



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Ciencias Químicas
Maestría en Ciencias Químicas



**Generación de construcciones para la transformación genética de
Chlamydomonas reinhardtii y *Escherichia coli* para la expresión de enterocina
AS-48**

**Tesis que presenta
QFB Flor María Alegría Mancilla**

**Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Químicas**

Directora: Dra. Ruth Elena Soria Guerra

Comité tutorial: Dr. Alejandro Hernández Morales

Comité tutorial extendido: Dr. Fidel Martínez Gutiérrez

Créditos Institucionales

El programa de Maestría en Ciencia Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), registro 000519, en el nivel consolidado.

La presente tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología molecular de Células Vegetales de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la dirección de la Dra. Ruth Elena Soria Guerra.

Durante la realización del proyecto el autor recibió la beca académica No. 966336 por parte del CONACyT.



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Ciencias Químicas
Maestría en Ciencias Químicas



Generación de construcciones para la transformación genética de
***Chlamydomonas reinhardtii* y *Escherichia coli* para la expresión de enterocina**
AS-48

Dra. Ruth Elena Soria Guerra
(Directora de la tesis)

Dr. Alejandro Hernández Morales
(Comité tutorial)

Dr. Fidel Martínez Gutiérrez
(Comité tutorial extendido)



Generación de construcciones para la transformación genética de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Escherichia coli* para la expresión de enterocina AS-48 by Flor María Alegría Mancilla is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Dedicatoria

Con todo mi amor para Josefina de la Rosa Silva “mami”, gracias por siempre estar pendiente de mis avances, sé que estaría muy contenta de verme hoy. Un abrazo enorme.

Agradecimientos

A mis papás Juan Antonio Alegría Ayala y María Mancilla de la Rosa por brindarme su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida y siempre alentarme a hacer realidad mis metas; los amo.

A la Dra. Ruth Elena Soria Guerra por haberme brindado la oportunidad de estar dentro de su grupo de investigación, y así contribuir a mi formación profesional. Gracias por las enseñanzas y la paciencia con que siempre me obsequió.

Al Dr. Roberto Quezada Calvillo por su amistad durante todos estos años, de igual manera, gracias por animarme a dar este paso y por su ayuda en el proyecto.

A los Doctores Fidel Martínez Gutiérrez y Alejandro Hernández Morales por formar parte de mi comité tutorial y acompañarme en mi crecimiento profesional; así como al Dr. Omar González Ortega por el apoyo brindado.

A todos los compañeros que iniciaron siendo extraños y hoy considero grandes amigos: Ana; por nunca rendirte conmigo y siempre animarme, Gabo; por las risas y por todo tu apoyo tanto académica como anímicamente, Adri; por ayudarme y enseñarme durante mis primeros días en el laboratorio, Edith; por tu valioso apoyo y por desvelarte conmigo durante los últimos días, y Sara; desde que llegaste los resultados empezaron a fluir, muchas gracias por toda tu ayuda.

A Héctor; por siempre animarme a ir por más a pesar de mis temores, gracias por siempre estar.

A Christian “Chuy” por todo tu apoyo, tus consejos y amistad a larga distancia.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) y al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) por las facilidades otorgadas.

Resumen

Generación de construcciones para la transformación genética de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Escherichia coli* para la expresión de enterocina AS-48

La transmisión de patógenos mediante los alimentos es un problema mundial de salud pública; una alternativa para mantener la inocuidad alimentaria es el uso de péptidos antimicrobianos (PAMs), de los cuales, el más utilizado es la Nisina; sin embargo, al tener restricciones en su uso debido sus propias características, resulta importante la búsqueda de nuevas opciones que puedan ser ampliamente utilizadas.

La Enterocina AS-48, un PAM producido en *Enterococcus faecalis*, presenta un amplio espectro de inhibición frente a bacterias de interés en la industria alimenticia como *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*; sin embargo, al ser *E. faecalis* un patógeno humano, se manifiesta la necesidad de contar con plataformas de expresión que sean seguras para el ser humano.

Por lo anterior, en el presente trabajo se han desarrollado las construcciones pET32-AS48 y p463-AS48 que permiten la expresión de la Enterocina AS-48 en la cepa BL21pLysS de *Escherichia coli* y en el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*, respectivamente.

La construcción pET32-AS48 fue introducida en células calcio competentes de *E. coli* BL21pLysS mediante choque térmico, y tras confirmar la transformación y orientación del gen mediante PCR, se realizó la inducción de la expresión de la Enterocina AS-48 utilizando IPTG como inductor; identificando el péptido recombinante mediante ELISA indirecta. Los resultados muestran que el péptido transgénico se expresa mayormente en la fracción proteica insoluble, con las condiciones de incubación a 28°C, 1mM de IPTG y 6 horas después de la inducción.

Por otra parte, la construcción p463-AS48 se insertó en el genoma del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* mediante balística y el cultivo se mantuvo en medio selectivo para evitar la pérdida del transgén. A la fecha se cuentan con colonias de microalgas creciendo en medio selectivo.

Con los resultados preliminares obtenidos se sientan las bases para la producción a gran escala de la Enterocina AS-48 y su posterior utilización dentro de la industria alimenticia.

Palabras clave: Péptidos antimicrobianos, inocuidad alimentaria, Enterocina AS-48, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia coli* BL21pLysS, expresión de proteínas.

Abstract

Constructs generation for genetic transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Escherichia coli* for enterocin's AS-48 expression

Food spoilage bacteria transmission is a global public health problem; an alternative to maintain food safety is the use of antimicrobial peptides (AMPs), of which the most used is Nisin; however, since its use is restricted due to its own characteristics, the search of new options that can be widely used is very important.

Enterocin AS-48, an AMP produced in *Enterococcus faecalis*, has a broad spectrum of inhibition against bacteria of interest in the food industry such as *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*; however, since *E. faecalis* is a human pathogen, there is a need for having a platform expression safe for humans.

Therefore, in the present work we developed the pET32-AS48 and p463-AS48 constructs that allow the expression of Enterocin AS-48 in the strain BL21pLysS of *Escherichia coli* and in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*, respectively.

The pET32-AS48 construct was introduced into calcium competent *E. coli* BL21pLysS cells by heat shock, and after confirming the transformation and orientation of the gene by PCR, the expression of Enterocin AS-48 was induced using IPTG; identifying the recombinant peptide by indirect ELISA. The results show that the transgenic peptide is mostly expressed in the insoluble protein fraction, with the incubation conditions at 28 ° C, 1mM IPTG and 6 hours postinduction.

On the other hand, the p463-AS48 construct was inserted into the chloroplast genome of *Chlamydomonas reinhardtii* by biolistic. At present, we have colonies growing in selective medium.

The preliminary results obtained, lay the foundations for the large-scale production of Enterocin AS-48 and its subsequent use within the food industry.

Key words: Antimicrobial peptides, food safety, Enterocin AS-48, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia coli* BL21pLysS, protein expression.

Contenido

1.	Introducción	1
1.1	Inocuidad alimentaria.....	1
1.1.1	Aditivos alimentarios.....	1
1.2	Péptidos Antimicrobianos (PAMs).....	3
1.2.1	Bacteriocinas	5
1.2.2	Enterocina AS-48	7
1.3	Proteínas recombinantes	8
1.4	Plataformas de expresión de PR.....	9
1.4.1	Uso de <i>E. coli</i> en la producción de PR	12
1.4.2	Uso de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en la producción de PR	13
2.	Justificación	14
3.	Hipótesis	15
4.	Objetivo general	15
4.1	Objetivos específicos	16
5.	Metodología	16
5.1	Diseño del gen sintético Enterocina AS-48 y oligonucleótidos específicos.....	16
5.1.1	Diseño del gen sintético codificante para la Enterocina AS-48.....	16
5.1.2	Diseño de oligonucleótidos específicos para amplificación del gen Enterocina AS-48	17
5.2	Clonación del gen Enterocina AS-48 en el plásmido de expresión p463	17
5.2.1	Transformación de <i>E. coli</i> TOP 10 con el gen sintético Enterocina AS-48.....	17
5.2.2	Transformación de <i>E. coli</i> TOP 10 con el plásmido p463	18
5.2.3	Digestión de los vectores pUC57-AS48 y p463.....	18

5.2.4 Desfosforilación del plásmido de expresión.....	19
5.2.5 Construcción del vector de expresión p463-AS48	20
5.2.6 Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 con la ligación p463-AS48	20
5.2.7 Extracción de ADN plasmídico.....	21
5.2.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para confirmar la transformación.....	22
5.2.9 PCR de orientación para la construcción p463-AS48	23
5.3 Transformación del cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> por el método de biobalística.....	24
5.3.1 Preparación de las células	24
5.3.2 Preparación de la suspensión de partículas de oro.....	25
5.3.3 Preparación del material para bombardeo	25
5.3.4 Bombardeo con partículas de oro.....	26
5.4 Clonación del gen Enterocina AS-48 en el plásmido de expresión pET32	27
5.4.1 Linealización del plásmido pET32.....	27
5.4.2 Desfosforilación del plásmido pET32	27
5.4.3 Construcción del vector de expresión pET32-AS48.....	28
5.4.4 Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 con la ligación pET32-AS48	28
5.4.5 PCR para confirmar transformación.....	28
5.4.6 PCR de orientación para la construcción pET32-AS48	29
5.5 Expresión del péptido antimicrobiano Enterocina AS-48 en <i>E. coli</i> BL21-pLysS	29
5.5.1 Inducción con IPTG	29

5.5.2 Extracción de proteínas	31
5.5.3 Cuantificación de proteínas totales.....	32
5.5.4 Identificación del péptido antimicrobiano Enterocina AS-48 recombinante.....	33
6. Resultados	36
6.1 Diseño del gen sintético Enterocina AS-48 y oligonucleótidos específicos.....	36
6.1.1 Diseño del gen sintético	36
6.1.2 Diseño de oligonucleótidos específicos para amplificación del gen Enterocina AS-48	37 36
6.2 Construcción del vector de expresión p463-AS48	37
6.2.1 Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 con la ligación p463-AS48	38
6.3 Transformación por balística de la microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 137 (+)	39
6.3.1 Bombardeo de <i>C. reinhardtii</i> con partículas de oro	39
6.4 Construcción del vector de expresión pET32-AS48.....	40
6.4.1 Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 con la ligación pET32-AS48	42
6.5 Expresión del péptido antimicrobiano Enterocina AS-48 en <i>E. coli</i> BL21 pLysS.....	44
6.5.1 Inducción con IPTG, extracción y cuantificación de proteínas.....	44
6.5.2 Identificación del péptido antimicrobiano Enterocina AS-48 recombinante.....	49
7. Discusión	53
8. Conclusiones.....	57
9. Referencias	58

Índice de tablas

Tabla 1. Condiciones para la digestión con <i>Nco</i> I	19
Tabla 2. Condiciones para la desfosforilación del plásmido	19
Tabla 3. Condiciones para ligación con la T4 ADN ligasa	20
Tabla 4. Gel separador	33
Tabla 5. Gel concentrador	34
Tabla 6. Preparación de soluciones para la tinción rápida de Coomassie	36 35
Tabla 7. Lecturas de ELISA a 450 nm	51

Índice de figuras

Figura 1. Representación de la Enterocina AS-48.	8
Figura 2 Sitio de amplificación para confirmar la unión en sentido 5'-3' del gen Enterocina AS-48 en el vector de expresión P464.	24
Figura 3. Secuencia del gen sintético Enterocina AS-48.	36
Figura 4. Digestión p463y pUC57-AS48 con Ncol.	38 37
Figura 5. Construcción p463-AS48 para la expresión de la Enterocina AS-48 en el cloroplasto de <i>C. reinhardtii</i>	38
Figura 6. PCR para confirmar la transformación y orientación.	39
Figura 7. Medio TAP + 100 mg/L Espectinomicina con colonias transformantes y WT	40
Figura 8. Digestión del pET32 con Ncol.	41
Figura 9. Diagrama esquemático de la construcción pET32-AS48.	41
Figura 10. PCR para confirmar transformación y orientación de construcción pET32-AS48.	43
Figura 11. Secuenciación de la construcción pET32-AS48.	44
Figura 12. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados.	45
Figura 13. Efectos principales y dobles a 28°C	46
Figura 14. Efectos principales y dobles a 37°C	47
Figura 15. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas por el método Bradford	48
Figura 16. Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.	49
Figura 17. Gel de Tricina-SDS-page para la identificación de la Enterocina AS-48.	50
Figura 18. Identificación del péptido antimicrobiano Enterocina AS-48 mediante ELISA indirecta	52

1. Introducción

1.1 Inocuidad alimentaria

La inocuidad de los alimentos se define como la ausencia, o los niveles seguros y aceptables, de peligro en los alimentos que pueden dañar la salud de los consumidores (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2019); siendo estos patógenos de naturaleza diversa, entre los que destacan los microorganismos.

De acuerdo con datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), anualmente más de 600 millones de personas enferman, y 420000 mueren como resultado de ingerir alimentos contaminados; afectando principalmente a los menores de 5 años y los habitantes de regiones de bajos ingresos. El impacto de los alimentos insalubres, además, genera pérdidas de producción que ascienden a los 95000 millones de dólares en las economías de países de ingresos bajos y medios (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2019).

1.1.1 Aditivos alimentarios

Con la finalidad de producir alimentos seguros para el consumo humano, a través del tiempo se han añadido sustancias que mejoran o mantiene la inocuidad, sabor, textura y/o aspecto de los alimentos, los cuales son llamados aditivos alimentarios (World Health Organization, 2019).

Los aditivos alimentarios han sido utilizados por la humanidad desde hace siglos; como ejemplos, podemos mencionar la sal de mesa (carnes secas) o el azúcar (conservas de fruta), y conforme a las necesidades de la población, se han desarrollado nuevos compuestos; estas sustancias se pueden obtener de distintos organismos, o bien producirse de manera sintética para posteriormente, ser añadidos al alimento y mejorar alguna de sus características propias. De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la FAO, estas sustancias pueden ser clasificadas como sigue basándose en su función (World Health Organization, 2019):

) Aromatizantes: Son añadidos a los alimentos para mejorar su sabor y/o su olor. Son los aditivos más utilizados, y existen tanto aromatizantes naturales como los que imitan los sabores naturales.

) Preparaciones de enzimas: Estos aditivos pueden o no estar presentes en el producto final, ya que son utilizados para catalizar reacciones bioquímicas; son usados como alternativas a las técnicas químicas.

) Otros aditivos: Esta clase de aditivos, se añade según sea requerido en la preparación, envasado, transporte o almacenamiento del alimento y están presentes en el producto final. Sus propósitos son diversos, pero son usados mayoritariamente como conservadores; para proteger a los alimentos de la degradación por patógenos o factores ambientales, a la par que previene la contaminación del alimento y con esto las enfermedades de origen alimentario; como colorantes, añadidos para mejorar el aspecto del producto final, y edulcorantes que son frecuentemente utilizados por su alto poder endulzante que no aporta calorías.

La OMS en cooperación con la FAO evalúa los aditivos alimentarios basándose en estudios científicos, datos bioquímicos y toxicológicos, así como estudios en animales para poder comprobar su inocuidad y posteriormente, establecer una ingesta diaria admisible. Una vez que se ha realizado lo anterior, la sustancia en cuestión, puede ser utilizada (World Health Organization, 2019).

1.2 Péptidos Antimicrobianos (PAMs)

Los PAMs son componentes de los mecanismos de defensa innatos de los seres vivos (Quezada Rivera, 2018); son oligopéptidos de entre 2 y 9 kDa y una longitud de 10 a 50 aminoácidos. Tienen una estructura helicoidal de naturaleza catiónica y anfipática, lo cual facilita su interacción con la membrana bacteriana, dañándola y provocando así la muerte celular.

Se han descrito una gran cantidad de PAMs, pueden ser sintetizados tanto por procariotas como eucariotas siendo la principal defensa contra agentes nocivos (Quezada Rivera, 2018).

Como ventaja ante los antibióticos convencionales se menciona su mecanismo de acción, ya que no se dirigen a un blanco específico (lo cual puede inducir mecanismos de resistencia); sino que interactúan con la membrana celular formando poros, dañando de esta manera su estabilidad y conduciendo a la muerte celular (Beristain-Bauza, Palou, & Lopez-Malo, 2012; Quezada Rivera, 2018).

Los PAMs se clasifican en base a los siguientes criterios (Quezada Rivera, 2018):

) Con base a la maquinaria biosintética productora:

- Codificados por genes
- No codificados por genes.

) Con base en la fuente biológica productora:

- PAMs bacterianos (Bacteriocinas)
- PAMs de plantas
- PAMs de animales, etc.

) Con base en sus funciones biológicas:

- PAMs antivirales
- PAMs antibacterianos
- PAMs antifúngicos
- PAMs antiparasitarios

) Con base en su estructura tridimensional:

- Familia α : PAMs con estructuras helicoidales
- Familia β : PAMs con estructuras de cadenas β
- Familia $\alpha\beta$: PAMS con estructuras helicoidales y cadenas β
- Familia no $\alpha\beta$: PAMs que no contienen cadenas helicoidales ni β

) Con base en los objetivos moleculares:

- Péptidos con objetivos en la superficie celular

- Péptidos con objetivos intracelulares

1.2.1 Bacteriocinas

Los PAMs producidos por bacterias son llamados bacteriocinas (World Health Organization, 2019) ; son metabolitos secundarios de algunas bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como de bacterias ácido lácticas (BAL) que presentan efecto bactericida/bacteriostático frente a diversas cepas (Beristain-Bauza et al., 2012). Son péptidos de entre 20 y 60 aminoácidos, conformados por puentes disulfuro, tioéter o grupos tiol libres y cuentan con puntos isoeléctricos en un intervalo de pH 8.6 a 10.4 (Quezada Rivera, 2018).

Dentro de sus características principales, destaca el ser estables al calor y a pH ácidos, lo que permite que mantengan su estabilidad aún después de ser sometidas a tratamientos agresivos de pH y temperatura.

Pueden ser clasificadas como sigue (Beristain-Bauza et al., 2012; Quezada Rivera, 2018):

) Clase I Lantibióticos: Son péptidos pequeños de entre 19 y 38 aminoácidos con peso menor a 5 kDa, son termolábiles y presentan modificaciones postraduccionales.

- Clase Ia: Péptidos elongados con forma de tornillo y peso molecular menor a 4kDa, su actividad antimicrobiana se debe a la destrucción de la célula por despolarización de la membrana. El ejemplo más representativo de este grupo es la nisina.

- Clase Ib: Péptidos globulares con peso molecular de entre 1.8 y 2.1 kDa, tiene carga neta negativa o no están cargados, su actividad antimicrobiana está dada por la inhibición enzimática; algunos ejemplos de este grupo son la duramicina A, B, C y la cinamisina.

) Clase II No Lantibióticos: Bacteriocinas de entre 30 y 60 aminoácidos con peso molecular menor de 10 kDa, no contienen aminoácidos modificados, son estables al calor y al pH.

- Clase IIa: Se caracteriza por tener una secuencia amino terminal –Tirosina-Glicina-Asparagina-Glicina-Valina-Xaa-Cisteína; donde Xaa representa cualquier residuo de aminoácido, y contiene uno o dos puentes disulfuro. Se conocen tres Bacteriocinas de este grupo: pediocina PA-1, enterocina A y divercina V41.
- Clase IIb: Bacteriocinas con dos péptidos que deben encontrarse en proporciones similares. Forman poros en la membrana celular, el representante de este grupo es la sakacina.
- Clase IIc: Presentan unión de sus extremos carboxilo y amino terminal, lo que les confiere una estructura cíclica, y a diferencia de las clases IIa y IIb, no contienen la secuencia amino terminal –Tirosina-Glicina-Asparagina-Glicina-Valina-Xaa-Cisteína. El ejemplo más representativo de este grupo es la bacteriocina AS-48.

) Clase III Termolábiles: Estas Bacteriocinas son también denominadas “bacteriolisinas”, son péptidos de peso mayor a 30kDa y son sensibles al calor. Su

mecanismo de acción está basado en la hidrólisis de la pared de las células. Algunos ejemplos de este grupo son la helveticina producida por *Lactobacillus helveticus*, y la enterocina que produce *Enterococcus faecium*.

1.2.2 Enterocina AS-48

La Enterocina AS-48 es un péptido antimicrobiano circular (Figura 1), su codificación es realizada en plásmidos (Heng, Wescombe, Burton, Tagg, & Jack, 2007) y fue descrita inicialmente en el año de 1985 (Galvez, Maqueda, Valdivia, Quesada, & Montoya, 1986), (en ese entonces llamada bacteriocina S-48); tiene una longitud de 70 aminoácidos, ninguno de ellos modificado.

El péptido tiene una masa molecular de 7.14kDa y un punto isoeléctrico de 10.09 (Burgos, Pulido, Aguayo, Gálvez, & Lucas, 2014). Su estructura circular está dada por la unión de los extremos N-terminal de la metionina y C-terminal del triptófano.

Fue inicialmente aislada de la cepa AS-48 de *Enterococcus faecalis*, y se observó que posee un amplio espectro de inhibición contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Galvez et al., 1986) incluidas algunas especies de relevancia clínica tales como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, sin embargo, recientemente se ha demostrado su actividad frente a algunas otras especies bacterianas como *L. monocytogenes* (Burgos et al., 2014) e incluso algunas formas de desarrollo de parásitos intracelulares del género *Leishmania* (Abengózar et al., 2017).

Su mecanismo de acción (Cebrián et al., 2015) está dado primero por la unión de dímeros inactivos de Enterocina AS-48 a la membrana de la bacteria, donde por acción del pH bajo de la periferia de la célula, se disocian y anclan a la membrana estableciendo entre si interacciones

electrostáticas e hidrofóbicas; la acumulación de las moléculas de la Enterocina AS-48 en la membrana de la célula, la desestabiliza y permeabiliza, ocasionando finalmente su muerte.

Debido a que en la actualidad hay una tendencia hacia los productos naturales, que de manera mínima hayan sido procesados o estén adicionados con sustancias sintéticas (Beristain-Bauza et al., 2012), se propicia cada vez más el uso frecuente de productos obtenidos de fuentes naturales tales como la Enterocina AS-48; sin embargo, al obtenerse de manera natural cantidades inferiores a las que se requieren, se hace necesaria la búsqueda de mecanismos que permitan cubrir con esta demanda.

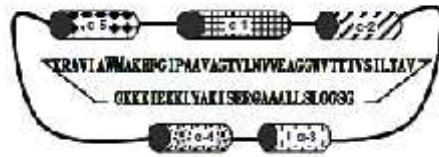


Figura 1. Representación de la Enterocina AS-48.

Tomada de (Burgos et al., 2014)

1.3 Proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes (PR) son aquellas producidas por organismos o células genéticamente modificadas, los cuales expresan material genético no propio que fue sometido a tecnología de recombinación e insertado en su genoma (Langlais & Korn, 2008). La tecnología del ADN recombinante (ADNr) surgió en los 70's debido a la demanda creciente de proteínas de uso terapéutico con alta calidad, que no dependiera de fuentes animales, y de una producción constante (Quezada Rivera, 2018). El uso de los productos del ADNr se ha vuelto cada vez más frecuente (Griesbeck, Kobl, & Heitzer, 2006); desde los últimos 20 años se han desarrollado un gran número de PR para las industrias farmacéuticas y químicas; un ejemplo de lo anterior es la

insulina humana “Humulin®”, la cual fue el primer biofármaco aprobado, igualmente, cientos de PR como hormonas, vacunas y anticuerpos monoclonales han sido aprobados por la FDA para su uso y otros más están en vías de serlo.

Para la producción de PR se puede hacer uso de una variedad de plataformas, desde microorganismos hasta líneas celulares de insectos, plantas y mamíferos teniendo cada una característica definidas en cuanto a crecimiento, rendimiento proteico, facilidad de manipulación y costos de producción; por lo que el uso de cada una de ellas conlleva ventajas y desventajas inherentes a las mismas (Mayfield et al., 2007).

A pesar de la fuerte demanda que se tiene, la producción de PR en ocasiones se ve afectada por los altos costos de su producción en sistemas actuales (Abengózar et al., 2017), por lo cual surge la necesidad de contar con sistemas de expresión con costos accesibles y posibilidad de producción a gran escala.

1.4 Plataformas de expresión de PR

Existen diversas plataformas de expresión de proteínas, cada una de las cuales son utilizadas dependiendo de la proteína o péptido de interés. En años previos se ha demostrado que las principales plataformas para la expresión de PR, concretamente de PAMs son las bacterias y levaduras, seguidas de las plantas (Parachin, Mulder, Viana, Dias, & Franco, 2012), sin embargo, en años recientes el uso de otras plataformas como las microalgas ha ido en aumento, ya que se han logrado producir una gran variedad de compuestos de interés tanto químico como farmacéutico (Griesbeck et al., 2006).

Dentro de las bacterias más comúnmente usadas para la producción de PR destaca *Escherichia coli* (Parachin et al., 2012), una bacteria Gram negativa de la cual se conoce completamente su genoma, permitiendo así su manipulación genética; es de rápido crecimiento y no es exigente en cuanto a nutrientes; su uso está limitado a proteínas pequeñas y que no requieran modificaciones postraduccionales (Abengózar et al., 2017), ya que la bacteria no posee la maquinaria intracelular necesaria para su síntesis. En este mismo grupo, se puede hacer mención a otros microorganismos utilizados en menor medida, como lo son los *Lactococcus*, *Bacillus* sp y *Pseudomonas* (Beristain-Bauza et al., 2012).

Otro tipo de plataformas de expresión comprende las células eucariontes, dentro del cual se pueden mencionar las levaduras; especies como *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae* son las más utilizadas, ya que presentan ventajas tales como permitir la secreción de las proteínas al medio y la realización de modificaciones postraduccionales (Parachin et al., 2012), permitiendo así, disminuir los costos por purificación y escalamiento del proceso, sin embargo, se debe tener especial cuidado con los patrones de glicosilación, ya que al contar con un sistema de glicosilación conservado, las levaduras pueden dar lugar a PR carentes de actividad o inmunogénicas (Vieira Gomes, Souza Carmo, Silva Carvalho, Mendonça Bahia, & Parachin, 2018). En cuanto a las plantas, han sido utilizadas ampliamente para la expresión de péptidos y PR principalmente con fines de mejora de los propios cultivos productores, ya que los productos obtenidos no pueden ser secretados al medio. Al igual que el caso de las levaduras, las plantas presentan patrones de glicosilación altamente inmunogénicos ($\beta(1-2)$ -xilosa y $\alpha(1,3)$ -fucosa), lo cual representa un reto en cuanto al desarrollo de PR para su uso en humanos (Parachin et al., 2012).

El uso de cultivos celulares de mamíferos presenta las ventajas de que las PR producidas son en gran parte idénticas a las producidas originalmente en humanos debido a los mecanismos de plegamiento de proteínas, glicosilación y demás modificaciones postraduccionales que las líneas celulares utilizadas pueden realizar. Esto hace que las PR obtenidas sean utilizadas tanto para estudios de funcionamiento como para uso terapéutico (Korn & Langlais, 2008). Sin embargo, la gran desventaja de estos sistemas es la dificultad de su manejo a gran escala, la facilidad de que se presenten contaminaciones en las líneas celulares, así como sus elevados costos de producción.

En los últimos años, el uso de microalgas transgénicas como plataformas de expresión de PR ha ido en aumento, ya que se ha probado su utilidad en la expresión de diversos productos de interés farmacéutico y biotecnológico, entre otros (Griesbeck et al., 2006). De manera natural, se ha reportado su uso en la producción de alimentos, aditivos alimenticios y cosméticos; sin embargo, el completo aprovechamiento de su potencial va de la mano con el avance de métodos y herramientas en Biología molecular, los cuales han presentado crecimientos sólo a fechas recientes (Griesbeck et al., 2006).

Las microalgas eucariontes como sistemas de expresión de PR, ofrecen múltiples beneficios en su uso como una tasa de crecimiento rápido y cultivos económicos, ya que sólo requieren de algunos minerales en comparación con los cultivos celulares; transformación en periodos de tiempo cortos y un alto rendimiento en las proteínas recombinantes que expresan (Campos-Quevedo et al., 2013); además, no contienen toxinas ni son afectadas por patógenos humanos; aunado a esto, la mayoría son reconocidas como microorganismos “GRAS” (Generally regarded as safe) (Mayfield et al., 2007).

La decisión del sistema a utilizar depende de la proteína que se quiera expresar (Kay Terpe, 2006), las características tales como el tamaño, plegamiento, localización, complejidad y modificaciones postraduccionales de las PR deben ser consideradas al momento de elegir la plataforma de expresión idónea (Parachin et al., 2012).

1.4.1 Uso de *E. coli* en la producción de PR

Escherichia coli es la plataforma de expresión de PR preferida (Chen, 2012; Langlais & Korn, 2008); su uso tanto en laboratorios de investigación como centros de desarrollo y producción a gran escala se ha mantenido vigente; esto gracias a sus muchas ventajas sobre las demás plataformas de expresión existentes, entre las cuales se puede mencionar: I) Su genoma está completamente secuenciado, con lo cual se tiene una mayor posibilidad de manipulación genética, II) Se cuenta con una gran variedad de herramientas biotecnológicas como cepas mutantes y vectores de expresión, III) Presenta gran facilidad para ser cultivada y alcanza buenos rendimientos en poco tiempo, además que los medios en los que crece son sumamente accesibles y IV) a pesar de que se encuentra limitada en cuanto a la mayoría de modificaciones postraduccionales, a la fecha se ha logrado transferir a *E. coli* el sistema de glicosilación presente en *Campylobacter jejuni*; lo cual abre las posibilidades para que en un futuro cercano *E. coli* sea capaz de sintetizar glicoproteínas (Chen, 2012; Quezada Rivera, 2018; Sørensen & Mortensen, 2005).

A pesar de las ventajas previamente señaladas, *E. coli* presenta desventajas inherentes a los organismos procariontes; como los son: I) La incapacidad para sintetizar proteínas muy grandes o de organismos superiores, ya que son necesarias diversas modificaciones postraduccionales o formación de puentes de disulfuro que se encuentran disponibles

únicamente en eucariontes, II) No secreta las proteínas de manera eficiente al medio, si no que se acumulan en el citoplasma y III) La acumulación de lipopolisacárido (LPS), mejor conocido como endotoxinas en las PR obtenidas, éste es pirogénico en humanos y otros mamíferos, por lo cual las PR deben de someterse a un paso de purificación previo a su uso (Quezada Rivera, 2018; Kay Terpe, 2006). Un problema más, se presenta cuando la PR forma cuerpos de inclusión, se encuentra plegada incorrectamente, o bien, se trata de una proteína potencialmente tóxica para la célula huésped; en este caso, los productos obtenidos pueden afectar la normalidad de su metabolismo y causar disminución del crecimiento y eventualmente conducirla a la muerte, haciendo así imposible de obtener buenos rendimientos de la proteína de interés; otros factores como la degradación de proteínas, traducción ineficiente o el uso de codones no óptimos para *E. coli* pueden igualmente conducir a bajos niveles de expresión proteicos. Para minimizar algunos de estos problemas se han diseñado cepas especializadas que permiten, por ejemplo, mejorar los rendimientos proteicos en sistemas que utilicen el promotor T7 (BL21 Star™ (DE3), Invitrogen), promover la formación de puentes disulfuro (Origami™, Novagen) o aumentar la tolerancia y estabilidad de la cepa BL21(DE3) frente a plásmidos que codifican para insertos potencialmente tóxicos (pLysS, pLysE) (Clare, Valentine, Catignani, & Swaisgood, 2001; Langlais & Korn, 2008), entre otros; de esta manera, la elección de la cepa a transformar, dependerá de las características particulares de la proteína a expresar, así como de sus aplicaciones.

1.4.2 Uso de *Chlamydomonas reinhardtii* en la producción de PR

Las microalgas son organismos fotosintéticos que contribuyen a la fijación del carbono en aproximadamente un 50 %; pueden ser tanto procariontes como eucariontes. Estos microorganismos, y en particular *C. reinhardtii*, una microalga eucarionte unicelular, ha servido

como organismo modelo para elucidar el funcionamiento del cloroplasto (Mayfield et al., 2007); sin embargo, en años recientes, su uso como plataforma de expresión de PR ha ido en aumento, ya que en ella se han logrado producir una gran variedad de compuestos de interés tanto químico como farmacéutico (Griesbeck et al., 2006).

Debido a la estructura de *C. reinhardtii* la expresión de PR es posible en dos diferentes vías (Griesbeck et al., 2006): la nuclear, con ventajas como la realización de modificaciones postraduccionales y la posibilidad de que los productos sean secretados al medio; y la cloroplástica, esta última resulta novedosa debido a que la microalga cuenta únicamente con un cloroplasto que ocupa más de la mitad del volumen celular, y cuyo genoma tiene aproximadamente 200 Kb (Quezada Rivera, 2018) lo cual, presumiblemente resultaría en una mayor expresión de la PR de interés.

Se tiene registro de la expresión de algunas PR en el cloroplasto de *C. reinhardtii* por mencionar algunas están: un anticuerpo anti-herpes humano, vacunas como el gen VP1 del virus de la fiebre aftosa fusionado con la subunidad B de la toxina del cólera (Griesbeck et al., 2006; Quezada Rivera, 2018), así como algunos péptidos bioactivos (Campos-Quevedo et al., 2013); lo anterior prueba el potencial y la versatilidad que presenta el cloroplasto de *C. reinhardtii* para la producción de PR de interés.

2. Justificación

La transmisión de organismos patógenos a través de los alimentos es un problema de salud a nivel mundial. Una alternativa para mantener la inocuidad en los procesos de producción de los alimentos son los péptidos antimicrobianos (PAMs). En este proyecto se plantea la

obtención de dos construcciones genéticas que serán útiles para la expresión del péptido antimicrobiano Enterocina AS-48 en *Chlamydomonas reinhardtii* y *Escherichia coli*. Estas plataformas de expresión presentan características tales como: Amplias facilidades para su manipulación genética, fácil y rápido crecimiento, transformación genética rápida, buen rendimiento de PR y en el caso de *C. reinhardtii* capacidad de realizar algunas modificaciones postraduccionales; en el caso de *E. coli* se cuenta con el plásmido pLysS, el cual le confiere resistencia frente a los insertos que como éste pueden ser potencialmente dañinos para la célula.

La generación de estas construcciones representa el primer paso para producir de manera recombinante a la Enterocina AS-48.

3. Hipótesis

Es posible diseñar un gen sintético que codifique para la Enterocina AS-48 y clonarlo en los vectores p463 y pET32. Con estas construcciones será posible modificar genéticamente a *Chlamydomonas reinhardtii* y *E. coli* BL21-pLysS para obtener cepas transformantes estables.

4. Objetivo general

Generar construcciones para la transformación genética de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Escherichia coli* para la expresión de Enterocina AS-48.

4.1 Objetivos específicos

1. Diseñar un gen sintético que codifique para la Enterocina AS-48 y oligonucleótidos específicos para su amplificación.
2. Generar la construcción p463-Enterocina AS-48.
3. Transformar genéticamente a la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*
4. Generar la construcción pET32-Enterocina AS-48.
5. Transformar genéticamente la cepa de *E. coli* BL21-pLysS.
6. Obtener líneas transplastómicas y transgénicas estables para cada sistema.

5. Metodología

5.1 Diseño del gen sintético Enterocina AS-48 y oligonucleótidos específicos

5.1.1 Diseño del gen sintético codificante para la Enterocina AS-48

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los distintos PAMs; se revisaron sus efectos antimicrobianos, así como su posibilidad de aplicación a largo plazo. Se optó por trabajar con la Enterocina AS-48 debido al amplio espectro de actividad que presenta, así como del potencial en cuanto a lograr su expresión en un hospedero diferente al género *Enterococcus*; ya que a la fecha, los intentos no han sido exitosos (Fernández, Martínez-Bueno, Martín, Valdivia, & Maqueda, 2007).

El diseño del gen sintético de la Enterocina AS-48 se realizó en conjunto con la Dra. Ruth Elena Soria Guerra; contiene 260 pares de bases (pb), además de la secuencia codificante para la Enterocina AS-48, se incluyeron en su secuencia sitios de restricción *Nco*I, un sitio de corte de tripsina, una etiqueta de histidinas y el sitio de unión a ribosomas; la síntesis y optimización de codones para su expresión en el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* fue realizada por la compañía Synbio Technologies Inc.

5.1.2 Diseño de oligonucleótidos específicos para amplificación del gen Enterocina AS-48

Se realizó el diseño de un par de oligonucleótidos específicos para la Enterocina AS-48 (F-AS48 y R-AS48); cuyo producto de amplificación esperado es de 168pb. Se utilizó el programa Oligo Calc para verificar que ambos oligonucleótidos cumplieran los requisitos de contenido de Guanina y Citosina, formación de dímeros y horquillas, así como de temperatura de fusión ($^{\circ}$ T_m). Los oligonucleótidos diseñados se verificaron dentro de la página de Sigma-Aldrich[®], compañía encargada de su síntesis.

5.2 Clonación del gen Enterocina AS-48 en el plásmido de expresión p463

5.2.1 Transformación de *E. coli* TOP 10 con el gen sintético Enterocina AS-48

Con la finalidad de contar con suficiente material genético para los procedimientos posteriores, se realizó una transformación de *E. coli* TOP 10 calcio competentes con el gen sintético Enterocina AS-48 contenido dentro del plásmido de clonación pUC57.

Se tomaron 2 μ L de la construcción pUC57AS48 enviada por el fabricante y se realizó la transformación de *E. coli* TOP 10 calcio competentes mediante choque térmico, posteriormente se sembraron en placas de agar Luria-Bertani (LB) con 100 mg/L de Kanamicina como agente de selección y se dejaron incubar durante 24 h a 37 $^{\circ}$ C. Se identificaron las colonias transformadas

mediante PCR de colonia, mismas que se inocularon en medio líquido LB adicionado con 100 mg/L de Kanamicina y se realizó un stock de glicerol con este cultivo (pUC57-AS48). Se extrajo ADN plasmídico mediante el Kit de purificación Wizard® de Promega y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.2.2 Transformación de *E. coli* TOP 10 con el plásmido p463

A fin de contar con suficiente plásmido p463 para los siguientes pasos de clonación, se propagó dicho vector a partir de una alícuota donada por la Dra. Luzmila Martínez con la cual se transformaron células de *E. coli* TOP 10 calcio competentes mediante choque térmico, las células se plaquearon en medio LB sólido con Ampicilina a 100 mg/L como agente de selección, tras obtener colonias positivas se realizaron cultivos en LB líquido manteniendo la presión selectiva, para posteriormente realizar un stock del cultivo en glicerol y finalmente extraer el ADN plasmídico mediante el kit de purificación Wizard® de Promega, mismo que se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.2.3 Digestión de los vectores pUC57-AS48 y p463

Para obtener la construcción p463-Enterocina AS-48, en lo sucesivo llamada p463-AS48 que se utilizó para transformar el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*, se realizaron en primer lugar dos digestiones del ADN plasmídico obtenido en las secciones anteriores; se utilizó la enzima *NcoI* de la compañía ThermoScientific; la primer digestión fue para liberar el inserto y la segunda para linealizar el plásmido p463; ambas se realizaron a 37 °C durante 2 h y de acuerdo a las cantidades descritas en la tabla 1, transcurrido el tiempo, el producto de ambas digestiones se corrieron en geles de agarosa (1 % para el plásmido y 2 % para el inserto) y se utilizaron marcadores de peso molecular (1 kb para el plásmido y 100 pb para el inserto) para comprobar

el resultado de las digestiones. Los dos geles se corrieron a 70 V durante 90 min, pasado este tiempo, se llevaron al transiluminador para observar las bandas correspondientes, y con ayuda de un bisturí se procedió a cortarlas. Las bandas con los productos de las digestiones se purificaron con el Kit de Extracción GenElute™ de Sigma-Aldrich de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos obtenidos (plásmido purificado e inserto) se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Tabla 1. Condiciones para la digestión con <i>Nco</i>I	
Reactivo	Volumen (μL)
Enzima (<i>Nco</i> I)	0.5
Buffer 10x	1.5
ADN plasmídico	De acuerdo a concentraciones obtenidas
Agua estéril	csp 15

5.2.4 Desfosforilación del plásmido de expresión

Con la finalidad de evitar una re-ligación del plásmido, se realizó una desfosforilación del mismo utilizando la enzima fosfatasa antártica de BioLabs Inc.®, la mezcla de reacción se preparó de acuerdo a las cantidades indicadas en la tabla 2, se incubó a 37 °C durante 2 h y posteriormente, 2 min a 65 °C para inactivar la enzima. El plásmido p463 linealizado y desfosforilado (P+F) se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Tabla 2. Condiciones para la desfosforilación del plásmido	
Reactivo	Volumen (μL)
Enzima (Fosfatasa antártica)	1
Buffer	1
Plásmido purificado	6
Agua estéril	2
Volumen total	10

5.2.5 Construcción del vector de expresión p463-AS48

El vector de expresión p463-AS48 se construyó ligando el inserto liberado previamente con el plásmido p463 linealizado y desfosforilado mediante una T4 ADN Ligasa de la compañía BioLabs Inc®, se realizó la mezcla de ligación guardando la relación plásmido:inserto de 1:3 de acuerdo a lo indicado en la tabla 3, y se llevó a 28 °C durante 2 h, posteriormente se incubó a 4 °C durante 24 h, obteniendo así la ligación p463-AS48.

Tabla 3. Condiciones para ligación con la T4 ADN ligasa	
Reactivo	Volumen (μL)
Inserto (Enterocina AS-48)	6
Plásmido P+F	2
T4 ADN Ligasa	0.5
Buffer 10x	1
Agua	0.5

5.2.6 Transformación de *E. coli* TOP10 con la ligación p463-AS48

Se transformaron células calcio competentes de *E. coli* TOP 10 mediante la técnica de choque térmico, se utilizaron 2 μL de la mezcla de ligación obtenida en la sección previa y se adicionaron al tubo que contenía las células calcio competentes, mismo que se incubó en hielo por 10 min. El choque térmico se realizó a 43 °C durante 2 min y posteriormente las células se colocaron nuevamente en hielo por 5 min, pasado este tiempo, se adicionó 1 mL de medio LB en condiciones de esterilidad y se llevó a incubar a 37 °C durante 45 min manteniendo agitación vigorosa (150 rpm). Al término de la incubación, se centrifugó el tubo a 10000 rpm durante 1 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de células transformadas. Posteriormente, se tomaron 100 μL de estas células y con ayuda de un asa de Diagralsky, se extendieron en cajas de Petri con medio LB sólido + 100 mg/L Ampicilina como agente de selección y se incubaron

durante 24 h a 37 °C. Al tener colonias creciendo en medio selectivo se confirmó la transformación mediante PCR y se realizó cultivo líquido de las mismas, manteniendo la presión selectiva. Finalmente se realizó un stock de glicerol de los cultivos, el cual fue almacenado a -60 °C para su conservación y posterior uso.

5.2.7 Extracción de ADN plasmídico

Con la finalidad de confirmar la presencia del gen de la Enterocina AS-48 en el vector de expresión p463-AS48, se realizó una extracción del ADN plasmídico con el kit de purificación Wizard® de Promega.

Se partió del cultivo en medio LB líquido + 100 mg/L Ampicilina, se tomaron 1.5 mL del mismo, y se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 min; el sobrenadante se decantó y la pastilla de células fue resuspendida con 250 µL de solución de resuspensión celular; posteriormente, se añadieron 250 µL de la solución de lisis celular y se mezcló 4 veces por inversión, se agregaron 10 µL de proteasa alcalina, y nuevamente se homogeneizó 4 veces por inversión, se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadieron 350 µL de la solución de neutralización y tras invertir el tubo 4 veces para homogeneizar el contenido, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min; al término de este paso, se utilizaron el tubo colector y la columna (incluidos en el kit), insertando dentro del tubo colector la columna y vertiendo dentro de ésta el sobrenadante con ayuda de una micropipeta; posteriormente se sometió a centrifugación durante 1 min a 12000 rpm; el sobrenadante, que quedó en el tubo colector se desechó. Se realizaron tres ciclos de centrifugación más a la misma intensidad: el primero durante 1 min con 750 µL de la solución de lavado con etanol, el segundo con duración de 2 min y 250 µL de la misma solución (entre cada una de estas series se descartó el sobrenadante) y el último durante 2 min,

donde se añadieron 50 µL de agua libre de nucleasas y se sustituyó el tubo colector por un tubo estéril de 1.5 mL donde se recolectó el ADN extraído.

Para confirmar la integridad del ADN plasmídico extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, se cargaron 5 µL de ADN más el buffer de carga y el gel se corrió a 100 V durante 15 min. Posteriormente, el gel se visualizó en el transiluminador.

5.2.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para confirmar la transformación

Una vez extraído el ADN plasmídico de la construcción p463-AS48 tal como se indicó en la sección anterior y con los oligonucleótidos diseñados se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los reactivos descritos a continuación:

Tabla 4. Composición de la mezcla de PCR		
Reactivo		Volumen (µL)
Buffer + MgCl ₂ 10X		2.5
dNTP's 10mM		0.5
Oligonucleótido Reverse AS48 10mM		0.5
Oligonucleótido Forward AS48 10mM		0.5
Taq polimerasa		0.5
ADN plasmídico (100 ng)		0.5
Agua estéril		20
Volumen total		25

Además de los tubos de reacción con las clonas a analizar, se incluyó como control positivo ADN plasmídico de las células *E. coli* TOP 10 transformadas con el plásmido pUC57-AS48; y un control negativo en el cual el volumen de ADN plasmídico se sustituyó por agua estéril.

Se configuró el termociclador de acuerdo a las condiciones descritas a continuación:

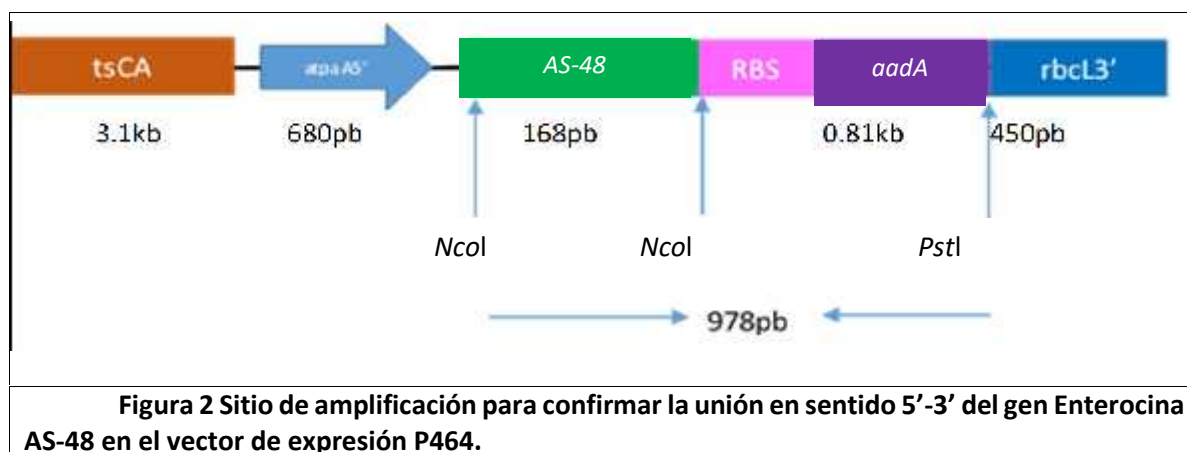
Tabla 5. Condiciones de la PCR			
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	3	1
Desnaturalización	94	0.5	35
Alineamiento	55	0.5	35
Extensión	72	0.5	35
Extensión final	72	5	1

Al finalizar la PCR se analizaron los productos de la reacción mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, corriendo el gel a 70 V durante 30 min. El gel obtenido se observó posteriormente en el transiluminador para identificar la banda esperada.

5.2.9 PCR de orientación para la construcción p463-AS48

Debido a que el gen de la Enterocina AS-48 está flanqueado únicamente por sitios de restricción para la enzima *NcoI* fue necesario realizar una PCR para confirmar la correcta orientación del gen (5' – 3'), ya que existe la posibilidad que se encuentre clonado en sentido inverso (3' – 5'). Esta PCR se realizó según la composición de la tabla 4, sustituyendo el oligonucleótido Reverse AS48 por el Reverse *aadA*; se incluyó además de las clonas a analizar, un control negativo, en el cual el volumen correspondiente al ADN se sustituyó por agua estéril. Se programó el termociclador de acuerdo con lo indicado en la tabla 5.

Al confirmar la orientación correcta del gen en la construcción, se realizaron análisis de restricción.



5.3 Transformación del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* por el método de biobalística

La transformación de cloroplastos es uno de los más utilizados debido a las ventajas que ofrece sobre la transformación nuclear (Kanamoto et al., 2006); estas ventajas están principalmente relacionadas por la cantidad de copias del genoma que hay en un cloroplasto en comparación con el núcleo; debido a lo cual, la proteína de interés puede llegar a expresarse en mayores concentraciones.

Además, el método de biobalística, basado en el bombardeo con micropartículas de oro recubiertas con el ADN de interés se ha descrito como el mejor método para la transformación de organelos como la mitocondria o el cloroplasto (Patiño Rodríguez, 2007).

5.3.1 Preparación de las células

Se partió de un cultivo líquido de *Chlamydomonas reinhardtii* en medio TAP con tres días de crecimiento, el cual fue usado como preinóculo para 200mL de medio TAP líquido que se llevó a incubación hasta alcanzar fase logarítmica bajo condiciones de luz blanca con fotoperiodo de 16 h luz 8 h oscuridad en agitación constante. El cultivo se sometió a centrifugación durante 5

min a 3000 rpm con la finalidad de concentrar la biomasa y posteriormente se sembraron 200 μ L de las células en el centro de una caja con medio TAP sólido.

5.3.2 Preparación de la suspensión de partículas de oro

Se pesaron 50 mg de partículas de oro de 1 μ m de diámetro en un tubo de 1.5 mL y se agregó 1 mL de etanol puro grado biología molecular, agitando por 3 min, posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante; en seguida se añadió un volumen de etanol al 70 % y tras mezclar vigorosamente 2 min, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 min, agitando cada 5 min; al final de este periodo, se centrifugó nuevamente a 14000 rpm por 3 min, y tras descartar el sobrenadante, se añadió 1 mL de agua destilada y se agitó durante 1 min, la mezcla se dejó reposar por 1 min, y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 2 min; estos lavados se repitieron dos veces, al final de los cuales, se añadió un volumen de glicerol 50 % (v/v) adecuado para alcanzar la concentración de partículas a 60 mg/mL. Finalmente, las partículas se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

5.3.3 Preparación del material para bombardeo

Para recubrir las micropartículas de oro con el ADN a introducir, se agregaron 10 μ L del material genético (vector p464-AS48, a una concentración de 1 μ g/ μ L) a 50 μ L de la suspensión de partículas preparada previamente; la mezcla se agitó de manera intensa durante 5 min, posteriormente se añadieron 50 μ L de CaCl₂ 2 M estéril + 20 μ L de espermidina 0.1 M y se mezcló nuevamente por espacio de 20 min manteniendo la temperatura a 4 °C, posteriormente se agregaron 200 μ L de etanol absoluto a temperatura ambiente, se agitó por 5 s y finalmente se centrifugó por 30 s a 10000 rpm. Este procedimiento se repitió 4 veces descartando el

sobrenadante en cada uno de ellos. Por último, el pellet formado se resuspendió en 30 µL de etanol al 100 % y se mantuvo en hielo hasta su uso.

5.3.4 Bombardeo con partículas de oro

Para realizar el protocolo de biobalística se utilizaron las partículas de oro recubiertas con la construcción p464-AS48 preparadas previamente y se siguieron los parámetros indicados en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones para la transformación del cloroplasto de <i>C. reinhardtii</i> mediante balística.	
Parámetro	Unidades
Distancia de disparo	9 cm
Vacío de Hg	20 pulgadas
Presión de He	1000 psi
Diámetro de partículas de oro recubiertas	1µM

Posterior al disparo, las cajas se sellaron y se incubaron durante tres días a 25 °C, transcurrido este tiempo, se añadió 1 mL de medio TAP sólido a cada caja para recuperar las células, las cuales fueron resembradas en medio TAP sólido adicionado con 50 mg/L de Espectinomicina como agente de selección. Las cajas se mantuvieron en incubación a 25 °C. Las resiembras subsecuentes se realizaron cada 15 días en medio TAP sólido aumentando la presión selectiva a 100 mg/L de Espectinomicina y añadiendo un control de una cepa WT al medio selectivo. Al cumplirse tres rondas de selección, las colonias resistentes al antibiótico se resembraron en medio TAP líquido + Espectinomicina (100 mg/L).

5.4 Clonación del gen Enterocina AS-48 en el plásmido de expresión pET32

5.4.1 Linealización del plásmido pET32

La construcción pET32-Enterocina AS-48, que en lo sucesivo se nombrará como pET32-AS48 se realizó a partir del plásmido pET-32a (+). El cultivo de *E. coli* que contenían dicho plásmido fue donado por el Dr. José Francisco Morales Domínguez de la UAA, a partir de éste se realizó un stock en glicerol el cual se conservó a -60 °C. Aparte, se creció este mismo cultivo en medio LB líquido más Ampicilina a 100 mg/L el cual sirvió para realizar una extracción de ADN plasmídico mediante el kit de extracción Wizard® de Promega tal como se describió anteriormente. Se verificó su concentración utilizando el NanoDrop y se realizó la digestión con la enzima *Nco*I de Thermo Scientific siguiendo las cantidades indicadas en la Tabla 1. La mezcla de digestión se incubó a 37 °C durante dos horas; posteriormente se corrió en un gel de agarosa al 1 % durante 90 min a 70 V. El gel se visualizó en el fotodocumentador, y se identificó y cortó la banda correspondiente al plásmido linealizado. La banda obtenida se purificó utilizando el Kit de Extracción GenElute™ de Sigma-Aldrich según el procedimiento descrito por el fabricante. El plásmido linealizado y purificado (P+D) se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.4.2 Desfosforilación del plásmido pET32

Para evitar que el plásmido se ligue nuevamente, el plásmido pET32 linealizado se trató con la enzima fosfatasa antártica de la marca BioLabs Inc.® la mezcla de reacción se preparó de acuerdo a la Tabla 2 y se incubó a 37 °C durante 2 h, posteriormente se inactivó la enzima a 65 °C por 5 min. El plásmido pET32 purificado, digerido y desfosforilado (P+D+F) se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.4.3 Construcción del vector de expresión pET32-AS48

El vector de expresión pET32-AS48 se construyó ligando el inserto liberado previamente (gen AS-48) con el plásmido pET32 P +D+F utilizando una T4 DNA Ligasa de la compañía BioLabs Inc®; se realizó la mezcla de ligación guardando la relación plásmido:inserto de 1:3 de acuerdo con la Tabla 3, y se incubó a 28 °C durante 2 h y posteriormente a 4 °C durante 24 h, obteniendo así la ligación pET32-AS48.

5.4.4 Transformación de *E. coli* TOP10 con la ligación pET32-AS48

Se transformaron células calcio competentes de *E. coli* TOP10 utilizando la técnica de choque térmico descrita previamente. Se utilizaron 3 µL de la ligación pET32-AS48 obtenida en la sección previa. Las células se plaquearon en medio LB adicionado con Ampicilina a 100 mg/L y se cultivaron a 37 °C durante 24 h.

Al tener colonias creciendo en medio selectivo se realizó un cultivo líquido de las mismas manteniendo la presión selectiva. Posteriormente se extrajo ADN plasmídico utilizando el kit de purificación Wizard® de Promega de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se confirmó la integridad del ADN obtenido mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (100 V durante 20 min), y posteriormente fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

5.4.5 PCR para confirmar transformación

Con el ADN obtenido en la sección anterior se realizó una PCR con la finalidad de confirmar la presencia del gen que codifica para la Enterocina AS-48 en la construcción pET32-AS48. Las mezclas de reacción se realizaron de acuerdo a la tabla 4 y las condiciones del termociclador fueron las descritas en la tabla 5.

El producto de reacción obtenido se corrió en un gel de agarosa al 2 % a 70 V durante 45 min, y posteriormente se observó en un transiluminador.

5.4.6 PCR de orientación para la construcción pET32-AS48

Como se comentó previamente, el gen que codifica para la Enterocina AS-48 está flanqueado por sitios *Nco*I; debido a esto, es necesario asegurar que se encuentre clonado en el sentido adecuado (5'-3'); para esto se realizó una PCR de acuerdo a la tabla 4 sustituyendo el oligonucleótido Forward-AS48 por el Forward-pET. Las condiciones de la PCR fueron igual a las indicadas en la tabla 5, excepto por la temperatura de alineación, que fue de 57 °C.

Los productos obtenidos se analizaron en un gel de agarosa al 2 %, corriendo a 70 V durante 30 min, y posteriormente se observó en un transiluminador para identificar la banda esperada.

Se identificaron las clonas que contaban con el gen que codifica para la Enterocina AS-48 y que se encontraban en sentido y se enviaron para su secuenciación. Finalmente, las clonas positivas, se almacenaron en glicerol 50 % a -60 °C hasta su uso.

5.5 Expresión del péptido antimicrobiano Enterocina AS-48 en *E. coli* BL21-pLysS

5.5.1 Inducción con IPTG

La expresión de la Enterocina AS-48 transgénica está bajo el control del promotor T7, este sistema de expresión es de los más utilizados debido a que la RNA polimerasa T7 es 5 veces más rápida que la RNA polimerasa de *E. coli* (Kay Terpe, 2006).

Debido a esto, es necesario el uso de un inductor, que para este estudio fue el IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido), éste es un análogo no hidrolizable de la lactosa, pero que puede

unirse a la proteína represora y de esta manera, permitir que la polimerasa inicie la transcripción de las proteínas bajo el control del promotor T7.

Se ha observado que factores como la concentración de IPTG, la temperatura de incubación y el tiempo posterior a la inducción influyen en la expresión de proteínas transgénicas en *E. coli* (Larentis et al., 2011), por lo cual, para evaluar si las variaciones en estos factores afectaban la expresión de la Enterocina AS-48, se realizó un diseño factorial en dos temperaturas de incubación (28 °C y 37 °C). En cada diseño se probaron cuatro concentraciones de IPTG y tres tiempos de muestreo posteriores a la inducción, además, al no tener referencia de dónde se expresaría la Enterocina AS-48, fueron evaluadas las fracciones proteicas soluble e insoluble, quedando los factores evaluados como sigue:

Factor	Niveles
Concentración de IPTG (mM)	0, 0.1, 0.5 y 1
Tiempo post-inducción (h)	4, 6 y 12
Fracciones proteicas	Soluble e insoluble

La combinación de los factores resultó en un total de 24 experimentos para cada temperatura, cuyos resultados fueron analizados con el software Minitab® 19.2020.1. La metodología para la inducción del cultivo se realizó conforme a lo descrito por Larentis y colaboradores (2011) con algunas modificaciones.

Se partió de un pre-inóculo crecido en 10 mL de medio LB + 100 mg/L de ampicilina, este cultivo se creció en agitación (150 rpm) a 37 °C toda la noche; de este pre-inóculo se tomó una alícuota para ajustar a una DO de 0.1 (600 nm) un matraz de 250 mL con 50 mL de medio LB manteniendo la presión selectiva y la agitación como en el paso previo; una vez que este matraz alcanzó la DO de 0.6 (600 nm), el cultivo se dividió por mitades en matraces de 125 mL.

Posteriormente, cada uno de los matraces de 125 mL se incubó en agitación (150 rpm) a 28 °C o 37 °C y se les adicionó la concentración de IPTG correspondiente al experimento de ese día.

Se tomaron muestras de 1 mL a los horarios indicados previamente, las cuales fueron centrifugadas para coleccionar la biomasa (14000 rpm, 5 min, 4 °C). La pastilla resultante fue almacenada a -20 °C hasta la extracción de proteínas.

5.5.2 Extracción de proteínas

Debido a las características de hidrofobicidad de la Enterocina AS-48 (GRAVY 0.53), se pensó que su localización podía ser en cuerpos de inclusión, para lo cual fue necesario utilizar una metodología que permitiera solubilizar las proteínas presentes en ellos. De manera general, estas metodologías consisten en: I) Aislar los cuerpos de inclusión, II) Solubilizar los cuerpos de inclusión y III) Plegado de las proteínas solubilizadas, para finalmente poder purificarlas (Singh, Upadhyay, Upadhyay, Singh, & Panda, 2015).

Para la extracción de proteínas en cuerpos de inclusión, se partió de la pastilla de 2 mL de muestra colectada a cada una de las horas establecidas; la cual fue resuspendida en 100 µL de PBS y posteriormente sonicada (3 ciclos de 10 s a 30 % de amplitud por 10 s de descanso) en un baño de hielo; en seguida la muestra se centrifugó durante 15 min a 13000 rpm y 4 °C, el sobrenadante, que corresponde a las proteínas de la fracción soluble fue almacenado a 4 °C, y la pastilla fue resuspendida en 50 µL de PBS + 1 % de Triton X-100 mezclando suavemente durante 5 min, al término de los cuales se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones eliminando el sobrenadante. El lavado se repitió ahora sin Triton X-100 y al término se resuspendió en 50 µL de PBS. La suspensión resultante se dividió en cuatro alícuotas de 12.5 µL las cuales se centrifugaron durante 15 min a 13000 rpm y 4 °C. Posteriormente, con la finalidad de solubilizar

los cuerpos de inclusión, cada fracción fue lavada con una distinta concentración de urea en PBS, siendo las concentraciones probadas 0 M, 1 M, 2 M y 4 M. El lavado se repitió sin urea para posteriormente resuspender cada pastilla en 50 μ L de PBS + 8 M de urea; esta suspensión se incubó durante toda la noche a 4 °C. Finalmente, al término de este tiempo cada fracción fue centrifugada bajo las condiciones descritas previamente; el sobrenadante, que contiene los cuerpos de inclusión solubilizados se almacenó a 4 °C para su estudio posterior.

5.5.3 Cuantificación de proteínas totales

Para llevar a cabo la cuantificación de proteínas, se realizó una curva de calibración utilizando como estándar BSA de acuerdo al protocolo indicado por Bio-Rad. Se preparó un stock de BSA a 1 mg/mL, a partir del cual se realizaron las diluciones correspondientes para tener 500 μ L de cada uno de los siguientes patrones: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 μ g/mL de proteína. Posteriormente, en una microplaca de ELISA se añadieron por triplicado 100 μ L de reactivo de Bradford en 7 pozos (uno por cada concentración más un control sin BSA), seguidos de 100 μ L de cada una de los patrones. Cada pozo se homogenizó perfectamente y posteriormente la placa se dejó incubar durante 3 min a temperatura ambiente y protegiendo de la luz. Al término de este tiempo, se registró la absorbancia de la placa a 600 nm, y con las lecturas obtenidas se generó la curva estándar de BSA.

Se realizó una dilución 1:5 de los extractos proteicos obtenidos previamente, de los cuales se tomaron 5 μ L que se aforaron a 50 μ L con agua estéril en una microplaca de ELISA. Sobre cada uno de los pozos que contenían las muestras se añadieron 50 μ L de reactivo de Bradford y se homogenizó perfectamente. En seguida la placa se protegió de la luz e incubó a temperatura

ambiente durante 3 min, tras los cuales se leyó a 600 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado. Las lecturas obtenidas se interpolaron en la curva estándar obtenida previamente.

5.5.4 Identificación del péptido antimicrobiano Enterocina AS-48 recombinante

Con el uso de las proteínas transgénicas en aumento se hace presente la necesidad de contar con estrategias que permitan su identificación y obtención en gran escala con la mayor pureza posible. Los métodos más comunes son la adición de “etiquetas” peptídicas que no interfieran con el efecto de la proteína de interés; de estos métodos, la etiqueta de histidinas es la más utilizada (K. Terpe, 2003).

La identificación de la Enterocina AS-48 transgénica se realizó mediante la técnica ELISA (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima) aprovechando la etiqueta de Histidinas en el extremo 5' que fue añadida en la secuencia.

En primer lugar, se realizó la identificación del péptido antimicrobiano Enterocina AS-48 mediante su peso molecular (7149 Da), para lo cual se prepararon geles de tricina-SDS Page con urea y se utilizó un marcador de bajo peso molecular (Amersham™ Rainbow™ Marker-Low Range 3500-40000 Da). Los geles se prepararon de acuerdo a los siguientes volúmenes, lo cual es suficiente para dos geles de 1mm:

Tabla 4. Gel separador	
REACTIVOS	16 % Gel
AB-3	10 mL
Gel buffer (3X)	10 mL
Glicerol	3 g
Urea	10.8g
Volumen final de agua	30 mL
APS (10 %)	100 µL
TEMED	10 µL

Tabla 5. Gel concentrador	
REACTIVOS	4 % Gel
AB-3	1mL
Gel buffer (3X)	3 mL
Volumen final de agua	12 mL
APS (10 %)	90 μ L
TEMED	9 μ L

Una vez que los vidrios se colocaron en la base y se verificó que no hubiera fugas, se vertió el gel separador hasta 2 cm antes del borde de los vidrios y el volumen restante se llenó con isopropanol para facilitar la polimerización e impedir la entrada de aire al gel; se dejó polimerizar por 30 min, tras los cuales se retiró el isopropanol y su volumen fue sustituido por gel concentrador; al final se colocó el peine para formar los pozos y el gel se dejó polimerizar por otros 30 min, tras los cuales se retiró el peine y los vidrios se desmontaron de la base para colocarlos en la cámara de electroforesis.

Los extractos proteicos obtenidos previamente se cargaron en los pozos (1 μ g de muestra por pozo); y aparte se utilizaron controles de lisozima e insulina además de incluir el marcador de bajo peso molecular. Posteriormente se corrió la electroforesis aplicando 30 V iniciales y cuando el frente de carga pasó el gel concentrador, se aumentó a 200 V hasta el final de la corrida.

Una vez realizada la electroforesis de proteínas, los geles fueron teñidos con la técnica de tinción rápida con azul de Coomassie (Tabla 6) adaptada de Wong et al (2000), la cual consistió en colocar el gel en un recipiente apto para microondas y cubrirlo con el reactivo A, en seguida se llevó al microondas hasta ebullición y posteriormente se enjuagó con agua destilada; este procedimiento se repitió con los reactivos B, C y D. Finalmente, se vertió nuevamente reactivo D

y se dejó toda la noche para desteñir por completo el gel. Al día siguiente, se buscó en el gel la banda correspondiente a la Enterocina AS-48.

Para el ensayo de ELISA, se utilizaron microplacas de 96 pozos. Se colocó en cada uno 50 μ L de buffer de carbonatos (35 mM NaHCO_3 + 14 mM Na_2CO_3) y posteriormente se añadieron por triplicado 50 μ L de agua estéril (blanco) o 1 μ g de cada fracción de las proteínas previamente cuantificadas. Tras homogeneizar el pozo, se realizaron tres diluciones seriadas tomando 50 μ L del primer pozo y pasándolos al siguiente, los últimos 50 μ L se descartaron. Posteriormente, la placa se cubrió con papel aluminio y se incubó durante 24 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, la placa se lavó tres veces con 200 μ L de TBS-T (20 mM Tris + 0.15 M NaCl +0.05 % Tween 20) y posteriormente se bloquearon los sitios libres utilizando leche descremada al 6 % disuelta en TBS (20 mM Tris + 0.15 M NaCl) durante 5 h a temperatura ambiente. La placa se lavó nuevamente tres veces con 200 μ L de TBS-T, y posteriormente, se añadió el anticuerpo primario (Anti-His) a una dilución 1:2000 disuelto en TBS más leche 1 %; se incubó durante 2 h a 37 °C, transcurrido este tiempo, la placa se lavó como anteriormente se describió y en seguida, se añadió el anticuerpo secundario ligado a peroxidasa a una dilución 1:5000; la dilución se preparó en TBS más leche al 1 %. La placa se dejó incubar por 2 h a temperatura ambiente. Al término de este paso, la placa se lavó nuevamente 3 veces con 250 μ L TBS-T. Finalmente, se añadió a cada pozo 50 μ L del sustrato ABTS (Ácido 2,2-azino-bis 3-etilbenztiazolina-6-sulfónico) disuelto en buffer de fosfatasa recién preparado (0.1 M NaHCO_3 + 1 mM MgCl_2 pH 9.8) a una concentración de 1 mg/mL, la placa se dejó reposar hasta observar el cambio de coloración, en ese momento se registraron las lecturas de absorbancia a 450 nm.

6.1.2 Diseño de oligonucleótidos específicos para amplificación del gen Enterocina AS-48

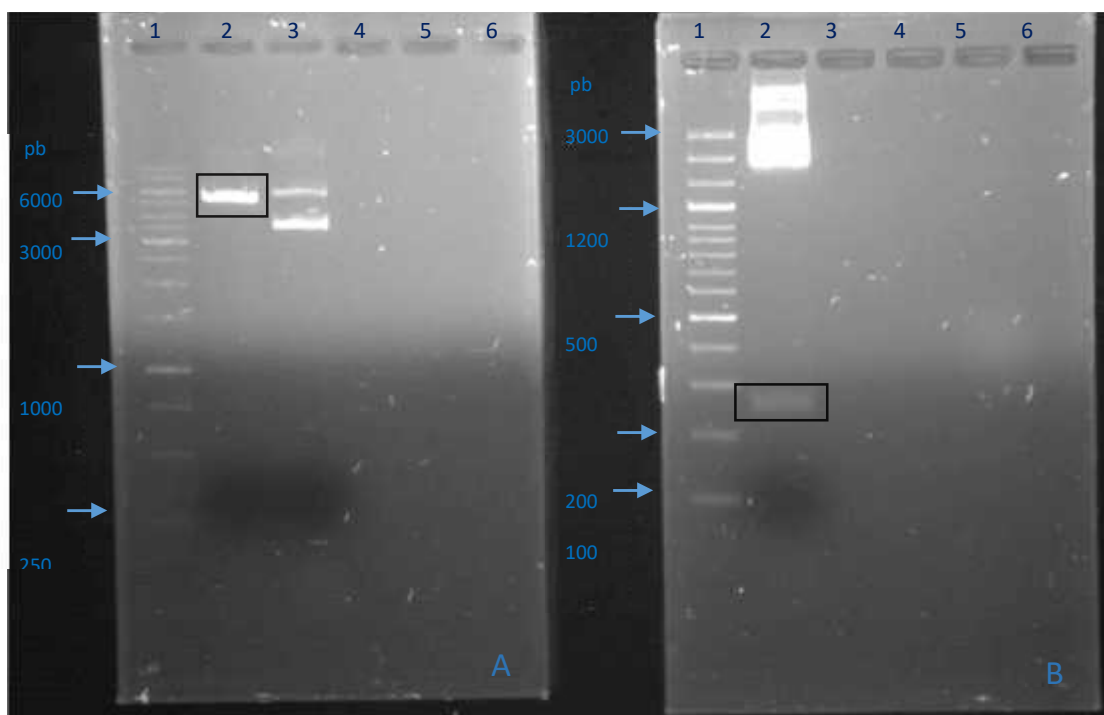
Con la finalidad de poder verificar la ligación del transgén a los vectores p463 y pET32; se diseñaron un par de oligonucleótidos específicos cuyas características están descritas a continuación:

Tabla 7. Oligonucleótidos específicos para Enterocina AS-48			
Secuencia		Tm (°C)	% GC
F:	5'-ATGGCTAAGGAGTTCGGGAT-3'	63.6	50
R:	5'-CTTGAGGTACGCCTTAATGC-3'	61.2	50

Con estos oligonucleótidos se espera obtener un amplicón de 168pb.

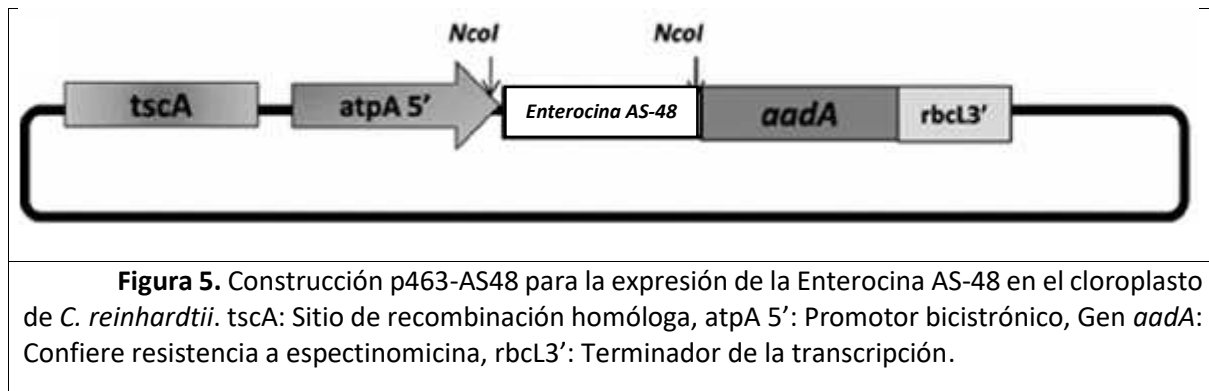
6.2 Construcción del vector de expresión p463-AS48

Se propagaron las líneas celulares que contenían el plásmido p463 y el vector pUC57 que porta el gen sintético de la Enterocina AS-48; posteriormente se realizaron extracciones del ADN plasmídico así como dos digestiones con la enzima *Nco*I; en primer lugar para linealizar el plásmido p463 y posteriormente para liberar el inserto (Figura 5); en seguida se desfosforiló el



plásmido y finalmente se ligó al inserto utilizando una T4 ADN ligasa obteniendo así la construcción p463-AS48, cuyo esquema se muestra en la Figura 6.

Figura 4. Digestión p463y pUC57-AS48 con *Nco*I. A) Carril 1: Marcador de 1 kb. Carril 2: En el recuadro negro se observa una banda de 5900 pb correspondiente al plásmido p463 linealizado. Carril 3: plásmido p463 sin digerir completamente; B) Carril 1: Marcador de 100 pb. Carril 2: En el recuadro negro se observa la banda de 260 pb correspondiente al inserto liberado de la Enterocina AS-48.



6.2.1 Transformación de *E. coli* TOP10 con la ligación p463-AS48

Posterior a obtener la ligación p463-AS48 se transformaron células calcio competentes de *E. coli* TOP10, obteniéndose dos colonias transformantes. Para confirmar la transformación se realizó una PCR con los oligonucleótidos específicos para el gen sintético y se corrió un gel de agarosa al 2 % (Figura 7, carriles 4 y 5) resultando ambas positivas para la amplificación de la Enterocina AS48. Posteriormente se confirmó la orientación del gen sustituyendo el oligonucleótido R-AS48 por el R-*aadA* (Figura 7, carril 6), se observa que solamente una de las dos colonias presentó la banda de aproximadamente 978 pb, lo que indica que el gen se encuentra clonado en sentido 5'-3'.

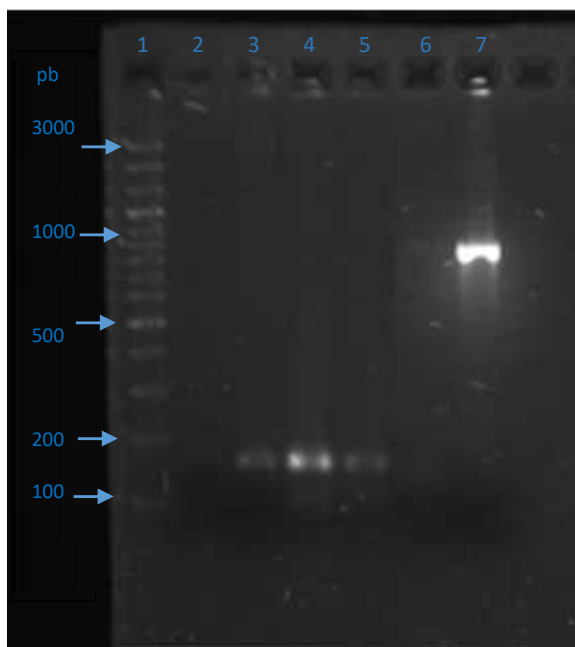


Figura 6. PCR para confirmar la transformación y orientación. Carril1: Marcador de 100 pb; Carriles 2-5: PCR para confirmar transformación; Carril 2: Control negativo, Carril 3: Control positivo, Carriles 4 y 5: Colonias transformadas crecidas en medio selectivo, Carriles 6 y 7: PCR de orientación, solo la colonia del carril 7 estaba en el sentido 5'-3'.

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

6.3.1 Bombardeo de *C. reinhardtii* con partículas de oro

El procedimiento de balística fue realizado con ayuda de la MC Karen Lizbeth Reyes Barrera del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del IPICYT; tras el cual, las cajas con los cultivos se mantuvieron en incubación a 25 °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad en el cuarto de cultivo del Laboratorio de Biotecnología Molecular de Células Vegetales. Tres días después del disparo con los proyectiles recubiertos, los cultivos se cambiaron a medio selectivo (TAP sólido + Espectinomicina 50 mg/L) y a partir de ahí se resembraron cada 15 días aumentando la presión selectiva hasta llegar a 100 mg/L de Espectinomicina.

Durante la etapa de resiembras se presentó contaminación por cocos Gram positivos, la cual fue tratada con Ampicilina (100 mg/L) y Cefotaxima (200 mg/L) manteniendo la presión

selectiva; los antibióticos extra se retiraron cuando el cultivo estuvo libre de contaminación bacteriana.

Cuando se cumplieron tres rondas de selección con Espectinomicina, se seleccionaron colonias y se inocularon en medio líquido TAP + Espectinomicina (100 mg/L) las cuales han crecido a una velocidad menor a las colonias sin transformar (WT), por lo que no se ha podido avanzar con su estudio hasta tener suficiente biomasa.

Las colonias WT inoculadas como control en medio selectivo TAP + Espectinomicina se tornaron amarillas (Figura 7).

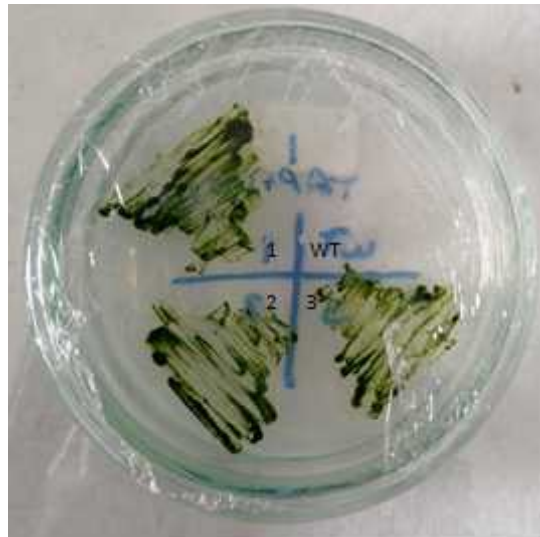


Figura 7. Medio TAP + 100 mg/L Espectinomicina con colonias transformantes y WT

Se muestran 3 colonias transformantes (1, 2 y 3) y se inoculó una sin transformar (WT) para confirmar resistencia al medio de selección de las primeras tres colonias.

6.4 Construcción del vector de expresión pET32-AS48

El plásmido pET-32 se propagó en medio selectivo, posteriormente se realizaron extracciones del ADN plasmídico, mismas que se sometieron a digestión con la enzima *Nco*I (Figura 8), el producto de la digestión se desfosforiló y ligó posteriormente con ayuda de una T4

ADN ligasa al inserto liberado previamente (Figura 4B), obteniendo la construcción pET32-AS48 como se esquematiza en la Figura 9.

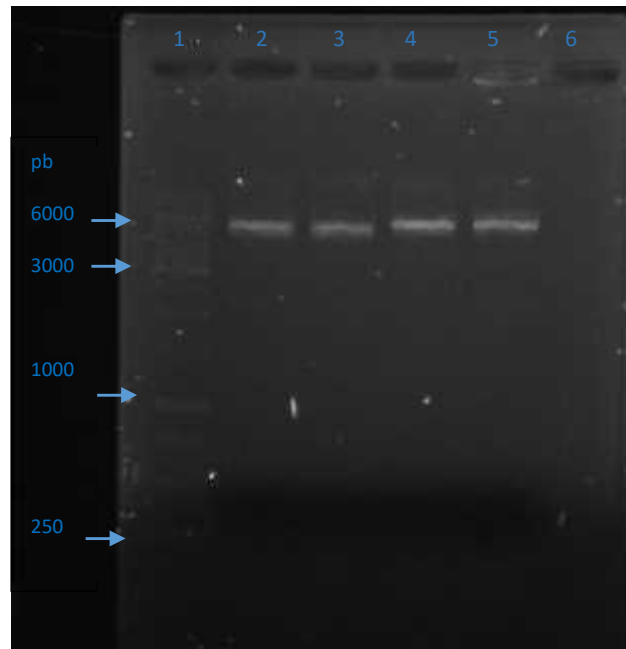
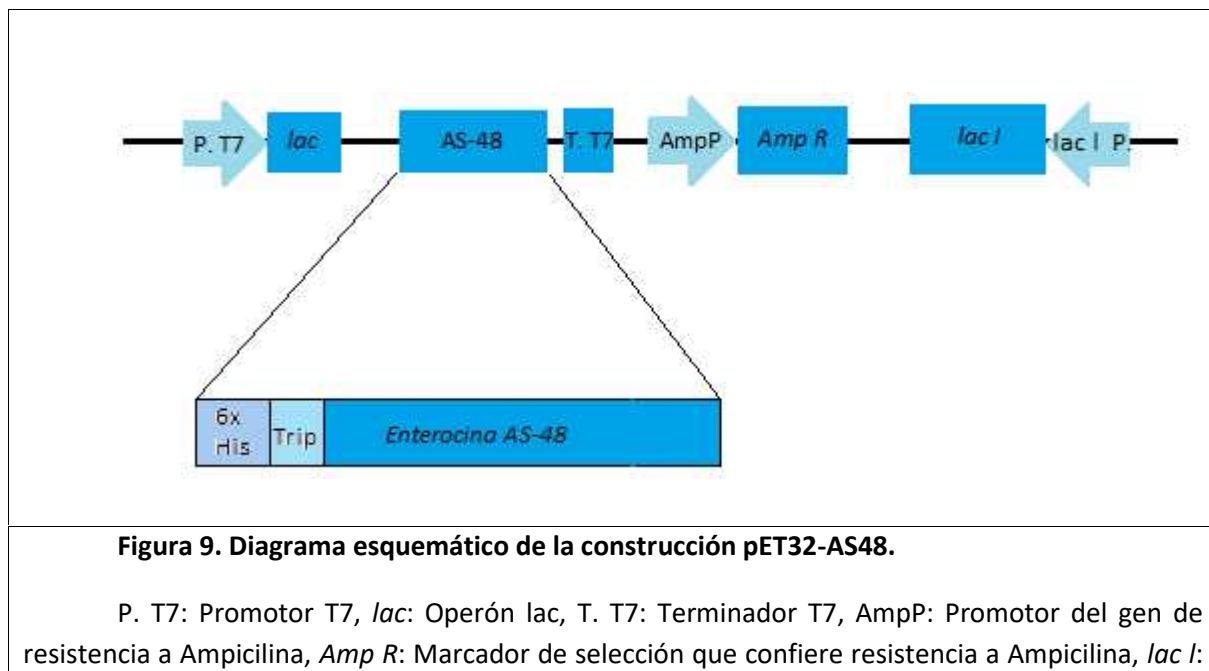


Figura 8. Digestión del pET32 con *NcoI*. Carril 1: Marcador de 1 kb, carriles 2-5 productos de digestión de pET32 con la enzima *NcoI*; se observa banda de 5900 pb.



Represor *lac*, *lac I* P.: Promotor del represor *lac I*, Enterocina AS-48: Gen sintético que codifica para el péptido antimicrobiano, 6x His: Etiqueta de Histidinas, Trip: Sitio de corte de Tripsina.

6.4.1 Transformación de *E. coli* TOP10 con la ligación pET32-AS48

La cepa de *E. coli* TOP10 se transformó mediante choque térmico con la ligación pET32-AS48 y cuando hubo crecimiento de colonias en medio LB sólido + Ampicilina (100 mg/L), se seleccionaron dos para crecerlas en medio líquido LB manteniendo la presión selectiva; posteriormente se extrajo el ADN plasmídico de dos de estos cultivos y se realizó una PCR con oligonucleótidos específicos para la Enterocina AS-48 con el fin de confirmar la transformación (Figura 9, carriles 2 al 5) en ambas colonias se obtuvo el amplicón de 168 pb correspondiente a la Enterocina AS-48. Posteriormente se realizó otra PCR para confirmar la orientación de la construcción donde se sustituyó el oligonucleótido F-AS48 por el F-pET. En la figura 10 (carriles 6 al 9) se aprecia que, de las dos colonias analizadas, sólo una de ellas se encontraba en sentido de 5'-3' por lo que su ADN plasmídico fue almacenado para los siguientes experimentos; en la figura se puede observar también que la temperatura de alineación (TA) de 57 °C resulta ser mejor para este par de oligonucleótidos, ya que fue la que presentó menos bandas inespecíficas.

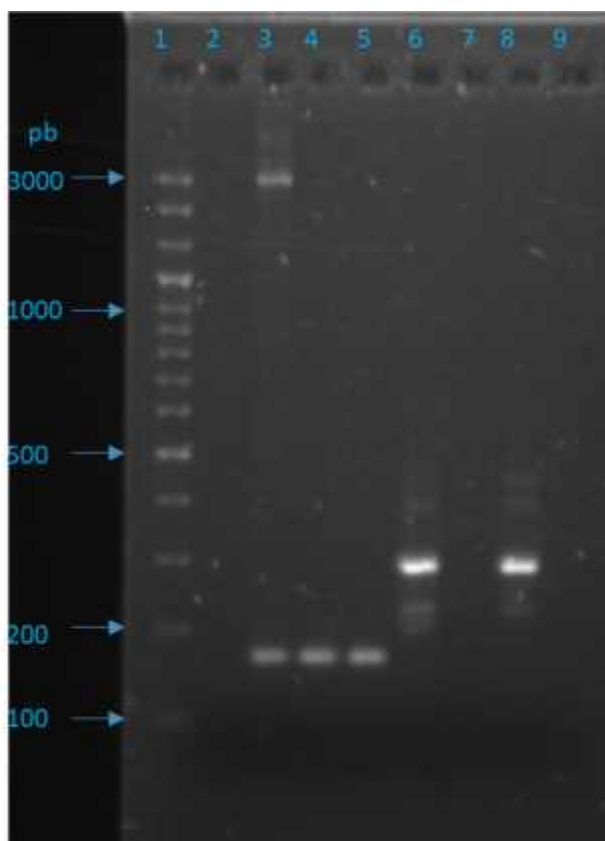
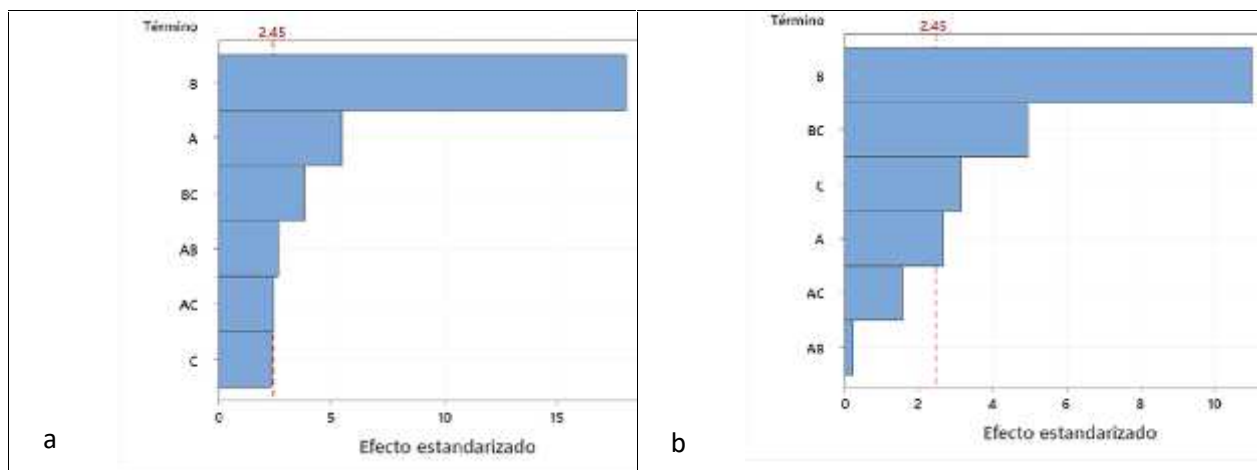


Figura 10. PCR para confirmar transformación y orientación de construcción pET32-AS48. Carril 1: Marcador de 100 pb, Carril 2: Control negativo con agua estéril, Carril 3: Control positivo ADN del plásmido pUC57-AS48, Carriles 4 y 5: Colonias transformantes positivas A y B respectivamente, Carril 6: PCR de orientación colonia “A” a TA 56 °C, Carril 7: PCR de orientación colonia “B” a TA 56 °C, Carril 8: PCR de orientación colonia “A” a TA 57 °C, Carril 9: PCR de orientación colonia “B” a TA 57 °C.

El ADN plasmídico de la colonia “A” se envió para su secuenciación al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) con la finalidad de confirmar su orientación y detectar posibles mutaciones puntuales en la secuencia. El resultado de la misma se comparó con la secuencia esperada y fue analizado con el programa Clustal Omega de EBI. En la figura 11 se aprecia que no existen diferencias entre la secuencia blanco (pET32-AS48) y los amplicones F y R obtenidos de la secuenciación.

y la interacción fracción-tiempo; para el diseño a 37 °C, además de estos factores, la fracción proteica también influyó en los resultados obtenidos. En cuanto a si su efecto fue positivo o negativo, en el caso del diseño a 28 °C (Figura 13), la concentración de IPTG tuvo un efecto positivo, al igual que la fracción insoluble, sin embargo, el tiempo post-inducción presenta un efecto negativo; para el diseño a 37 °C (Figura 14), la concentración de IPTG muestra un efecto negativo cuando se utiliza el nivel más alto, pero positivo en los dos niveles previos, de igual manera ocurre con el tiempo, donde el nivel más alto tiene un efecto negativo, y el intermedio positivo. En comparación con el diseño a 28 °C, a 37 °C, la fracción insoluble fue la que presentó el efecto negativo. Respecto a las interacciones dobles, en ambos diseños se observan los mejores resultados con la fracción insoluble a las 6 h, variando únicamente la concentración de IPTG; siendo la mejor 1 mM para el diseño a 28 °C y de 0.5 mM para el de 37 °C.



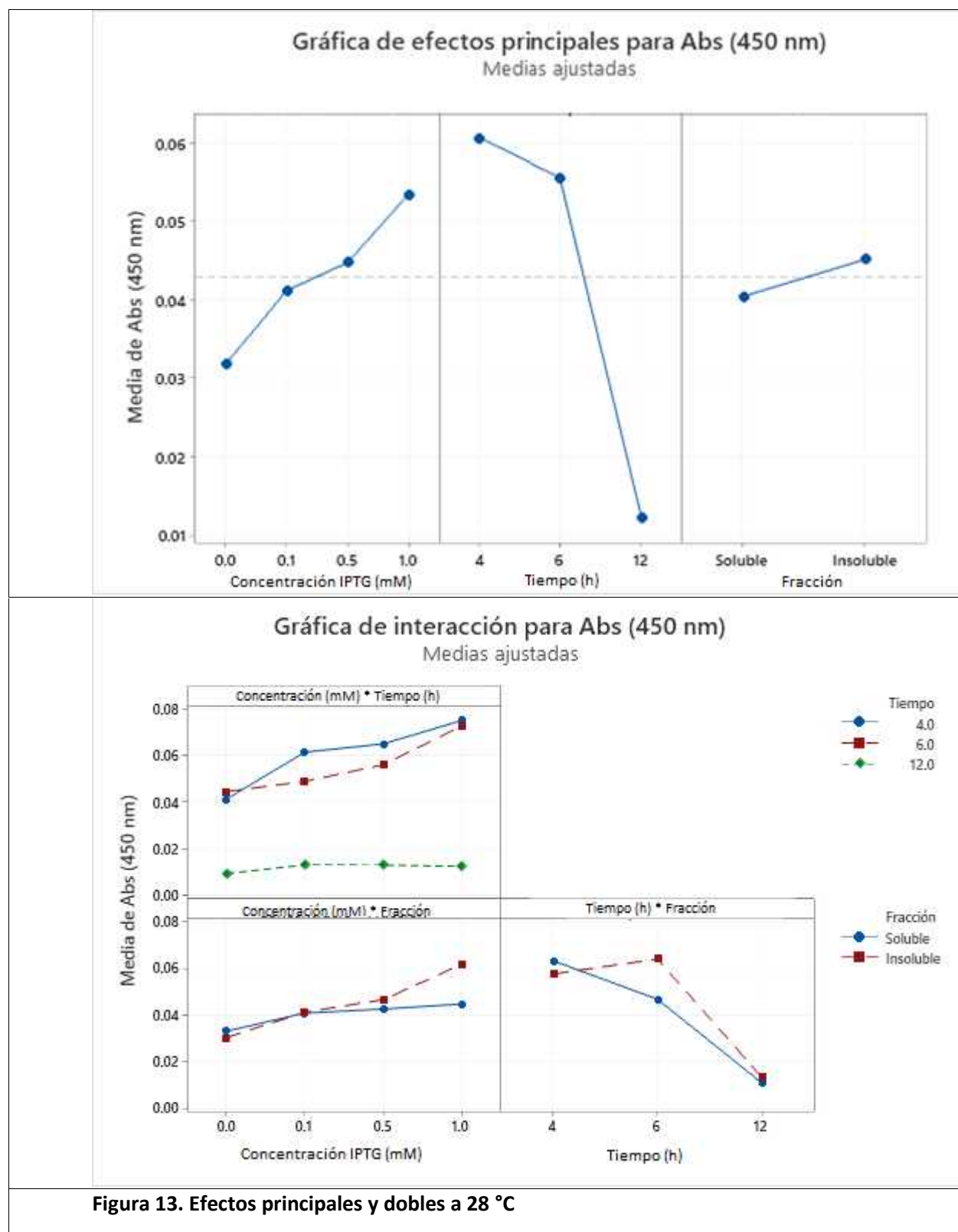


Figura 13. Efectos principales y dobles a 28 °C

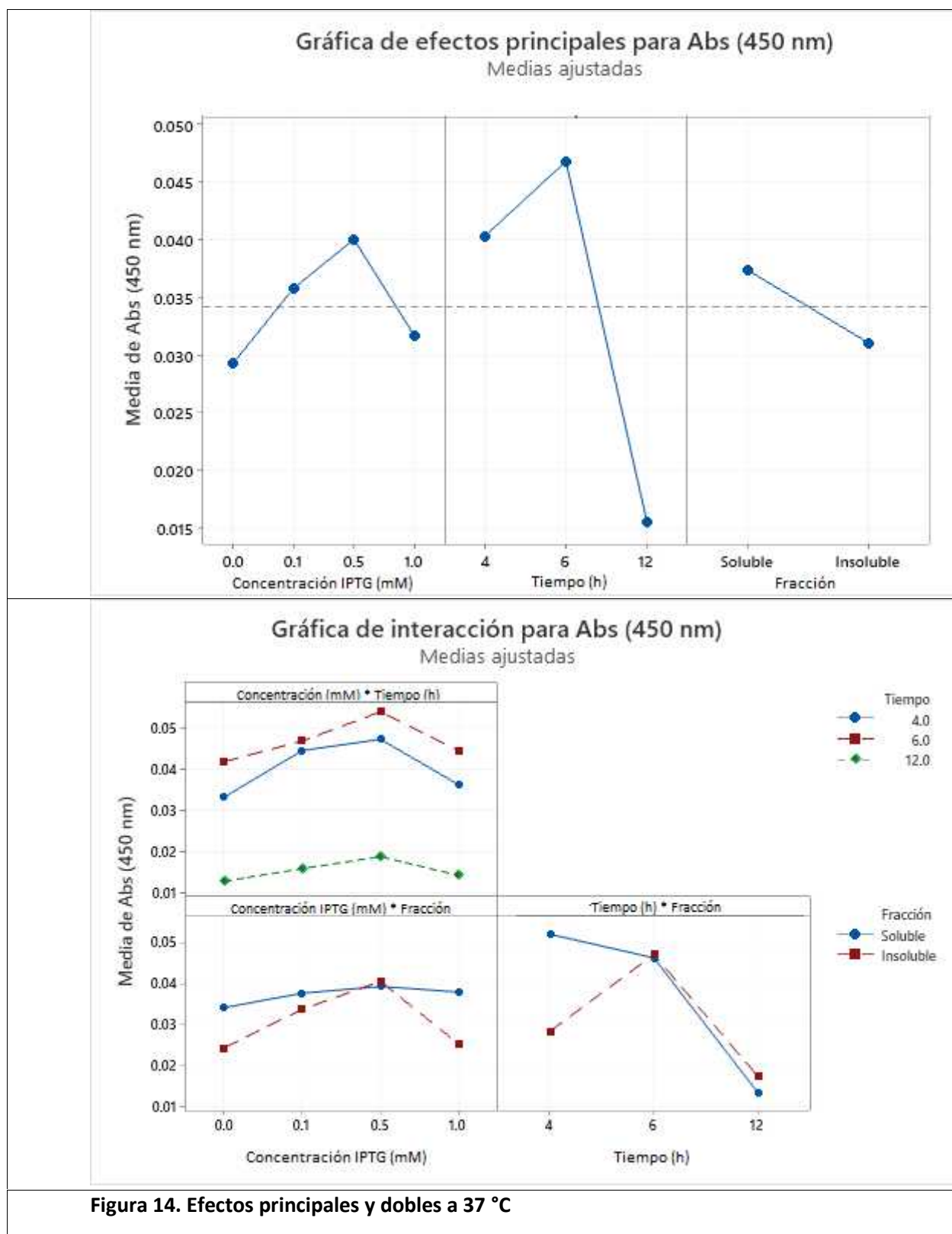


Figura 14. Efectos principales y dobles a 37 °C

La cuantificación de proteínas totales se llevó a cabo mediante el método de Bradford, realizando previamente una curva de calibración con BSA como estándar (Figura 15). Las lecturas obtenidas se interpolaron en la curva estándar para conocer sus concentraciones.

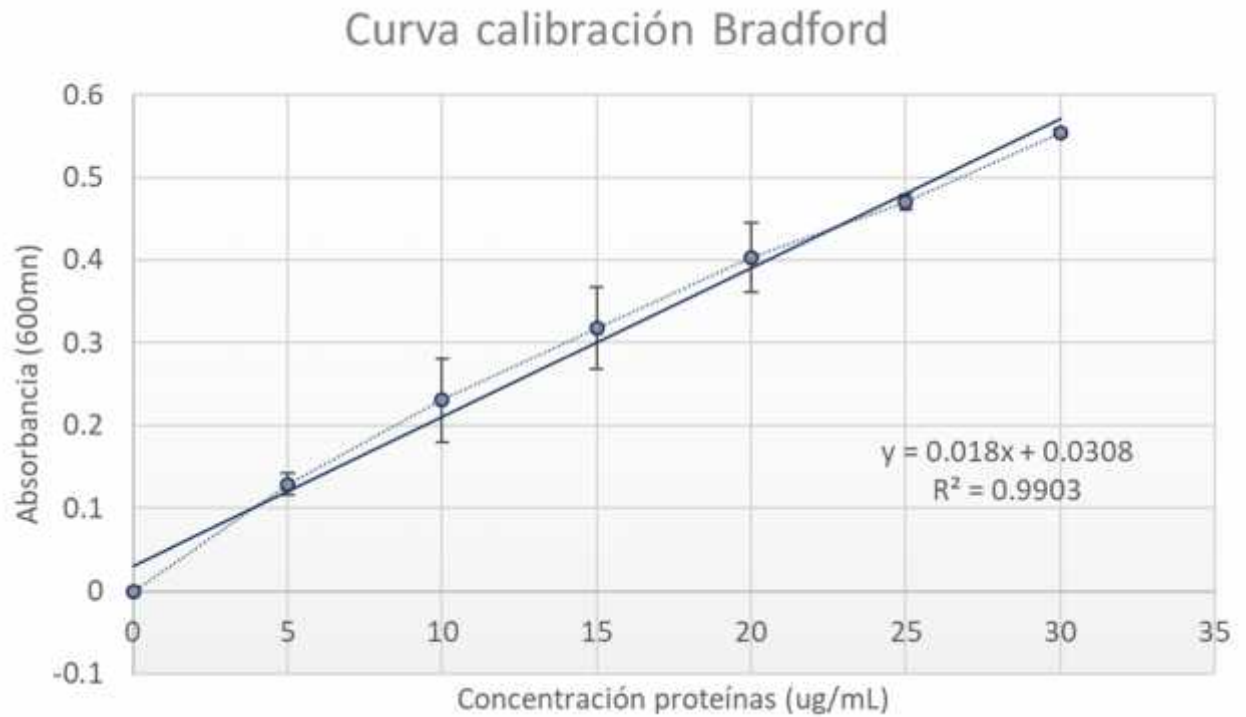
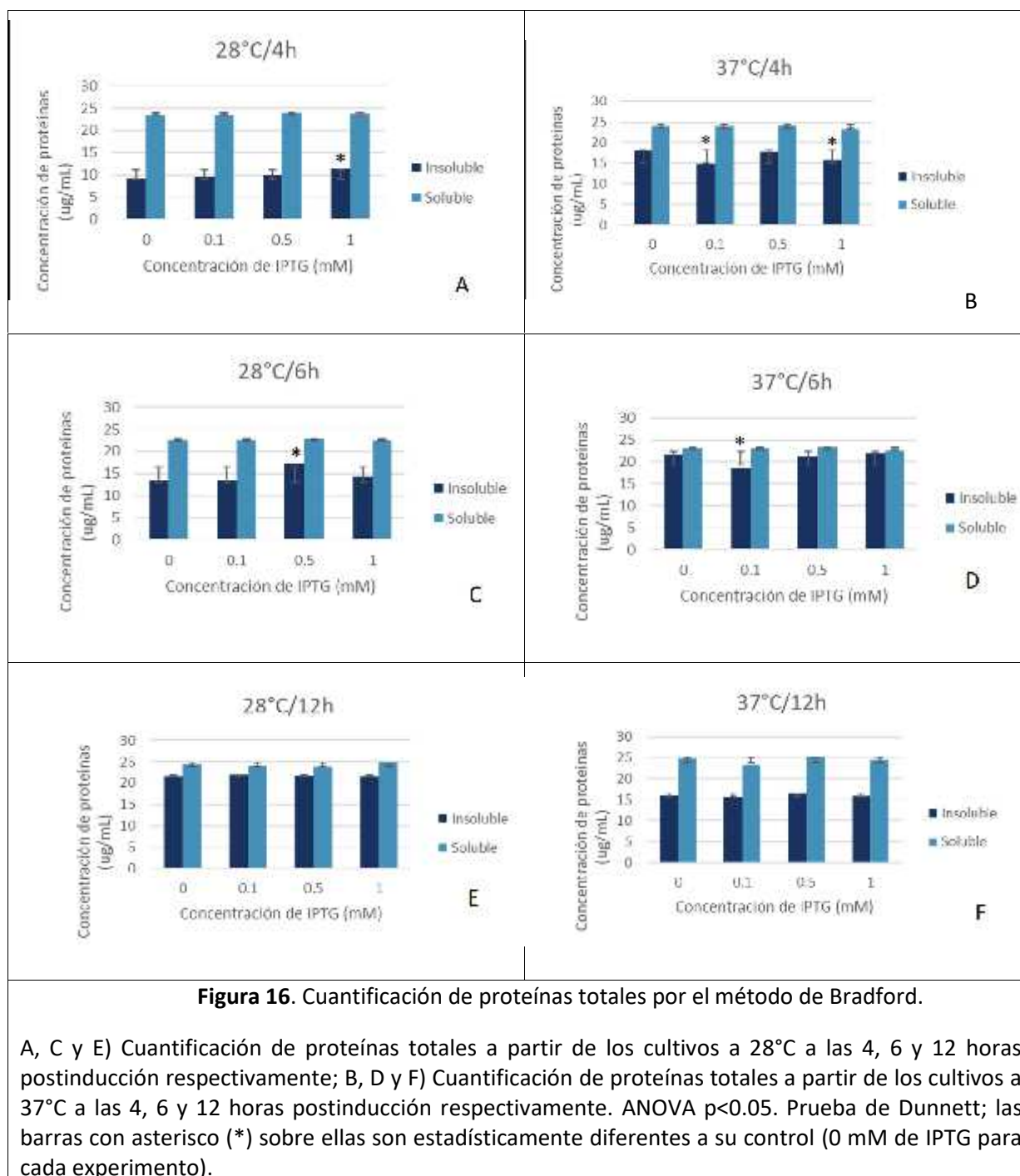


Figura 15. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas por el método Bradford

Las fracciones solubles de las cuantificaciones de proteína total no presentaron diferencia significativa respecto a su control (Figura 16), sin embargo, en las fracciones insolubles si hubo lecturas estadísticamente diferentes, siendo las mayores a las 4 h con 1 mM de IPTG en ambas temperaturas, así como a las 6 h con 0.5 y 0.1 mM de IPTG para 28 y 37°C respectivamente.



6.5.2 Identificación del péptido antimicrobiano Enterocina AS-48 recombinante

Para la identificación de la Enterocina AS-48 se siguieron dos metodologías; la primera fue la utilización de geles de tricina-SDS-Page con urea, donde se utilizó 1 µg de proteína total de cada

muestra y se cargaron en los geles. Al término de la corrida, los geles fueron teñidos para revelar las distintas bandas que componían la muestra. Se realizó una búsqueda de una banda diferencial de 7149 Da que indicaría la producción de la Enterocina AS-48; sin embargo, a esa altura los geles ya no contaban con buena resolución (Figura 17); por lo cual se buscaron alternativas para la identificación del péptido.

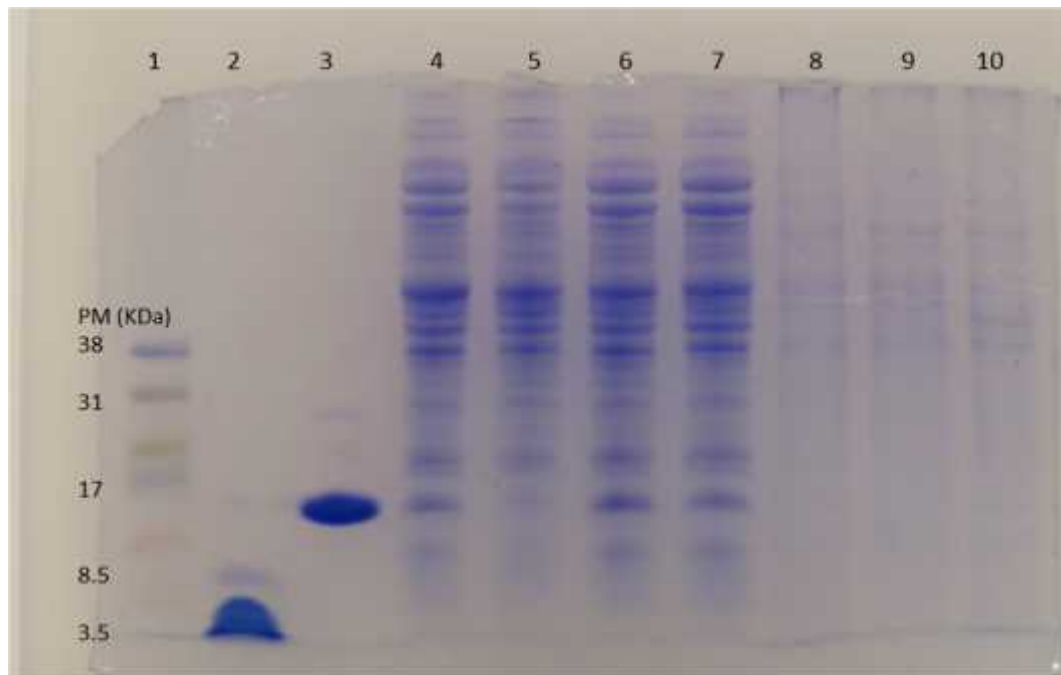


Figura 17. Gel de Tricina-SDS-page para la identificación de la Enterocina AS-48. Carril1: Marcador de pm (3500-40000 Da), Carril 2: Insulina 1 mg/mL, Carril 3: Lisozima 1 mg/mL, Carril 4: Control sin inducir, Carriles 5-7: Fracción soluble en orden ascendente según concentración de IPTG, Carriles 8-10: Fracción insoluble en orden ascendente según concentración de IPTG.

La segunda metodología utilizada fue la técnica de ELISA indirecta aprovechando la etiqueta de histidinas añadida al inicio del gen sintético, para lo cual se utilizó un anticuerpo primario contra histidinas y uno secundario contra este último. En la tabla 7 se muestran los valores de absorbancia a 450 nm para cada uno de los experimentos realizados; sin embargo, para fines ilustrativos, en la figura 18 se presentan las gráficas a las cuales se les restaron sus

respetivos controles sin inducir, de esta manera, se eliminaron las interferencias causadas por las proteínas propias de *E. coli* que contenían en su estructura histidina, obteniendo así la señal correspondiente únicamente a la etiqueta de histidinas.

Tabla 7. Lecturas de ELISA a 450 nm					
Experimento	Concentración IPTG (mM)	Tiempo post-inducción (h)	Fracción	Respuesta a 28 °C (Abs 450 nm)	Respuesta a 37 °C (Abs 450 nm)
1	0	4	Soluble	0.0499±0.0027	0.0489±0.0053
2	0.1	4	Soluble	0.0682±0.0197	0.0521±0.0131
3	0.5	4	Soluble	0.0671±0.0088	0.0529±0.0065
4	1	4	Soluble	0.0686±0.0024	0.0546±0.0037
5	0	6	Soluble	0.0404±0.0051	0.0424±0.0032
6	0.1	6	Soluble	0.043±0.0088	0.0470±0.0022
7	0.5	6	Soluble	0.0489±0.0061	0.0532±0.0077
8	1	6	Soluble	0.0553±0.0112	0.0428±0.0038
9	0	12	Soluble	0.0092±0.0015	0.0113±0.0013
10	0.1	12	Soluble	0.0117±0.0038	0.0141±0.0007
11	0.5	12	Soluble	0.0122±0.0031	0.0121±0.0032
12	1	12	Soluble	0.0107±0.0014	0.0166±0.0049
13	0	4	Insoluble	0.0326±0.0040	0.0175±0.0057
14	0.1	4	Insoluble	0.0546±0.0054	0.037±0.0018
15	0.5	4	Insoluble	0.0628±0.0008	0.0416±0.0098
16	1	4	Insoluble	0.0813±0.0057	0.0178±0.0034
17	0	6	Insoluble	0.0488±0.0013	0.0412±0.0048
18	0.1	6	Insoluble	0.0547±0.0069	0.0467±0.0020
19	0.5	6	Insoluble	0.0632±0.0046	0.0547±0.0039
20	1	6	Insoluble	0.0901±0.0040	0.0461±0.0043
21	0	12	Insoluble	0.0099±0.0004	0.0144±0.0005
22	0.1	12	Insoluble	0.0148±0.0006	0.0178±0.0047

23	0.5	12	Insoluble	0.0142±0.0001	0.0256±0.0033
24	1	12	Insoluble	0.0146±0.0045	0.0120±0.0010

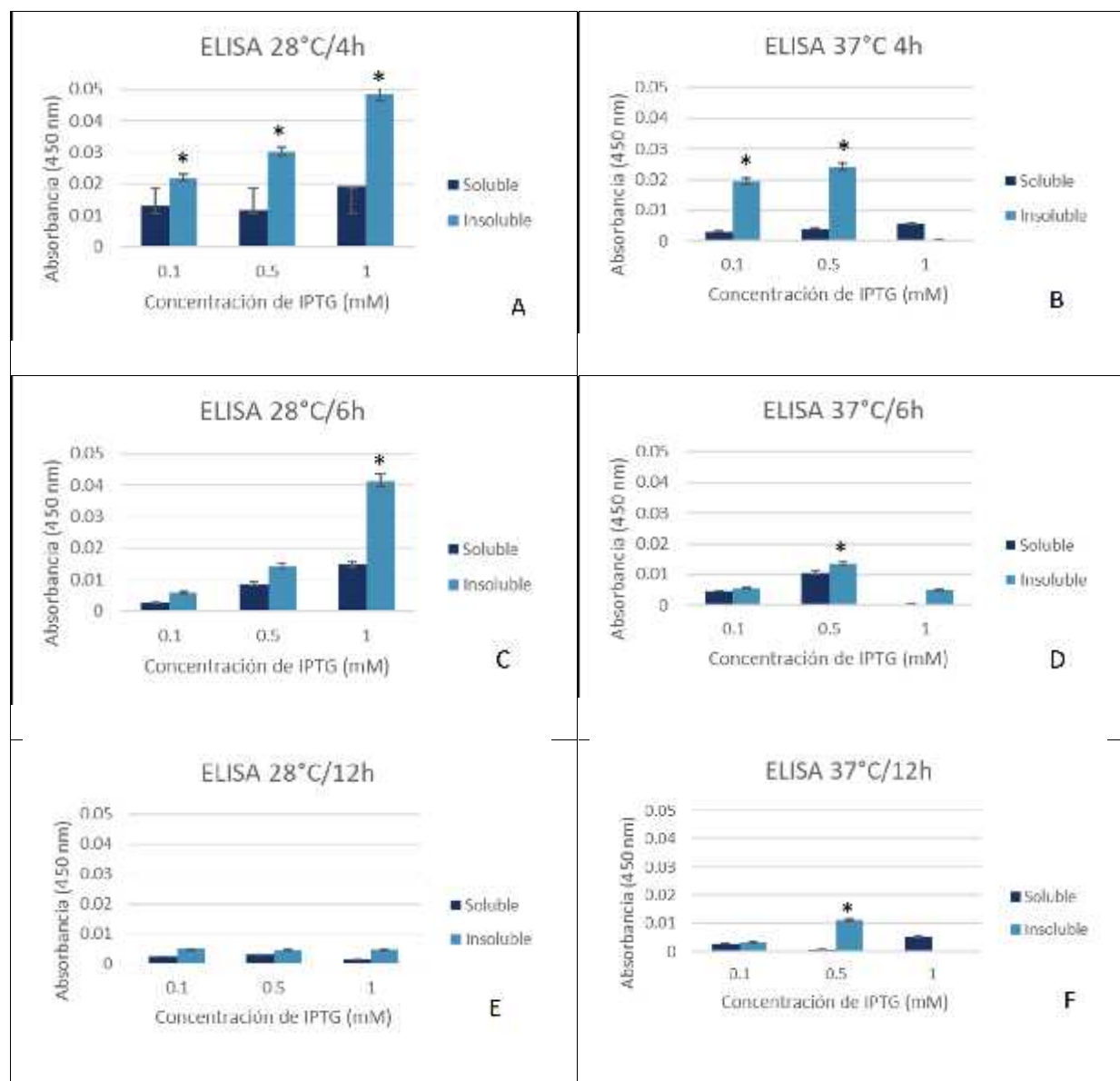


Figura 18. Identificación del péptido antimicrobiano Enterocina AS-48 mediante ELISA indirecta

A, C y E) Identificación Enterocina AS-48 a partir de los cultivos a 28 °C a las 4, 6 y 12 h postinducción respectivamente; B, D y F) Identificación Enterocina AS-48 a partir de los cultivos a 37 °C a las 4, 6 y 12

h postinducción respectivamente; ANOVA $p < 0.05$. Prueba de Dunnett; las barras con asterisco (*) sobre ellas son estadísticamente diferentes a su control (0 mM de IPTG para cada experimento).

Con el análisis de ELISA se aprecian las diferencias en la expresión de la Enterocina AS-48 según el factor estudiado. Así, observamos que, a 28 °C (figura 17 A, C y E), las lecturas de la fracción insoluble van de 0.005 hasta 0.05 Abs (450 nm); siendo la menor a 12 h con 0.5 mM de IPTG, y la mayor a las 4 h con una concentración de IPTG de 1 mM, mientras que a 37 °C (Figura 17 B, D y F) la señal obtenida abarca desde 0 hasta 0.025 Abs (450 nm); donde la señal más pequeña corresponde a las 12 h con una concentración de IPTG de 1 mM, y la mayor a las 4 h y 0.5 mM de IPTG.

7. Discusión

Las enfermedades causadas por patógenos alimenticios están dentro de los problemas de salud pública más serios y costosos; las cifras de la OMS indican que anualmente en todo el mundo 1 de cada 10 personas se enferma por consumir alimentos contaminados de las cuales casi medio millón de personas fallecen cada año; estas muertes son completamente evitables (Organización Panamericana de la Salud, 2019).

A pesar del control de calidad y las prácticas de higiene durante toda la cadena alimentaria, las enfermedades de origen alimenticio e intoxicaciones han incrementado desde inicios del milenio (García, Rodríguez, Rodríguez, & Martínez, 2010); ya que los alimentos pueden contaminarse de manera externa en cualquier punto desde su producción hasta que llega al consumidor; sin embargo, también se destaca que todo alimento cuenta con una microflora característica, que en muchos casos pueden producir metabolitos que degradan el alimento al crecer sin control (Choyam et al., 2019).

Las nuevas exigencias del mercado, así como la creciente demanda de alimentos mínimamente procesados requiere el desarrollo de nuevas estrategias de conservación en alimentos, dentro de las cuales se encuentra la llamada biopreservación (explora el potencial antimicrobiano de algunos microorganismos o sus metabolitos), que tiene capacidad de aumentar la vida de anaquel de los productos perecederos sin influir sobre sus propiedades organolépticas o nutricionales (García et al., 2010). Dentro de esta estrategia se aborda el uso de las bacteriocinas (bacteriocinas, lactocinas, enterocinas); los cuales son péptidos sintetizados por bacterias que tienen la capacidad de suprimir el crecimiento de algunas otras bacterias; debido a esto, son una estrategia prometedora en la conservación de alimentos (Choyam et al., 2019), ejemplo de ello es la Nisina; la cual ha sido ampliamente utilizada dentro de esta industria; sin embargo, las limitaciones respecto a su estrecho margen de pH al que es activa así como la baja estabilidad a altas temperaturas hacen necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para su aplicación en la industria alimenticia. (Garg et al., 2014).

La Enterocina AS-48 fue la primer bacteriocina circular caracterizada (Galvez, Gimenez-Gallego, Maqueda, & Valdivia, 1989), es producida por cepas clínicas y alimenticias de *Enterococcus faecalis* y su acción bacteriolítica ha sido probada contra una gran variedad de alimentos y contra diferentes patógenos; entre los que destacan bacterias Gram positivas como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*; en *Alicyclobacillus acidoterrestris* inhibe tanto la forma plantónica como las endoesporas. En el caso de las bacterias Gram negativas su efecto debe ser complementado con algún agente quelante o tratamiento térmico (Burgos et al., 2014; Choyam et al., 2019). Su potencial ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, el uso comercial está limitado debido a que sólo es posible obtenerla de la fuente original; una opción que vale la

pena explorar es la bioingeniería, técnica que en este caso puede ser utilizada para aumentar la producción de la Enterocina AS-48 en huéspedes heterólogos que posteriormente permitan su aplicación en la industria alimenticia (Choyam et al., 2019). Debido a que previamente los intentos por obtener la Enterocina AS-48 han sido infructuosos (Fernández et al., 2007) en el presente trabajo hemos sentado las bases para lograr su expresión transgénica y trasplastómica al desarrollar dos construcciones con las que será posible obtener la Enterocina AS-48.

El primero de ellos es la construcción pET32-AS48 que hemos clonado exitosamente en células calcio competentes de *E. coli* BL21 pLysS; los resultados obtenidos del ensayo de ELISA posteriores a la inducción con IPTG bajo distintas condiciones de temperatura, concentraciones de inductor y tiempo de inducción nos han permitido identificar el péptido transgénico en la fracción proteica insoluble, dentro de cuerpos de inclusión, lo cual no es extraño al ser una proteína transgénica (Choi, Keum, & Lee, 2006). Las condiciones más favorables para su obtención fueron 1 mM de IPTG a las 6 h de inducción para el ensayo a 28 °C y 0.5 mM de IPTG también a las 6 h de inducción para el ensayo a 37 °C.

En el ensayo a 28 °C se observó una relación directamente proporcional entre la concentración del inductor y la cantidad de péptido expresado en las primeras 6 h del ensayo; sin embargo, a las 12 h de inducción, la relación no se cumple, pues las lecturas fueron significativamente menores; esto puede deberse principalmente al efecto del IPTG sobre las células, ya que se ha demostrado que puede ejercer un efecto dañino sobre las mismas en tiempos prolongados de exposición (Choi et al., 2006; Larentis et al., 2014), por lo cual es recomendable la inducción en cultivos con densidad celular elevada ($>2 \text{ Ab}_{S600\text{nm}}$) así como

disminuir los tiempos de inducción para evitar la pérdida de células (Larentis et al., 2014; Smith & Corcoran, 1994).

En el caso del ensayo a 37 °C, los rendimientos fueron considerablemente más bajos que para el caso anterior; a pesar de que el nivel de acumulación de una proteína de interés suele estar relacionado con la cantidad de proteína total (Lee, Rhee, Kang, & Kim, 2006), sin embargo se han reportado casos como el nuestro, donde a pesar de obtener una alta concentración de proteína total, el péptido de interés resulta ser bajo (Nikerel, Toksoy, Kirdar, & Yildirim, 2005); una explicación puede ser que como sugiere Leites (2011), a pesar del uso de cepas deficientes en proteasas, se pueden degradar las proteínas recombinantes por el efecto de proteinasas intracelulares, esto se observó también en otro estudio donde la expresión de la proteína heteróloga fue inducida por lactosa e IPTG, siendo degradada cuando el inductor usado era IPTG (Kilikian, Suárez, Liria, & Gombert, 2000).

En segundo lugar, se desarrolló la construcción p463-AS48, la cual fue introducida al cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* mediante la técnica de biobalística; tras varias rondas de selección con Espectinomycin, las colonias transformadas se identificaron por continuar creciendo en el medio selectivo (Campos-Quevedo et al., 2013), a diferencia de las células WT que no presentaron crecimiento y se tornaron amarillentas, como lo describe Carrizalez-López et al., (2018); sin embargo, el parámetro de crecimiento en medio selectivo no confirma la presencia del gen en el cloroplasto, por lo que posteriormente se realizará un análisis de PCR para confirmarlo, con el cual se espera confirmar que el cloroplasto de *C. reinhardtii* es un sistema de expresión efectivo para diversas proteínas (Campos-Quevedo et al., 2013; Griesbeck et al., 2006).

8. Conclusiones

- Es posible diseñar un gen sintético que codifique para la Enterocina AS-48 con los codones optimizados para su expresión en el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Se logró clonar el gen sintético Enterocina AS-48 en los plásmidos p463 y pET32, para dar lugar a las construcciones p463-AS48 y pET32-AS48 respectivamente. Con la primera se realizó la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* 137(+) y la segunda fue utilizada para transformar *E. coli* BL21-pLysS.
- Con la transformación de *E. coli* BL21-pLysS se logró obtener una línea productora de Enterocina AS-48 transgénica.
- La transformación por balística de *C. reinhardtii* 137(+) con la construcción p463-AS48 permitió la obtención de líneas transplastómicas capaces de crecer en medio selectivo (TAP sólido + 100 mg/L de espectinomicina).

9. Referencias

- Abengózar, M. Á., Cebrián, R., Saugar, J. M., Gárate, T., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., ... Rivas, L. (2017). Enterocin AS-48 as evidence for the use of bacteriocins as new leishmanicidal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4), 1–13. <https://doi.org/10.1128/AAC.02288-16>
- Beristain-Bauza, S. ., Palou, E., & Lopez-Malo, A. (2012). Bacteriocinas : antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2(6), 64–78.
- Burgos, M. J. G., Pulido, R. P., Aguayo, M. del C. L., Gálvez, A., & Lucas, R. (2014). The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: Isolation, mode of action, and possible food applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22706–22727. <https://doi.org/10.3390/ijms151222706>
- Campos-Quevedo, N., Rosales-Mendoza, S., Paz-Maldonado, L. M. T., Martínez-Salgado, L., Guevara-Arauz, J. C., & Soria-Guerra, R. E. (2013). Production of milk-derived bioactive peptides as precursor chimeric proteins in chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 113(2), 217–225. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0261-3>
- Carrizalez-López, C., González-Ortega, O., Ochoa-Méndez, C. E., Galván-Moreno, F. U., Rosales-Mendoza, S., Monreal-Escalante, E., ... Soria-Guerra, R. E. (2018). Expression of multiple antihypertensive peptides as a fusion protein in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*, 30(3), 1701–1709. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1339-4>
- Cebrián, R., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Albert, A., Maqueda, M., & Sánchez-Barrena, M. J. (2015). The bacteriocin AS-48 requires dimer dissociation followed by hydrophobic interactions with the membrane for antibacterial activity. *Journal of Structural Biology*, 190(2), 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.03.006>
- Chen, R. (2012). Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1102–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.013>
- Choi, J. H., Keum, K. C., & Lee, S. Y. (2006). Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*, 61(3), 876–885. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.03.031>
- Choyam, S., Srivastava, A. K., Shin, J., Kammara, R., Degraeve, P., Bernard, C., & Lyon, U. (2019). Ocins for Food Safety. *Frontiers in Microbiology*, 10(August). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01736>
- Clare, D. A., Valentine, V. W., Catignani, G. L., & Swaisgood, H. E. (2001). Molecular design, expression, and affinity immobilization of a trypsin-streptavidin fusion protein. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(6), 483–491. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00361-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00361-6)
- Fernández, M., Martínez-Bueno, M., Martín, M. C., Valdivia, E., & Maqueda, M. (2007). Heterologous expression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5), 1350–1361. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03194.x>
- Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Maqueda, M., & Valdivia, E. (1989). Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus (Enterococcus) faecalis*

- subsp. liquefaciens S-48. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(4), 437–441. <https://doi.org/10.1128/AAC.33.4.437>
- Galvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Quesada, A., & Montoya, E. (1986). Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 32(10), 765–771. <https://doi.org/10.1139/m86-141>
- García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A., & Martínez, B. (2010). Food biopreservation : promising strategies using bacteriocins , bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 373–382. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.010>
- Garg, N., Oman, T. J., Wang, T. A., Gonzalo, C. V. G. De, Walker, S., & Donk, W. A. Van Der. (2014). Mode of action and structure – activity relationship studies of geobacillin I. *The Journal of Antibiotics*, 67(1), 133–136. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.112>
- Griesbeck, C., Kobl, I., & Heitzer, M. (2006). Chlamydomonas reinhardtii: A protein expression system for pharmaceutical and biotechnological proteins. *Molecular Biotechnology*, 34(2), 213–223. <https://doi.org/10.1385/MB:34:2:213>
- Heng, N. C. K., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Tagg, J. R., & Jack, R. W. (2007). The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In M. A. Riley & M. A. Chavan (Eds.), *Bacteriocins* (p. 81). https://doi.org/10.1007/978-3-540-36604-1_4
- Kanamoto, H., Yamashita, A., Asao, H., Okumura, S., Takase, H., Hattori, M., ... Tomizawa, K. I. (2006). Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic Research*, 15(2), 205–217. <https://doi.org/10.1007/s11248-005-3997-2>
- Kilikian, B. V., Suárez, I. D., Liria, C. W., & Gombert, A. K. (2000). Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. *Process Biochemistry*, 35, 1019–1025.
- Korn, B., & Langlais, C. (2008). Recombinant Protein Production in Mammalian Cell Culture. In A. Dröge (Ed.), *Encyclopedia of Molecular Pharmacology* (3rd ed., pp. 1616–1620). Berlin. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-38918-7>
- Langlais, C., & Korn, B. (2008). Recombinant Protein Expression in Bacteria. In O. S. & R. W. (Eds.), *Encyclopedia of Molecular Pharmacology* (pp. 1609–1616). <https://doi.org/10.1081/e-epcs-120005601>
- Larentis, A. L., Argondizzo, A. P. C., Esteves, G. D. S., Jessouron, E., Galler, R., & Medeiros, M. A. (2011). Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage. *Protein Expression and Purification*, 78(1), 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.02.013>
- Larentis, A. L., Fabiana, J., Quintal, M., Esteves, S., Vareschini, D. T., Vicente, F., ... Medeiros, M. A. (2014). Evaluation of pre-induction temperature , cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. *BMC Research Notes*, 7(671), 1–13. <https://doi.org/doi:10.1186/1756-0500-7-671>
- Lee, K. M., Rhee, C. H., Kang, C. K., & Kim, J. H. (2006). Sequential and simultaneous statistical optimization by dynamic design of experiment for peptide overexpression in recombinant *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 135(1), 59–80. <https://doi.org/10.1385/abab:135:1:59>
- Mayfield, S. P., Manuell, A. L., Chen, S., Wu, J., Tran, M., Siefker, D., ... Marin-Navarro, J. (2007).

- Chlamydomonas reinhardtii chloroplasts as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.02.001>
- Nikerel, I. E., Toksoy, E., Kirdar, B., & Yildirim, R. (2005). Optimizing medium composition for TaqI endonuclease production by recombinant Escherichia coli cells using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 40, 1633–1639. <https://doi.org/doi:10.1016/j.procbio.2004.06.017>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2019). Inocuidad alimentaria. Retrieved from <http://www.fao.org/food-safety/es/>
- Organización Panamericana de la Salud. (2019). La inocuidad de los alimentos es responsabilidad de todos. Retrieved from https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15241:food-safety-is-everyone-s-business&Itemid=1926&lang=es
- Parachin, N. S., Mulder, K. C., Viana, A. A. B., Dias, S. C., & Franco, O. L. (2012). Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides*, 38(2), 446–456. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.020>
- Patiño Rodríguez, O. (2007). *Transformación de cloroplastos de lechuga con tres genes sintéticos de protegrinas con actividad antimicrobiana*. (Tesis de maestría). Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, México.
- Quezada Rivera, J. J. (2018). *Obtención de péptidos antimicrobianos recombinantes derivados de Moringa oleífera Lam. y Enterococcus sp.* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México.
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>
- Smith, D. B., & Corcoran, L. M. (1994). Expression and Purification of Glutathione- S -Transferase Fusion Proteins. In *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.08.004>
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(5), 523–533. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1158-6>
- Terpe, Kay. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 211–222. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465-8>
- Vieira Gomes, A., Souza Carmo, T., Silva Carvalho, L., Mendonça Bahia, F., & Parachin, N. (2018). Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. *Microorganisms*, 6(2), 38. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020038>
- World Health Organization. (2019). Aditivos alimentarios. Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-additives>