando un amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 10 mM; Bio-Rad, E.U.A.), EDTA 1 mM (J.T. Baker, México), con pH 8.0. El gel fue colocado en un sistema de electroforesis horizontal Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad, Beijing, China), y se llevó a cabo la electroforesis a 80 V durante 40 min, utilizando el marcador GeneRule 1kb ADN (Thermo Scientific). Posteriormente, se determinó la concentración y pureza del ADN total extraído, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm mediante la placa Take3™ Multi-volume (Biotek Instruments GmbH, Vermont, E.U.A) en un espectrofotómetro Epoch Biotek (Synergy HT, Vermont, E.U.A). Finalmente, la visualización se realizó en un analizador de imágenes Molecular Imager Gel-Doc™ XR+ System (Bio-Rad, California, E.U.A), utilizando el *software* Image Lab versión 5.0.

La identificación de la cepa mediante el gen *recA* se fundamenta en que este gen se ha propuesto como marcador filogenético, ofreciendo resultados satisfactorios para numerosos géneros bacterianos. RecA es una proteína pequeña de 352 aminoácidos en *E. coli*, involucrada en la recombinación de ADN homólogo, la inducción de SOS y la mutagénesis inducida por daño del ADN. Debido a su papel fundamental, el gen *recA* es ubicuo y su producto génico se ha propuesto como marcador filogenético para especies distintamente relacionadas. En el presente estudio, la identificación de la cepa siguió la metodología descrita por Torriani y colaboradores (2001), con modificaciones reportadas por Hurtado (2019). Esta metodología se basa en la diferenciación de especies del grupo *Lacp. plantarum* mediante el análisis del polimorfismo del gen *recA*, utilizando la técnica de PCR punto final. Para ello, se realizaron PCR punto final por separado, empleando un oligonucleótido directo específico para cada especie, diseñado a partir de los sitios polimórficos presentes en las secuencias del gen *recA* de cada especie del grupo *Lacp. plantarum*. En la primera PCR se utilizó el oligonucleótido directo

llamado planF, específico para *Lacp. plantarum*; en la segunda PCR se usó el oligonucleótido pentF, específico para *Lacp. pentosus*; y en la tercera PCR se empleó el oligonucleótido paraF, específico para *Lacp. paraplantarum*. Para todas las PCR, se utilizó un único oligonucleótido reverso (pREV). Esto resultó en la obtención de diferentes tamaños de amplicones (Tabla 1). Como resultado, se obtiene uno de los tres posibles productos de amplificación específicos según la especie identificada.

La amplificación del gen *recA* se llevó utilizando la enzima Platinum<sup>TM</sup>Taq ADN polimerasa (Invitrogen, CA, EUA) y cada uno de los tres oligonucleótidos directos específicos de la especie (planF, pentF y paraF), combinados con el oligonucleótido reverso (pREV), en ensayos de PCR separados, siguiendo el método descrito por Bringel y colaboradores (2005). Las diferentes mezclas de PCR se detallan en la Tabla 2 y se programaron bajo las condiciones apropiadas en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, California, E.U.A.), según lo indicado en la Tabla 3.

**Tabla 1. Oligonucleótidos para amplificación el gen *recA*.**

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia 5´-3´</b>	<b>Temperatura de alineamiento (Tm)</b>	<b>Tamaño amplicon(pb)**</b>
<b>paraF</b>	GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC	60.0°C	107
<b>pentF</b>	CAG TGG CGC GGT TGA TAT C	64.0°C	218
<b>planF</b>	CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA	61.9°C	318
<b>pREV</b>	TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC	62.2°C	-----

\*Oligonucleótidos sintetizados por Sigma Aldrich.

\*\*Tamaño amplicon (pb) utilizando el oligonucleótido reverso pREV.

**Tabla 2. Componentes de la reacción de PCR con enzima Platinum™Taq ADN polimerasa para amplificación gen *recA***

<b>Componente</b>	<b>Volumen final (μL)</b>	<b>Concentración final</b>
<b>Agua libre de nucleasas</b>	36.8	
<b>10X PCR Buffer, -Mg</b>	5	1X
<b>50 mM MgCl<sub>2</sub></b>	1.5	1.5 mM
<b>10 mM dNTP Mix</b>	1.0	0.2 mM, cada uno
<b>10 μM oligonucleótido directo*</b>		
<b>paraF</b>	1.0	0.2 μM
<b>pentF</b>	1.0	0.2 μM
<b>planF</b>	0.5	0.2 μM
<b>10 μL oligonucleótido reverso (pREV)</b>	1.0	0.2 μM
<b>ADN templado</b>	2.0 (216.017 ng/μL)	
<b>Platinum™ Taq ADN polimerasa</b>	0.2	2 U por reacción

\*Se realizará un ensayo para cada uno de los oligonucleótidos directos (Tabla 1).

Finalmente, se verificó el tamaño de los amplicones mediante la realización de un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (Bio-Rad, 0.001%), utilizando un amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). La electroforesis se llevó a cabo a 70 V durante 50 minutos, utilizando un marcador 100 pb ADN (Promega). Se empleó una cepa de *Lacp. plantarum* como control positivo.

Tabla 3. Condiciones de PCR para amplificación el gen *recA*.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	2	1
Desnaturalización	94	0.5	
Alineación	*	0.5	34
Extensión	72	0.5	
Extensión final	72	5	1
Enfriamiento	12	∞	

\*La temperatura de alineación varía dependiendo del oligonucleótido directo (Tabla 1).

## 6.4 Identificación de proteína de alto peso molecular con actividad antimicrobiana.

### 6.4.1 Análisis de datos de espectrometría de masas.

En referencia a los trabajos previos, Hurtado (2019) logró identificar dos proteínas con actividad antimicrobiana. En su estudio, se detectó una proteína de bajo peso molecular (13.1 kDa) utilizando LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas) en un equipo LTQ-Orbitrap (ThermoFisher Scientific, Bremen, Alemania). Los resultados de la secuenciación fueron procesados y evaluados mediante el *software* Scaffold4 (versión 4.8.9.20181203, Proteoma Software Inc., Portland, OR), lo que permitió identificar la proteína 50S ribosomal uL14 (RP uL14). Respecto a la proteína de alto peso molecular (66.2 kDa) con actividad antimicrobiana, que fue visualizada en un zimograma de Tris-Glicina-PAGE, fue cortada la banda correspondiente de un gel de poliacrilamida Tris-Glicina y enviada para secuenciación al Laboratorio Nacional Plan TECC en el CINVESTAV (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN) en Irapuato, México. En este laboratorio, se empleó la técnica de ionización por electrospray LC-MS/MS.

Los resultados de la secuenciación se entregaron en forma de archivos (.RAW), que son datos sin procesar obtenidos directamente del espectrómetro de masas (MS) durante el proceso de

secuenciación. Estos archivos contienen información sobre los espectros de masas y la intensidad de las señales de los péptidos detectados durante el análisis. Los archivos (.RAW) se analizaron utilizando el *software* MaxQuant (versión 2.5.2.0, [www.maxquant.org](http://www.maxquant.org)) para llevar a cabo la identificación de péptidos y proteínas, siguiendo el protocolo de "Parámetros globales" descrito por Tyanova y colaboradores (2016). Los espectros de los archivos se compararon con el proteoma de *Lacp. paraplantarum* (ID: UP000016763) obtenido de la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

#### 6.4.2 Diseño de oligonucleótidos para amplificación proteína de alto peso molecular.

Para evaluar el cambio en la expresión de la proteína antimicrobiana de alto peso molecular mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen que codifica para dicha proteína de interés. El proceso se llevó a cabo en nueve etapas, descritas a continuación:

1. **Identificación de la proteína mediante espectrometría de masas (MS):** A partir de secuencias cortas en aminoácidos identificadas mediante LC-MS/MS y el análisis descrito en la sección 6.4.1 se identificó a la proteína de alto peso molecular.
2. **Búsqueda de la proteína en bases de datos:** Se accedió a bases de datos que contienen genomas ensamblados de diversos microorganismos para facilitar la consulta de secuencias en aminoácidos y nucleótidos. Para este estudio, se utilizó la base de datos gestionada por el National Center for Biotechnology Information (NCBI). El procedimiento consistió en realizar una búsqueda en toda la base de datos introduciendo el nombre de la cepa de interés "*Lactiplantibacillus paraplantarum*". Esto generó una nueva ventana en la plataforma donde se mostraron todos los genomas ensamblados disponibles en el apartado de genomas. Luego, se buscó la secuencia en aminoácidos de la proteína de interés para cada uno de los 13 genomas encontrados.
3. **Alineamiento de secuencias de aminoácidos:** Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de la proteína de interés, obtenidas de diferentes genomas ensamblados de distintas cepas de *Lacp. paraplantarum*. Este proceso se llevó a cabo utilizando el servidor del programa MultAlin (Multiple sequence alignment by Florence Corpet, <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Para ello, se introdujo el conjunto de secuencias en formato FASTA de la proteína de interés en el servidor de MultAlin, lo que permitió ejecutar los alineamientos múltiples utilizando los parámetros predefinidos por el servidor. Los alineamientos múltiples generados por este servidor se

basan en una comparación de la secuencia de la proteína de interés con las posibles homologías restantes, resultando en una suma de secuencias alineadas. Además, el servidor introduce espacios en cada secuencia para alinear fragmentos con similitudes conservadas, lo que facilita la identificación de regiones completamente conservadas y regiones con variabilidad en todas las secuencias alineadas. Este proceso se llevó a cabo con el objetivo de verificar si la secuencia identificada mediante espectrometría de masas presentaba diferencias en aminoácidos con respecto a las secuencias reportadas en NCBI. Posteriormente, utilizando las secuencias de nucleótidos reportadas por NCBI, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gen que codifica la proteína de interés. Esto se llevó a cabo con el propósito de confirmar si la secuencia identificada por espectrometría de masas difería en aminoácidos con respecto a las secuencias reportadas en NCBI, lo que permitiría, a partir de las secuencias de nucleótidos obtenidas del siguiente punto, diseñar oligonucleótidos para la amplificación del gen que codifica la proteína de interés.

4. **Blast (tblastn):** La plataforma del NCBI dispone de una herramienta de búsqueda de alineación local llamada BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), la cual permite identificar regiones de similitud entre secuencias biológicas. En esta herramienta, hay diferentes tipos de BLAST para comparar secuencias de nucleótidos (blastn, tblastx, tblastn) o de proteínas (blastp, blastx) con las bases de datos de secuencias, y calcula la significancia estadística asociada. En este estudio, se utilizó el tblastn, que compara una secuencia proteica con una base de datos de nucleótidos. Para ello, primero traduce todas las secuencias de nucleótidos de la base de datos en sus seis marcos de lectura y luego realiza la comparación. Se ejecutó el tblastn para cada una de las secuencias de aminoácidos obtenidas en el paso anterior, las cuales se proporcionaron en formato FASTA. La base de datos seleccionada fue "nucleotide collection (nr/nt)", que contiene una colección no redundante de secuencias nucleotídicas (abreviada como nr).
5. **Alineamiento de secuencias de nucleótidos:** Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de distintas cepas obtenidas mediante el tblastn realizado en el paso anterior. Esto se llevó a cabo ingresando el conjunto de secuencias en formato FASTA en el servidor de MultAlin, tal como se mencionó en secciones anteriores. Los alineamientos múltiples se realizaron utilizando los parámetros predeterminados por el servidor.
6. **Diseño de oligonucleótidos para la proteína de interés *in silico*:** Un aspecto crítico para el éxito de una reacción de PCR es el cuidadoso diseño de los oligonucleótidos, ya que un diseño deficiente puede resultar en la amplificación de fragmentos de ADN no deseados (amplificación inespecífica). Para garantizar un diseño óptimo, se aplican

varias reglas, que incluyen la optimización de la temperatura de fusión ( $T_m$ ), el tamaño de los oligonucleótidos, el contenido de GC (Guanina:Citosina) y la complementariedad de la secuencia. Idealmente, los oligonucleótidos deben tener una composición equilibrada de nucleótidos, un contenido de GC del 40 al 50%, un tamaño de aproximadamente 18 a 24 bases, y una  $T_m$  de 56°C a 62°C. Además, los pares de oligonucleótidos deben tener  $T_m$  similares (dentro de 5°C), comenzar y terminar con bases púricas, evitar estructuras secundarias internas, no ser complementarios entre sí ni auto complementarios, y preferiblemente tener una G o una C en el extremo 3' (Abdullah et al., 2024). Las herramientas computacionales permiten especificar estas variables para el diseño de oligonucleótidos, y hay numerosos programas disponibles de forma gratuita en línea. Para este estudio, se utilizó el programa PrimerQuest de IDT (Integrated DNA Technologies, <https://www.idtdna.com/pages>), que emplea un algoritmo para seleccionar secuencias según el tamaño deseado, el contenido de GC, la  $T_m$  y la cantidad de GC en el extremo 3'.

7. **Verificación de amplificación mediante PCR punto final *in silico*:** Este proceso se realizó con el fin de evaluar la idoneidad de los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen que codifica la proteína de interés producida por *Lacp. paraplantarum* y para identificar su variación en la expresión mediante qPCR bajo diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo. Se llevó a cabo mediante el análisis *in silico* de PCR. Para ello, se utilizó la plataforma SMS (Sequence Manipulation Suite, <http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html>). Se empleó la sección "PCR Products" ", en la cual se utilizó la secuencia de los oligonucleótidos diseñados y, como plantilla, la secuencia completa en nucleótidos de la proteína de interés de *Lacp. paraplantarum*. El programa analiza una secuencia de ADN y busca los sitios de reconocimiento con los oligonucleótidos diseñados, identificando aquellos que correspondan perfectamente y puedan generar un producto de PCR. En la Tabla 4 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen que codifica para la proteína de alto peso molecular identificada, la cual corresponde a una *N*-acetilmuramidasa (MupG).



Tabla 4. Oligonucleótidos para amplificación el gen *mupG*.

Oligonucleótido	Secuencia 5´-3´	Temperatura de alineamiento (Tm)	Tamaño amplicon(pb)
<b>MupGF</b>	GAAGTCTTCTTCAGCCCTTACC	62.0°C	103
<b>MupGR</b>	CGCGATAAGTTTGTGGTTGTG	62.0°C	

\*Oligonucleótidos sintetizados por Sigma Aldrich.

## 6.5 Evaluación de la expresión del gen *mupG* y *RP uL14*.

En su investigación, Hurtado (2019) identificó el impacto de la concentración de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo sobre el crecimiento y la actividad antimicrobiana de *Lacp. paraplantarum*. En este estudio, se investigó la relación entre la variación en la actividad antimicrobiana y la expresión de los genes estructurales asociados con esta actividad en esta cepa. Dichos genes incluyen la *N*-acetilmuramidasa (MupG) y la proteína 50S ribosomal uL14 (*RP uL14*), y se analizarán después de 18 y 24 h de crecimiento, debido a que a estos tiempo la cepa presentó mayor actividad antimicrobiana.

Para este estudio, se seleccionó el gen *recA* como gen de referencia. La elección de este gen se fundamenta en su alta conservación y su participación en una variedad de procesos biológicos cruciales, como la recombinación homóloga, la reparación del ADN mediante recombinación y la activación del sistema SOS. Estas funciones biológicas esenciales hacen que el gen *recA* sea una opción idónea como gen de referencia para el análisis de RT-qPCR. Además, el gen *recA* ha sido utilizado como gen de referencia en estudios de expresión génica de otras especies pertenecientes al grupo taxonómico de *Lacp. plantarum*, lo que refuerza su idoneidad para este propósito en nuestro estudio (Maggi Solcà et al., 2001; Tran et al., 2021).

### 6.5.1 Extracción y purificación de ARN total.

Para evaluar el impacto de la concentración de carbono y nitrógeno en el medio CGB, se cultivó *Lactobacillus paraplantarum* en diferentes medios de cultivo con variadas concentraciones de estos elementos. En la Tabla 5 se presentan las condiciones específicas de cada medio de cultivo, designando a C1 (2.7 g/L de carbono) y N1 (1.8 g/L de nitrógeno) como las concentraciones más bajas, y a C3 (8.8 g/L de carbono) y N3 (5.7 g/L de nitrógeno) como las

concentraciones más altas en el medio CGB. La condición control, con la concentración estándar de 6.0 g/L de carbono y 2.7 g/L de nitrógeno en el medio CGB, se denominó CGB control.

**Tabla 5. Concentración de carbono y nitrógeno proporcionada por cada medio de cultivo (CGB).**

	Condición				
	C1	C3	CGB control	N1	N3
<b>Concentración de carbono (g/L)</b>	2.7	8.8	<b>6.0</b>	<b>6.0</b>	
<b>Concentración de nitrógeno (g/L)</b>	<b>2.7</b>		<b>2.7</b>	1.8	5.7

Números en negritas indican la concentración de nitrógeno y carbono proporcionada por el medio sin modificar.

Antes de realizar la extracción de ARN total, se tuvieron en cuenta las consideraciones al trabajar con ARN, dado que las ARNsas podrían estar presentes durante el procedimiento de manipulación del ARN para obtener la segunda cadena o cadena complementaria. Por lo tanto, se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- Siempre se utilizaron guantes de látex para evitar la contaminación del ARN con bacterias o enzimas presentes en la piel durante la extracción.
- Se emplearon pipetas y micropipetas estériles reservadas exclusivamente para el trabajo con ARN.
- Se utilizó material tratado con inhibidores de ARNsas en un área designada y restringida para manipular el ARN.
- Las muestras para extracción se utilizaron siempre en estado fresco para garantizar la integridad del ARN.
- Se trabajó en un espacio de trabajo limpio, y todo el material se esterilizó dos veces para asegurar la esterilización adecuada.

La extracción de ARN total se llevó a cabo por triplicado biológico utilizando el reactivo Trizol™ Reagent (fenol, isotiocianato de guanidina y tiocianato de amonio) (Invitrogen, CA, EUA), siguiendo las especificaciones del manual. El proceso de extracción constó de cuatro fases: separación, aislamiento, lavado y resuspensión. Después de 18 y 24 h de crecimiento de *Lacp. paraplantarum* para cada una de las condiciones del medio de cultivo, se centrifugó la biomasa a 4,000 rpm durante 15 min a 4°C. Luego, se retiró el sobrenadante y se lavó con 2 mL de NaCl

al 0.9%. Las células se congelaron con nitrógeno líquido y se maceraron en un mortero estéril. Posteriormente, se tomó el macerado y se depositó en microtubos de 1.5 mL previamente congelados con nitrógeno. A cada tubo de macerado se le adicionó 1 mL de Trizol por cada 0.25 mL de muestra para separar proteínas, ADN y ARN total. La mezcla fue homogeneizada vigorosamente en un vórtex y luego se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 200  $\mu$ L de cloroformo y se mezclaron en el vórtex durante 10 segundos, seguido de una incubación de 3 min a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, luego se transfirió la fase acuosa a nuevos microtubos previamente esterilizados. El ARN total presente en la fase acuosa se precipitó mediante la adición de 500  $\mu$ L de isopropanol, se mezcló por inversión y se almacenó a -20°C durante 10 min. Después se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en agua libre de RNAsas (Slobodin y Gerst, 2011). Luego, las muestras de ARN total se trataron con DNase I (ThermoScientific, CA, EUA) siguiendo las especificaciones del proveedor. Para verificar la integridad del ARN total extraído, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (Bio-Rad, 0.001%). Finalmente, las muestras de extracción se almacenaron a -80°C.

### 6.5.2 Cuantificación de ARN total.

Antes de almacenar las muestras de ARN total a -80°C, se tomaron alícuotas de estas con el propósito de cuantificar posteriormente el ARN total extraído de cada muestra. Este procedimiento se llevó a cabo en un triplicado experimental por cada triplicado biológico utilizando el espectrómetro UV5-Nano (Mettler Toledo, Zurich, Suiza).

### 6.5.3 Síntesis de ADNc.

La retrotranscripción se realizó utilizando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (ThermoScientific, MA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el fin de evitar cualquier variación en la expresión debido a diferencias en la concentración total de ARN, se normalizó la concentración a 150 ng en cada una de las muestras de ARN total extraído para la síntesis de ADN complementario (ADNc) (Biassoni y Raso, 2014). Finalmente, se procedió a cuantificar la concentración de ADNc como se describe en la sección 6.5.2.

#### 6.5.4 Comprobación de síntesis de ADNc.

Para validar la correcta síntesis de ADNc en todas las muestras y la amplificación precisa de los oligonucleótidos diseñados para los genes que codifican las proteínas con actividad antimicrobiana, se realizó una PCR punto final para cada una de las muestras de ADNc sintetizado. Además del diseño de oligonucleótidos para el gen *mupG*, también se realizó el diseño de oligonucleótidos para el gen *RP uL14*, como se menciona en la sección 6.4.2. Este gen codifica para la proteína 50S ribosomal uL14, previamente identificada por Hurtado (2019) como una proteína con actividad antimicrobiana. La información detallada de ambos conjuntos de oligonucleótidos se encuentra recopilada en la Tabla 6. La PCR punto final se llevó a cabo utilizando la polimerasa Platinum™Taq ADN (Invitrogen, CA, EUA), con los componentes descritos en la Tabla 2, donde solamente varía la temperatura de alineamiento a 60 °C (Tabla 6) mediante el termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, California, E.U.A.). Finalmente, se verificó el tamaño de los amplicones mediante la realización de un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (Bio-Rad, 0.001%), utilizando como marcadores: 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen) y 100 pb AND (Promega). Es importante destacar que no se llevó a cabo la amplificación del gen *recA*, dado que los oligonucleótidos ya se habían probado en la identificación de la cepa, lo que confirmó su adecuada amplificación.

Tabla 6. Oligonucleótidos para amplificación el gen *RP uL14* y *mupG*.

Oligonucl eótido	Secuencia 5´-3´	Temperatura de alineamiento (Tm)	Tamaño amplicon(pb)
RP uL14F	GTGCCCGTGAAATCCTTACT	60°C	104
RP uL14R	ACCGGGTGTTGCTTGTTTA		
MupGF	GAAGTCTTCTTCAGCCCTTACC		103
MupGR	CGCGATAAGTTTGTGGTTGTG		

\*Oligonucleótidos sintetizados por Sigma Aldrich.

### 6.5.5 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

La expresión de los genes de interés con actividad antimicrobiana (*mupG* y *RP uL14*) frente a diferentes tratamientos se analizó mediante PCR en tiempo real. Se utilizó el kit comercial Absolute QPCR SYBR Green Mix (ThermoFisher, CA, EUA), que contiene tampón, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs y ADN polimerasa. En el caso de las reacciones de qRT-PCR para la amplificación del gen *mupG*, estas se llevaron a cabo en el equipo Gentier 48E real-time PCR system (TIANLONG, Xian, China), mientras que la amplificación del gen *RP uL14*, se llevó a cabo en el equipo QuantReady 9600 (LifeReal Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou, China), empleándose los oligonucleótidos correspondientes para la amplificación del gen correspondiente y en ambos casos, la amplificación del gen de referencia (*recA*) (Tabla 1). Cada reacción contenía los reactivos necesarios según se muestra en la Tabla 7, alcanzando un volumen final de 10  $\mu$ L.

Tabla 7. Componentes de la reacción de qPCR.

Componente	Volumen final ( $\mu$ L)	Concentración final
2X Absolute qPCR SYBR Green Mix	5.0	1X
Oligonucleótido directo (10 $\mu$ M)*	0.7	700 nM
Oligonucleótido reverso (10 $\mu$ M)*	0.7	700 nM
ADNc	**	100 ng
Agua libre de nucleasas	***	
Volumen final	10.0	

\* Se realizó un ensayo para cada juego de oligonucleótido (Tabla 1 y 6).

\*\*La cantidad de ADNc vario en cada muestra, al ajustar la concentración a 100 ng.

\*\*\*Se ajusto de acuerdo a la cantidad de ADNc utilizada para cada reacción

Ambos equipos se programaron con el siguiente protocolo: 15 minutos a 95°C para la activación de la enzima, seguido de 40 ciclos que incluyeron 15 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos de alineamiento y extensión a 72°C. Posteriormente, se llevó a cabo la etapa de disociación o curva de melting, comenzando con 15 segundos a 95°C, 15

segundos a 60°C y 15 segundos a 95°C. Los datos fueron analizados con el software Real-time PCR system (versión V1).

### 6.5.6 Cuantificación relativa por el método CT comparativo.

La estrategia empleada para la cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR fue la cuantificación relativa. En esta metodología, se comparan los valores Ct y se utiliza la eficiencia de la reacción de PCR como factor de corrección. Sin embargo, existe un modelo alternativo que no necesita la eficiencia de la reacción como factor de corrección, el cual asume una eficiencia óptima e idéntica (del 100%) en la reacción de PCR tanto para el gen de interés como para el gen de referencia (Livak y Schmittgen, 2001). En este estudio, se decidió emplear el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  debido a que no requiere utilizar la eficiencia de la reacción como factor de corrección. Este método describe la proporción obtenida al comparar los valores Ct de la muestra con los valores Ct del control (Rao et al., 2013), siguiendo las siguientes ecuaciones:

$$\Delta Ct = Ct_{bco} - Ct_{endógeno}$$

Después se obtendrá el segundo  $\Delta$  de la siguiente forma:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{tratamiento} - \Delta Ct_{calibrador}$$

## 6.6 Clonación del gen *RP uL14*.

La clonación del gen *RP uL14*, que codifica para la proteína 50S ribosomal uL14 se llevó a cabo utilizando el vector de expresión de proteínas recombinantes pTWIN1 (Figura 6), dentro de *E. coli*. Este vector permite una purificación de proteínas o para el aislamiento de proteínas con una cisteína en el extremo *N*-terminal y/o un tioéster en el extremo *C*-terminal. Además, integra un sitio de clonación múltiple diseñado específicamente para permitir la fusión del gen de interés entre los inteínas modificadas *Ssp* DnaB y *Mxe* GyrA. Asimismo, la incorporación del dominio de unión a la quitina proveniente de *Bacillus circulans* simplifica el proceso de purificación, proporcionando una herramienta versátil y eficaz para las investigaciones en biología molecular, al obtener genes que codifiquen para proteínas nativas. Por otra parte, la expresión del gen fusionado está controlada por el promotor T7 y su regulación está llevada a cabo por el gen *lacI*, ubicado inmediatamente aguas abajo del promotor T7.

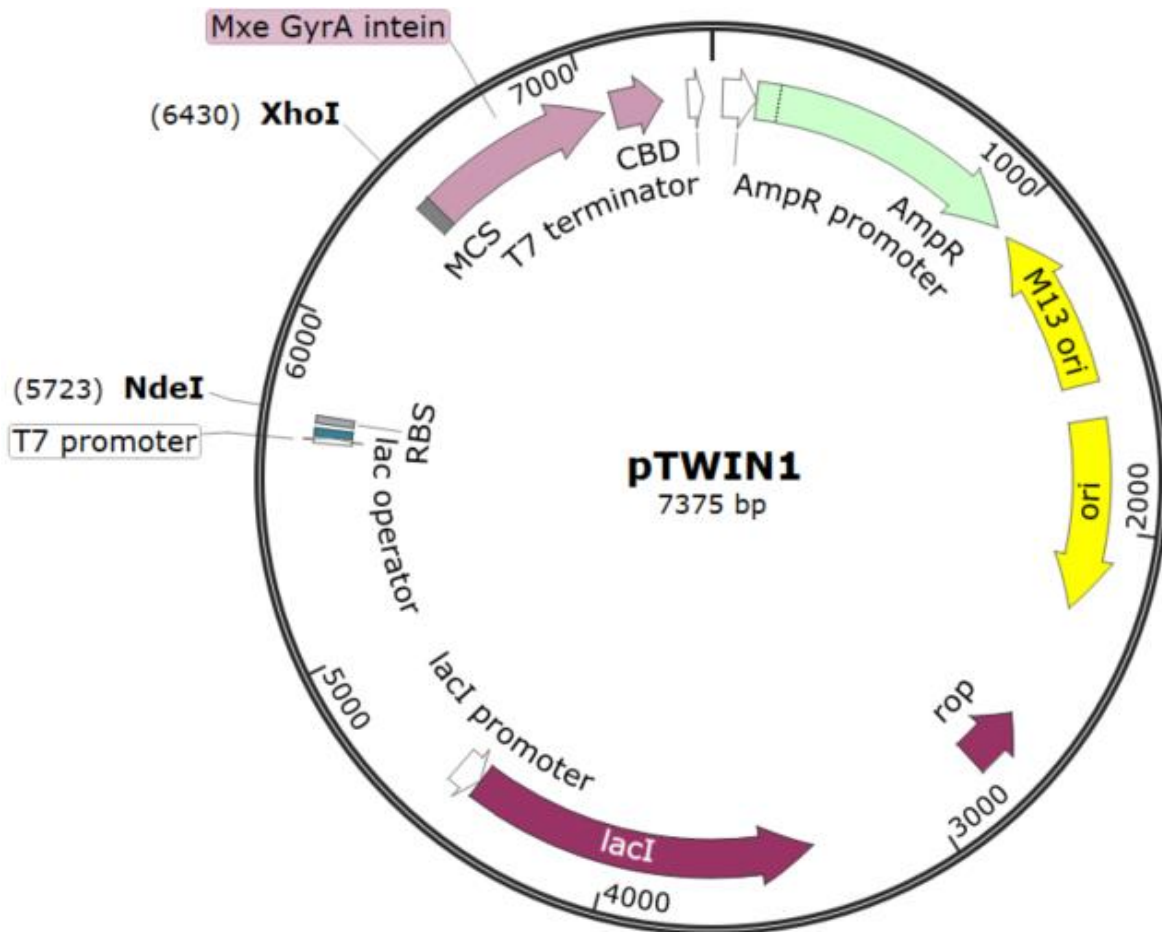


Figura 6. Vector de clonación pTWIN1 (New England Biolabs, Inc., Beijing, China).

### 6.6.1 Obtención del inserto codificante a la *RP uL14*.

Para la construcción del plásmido recombinante pTWIN1-bRPuL14 se diseñaron oligonucleótidos adaptados en el extremo 5' con un sitio de restricción *NdeI* y en el extremo 3' con un sitio de restricción *XhoI*. Esta estrategia de diseño se llevó a cabo utilizando el programa bioinformático SnapGene (GLS Biotech., Estados Unidos), disponible en: <http://www.snapgene.com>. Además, se corroboró el cálculo de la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) mediante la herramienta NEB  $T_m$ , disponible en: <https://tmcalculator.neb.com/#/main>. Los oligonucleótidos diseñados anteriormente (Tabla 8) fueron utilizados para realizar la PCR de clonación en el termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, California, E.U.A.), empleando los componentes detallados en la Tabla 9 y siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 10. Posteriormente, se verificó el tamaño de los amplicones mediante la realización de un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (Bio-Rad, 0.001%), utilizando el marcador Quick-

load purple 100 pb DNA (New England BioLabs). Finalmente, el producto de PCR o inserto (*NdeI* / *RPuL14* / *XhoI*) fueron purificados mediante el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo research, Irvine,EUA), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

**Tabla 8. Oligonucleótidos para amplificación inserto (*NdeI* / *RPuL14* / *XhoI*).**

Oligonucl eótido	Secuencia 5´-3´	Temperatura de alineamiento (Tm)	Tamaño amplicon(pb)
<b>FNdeIRPu L14</b>	GGT GGT CAT ATG ATC CAA CAA GAA AGT CGT TTA AAA G	64.4°C	378
<b>RXhoIRp uL14</b>	GTG GTC TCG AG CAG AAC TTC TGG CGC TAA T		

**Tabla 9. Componentes de la reacción de PCR con enzima Platinum™Taq ADN polimerasa para obtención de inserto (*NdeI* / *RPuL14* / *XhoI*).**

Componente	Volumen final (µL)	Concentración final
<b>Agua libre de nucleasas</b>	35.3	
<b>10X PCR Buffer, -Mg</b>	5	1X
<b>50 mM MgCl<sub>2</sub></b>	1.5	1.5 mM
<b>10 mM dNTP Mix</b>	1.0	0.2 mM, cada uno
<b>10 µM oligonucleótido directo*</b>	1.0	0.2 µM
<b>10 µM oligonucleótido reverso*</b>	1.0	
<b>ADN templado</b>	5.0	
<b>Platinum™ Taq ADN polimerasa</b>	0.2	2 U por reacción

\*Oligonucleótidos para amplificación inserto (*NdeI* / *RPuL14* / *XhoI*), Tabla 8.



Tabla 10. Condiciones de PCR para obtención de inserto (*NdeI* / *RPuL14* / *XhoI*).

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Número de ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	94	2	1
<b>Desnaturalización</b>	94	0.5	
<b>Alineación</b>	64.4	0.5	40
<b>Extensión</b>	72	0.5	
<b>Extensión final</b>	72	5	1
<b>Enfriamiento</b>	12	∞	

### 6.6.2 Digestión inserto (*NdeI* / *RPuL14* / *XhoI*) y vector pTWIN1.

El inserto obtenido en el apartado 6.6.1 y el vector de expresión pTWIN1 fueron digeridos utilizando la enzima de restricción *XhoI* (Promega, Madison, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez completada la digestión con *XhoI*, estas fueron purificadas utilizando el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo research, Irvine, EUA). La segunda digestión de los productos previamente purificados se llevó a cabo con la enzima de restricción Anza™ 9 *NdeI* (Invitrogen, Lituania), también siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se verificaron las digestiones mediante la realización de un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (Bio-Rad, 0.001%), utilizando el marcador Quick-load purple 100 pb DNA (New England BioLabs). Finalmente, se procedió a purificar las digestiones utilizando el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery.

### 6.6.3 Ligación inserto (*NdeI* / *RPuL14* / *XhoI*) y vector pTWIN1.

A partir de los fragmentos del inserto y el vector pTWIN1 previamente digeridos y purificados, se realizó la reacción de ligación en una proporción 2:3 (plásmido:inserto) como se muestra en la Tabla 11, utilizando T4 DNA ligasa (Promega, Madison, EUA). La ligación se incubó a 4°C durante 5 días.

**Tabla 11. Componentes para reacción de ligación.**

<b>Componente</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>L)</b>
<b>Vector pTWIN1 digerido</b>	2.0
<b>Inserto digerido</b>	3.0
<b>Buffer ligasa 10X</b>	1.0
<b>ADN Ligasa T4</b>	1.0
<b>Agua libre de nucleasas</b>	3.0
<b>Volumen final</b>	10.0

#### 6.6.4 Preparación de células competentes de *E. coli* TOP10.

Se procedió a la inoculación de 25 mL de medio LB (Luria Broth, AEXO A) con 12 colonias de *E. coli* TOP, las cuales se incubaron a 37°C durante 9 horas. Posteriormente, se realizó la inoculación de 250 mL de LB en un matraz de 2 L utilizando 2.5 mL del preinóculo. Esta inoculación se incubó con agitación constante (180-250 rpm) a 18°C aproximadamente 14 h, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5-0.6 a 600 nm. Luego, el matraz fue transferido a un baño de hielo durante 10 minutos antes de ser centrifugado el medio a 4000-5000 rpm por 10 min a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 80 mL de Buffer TB (ANEXO A) frío y se mantuvo en hielo durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 4000-5000 rpm por 10 min a 4°C y se resuspendió el pellet en 20 mL de TB con 1.4 mL de DMSO (dimetilsulfóxido), manteniéndose en hielo durante 10 minutos. El volumen final se distribuyó en alícuotas de 100  $\mu$ L en microtubos de 1.5 mL, los cuales fueron almacenados a -80°C para su posterior uso (Green y Rogers, 2013).

#### 6.6.5 Transformación.

Se tomaron 100  $\mu$ L de células competentes de *E. coli* TOP10 y se colocaron en un microtubo de 1.5 mL. Luego, se añadieron 10  $\mu$ L del producto de la ligación (apartado 6.6.3), se mezcló

suavemente y se mantuvo en hielo durante 30 min. La mezcla se transfirió a un baño de agua a 42°C durante 2 min y se enfrió rápidamente en hielo. Posteriormente, se agregaron 800 µL de medio LB, se mezcló por inversión y se incubó a 37°C durante 1 h. Se sembró una alícuota de 100 µL en una placa con LB al 1% en agar con ampicilina, y se incubó durante toda la noche a 37°C. Se llevaron a cabo los siguientes controles: un control positivo, 100 µl de células competentes con 10 µl de plásmido intacto en placas con ampicilina; un control negativo, donde se utilizó 100 µl de células competentes sin plásmido en placas con ampicilina; y finalmente, un control adicional con 100 µl de células competentes en placas sin antibiótico.

#### 6.6.6 TENS-Mini Prep.

Con el objetivo de extraer ADN plasmídico purificado de las células transformadas de *E. coli* TOP10, a partir de su crecimiento en placa de agar LB con ampicilina durante 14 h a 37°C, se obtuvo una colonia bacteriana la cual fue transferida a una nueva placa, sembrada en placa de agar LB con ampicilina usando la técnica de siembra masiva, la placa se cultivó a 37°C durante 14 h. Posteriormente, se recolectó un botón celular con un palillo estéril y se resuspendió en 50 µL de agua estéril. Se añadieron 350 µL de Buffer TENS (ANEXO A) y 1.5 µL de RNase A, DNase-and Protease-free (ThermoScientific, Merelbeke, Bélgica). En seguida, la mezcla se homogeneizó utilizando un vórtex durante 2 seg. Luego, se agregaron 100 µL de acetato de sodio 3.0 M, pH 5.2, y se mezcló adecuadamente con un vórtex durante 2 seg. La muestra fue centrifugada a 14, 000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se transfirió a un microtubo estéril de 1.5 mL. A continuación, se adicionaron 600 µL de isopropanol absoluto frío y se mezcló por inversión, para después incubar a -20°C durante 5 min. En seguida, se centrifugó el tubo a 14,000 rpm durante 2 min, se retiró el sobrenadante. El botón celular se lavó dos veces con 900 µL de etanol frío al 70%, se centrifugó durante 2 min a 14, 000 rpm y se retiró el sobrenadante. Se dejó secar al aire durante 10 min y luego se resuspendió el botón celular con 50 µL de agua libre de nucleasas estéril. Finalmente, se analizaron 7 µL de la muestra en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (Bio-Rad, 0.001%).

#### 6.6.7 Confirmación construcción pTWIN1-bRPuL14.

Para validar la transformación del vector pTWIN1 con el inserto (*NdeI* / RPuL14 / *XhoI*), se empleó la técnica de PCR en punto final utilizando dos juegos de oligonucleótidos. El primer juego consistió en los mismos utilizados para la construcción del inserto, que amplifican el gen

de interés, *RPuL14*, con los extremos correspondientes a las secuencias de las enzimas de restricción (*NdeI* y *XhoI*). Además, se diseñó un segundo juego de oligonucleótidos para amplificar una región del vector pTWIN1, donde el gen de interés queda encajado, flanqueado por partes del vector pTWIN1 (oligonucleótidos de construcción, conspTWINuL14). Esta estrategia de diseño se llevó a cabo utilizando el programa bioinformático SnapGene (GLS Biotech., Estados Unidos), disponible en: <http://www.snapgene.com>. Además, se verificó la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) utilizando la herramienta NEB  $T_m$ , disponible en: <https://tmcalculator.neb.com/#/main>.

#### 6.6.7.1 PCR punto final.

En la Tabla 12 se detallan los oligonucleótidos empleados para la PCR en punto final, donde se utilizó la polimerasa DreamTaq Hot Start PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando el termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, California, E.U.A.), con los componentes indicados en la Tabla 13 y siguiendo las condiciones especificadas en la Tabla 14.

**Tabla 12. Oligonucleótidos para confirmación de construcción pTWIN1-bRPuL14.**

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Temperatura de alineamiento ( $T_m$ )	Tamaño amplicon(pb)
<b>FNdeIRPuL14</b>	GGTGGTCATATGATCCAACAAGAAA GTCGTTTAAAAG	64.4°C	378
<b>RXhoIRpuL14</b>	GTGGTCTCGAGCAGAACTTCTGGCG CTAAT		
<b>conspTWINuL14</b>	TGTGAGCGGATAACAATTC	59.4°C	812
<b>conspTWINuL14</b>	GGGCAACTAGTGCATCTCCC		

**Tabla 13. Componentes de la reacción de PCR con enzima DreamTaq Hot Start PCR Master Mix para confirmación de construcción.**

<b>Componente</b>	<b>Volumen final (µL)</b>
<b>Agua libre de nucleasas</b>	18.0
<b>Oligonucleótido directo*</b>	1.0
<b>Oligonucleótido directo*</b>	1.0
<b>ADN plasmídico</b>	5.0
<b>DreamTaq Hot Start PCR Master Mix (2X)</b>	25.0

\*Oligonucleótidos para amplificación inserto (*NdeI* / *RPuL14* / *XhoI*) y construcción, Tabla 12.

**Tabla 14. Condiciones de PCR para obtención de inserto (*NdeI* / *RPuL14* / *XhoI*).**

<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Número de ciclos</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	94	2.0	1
<b>Desnaturalización</b>	94	0.5	
<b>Alineación*</b>	----	1.0	35
<b>Extensión</b>	72	2.0	
<b>Extensión final</b>	72	5	1
<b>Enfriamiento</b>	12	∞	

#### 6.6.7.2 Secuenciación.

El producto de PCR amplificado y purificado se envió para su secuenciación a MacroGen Inc (Seúl, Corea del Sur), en donde utilizaron un secuenciador de 96 capilares ABI 3730XL (Applied Biosystems, California).

## 6.7 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Se ha determinado que la actividad antimicrobiana de las proteínas ribosomales provenientes de anfibios se debe a que estas incrementan la producción de ROS en los microorganismos objetivo (Baozhen et al., 2020; Chen et al., 2021). En este estudio, los niveles de ROS se midieron según lo descrito por Baozhen y colaboradores (2020) y Díaz-Duarte (2015), con algunas modificaciones. Los microorganismos objetivo utilizados fueron bacterias patógenas de relevancia en la industria alimentaria y farmacéutica: *S. aureus*, *Salmonella Typhi*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *E. faecium* y *Enterococcus faecalis*.

Inicialmente, en tubos estériles de 15 mL cubiertos con papel aluminio para protegerlos de la luz, se inocularon los microorganismos objetivo al 1% (v/v) (D.O.<sub>600 nm</sub> 0.067) en medio LB (caldo Luria) con 50 µL del extracto semipurificado de la proteína 50S ribosomal uL14 (sp-RP uL14) con actividad antimicrobiana a una concentración de 13.602 µg/mL, obtenido de *Lacp. paraplantarum* como lo describe Hurtado (2019). Como control positivo, los microorganismos fueron inoculados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 500 µM, y como blanco, las bacterias no fueron expuestas a sp-RP uL14 ni a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los tubos se incubaron a 37 °C y 200 rpm con una inclinación aproximada de 45°, en condiciones estériles y sin luz. La generación de ROS intracelular se midió a las 0 h, 18 h y 24 h de incubación, considerando que a las 18 h las bacterias están en crecimiento exponencial y a las 24 h en fase estacionaria.

Para determinar la generación de ROS intracelular, se tomaron 600 µL de cada tubo en condiciones estériles y sin luz, depositándolos en tubos Eppendorf de 1.5 mL color ámbar. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y los pellets de células se lavaron dos veces con PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7.4). Posteriormente, los pellets lavados se resuspendieron en 540 µL de PBS y se agregó diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, Misuri, E.U.A.) (100 µM en DMSO, Sigma-Aldrich, Misuri, E.U.A.) para obtener una concentración final de 10 µM. La mezcla se homogenizó con micropipeta y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Tras la incubación, se centrifugó la mezcla a 10,000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet nuevamente bajo las mismas condiciones mencionadas. El pellet se resuspendió en 600 µL de PBS y se homogenizó con micropipeta, tomando 150 µL para colocarlos en los pozos de placas negras. La fluorescencia se midió con el equipo Synergy HT, Biotyper (Vermont, E.U.A.) a 488 nm de excitación y 525 nm de

emisión. Todas las muestras fueron tratadas por duplicado biológico y triplicado técnico, asegurando protección contra la luz durante todo el proceso en la medida de lo posible.

## 6.8 Análisis estadístico.

El análisis estadístico que se realizó para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos fue mediante el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5% y un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el método de comparación de medias de Tukey para comparar las medias entre los diferentes tratamientos y para cada intervalo de tiempo correspondiente al crecimiento del microorganismo objetivo. Este análisis se realizó utilizando el paquete estadístico XLSTAT-premium (versión 2024.2.2). En las gráficas, los grupos marcados con la misma letra indican que no hay diferencias significativas.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE ANÁLISIS

### 7.1 Identificación de cepa.

#### 7.1.1 Identificación de cepa por espectrometría de masas.

La identidad de la cepa con actividad antimicrobiana, obtenida a partir de un producto cárnico fermentado (salami), fue verificada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, ya que previamente había sido caracterizada por el grupo de investigación (Hurtado, 2019). El estudio realizado en el Laboratorio Divisional de Espectrometría de Masas en la UAM-Iztapalapa consistió en identificar el género y especie de la cepa a partir de una colonia aislada. Se seleccionaron 4 colonias aisladas y se realizaron 4 lecturas para cada colonia en una placa de metal pulido, lo anterior con el fin de obtener mayor precisión en los resultados. Este proceso permitió examinar la reproducibilidad del equipo y de las muestras analizadas.

El *software* MALDI BioTyper TM4.0 (Base de datos de Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) interpreta los espectros generados por el sistema automatizado. Se utilizó el registro de BioTyper (puntuaciones), el cual expresa los resultados de la identificación, con puntuaciones de confianza que van desde 0.00 hasta 3.00. Estos valores cuantifican la similitud entre el perfil desconocido de MALDI-TOF-MS con las entradas disponibles en la base de datos. Los resultados de la ecuación logarítmica para los espectros obtenidos se presentan en la Figura 7. De acuerdo con estos resultados, se puede concluir que la cepa aislada del salami corresponde a *Lactiplantibacillus paraplantarum*, ya que el espectro obtenido y el valor indicativo de fiabilidad son de 2.20 y 2.29, como mínimo y máximo, respectivamente. Este valor asegura una identificación a nivel de género y especie (Sibińska et al., 2024).



Gama de valores	Descripción	Símbolos	Color
2.00 - 3.00	Identificación de alta confianza	(+++)	verde
1.70 - 1.99	Identificación de baja confianza	(+)	amarillo
0.00 - 1.69	Sin identificación posible	(-)	rojo

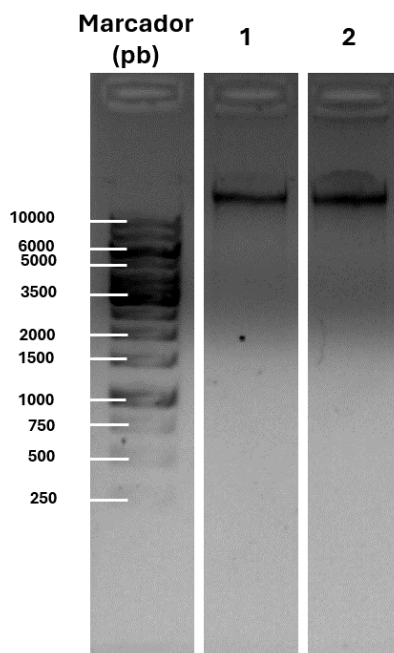
  

Nombre de la muestra	ID de la muestra	Organismo (mejor candidato)	Puntuación Valor
<u>D12</u> (+++)(A)	5JHR_1 (standard)	Lactobacillus paraplantarum	<u>2.20</u>
<u>D13</u> (+++)(A)	5JHR_2 (standard)	Lactobacillus paraplantarum	<u>2.29</u>
<u>D14</u> (+++)(A)	3JHR_1 (standard)	Lactobacillus paraplantarum	<u>2.22</u>
<u>D15</u> (+++)(A)	3JHR_2 (standard)	Lactobacillus paraplantarum	<u>2.20</u>

**Figura 7. Resultado y significado del valor de puntuación MALDI Biotyper para una colonia aislada de salami.**

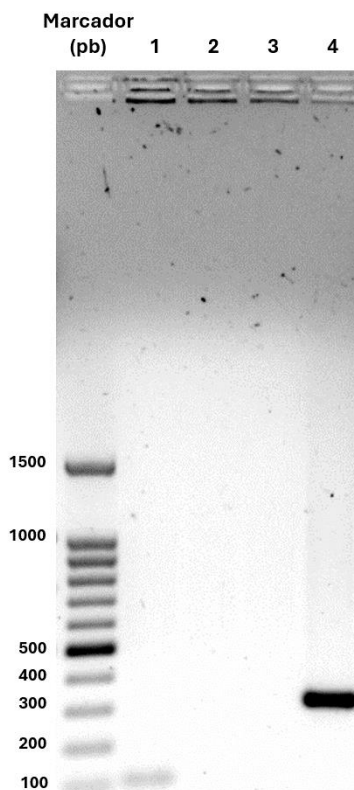
### 7.1.2 Identificación de cepa por gen *recA*.

En primer lugar, se verificó la integridad del ADN total extraído de la cepa aislada de salami y de la cepa *Lacp. plantarum* (control positivo). En la Figura 8 se observa una banda en los carriles 1 y 2, la cual corresponde al ADN extraído con un tamaño superior a los 10000 pb, lo que indica que el ADN total posee la integridad necesaria para llevar a cabo la amplificación del gen *recA* mediante PCR. Antes de proceder con la amplificación del gen, se determinó la concentración de ADN, la cual fue de 220 ng/μL. También se evaluó la relación de absorbancia 260/280, la cual es una medida común para expresar la pureza del ADN, siendo valores entre 1.8 y 2.0 indicativos de una muestra pura. El resultado de la absorbancia fue de 1.891, lo que sugiere que se obtuvo ADN con una pureza aceptable, ya que valores fuera del rango, representan una posible contaminación por compuestos aromáticos como proteínas y fenoles (Sumerta et al., 2024). Una vez determinada la integridad, concentración y pureza del ADN extraído, se procedió a amplificar el gen *recA* específico para cada especie mediante PCR.



**Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del ADN extraído y purificado. Carril 1: cepa aislada del salami. Carril 2: cepa control *Lactiplantibacillus plantarum* UNAM. Marcador: GeneRule 1kb ADN (Thermo Scientific).**

La identificación de la cepa mediante la amplificación del gen *recA*, de 322 pares de bases (pb), se basa en el polimorfismo de este gen en las especies del taxón *Lacp. plantarum*. Para cada especie, se emplea un oligonucleótido directo diseñado a partir de la secuencia con polimorfismo (paraF, pentF y planF) y un único oligonucleótido reverso (pREV) (Tabla 1). Al numerar la secuencia de 322 pares de bases del 1 al 322, los oligonucleótidos directos se localizaron de la siguiente manera: paraF, específico para *Lacp. paraplantarum*, en la posición 220 a 239; pentF, específico para *Lacp. pentosus*, en la posición 109 a 127; y planF, específico para *Lacp. plantarum*, en la posición 9 a 28. Por lo tanto, los tamaños esperados de los amplicones son de 107 pb para *Lacp. paraplantarum*, 218 pb para *Lacp. pentosus* y 318 pb para *Lacp. plantarum* (Torriani et al., 2001). En tal sentido, en la Figura 9 se muestra un único amplicon de 107 pb en el carril 1, el cual se obtiene al amplificar el gen *recA* de la cepa aislada del salami utilizando el oligonucleótido específico para *Lacp. paraplantarum* (paraF). Esto confirma la identificación de la cepa del salami como perteneciente a la especie *Lacp. paraplantarum*. Además, en el control positivo se observa un amplicon de 318 pb, en concordancia con lo esperado para *Lacp. plantarum*.



**Figura 9.** Amplificación del gen *recA* de cepa aislada de salami mediante PCR en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: amplificación con oligonucleótido directo paraF (*Lacp. paraplantarum*). Carril 2: amplificación con oligonucleótido directo planF. Carril 3: amplificación con oligonucleótido directo pentF. Carril 4: amplificación con oligonucleótido directo planF del control positivo (*Lacp. plantarum*). Marcador: 100 pb ADN (Promega)

## 7.2 Identificación de proteína antimicrobiana de alto peso molecular.

En un estudio anterior llevado a cabo por Hurtado en 2019, se identificó una proteína de alto peso molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida Tris-Glicina al 10%. Esta proteína mostró actividad antimicrobiana contra *Micrococcus lysodeikticus* y *L. innocua*, además se determinó su peso molecular aparente de 66.2 kDa utilizando el Software Image Lab 6.0.1. Basándose en estos resultados, se realizó una búsqueda bibliográfica de proteínas de alto peso molecular con actividad antimicrobiana producidas por *Lacp. paraplantarum* u otras especies relacionadas, como las especies pertenecientes al grupo de *Lacp. plantarum*. Se encontraron informes de PGHs con pesos moleculares entre 60 a 110 kDa para *Lacp. plantarum* (van den Nieuwboer et al., 2016; Rolain et al., 2012). Posteriormente, se llevó a cabo un análisis *in silico* en el genoma de *Lacp. paraplantarum* L-ZS9 (NCBI GenBank: CP013130.1), buscando PGHs con pesos moleculares similares al previamente calculado, lo que condujo a la identificación de

una muramidasa (NCBI Protein id: ALO05578.1) con un peso molecular de 67.2 kDa. Finalmente, se verificó el tipo de PGH mediante la especificidad del sustrato, resultando positiva para *N*-acetilmuramidasa.

La banda que mostró actividad fue cortada del gel de Tris-glicina al 10% y enviada para ser analizada por LC-MS/MS con ionización por electrospray. Los archivos crudos (\*.raw) que contienen los datos sin procesar de los espectros de masas obtenidos de la espectrometría de masas fueron analizados mediante el software MaxQuant (versión 2.5.2.0) ([www.maxquant.org](http://www.maxquant.org)) para realizar la identificación de péptidos y proteínas, siguiendo el protocolo de “Parámetros globales” citado por Tyanova y colaboradores (2016). MaxQuant utiliza algoritmos avanzados para identificar y cuantificar las proteínas presentes en la muestra, teniendo en cuenta parámetros como la masa y la intensidad de los péptidos observados en los espectros de masas. Finalmente, MaxQuant proporciona una lista de proteínas reconocidas de la muestra analizada, dentro de las cuales se identificó una con código de acceso a UniProt, la F9URN7. Esta base de datos redirige a InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/UniProt/F9URN7/>), la cual identifica a la proteína secuenciada como la 6-fosfo-*N*-acetilmuramidasa, *N*-terminal, denominada MupG (Figura 10), lo cual concuerda con los resultados obtenidos anteriormente, en donde la proteína en estudio presentó actividad positiva para *N*-acetilmuramidasa mediante especificidad de sustrato.

The image shows a software interface for mass spectrometry analysis. At the top, there are tabs for 'Scans', 'Identifications', 'Features', and 'Metadata'. Below these, there are sub-tabs for 'Protein groups', 'Peptides', 'Modification-specific peptides', and 'Evidence'. A dropdown menu is set to 'Show protein sequences' and 'Show in peptide table'. A table lists 14 protein identifications with columns for 'Protein IDs' and 'Majority protein ID'. The entry for 'F9URN7' is highlighted in blue. A red dashed box surrounds the table and the detailed view below it.

	Protein IDs	Majority protein ID
1	CON__ENSEMBL:ENSBTAP00...	CON__ENSEMBL:
2	CON__ENSEMBL:ENSBTAP00...	CON__ENSEMBL:
3	F9UMA4	F9UMA4
4	F9URN7	F9URN7
5	F9UPD9	F9UPD9
6	F9UPJ6	F9UPJ6
7	F9UPW4;F9UPY2;Q877N1	F9UPW4;F9UPY2:
8	F9URC3	F9URC3
9	F9UTB5	F9UTB5
10	F9UTG6	F9UTG6
11	F9UTH2	F9UTH2
12	F9UTK3	F9UTK3
13	P77885	P77885
14	Q6LWE4	Q6LWE4

**F9URN7 DUF871 domain-containing protein**  
UniProtKB/TrEMBL protein

**Overview**

- Entries: 6
- AlphaFold: 1
- Sequence
- Similar Proteins: 4k

**Short name:** F9URN7\_LACPL

**Length:** 363 amino acids

**Species:** Lactiplantibacillus plantarum (strain ATCC BAA-793 / NCIMB 8826 / WCFS1)

**Proteome:** UP000000432

**Gene:** lp\_2766

**Family membership:** 6-phospho-N-acetylmuramidase (IPR008589)

**Figura 10. Resultados obtenidos del análisis de los espectros de masas adquiridos mediante LC-MS/MS por ionización por electrospray utilizando el software MaxQuant (versión 2.5.2.0) y las bases de datos de UniProt e InterPro.**

La función principal de MupG es hidrolizar el enlace MurNAc 6-fosfato-GlcNAc del peptidoglicano (PG) presente en la pared celular bacteriana y producir MurNAc 6-fosfato y *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), lo que conduce a la división y muerte de las bacterias (Shaku et al., 2020; Wu et al., 2023). La MupG que ha sido ampliamente estudiada es la lisozima de huevo, se ha utilizado ampliamente en cosméticos e industria farmacéutica, así como aditivo alimentario en la conservación de alimentos debido a sus propiedades antibacterianas en pescado, carne, vegetales frescos, frutas y otros alimentos, además está catalogado como un compuesto GRAS (generalmente reconocido como seguro) por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, EE. UU.) (Nakimbugwe et al., 2006; Maidment et al., 2009; Zhang et al., 2024). En la actualidad, son pocos los autores que refieren la actividad antimicrobiana por PGHs producidas por BAL en especial, por una *N*-acetilmuramidasa, tal es el caso de García-

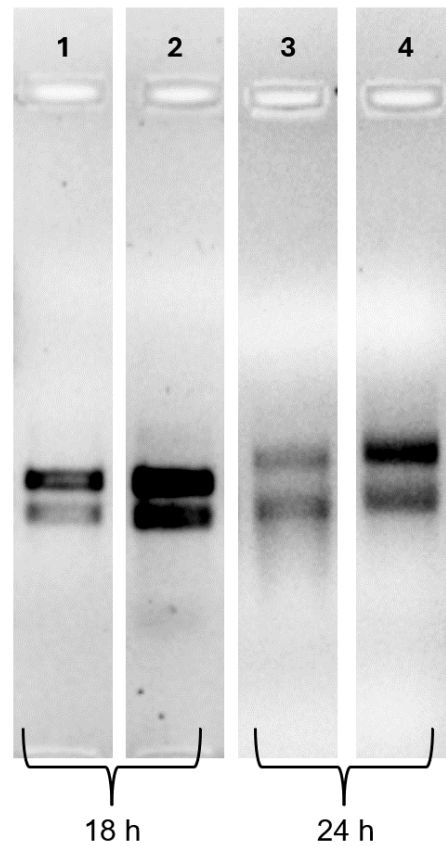
Cano y colaboradores (2015), quienes identificaron y estudiaron una MupG producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, la cual inhibió bacterias patógenas y no deseadas en la industria alimentaria, como *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Años más tarde, otra cepa de *Pediococcus acidilactici* OSU-PECh-3A presentó en su fracción de sobrenadante una MupG identificada con actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, lo que indica su actividad endopeptidasa (García-Cano et al., 2019).

### 7.3 Efecto del carbono y nitrógeno en el medio de cultivo sobre la expresión de proteínas con actividad antimicrobiana.

En una investigación previa realizada por Hurtado (2019), se evaluó como diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno afectan el crecimiento y la actividad antimicrobiana de *Lacp. paraplantarum* frente a *L. innocua*. Se identificaron dos proteínas responsables de esta actividad: una de bajo peso molecular y otra de alto peso molecular, siendo la primera identificada como una proteína 50S ribosomal uL14 (RP uL14). En este presente trabajo, la proteína de alto peso molecular se identificó como una *N*-acetilmuramidasa (MupG). Una vez identificadas las proteínas responsables de la actividad antimicrobiana, se evaluó mediante RT-qPCR el nivel relativo de expresión del gen *mupG* y el gen *RP uL14*, para determinar si diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno en el medio CGB inducen su expresión, utilizando el gen *recA* como referencia interna. La evaluación de la expresión génica se realizó a las 18 y 24 h de crecimiento de *Lacp. paraplantarum*, ya que en un estudio previo se observó un aumento progresivo de la actividad antimicrobiana en esos tiempos de crecimiento (Hurtado, 2019).

La extracción con Trizol permitió obtener RNA total de *Lacp. paraplantarum* en dos tiempos de crecimiento (18 y 24 h), así como para cada una de las concentraciones de carbono y nitrógeno en el medio CGB. La integridad del ARN total extraído se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% como se muestra en las Figura 11, en donde se observan dos bandas correspondientes al ARN ribosomal (ARNr), la subunidad grande 50S (contiene los ARNr 23S y 5S) y la subunidad pequeña 30S (contiene el ARNr 16S) (del Rosario Rodicio y del Carmen Mendoza, 2004). Las bandas bien definidas indican que el ARN obtenido está integro y, por lo tanto, se puede proceder a realizar las RT-qPCR para evaluar la expresión del gen *mupG* y *RP uL14*. Para confirmar la síntesis correcta de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN total, se llevó a cabo PCR de punto final amplificando los genes de interés (*mupG* y *RP uL14*) utilizando el ADNc sintetizado como molde. Después de la PCR en punto final, se realizaron

electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, donde se visualizaron los fragmentos de amplificación para cada uno de los genes estudiados, con un peso molecular aparente de alrededor de 100 pb, como se esperaba para los genes *mupG* y *RP uL14*, con pesos de 104 y 103 pb, respectivamente (Figuras 12 y 13). Se muestran geles de agarosa solo para algunas extracciones de ARN total y genes amplificados a partir de ADNc de algunos tratamientos, por razones prácticas. Finalmente, cada producto amplificado por RT-qPCR mostró un único pico en su curva de disociación (Figura 14), lo que sugiere que la amplificación fue específica para cada uno de los genes estudiados.



**Figura 11. Integridad del ARN total extraído de *Lacp. paraplantarum* en gel de agarosa al 0.8% de agarosa. Carril 1 y 2: condición C3 y N3 a las 18 h de crecimiento, ambos a mayor concentración de carbono y nitrógeno, respectivamente. Carril 3 y 4: condición C1 y N1 a las 24 h de crecimiento, ambos a menor concentración de carbono y nitrógeno, respectivamente**

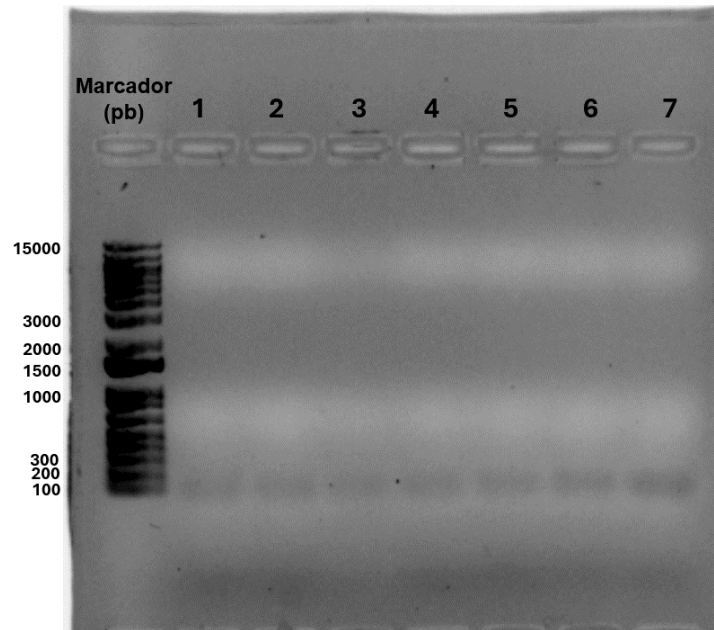


Figura 12. Amplificación del gen *mupG* a partir de ADNc de *Lacp. paraplantarum* a las 18 h de crecimiento en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1 al 3: condición N1 (menor concentración de nitrógeno). Carril 4 al 6: condición C1 (menor concentración de carbono). Carril 7: condición N3 (mayor concentración de nitrógeno). Marcador: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

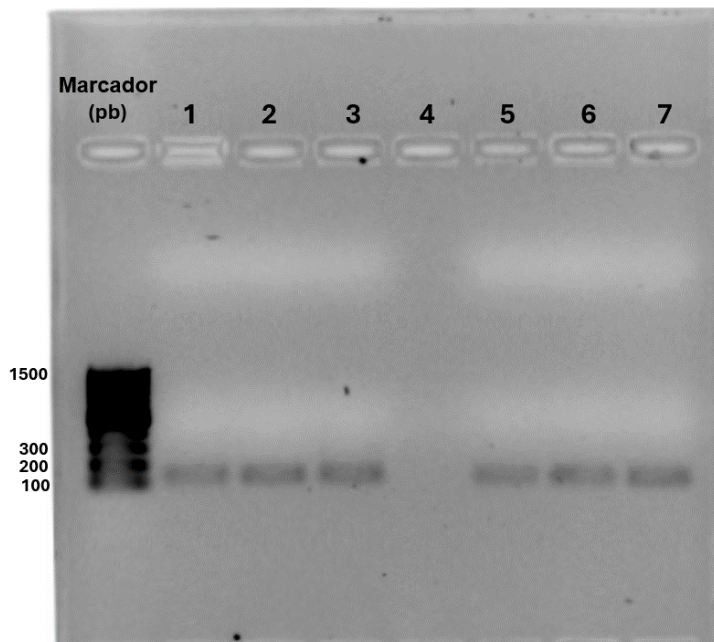
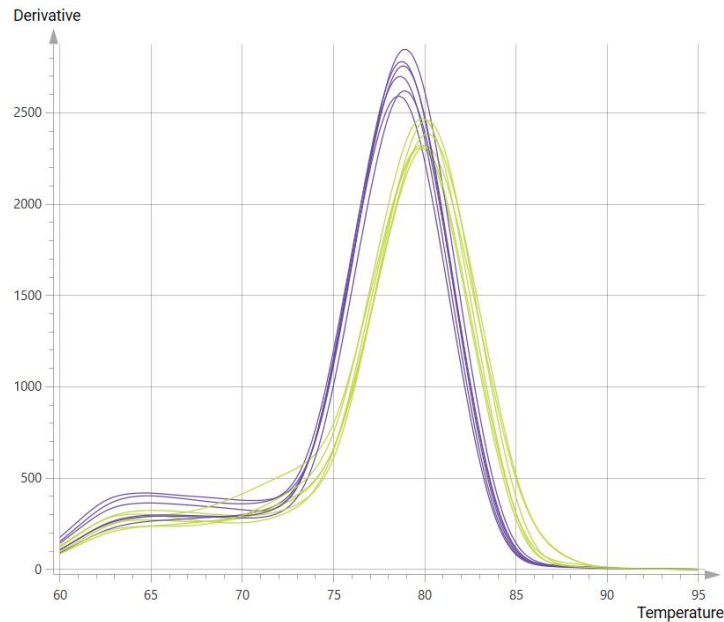


Figura 13. Amplificación del gen *RP uL14* a partir de ADNc de *Lacp. paraplantarum* a las 18 h de crecimiento en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1 al 3: condición N3 (mayor concentración de nitrógeno). Carril: 5 al 7: condición N1 (menor concentración de nitrógeno). Marcador: 100 pb ADN (Promega).





**Figura 14. Curvas de disociación de ADNc de *Lacp. paraplantarum* para la condición con menor concentración de carbono en el medio de cultivo (C1) a las 18 h para el gen *RP uL14* (verde) y el gen referencia (*recA*, morado). Cada reacción se llevó a cabo por triplicado biológico y duplicado técnico.**

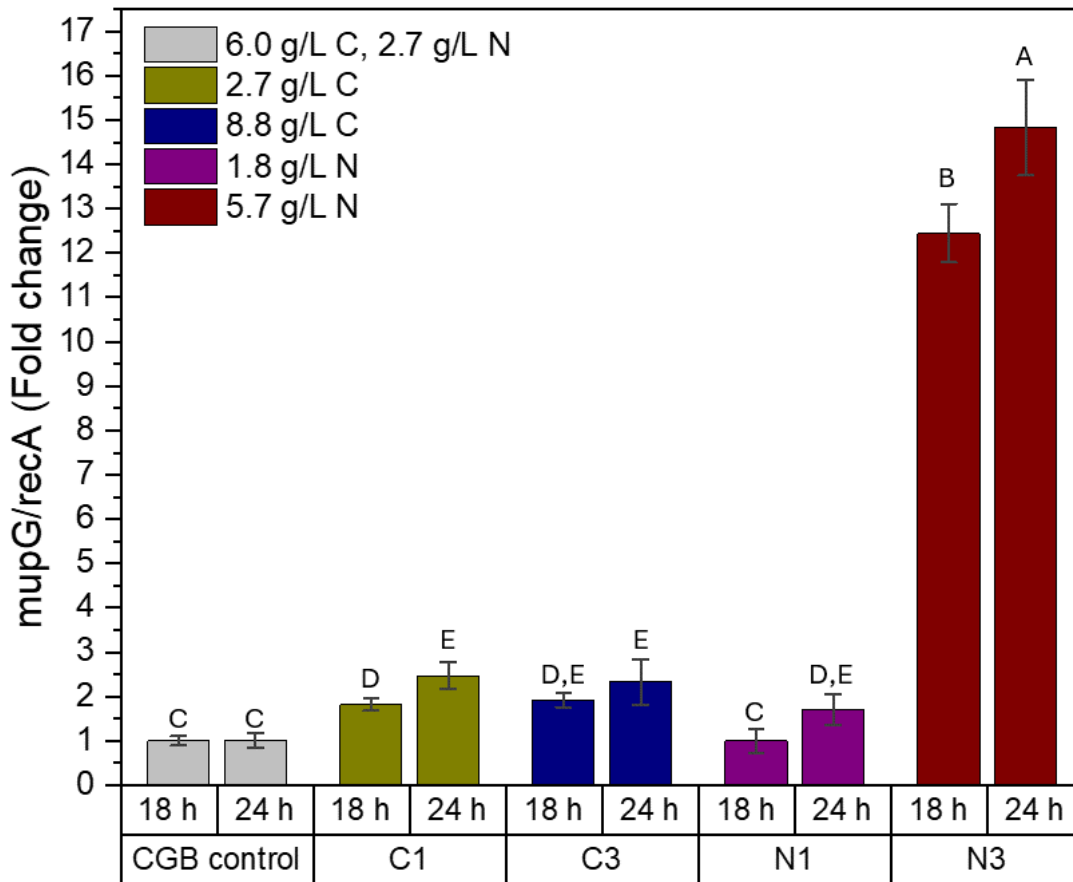
### 7.3.1 Peptidoglucano hidrolasa, MupG.

Investigaciones previas han mencionado que la composición del medio puede tener un efecto significativo en la producción de compuestos antimicrobianos y en el crecimiento de las células productoras de LAB (Kumar et al., 2012; Ooi et al., 2021). Sin embargo, también se ha reportado que los niveles de transcripción no guardan una correlación directa con la actividad antimicrobiana. No obstante, es evidente que la actividad biológica no puede surgir sin un nivel mínimo de expresión génica. Algunos autores mencionan que no hay una estimación de los niveles de proteína basados en los niveles de ARNm (Fortelny et al., 2017). Por otro lado, estudios realizados por otros científicos han demostrado una correlación positiva entre el ARNm y los niveles de proteína mediante evaluaciones experimentales y estadísticas (Guimaraes et al., 2014; Wilhelm et al., 2014; Zhang et al., 2024).

Los resultados obtenidos de la expresión génica de *mupG* al modificar concentración de nitrógeno en el medio CGB fueron significativos. Como se muestra en la Figura 15, la expresión fue significativamente ( $p < 0.05$ ) quince veces mayor al aumentar la concentración de nitrógeno en el medio CGB (N3) en comparación con el medio control CGB, que no experimentó modificaciones en la cantidad de nitrógeno y carbono. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión del gen *mupG* al incrementar (C3) o disminuir (C1) la

concentración de carbono en el medio CGB. En relación al tiempo, se observó un aumento en la expresión del gen *mupG* a las 24 h en comparación con las 18 h, independientemente del tratamiento empleado. Con base en los resultados obtenidos, el aumento en la expresión de *mupG* en el medio con mayor contenido de nitrógeno (N3) puede deberse a un aumento en la fuente de nitrógeno, en este caso, la peptona biotriptasa. Además, el medio contenía extracto de levadura, por lo que ambas fuentes de nitrógeno proporcionaron aminoácidos, péptidos y vitaminas a *Lacp. paraplantarum*, actuando como precursores o inductores en el crecimiento y síntesis de péptidos antimicrobianos en LAB (Abbasiliasi et al., 2017; Khubber et al., 2022; Naveed et al., 2022). Se ha demostrado que el uso de aminoácidos en el medio de cultivo mejora la producción extracelular de lisozimas humanas. Un ejemplo de esto es la adición de 1% de casaminoácido, el cual contiene una mezcla de aminoácidos (excepto triptófano) y péptidos pequeños (Ercan y Demirci, 2014), lo que coincide con los datos obtenidos en este estudio: al aumentar la fuente que proporciona estos aminoácidos, la expresión de *mupG* fue mayor.

Hurtado (2019) reportó que un incremento en la fuente de nitrógeno en el medio CGB indujo un mayor crecimiento de *Lac. paraplantarum*. Asimismo, se observó una mayor actividad antimicrobiana a las 24 h en comparación con las 18 h de crecimiento. Estos resultados coinciden con lo reportado por Ooi y colaboradores (2021), en donde observaron un incremento proporcional entre la concentración de la fuente de nitrógeno orgánico en el medio de cultivo y la actividad antimicrobiana. Además, Naveed y colaboradores (2022), demostraron que fuentes de nitrógeno orgánicas producen un mayor crecimiento de *Bacillus subtilis*, así como una mayor actividad enzimática producida por lisozima. Con base a lo mencionado anteriormente, podemos sugerir que la expresión de *mupG* está vinculada al crecimiento de *Lacp. paraplantarum* e influenciada por la fuente de nitrógeno orgánico en el medio de cultivo.



**Figura 15. Expresión relativa del gen *mupG* en medios de cultivo con diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno. Control CGB, medio sin modificación de carbono y nitrógeno. Medios modificados: C1 y N1, menor concentración de carbono y nitrógeno, respectivamente. C3 y N3 mayor concentración de carbono y nitrógeno, respectivamente. Todos los resultados de expresión se normalizaron en relación al gen *recA* mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Las barras verticales representan el SEM. Letras desiguales indican que hay diferencia significativa.**

### 7.3.2 Proteína ribosomal, RP uL14.

Como se muestra en la Figura 16, RP uL14 se expresó significativamente ( $p < 0.05$ ) tres veces más en la condición C3, con concentraciones más altas de carbono en el medio CGB, que en el medio control CGB, sin cambio en la concentración de carbono. En contraste, se observó una menor expresión en la condición N3, que presentaba una concentración más alta de nitrógeno, así como en las condiciones C1 y N1, donde las concentraciones de carbono y nitrógeno en el medio CGB fueron más bajas, respectivamente. Curiosamente, los hallazgos obtenidos por

Hurtado (2019) muestran que el crecimiento de *Lacp. paraplantarum* fue mayor cuando se incrementó la concentración de nitrógeno en el medio CGB (N3). Sin embargo, en esta condición (N3), la expresión de RP uL14 fue la más baja (Figura 16), contrario a lo que se hubiera esperado, debido a que habitualmente un mayor crecimiento celular se asocia a un aumento del contenido de ribosomas, conduciendo a un aumento en el ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) y las proteínas ribosomales para la síntesis de nuevas proteínas y favorecer así el crecimiento celular (Li et al., 2018; Hurtado-Rios et al., 2022; Stevanovic et al., 2023). El aumento en el crecimiento de *Lacp. paraplantarum* al incrementar la concentración de nitrógeno (N3) en el medio de cultivo y la disminución en la expresión de RP uL14 pueden deberse a que un aumento en la concentración de nitrógeno afecta la síntesis de proteínas, un proceso que puede ser controlado en varias etapas, incluyendo la transcripción, la degradación del ARN mensajero (ARNm) recién sintetizado, o la inhibición de la traducción del ARNm en proteínas. No obstante, el incremento de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo puede favorecer el crecimiento bacteriano al aumentar la disponibilidad de recursos y optimizar la eficiencia metabólica, lo que impulsa un crecimiento celular más rápido, a pesar de la disminución en la expresión de proteínas ribosomales (Hui et al., 2014; Turnbough Jr, 2019; Khubber et al., 2022).

En lo que respecta al aumento significativo de la expresión de RP uL14 al incrementar la concentración de carbono en el medio CGB (C3) (Figura 16), resulta interesante observar que no existe una correlación proporcional con el crecimiento de *Lacp. paraplantarum* y el incremento de las proteínas ribosomales, como sería de esperar, dado que el carbono es un componente esencial de biomoléculas fundamentales como carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, todos ellos indispensables para el crecimiento y la proliferación celular (Butnariu, 2018). Con base a los resultados obtenidos, se podría mencionar que un incremento en la concentración de carbono estimula la expresión de proteínas ribosomales, en este caso específico de RP uL14. Lo anterior puede atribuirse a la disponibilidad de este elemento en el medio de cultivo, lo cual puede influir en la expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas ribosomales mediante mecanismos de regulación génica. Estudios previos han demostrado que ciertos genes ribosomales están sujetos a regulación por la disponibilidad de nutrientes, incluyendo el carbono, y la expresión de proteínas ribosomales puede aumentar en respuesta a un mayor suministro de carbono en el medio de cultivo (de la Serna y Tyler, 1999). Sin embargo, el decremento en el crecimiento de *Lacp. paraplantarum* cuando aumenta la expresión de RP uL14 en la condición C3 (mayor concentración de carbono), podría atribuirse a la falta de inmunidad de la cepa en estudio contra la actividad antimicrobiana de RP uL14. Este fenómeno se observa en algunas células que producen bacteriocinas, las cuales contienen genes de inmunidad que protegen al microorganismo productor de la actividad antimicrobiana

de las bacteriocinas (Weng et al., 2024). Este descenso en el crecimiento de *Lacp. paraplantarum* al incrementar la expresión de RP uL14 podría ser análogo al efecto observado con las colicinas, un tipo de bacteriocina que es letal para la célula que lo produce (*E. coli*) (Mfon, 2024).

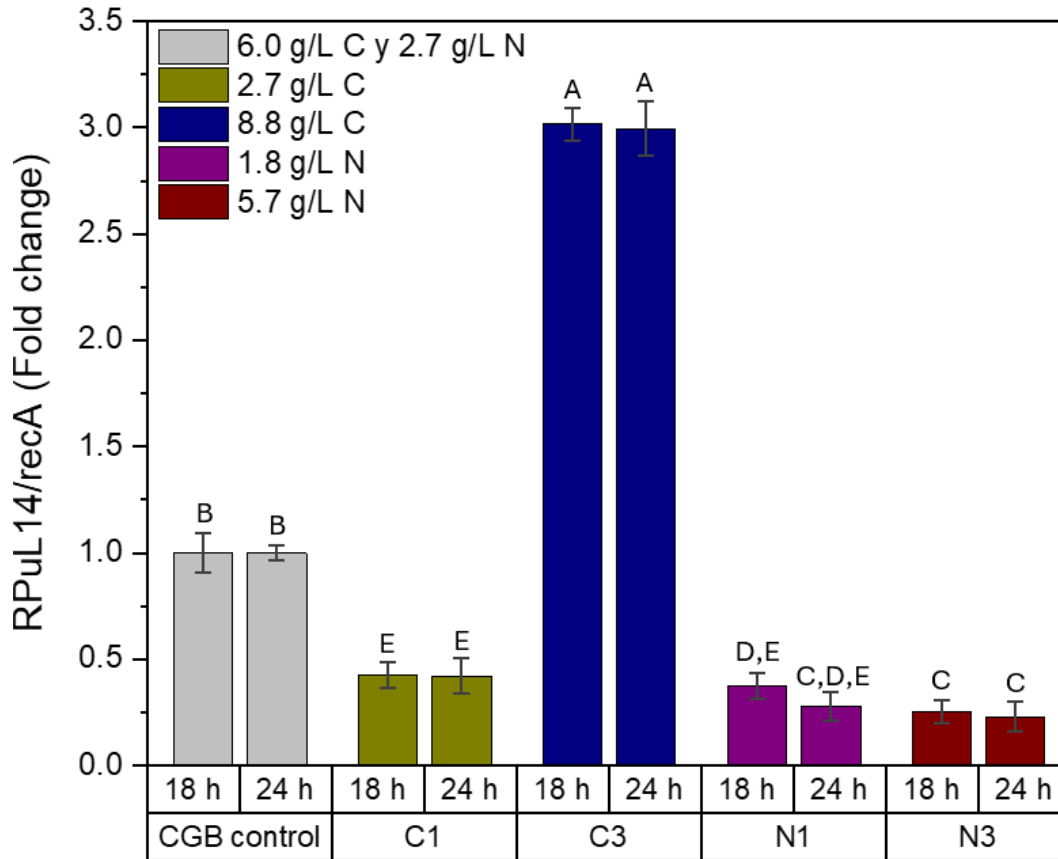


Figura 16. Expresión relativa del gen *RP uL14* en medios de cultivo con diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno. Control CGB, medio sin modificación de carbono y nitrógeno. Medios modificados: C1 y N1, menor concentración de carbono y nitrógeno, respectivamente. C3 y N3 mayor concentración de carbono y nitrógeno, respectivamente. Todos los resultados de expresión se normalizaron en relación al gen *recA* mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Las barras verticales representan el SEM. Letras desiguales indican que hay diferencia significativa.

## 7.4 Clonación de *RP uL14* y construcción de plásmido *pTwin1-bRPuL14*.

### 7.4.1 Amplificación del gen *RP uL14* y vector de expresión.

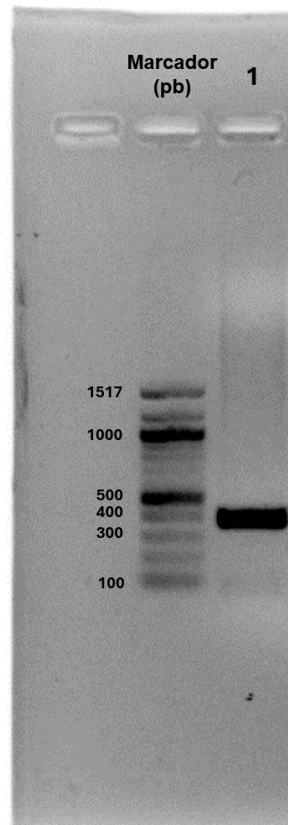
El objetivo de clonar el gen *RP uL14* de *Lacp. paraplantarum* fue incrementar la producción de esta proteína, dado que la cantidad obtenida mediante el método de extracción y desorción reportado por Hurtado (2019) fue muy poca y, además dicho método no proporciona una proteína purificada totalmente. Asimismo, dado el reciente descubrimiento de la actividad antimicrobiana de las proteínas ribosomales, existe un gran interés en investigar su mecanismo de acción y llevar a cabo pruebas bioquímicas que requieren una cantidad significativa de estas proteínas. Para este propósito, se seleccionó el vector pTWIN1, que es un vector de expresión de *E. coli* diseñado para la purificación de proteínas, que utiliza la inteína Ssp DnaB (INT) con un dominio de unión a quitina (CBD). Este vector proporciona un sistema práctico y económico, permitiendo la inmovilización de la proteína objetivo mediante un enriquecimiento por afinidad en un solo paso. Posteriormente, la proteína es liberada por auto-escisión interna, eliminando así la etiqueta de afinidad. Este proceso garantiza la obtención de una proteína nativa sin ninguna etiqueta de afinidad (Zhang et al., 2020). Además, estudios previos, como el realizado por Fang y colaboradores (2020), han demostrado éxito en la clonación y producción de péptidos antimicrobianos utilizando el vector pTWIN1. Esto resulta ventajoso, ya que es de principal preocupación que un péptido antimicrobiano pueda resultar tóxico para el hospedero.

A partir del ADN total de *Lacp. paraplantarum*, se realizó una amplificación por PCR punto final de un fragmento de 378 pb que contiene el gen *RP uL14*, con los extremos correspondientes a las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* (inserto: *NdeI* / *RPuL14* / *XhoI*) (Figura 17), cuya secuencia corresponde a:

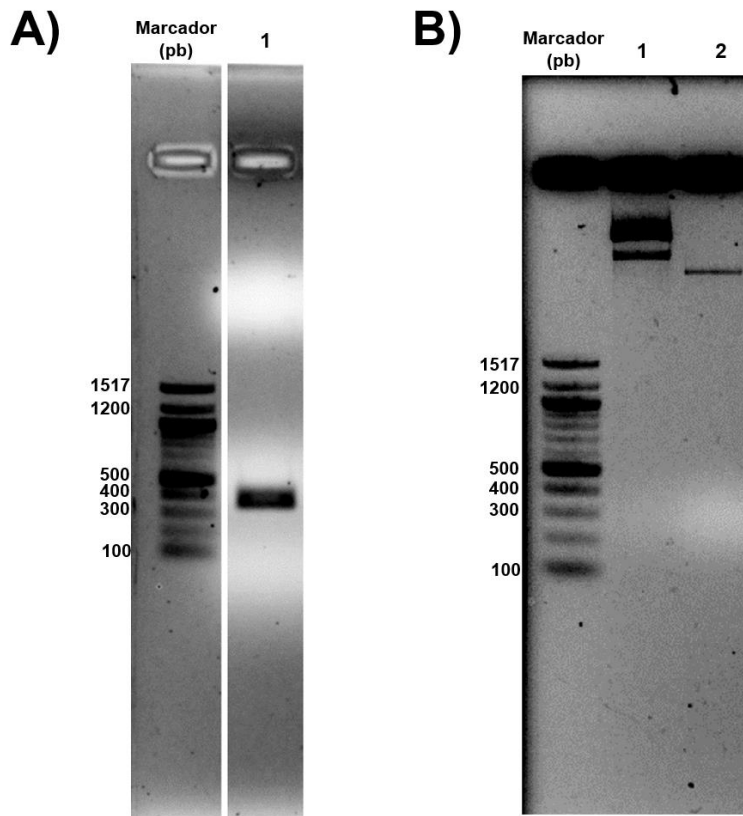
```
5'-CATATGATCCAACAAGAAAGTCGTTTAAAAGTTGCTGACAACCTCCGGTGCCCGTGAAATCC
TTACTATTAAGGTATTAGGTGGCTCTGGTCGTAAACTGCTAACATTGGTGATGTCATTGT
TGCTACGGTTAAACAAGCAACACCCGGTGGTGTGTCAAAGCTCATGATGTCGTTAAAGC
TGTGATCGTCCGGACTAAGTCTGGTGTTACCGTGCTGACGGTTCATACATCAAGTTTGAT
GAAATGCTGCAGTTATTATTCGTGATGACAAAACGCCACAAGGTACTIONGATCTTTGGCC
CAGTCGCTCGTGAATTACGTGATAAAGACTTCATGCGTATTGTTTCATTAGCGCCAGAAGT
TCTGcTCGAG -3'.
```

Posteriormente, se efectuó una reacción de digestión del fragmento de 378 pb y del vector pTWIN1, utilizando las enzimas *NdeI* y *XhoI*, con el fin de obtener extremos

cohesivos y posteriormente obtener la construcción pTWIN1-bRPuL14 mediante su ligación. La Figura 18A muestra la digestión del fragmento que contiene a la *RP uL14* con extremos de las enzimas de restricción (*NdeI* y *XhoI*), con un peso molecular entre los 300 y 400 pb, denominado como inserto (*NdeI* / RPuL14 / *XhoI*). Respecto a la digestión del vector pTWIN1, el carriles 2 de la Figura 18B muestra una sola banda, indicando la linealización del vector. Como control de la linealización, en el carril 1 (Figura 18B) se visualiza el vector sin digestión, donde se observan dos bandas correspondientes a las diferentes formas que puede adoptar el vector, incluyendo la forma enrollada, súper enrollada y lineal (Ćulah, 2022).



**Figura 17. Amplicon del gen *RP uL14* con extremos de enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* en gel de agarosa al 0.8%. Marcador: Quick-load purple 100 bp DNA (New England BioLabs).**



**Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. A) Digestión del inserto (*NdeI* / RPuL14 / *XhoI*). B) Carril 1: vector de expresión pTWIN1 sin digerir. Carril 2: digestión del vector de expresión pTWIN1. Ambas digestiones realizadas con enzimas de restricción: *NdeI* y *XhoI*. Marcador: Quick-load purple 100 bp DNA (New England BioLabs).**

#### 7.4.2 Ligación del inserto y el vector de construcción.

El vector de expresión pTWIN1 y el inserto (*NdeI* / RPuL14 / *XhoI*), previamente digeridos y purificados, fueron ligados siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor utilizando la ligasa T4, con el fin de obtener la construcción mostrada en la Figura 19. La reacción de ligación se transformó en células de *E. coli* TOP 10, y la selección de las células transformadas se realizó sembrándolas en medio LB con agar al 1%, el cual contiene ampicilina como un marcador de selección para los plásmidos. Este marcador permite distinguir entre las colonias transformadas y las no transformadas, ya que solo las células que contienen el plásmido con el gen de resistencia crecerán en el medio, mientras que las células sin el plásmido no podrán crecer (Brechun et al., 2024). Una vez seleccionadas las colonias transformadas, se extrajo el ADN plasmídico de una colonia (Figura 20) utilizando el método TENS-Mini Prep. A partir de este ADN, se realizó la confirmación del inserto (*NdeI* / RPuL14 / *XhoI*) en la construcción pTWIN1-bRPuL14 mediante PCR punto final, utilizando oligonucleótidos específicos que amplifican la



secuencia del inserto y una región del plásmido pTWIN1 (ver Tabla 12). Los resultados obtenidos en la PCR coincidieron con lo esperado. Se detectó un producto de amplificación con un tamaño aparente de 473 pb, que representa la fusión del inserto con una región del plásmido, como se muestra en el carril 1 de la Figura 21 A. Además, el tamaño del amplicon para la amplificación específica del inserto fue alrededor de 378 pb como se muestra en el carril 2 de la Figura 21 B.

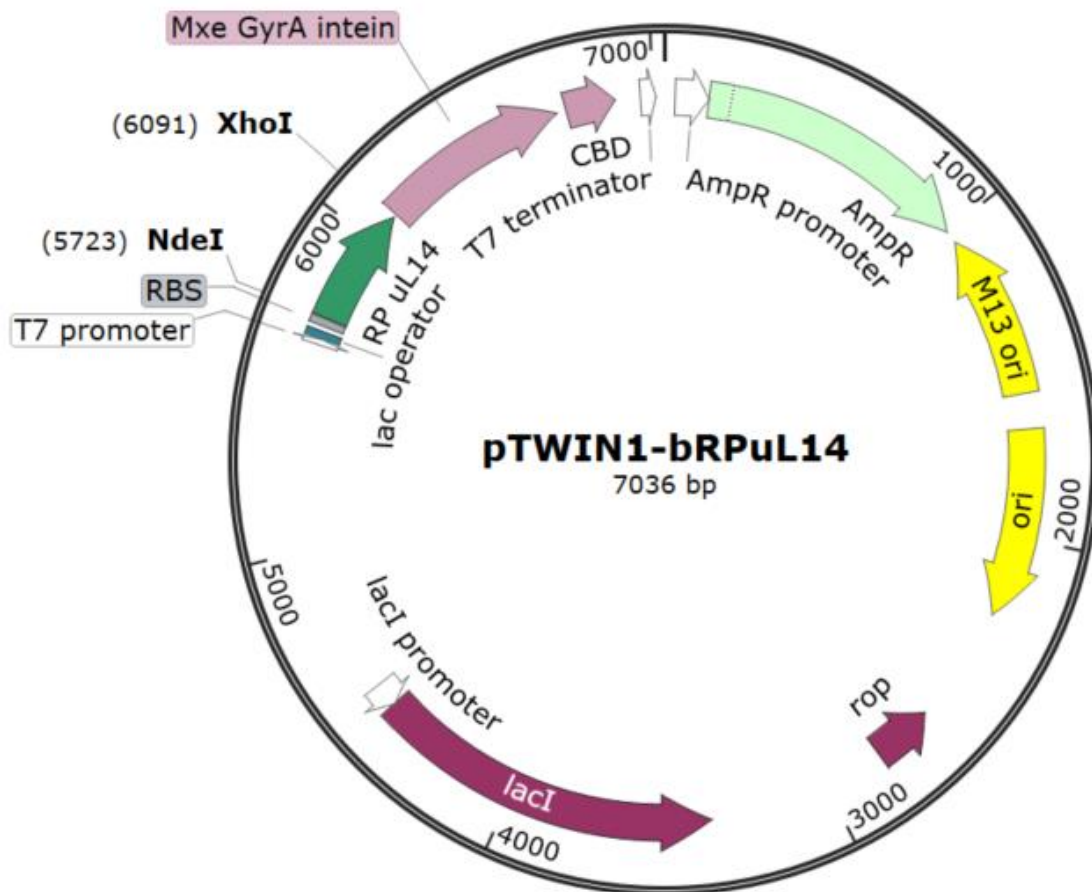
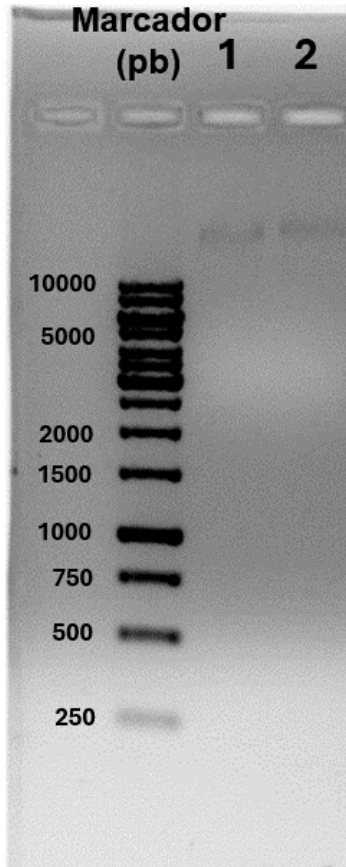


Figura 19. Construcción del plásmido (pTWIN1-bRPuL14). Mapa circular del plásmido mostrando la ubicación de sitios de corte *NdeI* y *XhoI*. Gen RP uL14 (verde). Imagen obtenida utilizando SnapGene (GLS Biotech., Estados Unidos).



**Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: ADN plasmídico de células transformadas de *E. coli* TOP10 con inserto (construcción: *NdeI* / *RPuL14* / *XhoI*). Carril 2: vector de expresión pTWIN1 sin inserto. Marcador: GeneRule 1kb ADN (Thermo Scientific).**

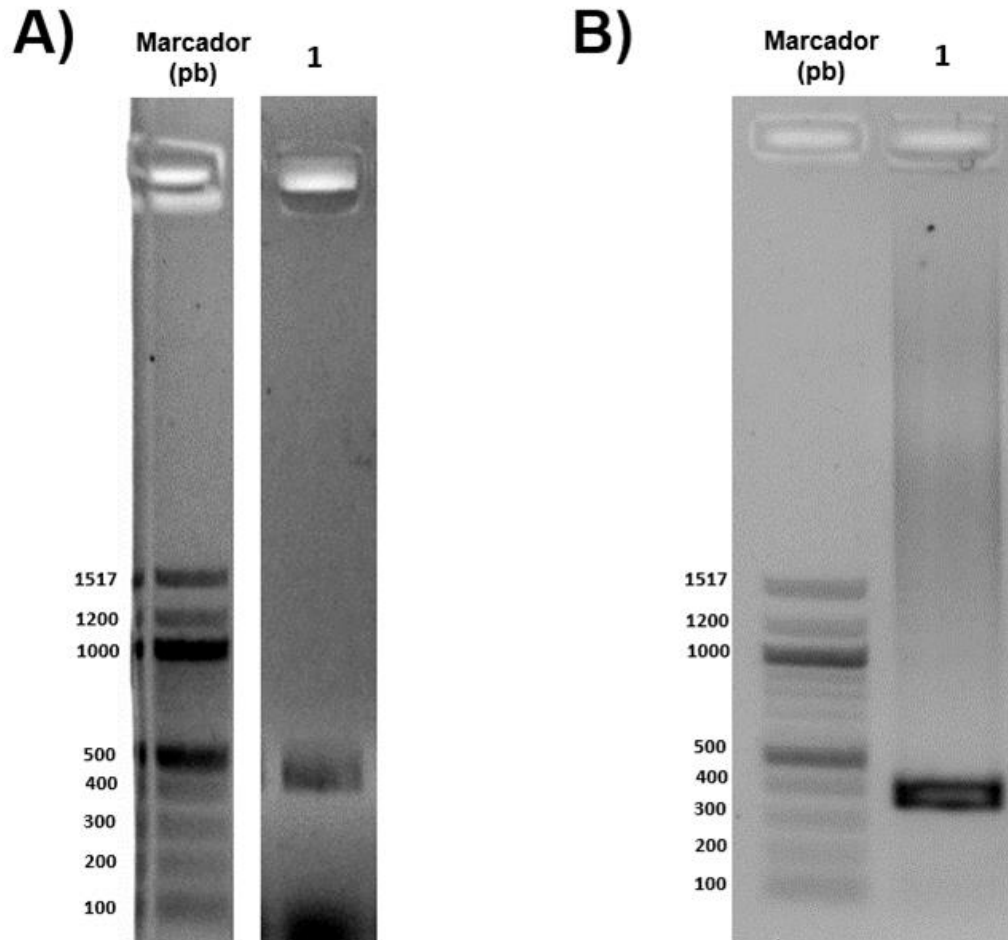


Figura 21. Productos amplificados por PCR para la comprobación del inserto (*NdeI* / RPuL14 / *XhoI*) en ADN plasmídico de células transformadas de *E. coli* TOP10 en gel de agarosa al 0.8%. A) Amplicon de 473 pb con oligonucleótidos que amplifican el inserto y una parte del plásmido. B) Amplicon de 378 pb con oligonucleótidos que amplifican inserto (*NdeI* / RPuL14 / *XhoI*). Marcador: Quick-load purple 100 pb DNA (New England BioLabs).

#### 7.4.3 Secuenciación del inserto (*NdeI* / RPuL14 / *XhoI*).

Para confirmar la presencia del inserto que contiene el gen *RP uL14* en la transformación de *E. coli* TOP 10 con la construcción (pTWIN1-bRPuL14), se secuenciaron dos bandas obtenidas en mediante la amplificación por PCR del inserto (*NdeI* / RPuL14 / *XhoI*) con el gen *RP uL14*. La secuencia por MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur), fue analizada en la base de datos NCBI. Los resultados se presentan en la Figura 22, donde se analizaron las dos secuencias del amplicon, obteniendo para ambas un 100% de identidad y un valor de expectativa bajo. Sin embargo, una de las secuencias mostró identidad de la proteína 50S ribosomal L14 con el

género *Lactiplantibacillus* (Figura 22 A) y la otra secuencia con género y especie de *Lactiplantibacillus plantarum* (Figura 22 B). En la base de datos de proteínas del NCBI, las secuencias de la proteína 50S ribosomal L14 se identifican como la con el número de acceso WP\_003641257.1 y WP\_251340687.1. Lo anterior confirma que el amplicon secuenciado contiene al gen *RP uL14*. Consecuentemente, se llevó a cabo la construcción del plásmido pTWIN1-bRPuL14 que contiene al gen *RP uL14*.

A)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
50S ribosomal protein L14 [Lactiplantibacillus]	<a href="#">Lactiplantibacillus</a>	38.9	38.9	10%	0.003	100.00%	122	<a href="#">WP_003641257.1</a>
50S ribosomal protein L14 [Lactiplantibacillus plantarum]	<a href="#">Lactiplantibacillus plantarum</a>	38.5	38.5	10%	0.003	100.00%	122	<a href="#">WP_251340687.1</a>

B)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
50S ribosomal protein L14 [Lactiplantibacillus]	<a href="#">Lactiplantibacillus</a>	38.9	38.9	10%	2e-04	100.00%	122	<a href="#">WP_003641257.1</a>

**Figura 22. Resultado de BLASTx en la base de datos NCBI para el gen *RP uL14* para la cepa *Lacp. paraplantarum*.**

## 7.5 Efecto de RP uL14 en la producción de ROS.

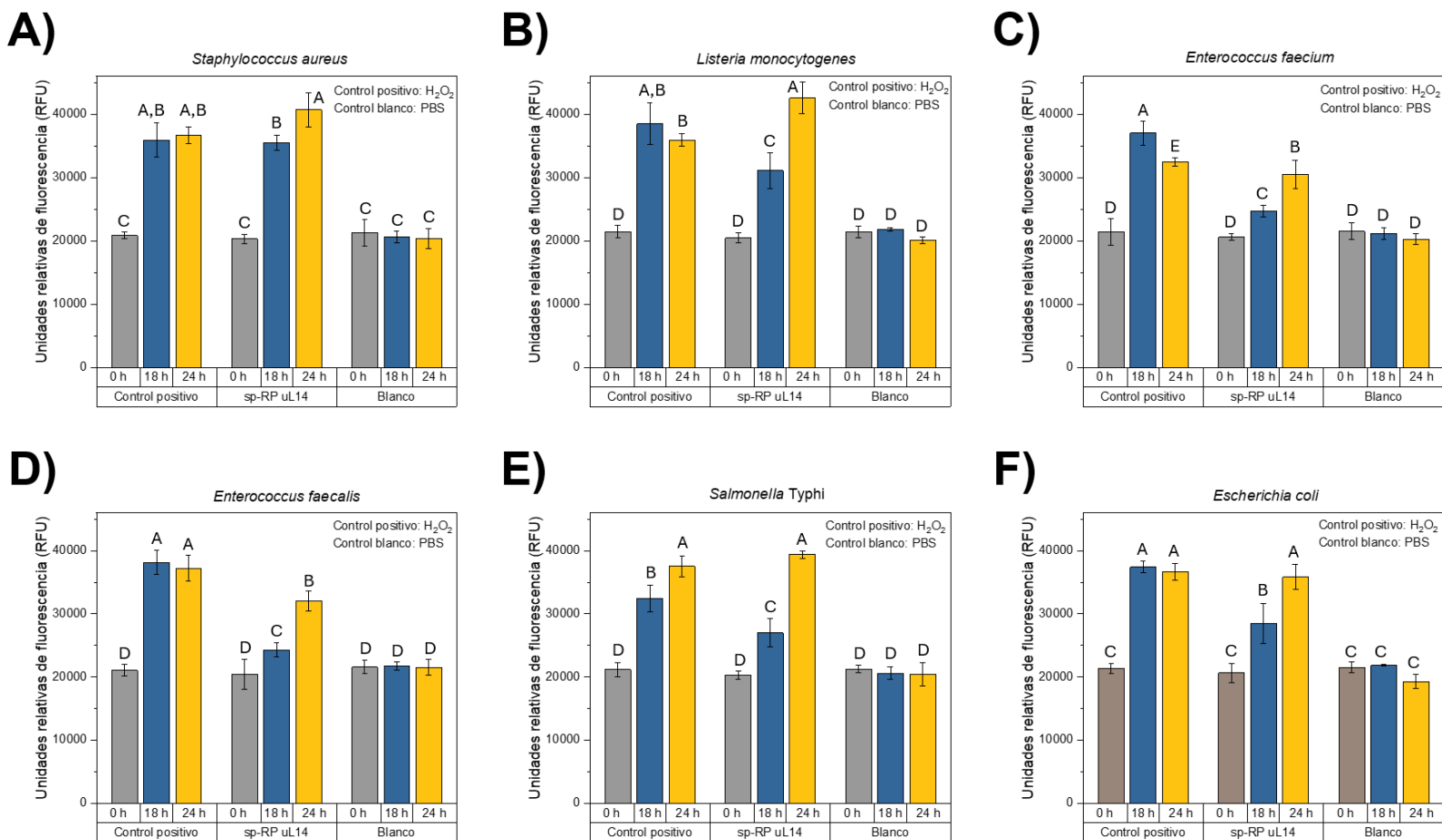
Para determinar los niveles intracelulares de ROS producidos por los microorganismos objetivo bajo la influencia de sp-RP uL14 con actividad antimicrobiana, se utilizó el reactivo fluorogénico permeable a las células DCFH-DA. Este reactivo es absorbido por las células, donde una esterasa celular elimina los grupos acetilo, resultando en diclorodihidrofluoresceína (DCFH). La oxidación de DCFH por ROS convierte la molécula en diclorofluoresceína (DCF), que emite fluorescencia verde con una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión de 525 nm (Kim y Xue, 2020).

En la Figura 23, las unidades relativas de fluorescencia (RFU) representan la intensidad de fluorescencia emitida por DCF debido a la oxidación de DCFH por las ROS presentes

intracelularmente en las células bacterianas de *S. aureus*, *S. Typhi*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *E. faecium* y *E. faecalis* a las 0, 18 y 24 h de su crecimiento. En todas las células tratadas con sp-RP uL14, se observó un aumento significativo en RFU, superando las 24,000 RFU a las 18 y 24 h. Esto indica un incremento en los niveles de ROS intracelular en comparación con el blanco, que mostró aproximadamente 20,000 RFU y no fue tratado con sp-RP uL14 ni con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En relación con el control positivo, donde el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa como inductor intracelular de ROS (Yang et al., 2021), las células tratadas con sp-RP uL14 mostraron valores de RFU similares al control positivo, con más de 30,000 RFU, a excepción fue *E. faecium*, que presentó valores de RFU entre 20,000 y 30,000 RFU. Además, a las 24 h de tratamiento con sp-RP uL14, las células bacterianas presentaron mayores valores de RFU en comparación con las 18 h, lo que indica una mayor cantidad de ROS intracelulares a las 24 h. Esto sugiere que a las 24 h existe un desequilibrio entre la cantidad de ROS y la primera línea de defensa antioxidante, debido a la ineficaz acción de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasas y peroxidasas), provocando así un mayor estrés oxidativo en las células (De Castro et al., 2013).

En los últimos años, diversos estudios han identificado proteínas ribosomales con actividad antimicrobiana. Sin embargo, aún no está claro el mecanismo de acción antimicrobiano de estas proteínas. Las hipótesis actuales sugieren que las proteínas ribosomales o sus fragmentos podrían inducir la producción de ROS, lo que tendría un efecto nocivo sobre el ADN, ARN, lípidos o proteínas del microorganismo objetivo. Esto podría afectar la integridad de la membrana celular mediante la alteración de la distribución normal de los lípidos de la bicapa lipídica, formando poros y causando la muerte celular (Hurtado-Rios et al., 2022).

Este mecanismo ha sido reportado en proteínas ribosomales con actividad antimicrobiana como RP uS15 y RP eL30 producidas por el anfibio *Branchiostoma japonicum*. Baozhen y colaboradores (2020) mencionan un incremento de ROS intracelulares en células de *E. coli*, *S. aureus*, *Aeromonas hydrophila* y *Bacillus subtilis* debido a RP uS15, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio en cuanto a la inducción de ROS intracelulares por la proteína ribosomal con actividad antimicrobiana, sp-RP uL14, en las células de *S. aureus* y *E. coli* (Figura 24 A y F). De manera similar, Chen y colaboradores (2021) reportaron un incremento de ROS intracelulares en células de *S. aureus* y *A. hydrophila* debido a RP eL30, con una intensidad de fluorescencia entre 30,000 y 40,000 RFU, resultados que son comparables a los obtenidos en el presente trabajo en células de *S. aureus* tratadas con sp-RP uL14 (Figura 24 A).



**Figura 23. Efecto de sp-RP uL14 en los niveles intracelulares de *S. aureus* (A), *L. monocytogenes* (B), *E. faecium* (C), *E. faecalis* (D), *S. Typhi* (E) y *E. coli* (F). Control positivo, bacterias inoculadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 500 µM. Blanco, bacterias no fueron expuestas a sp-RP uL14 ni a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las barras verticales representan el SEM. Letras desiguales indican que hay diferencia significativa.**

Cabe destacar que el presente estudio es el primero en mostrar el efecto de una proteína ribosomal (sp-RP uL14) producida por una BAL en la inducción de ROS en células de importancia en la industria alimenticia y farmacéutica, como *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis* y *S. Typhi*. Debido a que solamente existen reportes de algunas proteínas ribosomales con actividad antimicrobiana provenientes de BAL, pero sin mostrar su inducción en las ROS intracelulares. Por ejemplo, se ha demostrado la actividad antimicrobiana de la RP bL36 producida por *P. acidilactici* (García-Cano et al., 2019). Recientemente, se reportó la secuencia de una proteína ribosomal de la subunidad pequeña (30S) producida por *Lactiplantibacillus* spp. (Tiwari et al., 2024). Como se

mencionó anteriormente, el aumento en los niveles de ROS intracelulares podría llevar a la muerte de estas células. Por lo tanto, estas proteínas ribosomales inductoras de ROS podrían ofrecer una solución al creciente problema de la resistencia a los antibióticos a nivel mundial (Hurtado-Rios et al., 2022).

## 8. CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que *Lacp. paraplanatum* produce dos proteínas antimicrobianas identificadas como *N*-acetilmuramidasa y RP uL14. La expresión de genes relacionados con la actividad antimicrobiana se ve favorecida por la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo, específicamente nitrógeno y carbono, respectivamente. Se logró la construcción de un plásmido pTWIN1-bRPuL14 para la expresión heteróloga del gen RP uL14, lo que permitió la obtención de cepas de *E. coli* TOP10 transformantes que expresan este gen. La proteína RP uL14, además, tiene la capacidad de estimular la producción de ROS en microorganismos patógenos, contribuyendo a su muerte celular. Estos hallazgos proporcionan una base para futuras investigaciones sobre su mecanismo de acción antimicrobiano y su potencial aplicación en la lucha contra patógenos.



## 9. PERSPECTIVAS

- Identificar los genes involucrados en la regulación de la expresión de los genes *mupG* y *RPuL14* para examinar su actividad en diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo. Esto es fundamental dado que el crecimiento de *Lacp. paraplantarum* no muestra una relación directa entre las variaciones en la concentración de carbono y nitrógeno y la expresión de estos genes.
- Realizar un análisis cinético de la actividad antimicrobiana de cada una de las proteínas antimicrobianas para investigar posibles efectos sinérgicos entre ellas en la actividad antimicrobiana generada por *Lacp. paraplantarum*.
- Llevar a cabo la sobreexpresión de la proteína RPuL14 en *Escherichia coli* BL21 y purificarla en su forma nativa para realizar ensayos que permitan su caracterización bioquímica y comprender su mecanismo de acción antimicrobiana.
- En una fase inicial, llevar a cabo la caracterización fisicoquímica de la proteína RPuL14, incluyendo la evaluación de su espectro de inhibición contra microorganismos patógenos, alterantes en los alimentos y fitopatógenos, así como su susceptibilidad a proteasas, pH, estabilidad térmica y de almacenamiento. Posteriormente, realizar ensayos clínicos para evaluar su potencial como nuevo agente antimicrobiano.
- Realizar cinéticas antimicrobianas de los microorganismos objetivo con la adición de la RP uL14, con el fin de corroborar que la muerte celular de los microorganismos es debida al incremento de especies ROS inducido por dicha proteína.
- Llevar a cabo experimentos que demuestren si hay daño en la membrana celular de los microorganismos objetivo como resultado de la acción de las ROS producidas por la adición de la RP uL14.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Abbasliasi, S., Tan, J. S., Ibrahim, T. A. T., Bashokouh, F., Ramakrishnan, N. R., Mustafa, S., & Ariff, A. B. (2017). Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. *Rsc Advances*, 7(47), 29395-29420.

Abdullah, A., Putri, A., & Nurilmala, M. (2024). Specific Primer Design for Detection of gene Cyt b for Shark Species *Prionace glauca* and gene COI for *Carcharhinus* spp. Using Real-Time PCR Method. *BIO Web of Conferences* 92, 01008, 1-19.

Allard, M., Binet, R., Brown, E., Cao, G., Deng, X., Grim, C., . . . Stevens, E. (2024). Detection of Microbiological Hazards, qPCR Strengths and Limitations. *Encyclopedia of Food Safety* (Second Edition). Volume 4, 61-85.

Ambion Biosystems. (2008). Use of Internal and External Standards or Reference RNAs for Accurate Quantitation of RNA Levels. Recuperado el 01 de mayo de 2024, de <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Ambion-Tech-Support/northern-analysis/tech-notes/use-of-internal-and-external-standards-or-reference-rnas-for-accurate-quantitation-of-rnalevels.html>.

Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., Claro da Silva, R., Ibrahim, S. A. (2020). Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy* 1(3), 202-232.

Baozhen, Q., Zengyu, M., Lan, Y., Zhan, G., & Zhang, S. (2020). Preserved antibacterial activity of ribosomal protein S15 during evolution. *Molecular Immunology* 127, 57-66.

Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018). *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. *Biomed research International*, 1-18.

Beukes, M., Bierbaum, G., Sahl, H. G., & Hastings, J. W. (2000). Purification and Partial Characterization of a Murein Hydrolase, Millericin B, Produced by *Streptococcus milleri* NMSCC 061. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 23-28.

Bhattacharya, D., Nanda, P., K., Pateiro, M., Lorenzo, J. M., Dhar, P., & Das, A. K. (2022). Lactic Acid Bacteria and Bacteriocins: Novel Biotechnological Approach for Biopreservation of Meat and Meat Products. *Microorganisms*, 10 (10), 1-25.

Biassoni, R., & Raso, A. (2014). Quantitative Real-Time PCR. Methods and Protocols. Recuperado el 01 de mayo de 2024, de <https://www.gene-quantification.de/biassoni-raso-quantitative-real-time-pcr-ebook-2014.pdf>

Bintsis T. (2018). Lactic acid bacteria: their applications in foods. *Journal of Bacteriology & Mycology* 6(2), 89-94.

Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Nastasi, M. R., & Forte, E. (2021). ROS defense systems and terminal oxidases in bacteria. *Antioxidants*, 10(6), 839.

Brechun, K. E., Förschle, M., Schmidt, M. & Kranz, H. (2024). Method for plasmid-based antibiotic-free fermentation. *Microbial Cell Factories* 23(1), 1-11.

Bringel, F., Castioni, A., Olukoya, D. K., Felis, G. E., Torriani, S. & Dellaglio, F. (2005). *Lactobacillus plantarum* subsp. *argenteratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1629-1634.

Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T. & Pfaffl, M.W. (2005) Quantitative real-time RT-PCR-a perspective. *Journal of molecular endocrinology*, 34(3), 597-601.

Butnariu, M. (2018). General Concepts of Plant Biochemistry. *Biochemistry & Physiology: Open Access* 7(2), 1-4.

Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in Microbiology*. 28(4), 281-370.

Chen, Y., Yao, L., Wang, Y., Ji, X., Gao, Z., Zhang, S., & Ji, G. (2021). Identification of ribosomal protein L30 as an uncharacterized antimicrobial protein. *Developmental & Comparative Immunology*, 120, 104067

Coelho, M.C., Malcata, F. X., & Silva, C. C. G. (2022). Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Started Cultures to Probiotic Functions. *Food MDPI*, 11(5), 1-32.



Do, T., Page, J. E., & Walker, S. (2020). Uncovering the activities, biological roles, and regulation of bacterial cell wall hydrolases and tailoring enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 295(10), 3347-3361.

Domenech, M., García, E., & Moscoso, M. (2011). In vitro destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(9), 4144-4148.

Ercan, D., & Demirci, A. (2014). Enhanced human lysozyme production in biofilm reactor by *Kluyveromyces lactis* K7. *Biochemical engineering journal*, 92, 2-8.

Fang, Y. T., Li, S. Y., Hu, N. J., Yang, J., Liu, J. H., & Liu, Y. C. (2020). Study on Cecropin B2 Production via Construct Bearing Intein Oligopeptide Cleavage Variants. *Molecules MDPI*, 25(4), 1005, 1-15.

Fedorov, T. V., Surovtsev, V. I., Pletnev, V. Z., Borozdina, M. A., & Gusev, V. V. (2003). Purification and some properties of lysostaphin, a glycylglycine endopeptidase from the culture liquid of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. *Biochemistry*, 68(1), 50-53.

Fortelny, N., Overall, C. M., Pavlidis, P., & Freue, G. V. C. (2017). Can we predict protein from mRNA levels?. *Nature*, 547(7664), E19-E20.

Fredlund, E., Gidlund, A., Olsen, M., Börjesson, T., Spliid, N.H.H., & Simonsson, M. (2008). Method evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. *Journal of Microbiological Methods*, 73(1), 33-40.

Fuentes Curiel, C. S. N. (2023). Tesis de Maestría. Análisis de la expresión de bacteriocinas de *Enterococcus faecium* QD-2. Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. México: UNAM, 1-87.

García-Cano, I., Campos-Gómez, M., Contreras-Cruz, M., Serrano-Maldonado, C. E., González-Canto, A., Peña-Montes, C., ... & Farrés, A. (2015). Expression, purification, and characterization of a bifunctional 99-kDa peptidoglycan hydrolase from *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 8563-8573.

García-Cano, I., Rocha-Mendoza, D., Kosmerl, E., Zhang, L., & Jiménez-Flores, R. (2020). Technically relevant enzymes and proteins produced by LAB suitable for industrial and biological activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 1401-1422.

García-Cano, I., Rocha-Mendoza, D., Ortega-Anaya, J., Wang, K., Kosmerl, E., & Jiménez-Flores, R. (2019). Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(13), 5243-5257.

Garde, S., Kumar Chodiseti, P., & Reddy, M. (2021). Peptidoglycan: Structure, Synthesis and Regulation. *EcoSal Plus*. 9(2), 1-35.

Green, R., & Rogers, E. J. (2013). Transformation of chemically competent *E. coli*. *Methods in Enzymology*, 529, 329-336.

Guimaraes, J. C., Rocha, M., & Arkin, A. P. (2014). Transcript level and sequence determinants of protein abundance and noise in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 42(8), 4791-4799.

Guzmán, S. (1999). Empelo de la fermentación láctica en músculo fresco de cazón para aumentar el tiempo de anaquel. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.

Heredia-Castro, P. Y., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42(6), 340-346.

Hui, M. P., Foley, P. L., & Belasco, J. G. (2014). Messenger RNA degradation in bacterial cells. *Annual review of genetics*, 48, 537-559.

Hurtado Ríos, J. J. (2019) Tesis de Maestría. Identificación y caracterización parcial de proteínas con actividad antimicrobiana producidas por *Lactobacillus paraplantarum* aislada de un producto cárnico. Universidad Autónoma Metropolitana, México, Ciudad de México.

Hurtado-Ríos, J. J., Carrasco-Navarro, U., Almanza-Pérez, J. C., & Ponce-Alquicira, E. (2022). Ribosomes: The New Role of Ribosomal Proteins as Natural Antimicrobials. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9123, 1-23.

Khubber, S., Marti-Quijal, F. J., Tomasevic, I., Remize, F., & Barba, F. J. (2022). Lactic acid fermentation as a useful strategy to recover antimicrobial and antioxidant compounds from food and by-products. *Current Opinion in Food Science*, 43, 189-198.

Kim, H., & Xue, X. (2020). Detection of total reactive oxygen species in adherent cells by 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate staining. *Journal of Visualized Experiments*, (160), e60682.

Kim, J. H., Lee, E. S., Kim, B. M., Ham, J. S., & Oh, M. H. (2023). Simple Purification and Antimicrobial Properties of Bacteriocin-like Inhibitory Substance from Bacillus Species for the Biopreservation of Cheese. *Foods*, 13(1), 10.

Kouadri Boudjelthia, N., Belabbas, M., Bekenniche, N., Monnoye, M., Gérard, P., & Riazi, A. (2023). Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Newly Isolated from Algerian Raw Cow's Milk. *Microorganisms MDPI*, 11(8), 2091, 1-12.

Kumar, M., Jain, A. K., Ghosh, M., & Ganguli, A. (2012). Statistical optimization of physical parameters for enhanced bacteriocin production by *L. casei*. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 17(3), 606-616.

Layec, S., Decaris, B., & Leblond-Bourget, N. (2008). Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. *Research in Microbiology*, 159(7-8), 507-515.

Leska, A., Nowak, A., & Motyl, I. (2022). Isolation and some basic characteristics of Lactic Acid Bacteria from Honeybee (*Apis mellifera* L.) Environment - A preliminary study. *Agriculture*, 12(10), 1562, 1-18.

Li, H., Zhou, X., Huang, Y., Liao, B., Cheng, L., & Ren, B. (2021). Reactive oxygen species in pathogen clearance: the killing mechanisms, the adaption response, and the side effects. *Frontiers in microbiology*, 11, 622534.

Li, S. H. J., Li, Z., Park, J. O., King, C. G., Rabinowitz, J. D., Wingreen, N. S., & Gitai, Z. (2018). *Escherichia coli* translation strategies differ across carbon, nitrogen and phosphorus limitation conditions. *Nature microbiology*, 3(8), 939-947.

Litterio, M., Castello, L., Venuta, M. E., Abel, S., Fernández-Canigia, L., Legaria, M. C., Rollet, R., Vaustat, D., Azula, N., Fox, B., Otero, S., Maldonado, M. L., Mangieri, N. A., Rossetti, M. A., Predari, S.C., Cejas, D., & Barberis, C. (2024). Comparison of two MALDI-TOF MS systems for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 56(1), 33-61.

Liu, J. M., Fehér, C., Cao, M., Lu, F., & Jensen, P. R. (2021). Lactic Acid Bacteria: Microbial Metabolism and Expanding Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology: Sec. Synthetic Biology*, 9, 1-4.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method. *Methods*, 25(4), 402-408.

López-Arvizu, A., García-Cano, I., Pérez-Chabela, M. de L. y Ponce-Alquicira, E. (2019). Antimicrobial Bacteriocins and Peptidoglycan Hydrolases: Beneficial Metabolites Produced By Lactic Acid Bacteria. *The Many Benefits of Lactic Acid Bacteria*. New York: Nova Science Publishers, Inc. 1-38.

Maidment, C., Dyson, A., & Beard, J. (2009). A study into measuring the antibacterial activity of lysozyme-containing foods. *Nutrition & Food Science*, 39(1), 29-35.

Mfon Ifiok, E. (2024). Production of bacteriocin using lactic acid bacteria isolated from fermented fufu. *International Journal of Development, Sustainability and Environmental Management* 4(1), 45-59.

Monroy Dosta, M. C., Castro Barrera, T., Fernández Perrino, F. J., & Mayorga Reyes, L. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contactos* 73, 63-72.

Morishita, T., Fukada, T., Shirota, M., & Yura, T. (1974). Genetic basis of nutritional requirements in *Lactobacillus casei*. *Journal of Bacteriology*, 120(3). 1078-1084.

Nakimbugwe, D., Masschalck, B., Deckers, D., Callewaert, L., Aertsen, A., & Michiels, C. W. (2006). Cell wall substrate specificity of six different lysozymes and lysozyme inhibitory activity of bacterial extracts. *FEMS microbiology letters*, 259(1), 41-46.



Naveed, M., Tianying, H., Wang, F., Yin, X., Chan, M. W. H., Ullah, A., Xu, B., Aslam, S., Ali, N., Abbas, Q., Hussain, I., Khan, A., & Khan, A. M. (2022). Isolation of lysozyme producing *Bacillus subtilis* Strains, identification of the new strain *Bacillus subtilis* BSN314 with the highest enzyme production capacity and optimization of culture conditions for maximum lysozyme production. *Current Research in Biotechnology*, 4, 290-301.

Ooi, M. F., Foo, H. L., Loh, T. C., Mohamad, R., Rahim, R. A., & Ariff, A. (2021). A refined medium to enhance the antimicrobial activity of postbiotic produced by *Lactiplantibacillus plantarum* RS5. *Scientific reports*, 11(1), 7617. 1-16.

Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9). 2002-2007.

Pidutti, P., Federici, F., Brandi, J., Manna, L., Rizzi, E., Marini, U., & Cecconi, D. (2018). Purification and characterization of ribosomal proteins L27 and L30 having antimicrobial activity produced by the *Lactobacillus salivarius* SGL 03. *Journal of Applied Microbiology*, 124(2), 398-407.

Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, 3(3), 71-85.

Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2010). Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological Research*, 1(4), 218-228.

Razew, A., Schwarz, J.-N., Mitkowski, P., Sabala, I., & Kaus-Drobek, M. (2022). One fold, many functions - M23 family of peptidoglycan hydrolases. *Frontiers in Microbiology. Sec. Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, 13, 1-20.

Rodicio, M. R., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(4), 238-245.

Rolain, T., Bernard, E., Courtin, P., Bron, P. A., Kleerebezem, M., Chapot-Chartier, M. P., & Hols, P. (2012). Identification of key peptidoglycan hydrolases for morphogenesis, autolysis, and peptidoglycan composition of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbial cell factories*, 11. 1-15.

Sadeghi, A., Katouzian, I., Ebrahimi, M., Assadpour, E., Tan, C., & Jafari, S. M. (2023). Bacteriocin-like inhibitory substances as green bio-preservatives; nanoliposomal encapsulation and evaluation of their in vitro/in situ anti-Listerial activity. *Food Control*. 150(11). 1-12.

Saeed, A.H., & Salam, A. I. (2013). Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*. 4(11A). 1-15.

Seixas, A. F., Quendera, A. P., Sousa, J. P., Silva, A. F., Arraiano, C. M., & Andrade, J. M. (2022). Bacterial response to oxidative stress and RNA oxidation. *Frontiers in Genetics*, 12, 821535.

Serrano-Maldonado, C. E., García-Cano, I., González-Canto, A., Ruíz-May, E., Elizalde-Contreras, J. M., & Quirasco M. (2018). Cloning and characterization of a novel N-acetylglucosaminidase (AtID) from *Enterococcus faecalis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 14-27.

Shaku, M., Ealand, C., Matlhabe, O., Lala, R., & Kana, B. D. (2020). Peptidoglycan biosynthesis and remodeling revisited. *Advances in applied microbiology*, 112. 67-103.

Sibińska, E., Arendowski, A., Fijałkowski, P., Gabryś, D., & Pomastowski, P. (2024). Comparison of the Bruker Microflex LT and Zymbio EXS2600 MALDI TOF MS systems for the identification of clinical microorganisms. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 108(2), 116150. 1-7.

Slobodin, B., & Gerst, J.E. (2011) RaPID: an aptamer-based mRNA affinity purification technique for the identification of RNA and protein factors present in ribonucleoprotein complexes. *Methods in Molecular Biology*, 714. 387–406.

Solcà, N. M., Bernasconi, M. V., Valsangiacomo, C., Van Doorn, L. J., & Piffaretti, J. C. (2001). Population genetics of *Helicobacter pylori* in the southern part of Switzerland analysed by sequencing of four housekeeping genes (atpD, glnA, scoB and recA), and by vacA, cagA, iceA and IS 605 genotyping. *Microbiology*, 147(6), 1693-1707.

Stevanovic, M., Carvalho, J. P. T., Bittihn, P., & Schultz, D. (2023). Dynamical model of antibiotic responses linking expression of resistance to metabolism explains emergence of heterogeneity during drug exposures. *bioRxiv* 2. 1-24.

Sumerta, I. N., Legras, J. L., Howell, K., & Liu, D. (2024). Optimization of Microbial DNA Extraction from Wine, Juice, and Sap for Community-Based Genome Studies. *Wine Analysis and Testing Techniques*, 13-22.

Szweda, P., Schielmann, M., Kotlowski, R., Gorczyca, G., Zalewska, M., & Milewske, S. (2012). Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(5), 1157-1174.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2(2), 70-78.

Tiwari, I., Bhojiya, A. A., Prasad, R., Porwal, S., Varma, A., & Choudhary, D. K. (2024). Putative Role of Anti-microbial Peptide Recovered from *Lactiplantibacillus* spp. in Biocontrol Activity. *Current Microbiology*, 81(3), 88.

Torriani, S., Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Applied and environmental microbiology*, 67(8), 3450-3454.

Trabelsi, I., Ben Slima, S., Ktari, N., Triki, M., Abdehedi, R., Abaza, W., Moussa, H., Abdeslam, A., & Ben Salah, R. (2019). Incorporation of probiotic strain in raw minced beef meat: Study of textural modification, lipid and protein oxidation and color parameters during refrigerated storage. *Meat Science*, 154, 29-36.

Tran, A. M., Unban, K., Kanpiengjai, A., Khanongnuch, C., Mathiesen, G., Haltrich, D., & Nguyen, T. H. (2021). Efficient secretion and recombinant production of a Lactobacillal  $\alpha$ -amylase in *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1: analysis and comparison of the secretion using different signal peptides. *Frontiers in Microbiology*, 12, 689413. 1-11.

Turnbough, C. L. Jr. (2019). Regulation of bacterial gene expression by transcription attenuation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 83(3), 10-1128.

Turner, M., Waldherr, F., Loessner, M. J., & Giffard, P. M. (2007). Antimicrobial activity of lysostaphin and a *Listeria monocytogenes* bacteriophage endolysin produced and secreted by lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 30(1), 58-67.

Tyanova, S., Temu, T., & Cox, J. (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature protocols*, 11(12), 2301-2319.

van den Nieuwboer, M., van Hemert, S., Claassen, E., & de Vos, W. M. (2016). *Lactobacillus plantarum* WCFS 1 and its host interaction: a dozen years after the genome. *Microbial biotechnology*, 9(4), 452-465.

VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, 44(5), 619-626.

Vermassen, A., Leroy, S., Talon, R., Provot, C., Popowska, M., & Desvaux, M. (2019). Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan. *Frontiers in Microbiology. Sec. Microbial Physiology and Metabolism*, 10, 1-27.

Vollmer, W., Blanot, D., & De Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 149-167.

Wang, W., & Wang, H. (2014). The effect of Lactic Acid Bacteria in food and feed and their impact on food safety. *International Journal of Food Engineering*, 10(2), 203-210.

Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. Sec. Synthetic Biology*, 9, 1-19.

Weng, S., Leng, G., Gao, J., Wang, Y., Yao, J., Li, X., Liu, Z., Zhou, Q., & Tang, W. (2024). Garvicin-SHAMU-LG6, A Novel Bacteriocin from *Lactococcus garvieae* That Exert Broad Antimicrobial Activity Against Drug-Resistant Pathogens. *Research Square*, 1. 1-27.

Wilhelm, M., Schlegl, J., Hahne, H., Gholami, A. M., Lieberenz, M., Savitski, M. M., Ziegler, E., Butzmann, L., Gessulat, S., Marx, H., Mathieson, T., Lemeer, S., Schnatbaum, K., Reimer, U., Wenschuh, H., Mollenhauer, M., Huspanina, J. S., Boese, J. H., Bantscheff, M., Gerstmair, A., Faerber, F., & Kuster, B. (2014). Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature*, 509(7502), 582-587.

Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.

Wu, Y., Cheng, B., Ji, L., Lv, X., Feng, Y., Li, L., & Wu, X. (2023). Dietary lysozyme improves growth performance and intestinal barrier function of weaned piglets. *Animal Nutrition*, 14, 249-258.

Yang, Y., Zheng, M., Jia, Y. N., Li, J., Li, H. P., & Tan, J. G. (2021). Time-dependent reactive oxygen species inhibit *Streptococcus mutans* growth on zirconia after a helium cold atmospheric plasma treatment. *Materials Science and Engineering: C*, 120, 111633.

Yilmaz, B., Punia Bangar, S., Echegaray, N., Suri, S., Tomasevic, I., Lorenzo, J. M., Melekoglu, E., Rocha, J. M., & Ozogul, F. (2022). The Impacts of *Lactiplantibacillus plantarum* on the Functional Properties of Fermented Foods: A Review of Current Knowledge. *Microorganisms*, 10(4), 1-18.

Zhang, J., Liu, M., Guo, H., Gao, S., Hu, Y., Zeng, G., & Yang, D. (2024). Nanotechnology-driven strategies to enhance the treatment of drug-resistant bacterial infections. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 16(3), e1968.

Zhang, M., Michie, KL, Cornforth, DM, Dolan, SK, Wang, Y., & Whiteley, M. (2023). Impacto de la tasa de crecimiento en la relación proteína-ARNm en *Pseudomonas aeruginosa*. *Mbio*, 14 (1), 1-16.

Zhang, M., Zhang, Y., Wu, B., Peng, Y., Simair, A. A., Siegel, G. W., Lu, C., & Chen, T. (2020). Intein-mediated recombinant expression of monomeric B22Asp desB30 insulin. *BMC biotechnology*, 20, 1-9.



Zhang, Q., Zhao, Y., Yao, Y., Wu, N., Chen, S., Xu, L., & Tu, Y. (2024). Characteristics of hen egg white lysozyme, strategies to break through antibacterial limitation, and its application in food preservation: A Review. *Food Research International*, 114114, 1-10.

## ANEXO A. Medios y soluciones para transformación *E.coli* TOP10.

- Medio LB (Luria Broth) para 1L a pH 7.0: 10.0 g peptona, 5.0 g extracto de levadura y 10.0 g NaCl.
- Buffer TB: 10 mM Pipes; 15 mM CaCl<sub>2</sub>; 250 mM KCl. Mezclar componentes y ajustar a pH 6.7 con KOH (1 M) y esterilizar en autoclave. Después adicionar 55 mM MnCl<sub>2</sub> previamente estéril.

Review

## Ribosomes: The New Role of Ribosomal Proteins as Natural Antimicrobials

Jessica J. Hurtado-Rios <sup>1</sup>, Ulises Carrasco-Navarro <sup>1</sup>, Julio Cesar Almanza-Pérez <sup>2</sup>  and Edith Ponce-Alquicira <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Ciudad de México 09340, Mexico

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Ciudad de México 09340, Mexico

\* Correspondence: pae@xanum.uam.mx; Tel.: +52-55-58044600 (ext. 2676)

**Abstract:** Moonlighting proteins are those capable of performing more than one biochemical or biophysical function within the same polypeptide chain. They have been a recent focus of research due to their potential applications in the health, pharmacological, and nutritional sciences. Among them, some ribosomal proteins involved in assembly and protein translation have also shown other functionalities, including inhibiting infectious bacteria, viruses, parasites, fungi, and tumor cells. Therefore, they may be considered antimicrobial peptides (AMPs). However, information regarding the mechanism of action of ribosomal proteins as AMPs is not yet fully understood. Researchers have suggested that the antimicrobial activity of ribosomal proteins may be associated with an increase in intracellular reactive oxidative species (ROS) in target cells, which, in turn, could affect membrane integrity and cause their inactivation and death. Moreover, the global overuse of antibiotics has resulted in an increase in pathogenic bacteria resistant to common antibiotics. Therefore, AMPs such as ribosomal proteins may have potential applications in the pharmaceutical and food industries in the place of antibiotics. This article provides an overview of the potential roles of ribosomes and AMP ribosomal proteins in conjunction with their potential applications.



Citation: Hurtado-Rios, J.J.;

Carrasco-Navarro, U.; Almanza-Pérez, J.C.; Ponce-Alquicira, E. Ribosomes:

The New Role of Ribosomal Proteins as

**Keywords:** ribosome; ribosomal protein; antimicrobial peptides; moonlighting protein

## Cursos y congresos.

- Curso de Proteómica (CCBIO, junio 2024).
- Curso de Microbioma Experimental (CIENCIABIO, noviembre 2023).
- Presentación seminario Identificación y Caracterización Parcial de Proteínas con Actividad Antimicrobiana producida por *Lactiplantibacillus paraplantarum* aislada de un producto cárnico (UNAM, mayo 2023).
- Participación como jurado en Convocatoria La UAM Rumbo al 50 Aniversario (UAM, diciembre 2022).
- Participación con la contribución en cartel en European Biotechnology Congress (EUROBIOTEC, octubre 2022).
- Curso de PCR Tiempo Real 45 h (OnSience, agosto 2021).
- Capacitación en línea Estrategias para la Preparación de Librerías para el Análisis por NGS (BIO-RAD, junio 2021).
- Participación como evaluador en Foro estudiantil para el desarrollo de productos cárnicos saludables (Universidad Simón Bolívar, junio 2021)
- Capacitación en línea Evolución en el Western blot: Detección múltiple por fluorescencia (BIO-RAD, mayo 2021).
- Capacitación en línea Módulo III: Análisis básico para interpretación y detección de problemas (BIO-RAD, abril 2021).
- Capacitación en línea Módulo II: Buenas prácticas de laboratorio y Troubleshooting (BIO-RAD, abril 2021).
- Capacitación en línea Módulo I: Principios de la PCR Tiempo Real y Aplicaciones en Diagnóstico (BIO-RAD, abril 2021).





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00288

Matrícula: 2173801826

Efecto del medio de cultivo sobre la expresión de proteínas antimicrobianos y su actividad conjunta con las especies reactivas de oxígeno en *Lactiplantibacillus paraplantarum*.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 26 del mes de julio del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA DE LOURDES PEREZ CHABELA  
DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ  
DR. ISRAEL GARCIA CANO  
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

DE: JESSICA JOSEFINA HURTADO RIOS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



JESSICA JOSEFINA HURTADO RIOS  
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. MARIA DE LOURDES PEREZ CHABELA

VOCAL

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DR. ISRAEL GARCIA CANO

SECRETARIO

DR. ULISES CARRASCO NAVARRO