



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias Químicas

**“Evaluación de la funcionalidad de un péptido
antimicrobiano producido en microalgas”**

Tesis que para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencias Químicas

Presenta:

Ponce Alonso Julieta

Director de
Tesis:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

FECHA: (DICIEMBRE 2025)



REPOSITORIO INSTITUCIONAL



UASLP-Sistema de Bibliotecas
Repositorio Institucional Tesis digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Evaluación de la funcionalidad de un péptido antimicrobiano producido en microalgas © 2025 por Ponce Alonso Julieta se distribuye bajo una licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de Células Vegetales, de la unidad de Biotecnología de Plantas en la Facultad de Ciencias Químicas de Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en el periodo comprendido entre enero 2020 y enero 2024 bajo la dirección de la Dra. Ruth Elena Soria Guerra.

El programa de Doctorado en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del CONAHCYT, registro 00520. Número de la beca otorgada por CONAHCYT: 762895. Número de CVU 863042.

Los datos del trabajo titulado *Evaluación de la funcionalidad de un péptido antimicrobiano producido en microalgas* se encuentran bajo el resguardo de la Facultad de Ciencias Químicas y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

Centro de Investigación y Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Químicas

Av. Manuel Nava # 6, Zona Universitaria, C.P. 78210

San Luis Potosí, S.L.P

INSCRIPCIÓN DEL TEMA DE TESIS

San Luis Potosí, 23 de Marzo del 2020

Dr. Antonio Montes Rojas
Coordinador Académico del Posgrado en Ciencias Químicas
Presente

Por este conducto solicito a usted se lleve a cabo la inscripción del tema de tesis de doctorado en Ciencias Químicas titulado: Evaluación de la funcionalidad del péptido antimicrobiano nisina producido en microalgas que llevará a cabo la alumna: Julieta Ponce Alonso

Acentamiento

Dra. Ruth Elena Sorla Guerra



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Posgrado en Ciencias Químicas

**“Evaluación de la funcionalidad de un péptido
antimicrobiano producido en microalgas”**

Tesis que para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencias Químicas

Presenta:

Ponce Alonso Julieta

SINODALES:

Presidente:

Secretario:

Vocal:

Vocal:

Vocal:

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

FECHA: (DICIEMBRE, 2025)

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO

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

Dr. Fidel Martínez Gutiérrez: Asesor de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís: Asesor Externo. Adscrito al Departamento de Biología Molecular del IPICYT, S.L.P.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias Químicas
Programa de Doctorado

Formato D5

Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí SLP a diciembre/04/2025

En la ciudad de San Luis Potosí el día 04 del mes de diciembre del año 2025. El que suscribe Julieta Ponce Alonso Alumno(a) del programa de posgrado Doctorado en Ciencias Químicas adscrito a Facultad de Ciencias Químicas manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dra. Ruth Elena Soría Guerra y cede los derechos del trabajo titulado Evaluación de la funcionalidad de un péptido antimicrobiano producido en microalgas a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, para su difusión con fines académicos y de investigación.

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

Julieta Ponce Alonso

Nombre y firma del alumno



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias Químicas
Programa de Doctorado

Formato D28

Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí, S.L.P. a 03 de diciembre del 2025

L.B. Reyna Nayeli Ortiz Quintero
Biblioteca de Posgrado FCQ

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada: Evaluación de la funcionalidad de un péptido antimicrobiano producido en microalgas presentada por la autora M.C. Ponce Alonso Julieta. La tesis es requisito para obtener el grado de Doctorado en el Posgrado en Ciencias Químicas. El análisis reveló un porcentaje de similitud de 20% excluyendo referencias y metodología.

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

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

ATENTAMENTE

Dr. Fidel Martínez Gutiérrez
Coordinador Académico del Posgrado
en Ciencias Químicas

Índice general

Resumen	¡Error! Marcador no definido.
Abstract	¡Error! Marcador no definido.
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Resistencia antimicrobiana	2
2.2 Proteínas recombinantes	5
2.3 Plataformas de expresión	7
2.4 Bacterias	8
2.5 Plantas	8
2.6 Levaduras	9
2.7 Células de mamíferos	9
2.8 Animales transgénicos	10
2.9 Microalgas como plataformas de expresión	11
2.10 Péptidos antimicrobianos	12
2.11 Bacteriocinas	13
2.12 Mecanismo de acción general de los péptidos	15
2.13 Nisina	16
2.14 Antecedentes directos	20
3. Justificación	21
4. Hipótesis	21
5. Objetivo general	21
5.1 Objetivos específicos	21
6. Materiales y métodos	¡Error! Marcador no definido.
6.1 Microalgas y condiciones de cultivo	¡Error! Marcador no definido.
6.2 Confirmación de líneas transformadas por PCR	¡Error! Marcador no definido.
6.3 Extracción de proteína total soluble e insoluble de microalgas	¡Error! Marcador no definido.
6.4 Identificación del péptido nisina mediante ELISA	¡Error! Marcador no definido.
6.5 Curva de letalidad del péptido nisina frente a bacterias Gram positivas ATCC	¡Error! Marcador no definido.

6.6 Ensayo de hemaglutinación	¡Error! Marcador no definido.
6.7 Ensayo de citotoxicidad	¡Error! Marcador no definido.
6.8 Análisis estadísticos	¡Error! Marcador no definido.
7. Resultados y discusión	¡Error! Marcador no definido.
7.1 Confirmación de líneas transformantes	¡Error! Marcador no definido.
7.2 Extracción de proteína total soluble e insoluble de microalgas	¡Error! Marcador no definido.
7.3 Ensayos antimicrobianos con buffers de extracción	¡Error! Marcador no definido.
7.4 Identificación del péptido nisina mediante ELISA	¡Error! Marcador no definido.
7.5 Ensayos antimicrobianos con cepas ATCC ..	¡Error! Marcador no definido.
7.6 Ensayo de Hemaglutinación	¡Error! Marcador no definido.
7.7 Ensayo de respuesta inflamatoria en células THP-1	¡Error! Marcador no definido.
8. Conclusiones	¡Error! Marcador no definido.
9. Bibliografía	22
10. Anexos	30
10.1 Extracción de ADN de microalgas	30
10.2 Preparación de gel de poliacrilamida	30
10.3 Preparación de medios de cultivos y soluciones	31

1. Introducción

La resistencia antimicrobiana es uno de los desafíos de salud global más importante de nuestros tiempos (Sampaio de Oliveira et al., 2020). Impactantemente las predicciones estadísticas indican que para el 2050 la principal causa de mortalidad será debido a la resistencia antimicrobiana ocasionando 10 millones de muertes (Lin et al., 2021). Históricamente las bacterias tienen la habilidad de adaptarse y evolucionar frente a los antibióticos convencionales, debido a esto es de vital importancia encontrar nuevos antimicrobianos (Lin et al., 2021). Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son una alternativa para poder combatir la resistencia antimicrobiana gracias a la capacidad que tienen para lisar las membranas bacterianas, proporcionando efectos antimicrobianos rápidos y de amplio espectro (Nordström et al., 2018). Debido al alto potencial clínico que tienen los PAMs se ha prestado mayor atención en este tipo de péptidos por lo que se ha incrementado el número de investigaciones relacionadas con estos desde el año 2000 (Cresti et al., 2024). A diferencia de los antibióticos los PAMs tienen distintos mecanismos de acción en diferentes sitios de acción que en conjunto contribuyen a su amplio espectro antimicrobiano (Browne et al., 2020), lo anterior los hace atractivos como posibles fármacos antimicrobianos. Las bacteriocinas son péptidos sintetizados ribosomalmente por bacterias ácido lácticas Gram positivas que pueden ser divididas en cuatro clases, nisina pertenece a la clase I las cuales son conocidas como antibióticos (Zaschke-Kriesche et al., 2019, Małaczewska y Kaczorek-Łukowska, 2021). Esta bacteriocina tiene efectos antimicrobianos frente a las bacterias Gram positivas, durante años nisina ha sido explotada principalmente en la industria alimenticia principalmente en productos lácteos, enlatados, carnes procesadas, pescados, jugos y frutas sin embargo gracias a sus propiedades antimicrobianas, se ha explorado como posible agente frente a enfermedades infecciosas disminuyendo de esta manera el uso de antibióticos, de hecho ha sido utilizado en la industria veterinaria para prevenir mastitis y recientemente se ha evaluado el potencial antitumoral de este péptido (Joo et al., 2012; Komal et al., 2019; Jensen et al., 2020; Field et al., 2023).

La producción de esta bacteriocina de forma recombinante es una alternativa para obtener grandes cantidades del péptido nisina a precios económicos. Existen diversas plataformas de expresión para la producción de proteínas recombinantes (PR), las microalgas son una alternativa que se ha explorado desde hace algunos años (Rosales-Mendoza et al., 2012). Recientemente se han utilizado microalgas oleaginosas tales como *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*, como plataforma de expresión del péptido antimicrobiano nisina (Ponce-Alonso, 2019). Estas microalgas tienen periodos cortos de crecimiento y son capaces de crecer en contenedores cerrados, reduciendo así cualquier preocupación de contaminación ambiental, además, tienen la habilidad de realizar modificaciones postraduccionales y son consideradas GRAS (Generally Regarded As Safe) lo que implica que es seguro su consumo humano, por lo que se requiere poca o incluso ninguna purificación (Arias-Gómez, 2012; Campos-Quevedo et al., 2013; Pratheesh y Kurup 2013). Debido a lo anterior en este trabajo se evaluó el efecto antimicrobiano del péptido transgénico nisina y el efecto citotóxico con la finalidad de evaluar su eficacia.

2. Antecedentes

2.1 Resistencia antimicrobiana

Con el descubrimiento de los antibióticos, la comunidad sanitaria suponía que la batalla contra las enfermedades infecciosas estaba ganada. Sin embargo, ahora hay bacterias resistentes a múltiples agentes antimicrobianos y las enfermedades infecciosas son actualmente una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Reygaert, 2018).

La resistencia antimicrobiana (RAM) se define como la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de los antibióticos (Giono-Cerezo et al., 2020). La RAM se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI, de hecho, se le ha llamado como la “pandemia silenciosa”, este tipo de resistencia amenaza la prevención y el tratamiento eficaces de una gama cada vez mayor de infecciones causadas por bacterias, parásitos, virus y hongos que ya no son susceptibles a los medicamentos habituales para su tratamiento (Prestinaci et al., 2015). En la Figura 1 se describen los distintos factores que están involucrados en el desarrollo y propagación de la resistencia antimicrobiana las cuales deben de ser atendidas de manera inmediata, pues si

no se aplican medidas de prevención para frenar el crecimiento de la resistencia antimicrobiana se estima que para el año 2050 habrá 1.91 millones de muertes anuales atribuibles a la RAM a nivel mundial y 8.22 millones de muertes anuales asociadas a la RAM (Naghavi et al., 2024).

En el 2017 la OMS publicó la lista de "patógenos prioritarios" (Tabla 1) resistentes a los antibióticos: un catálogo de 12 familias de bacterias que representan la mayor amenaza para la salud humana (<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>) con la finalidad de promover la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos frente a estos patógenos.

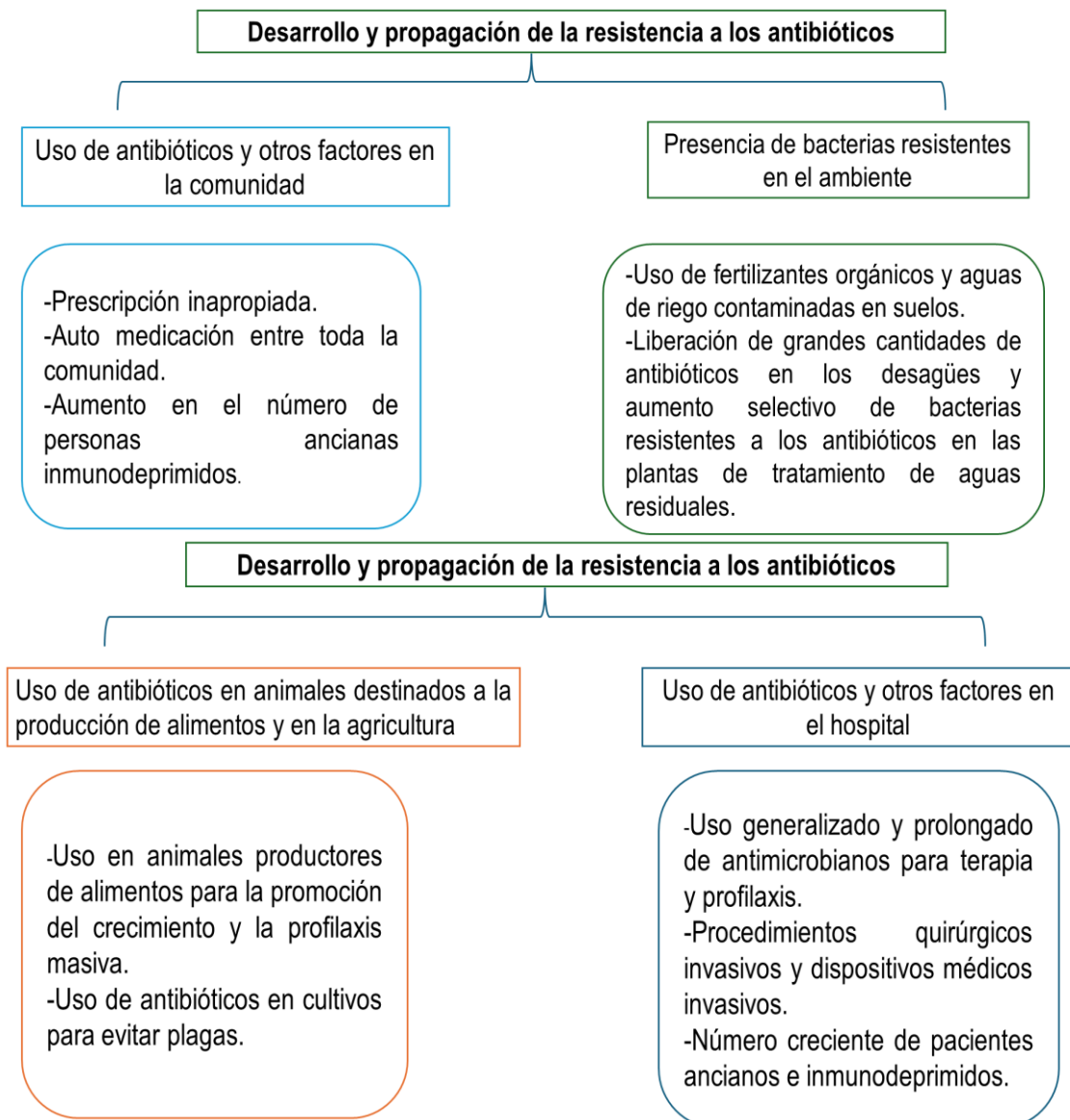















Figura 1. Factores que intervienen en la propagación de la resistencia a los antibióticos en diferentes sectores. Traducido de Prestinaci et al. (2015).

Tabla 1. Lista de patógenos prioritarios para investigación y desarrollo de nuevos antibióticos según la WHO, 2025.

PRIORIDAD CRÍTICA	PRIORIDAD ALTA	PRIORIDAD MEDIA
<div><p><i>Acinetobacter baumannii</i> Resistente a carbapenémicos</p></div> <div><p>Enterobacteriales Tercera generación Resistentes a cefalosporinas</p></div> <div><p>Enterobacteriales Resistente a carbapenémicos</p></div>	<div><p><i>Salmonella Typhi</i> Resistente a fluoroquinolonas</p></div> <div><p><i>Shigella</i> spp. Resistente a fluoroquinolonas</p></div> <div><p><i>Enterococcus faecium</i> Resistente a vancomicina</p></div> <div><p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> Resistente a carbapenémicos</p></div>	<div><p>Non-typhoidal <i>Salmonella</i> Resistente a fluoroquinolonas</p></div> <div><p><i>Neisseria gonorrhoeae</i> Tercera generación resistente a cefalosporinas y/o fluoroquinolonas</p></div> <div><p><i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a meticilina</p></div> <div><p>Group A <i>Streptococci</i> Resistente a macrólidos</p></div> <div><p><i>Streptococcus pneumoniae</i> Resistente a macrólidos</p></div> <div><p><i>Haemophilus influenzae</i> Resistente a ampicilina</p></div> <div><p>Group B <i>Streptococci</i> Resistente a penicilina</p></div>

Para combatir esta resistencia es importante conocer los múltiples mecanismos de las bacterias para hacer frente a los antibióticos, los cuales son: 1) modificaciones de la molécula antimicrobiana, 2) impedimento para alcanzar la diana del antibiótico (al disminuir la penetración o extruir activamente el compuesto antimicrobiano), 3) cambios o eludir los sitios diana, y 4) resistencia debida a procesos adaptativos celulares globales (Munita y Arias, 2016).

Estos mecanismos de resistencia pueden desarrollarse espontáneamente (mutaciones) o adquirirse (mediante procesos de transducción, transfección o conjugación), como se muestra en la Figura 2 (Álvarez-Martínez et al., 2020).

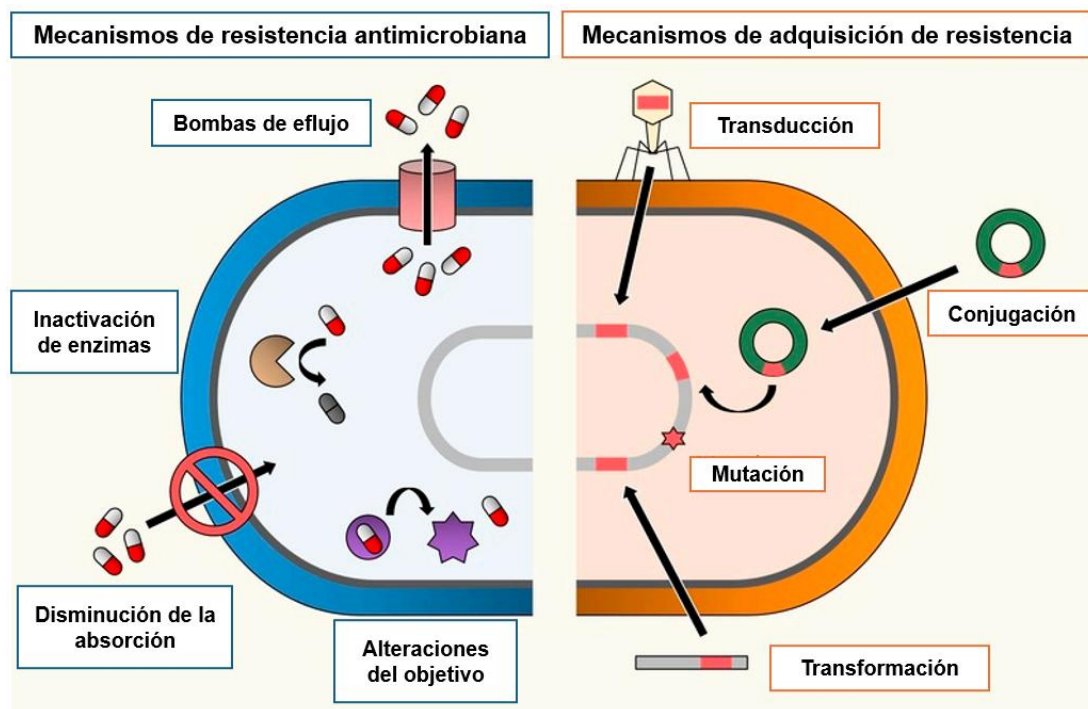


Figura 2. Mecanismos de resistencia antibacteriana obtenidos mediante mutación y adquisición. Imagen traducida de (Álvarez-Martínez et al., 2020).

Es importante conocer los múltiples mecanismos por los cuales las bacterias generan resistencia frente a los antibióticos para poder desarrollar nuevos fármacos, así como implementar las medidas de prevención para que no se continúe diseminando la resistencia antimicrobiana.

2.2 Proteínas recombinantes

Las proteínas son moléculas complejas en términos de su estructura y función. Si bien existen métodos de síntesis química que permiten la fabricación de péptidos y algunas proteínas de menor tamaño, la producción de proteínas más grandes y/o funcionalmente complejas se realiza principalmente mediante procesos biológicos. En estos casos, la proteína se expresa en una célula huésped frecuentemente de una especie diferente a la de origen utilizando ADN recombinante.

Las proteínas recombinantes son aquellas que se producen por un organismo diferente al nativo, usando ingeniería genética y uso óptimo de codones, lo que permite incrementar su eficiencia de expresión y obtener niveles adecuados de producción (Overton, 2014).

Desde que la FDA (Food and Drug Administration) aprobó la insulina recombinante el tipo de proteínas terapéuticas ha tenido un crecimiento exponencial (Rasala et al., 2010). Gracias a los avances en el área de proteínas recombinantes la producción de las mismas ha cambiado, favoreciendo una mayor producción con precios más bajos, permitiendo de esta manera la producción de proteínas a escala industrial abriendo la posibilidad para la producción de proteínas para múltiples tratamientos de distintas enfermedades y desordenes (Tripathi y Shrivastava, 2019).

La metodología general para la producción de proteínas recombinantes mediante la tecnología del ADN recombinante se visualiza en la Figura 3, en donde primero se comienza con la selección del gen de interés, posteriormente se inserta un fragmento específico de ADN que contiene el gen de interés en un vector de expresión apropiado. El vector se inserta posteriormente en un sistema de expresión, que se cultiva en un biorreactor para producir varias copias del gen de interés y así obtener los productos deseados (Sahreem et al., 2023). Los vectores son elementos de ADN autónomos y autorreplicantes, en los que se introduce un fragmento de ADN foráneo. Los vectores de expresión son los vehículos que transportan los genes recombinantes de interés a la célula huésped y, además del transgén, suelen constar de elementos de expresión como promotores, potenciadores, sitios de clonación múltiple (MCS), secuencias de intrones, terminadores de la transcripción, marcadores de selección y elementos de ADN que modulan la estructura de la cromatina (O'Flaherty et al., 2020).

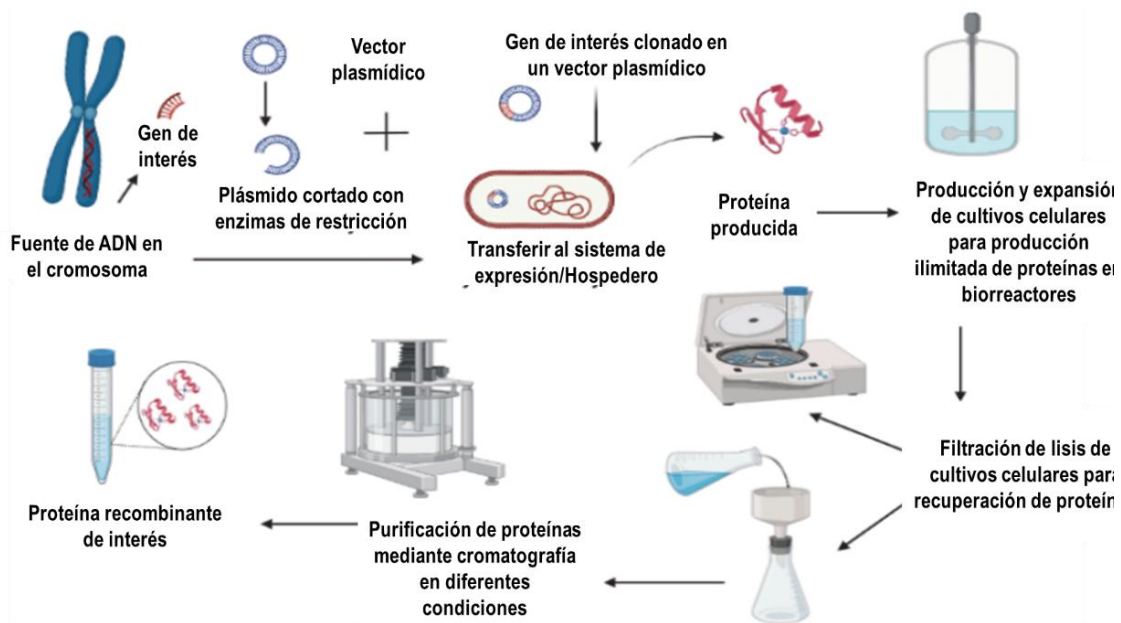


Figura 3. Metodología general para la producción de una proteína recombinante. Imagen traducida de (Sahreem et al., 2023).

Gracias a esta tecnología, se han salvado millones de vidas debido a la accesibilidad casi ilimitada a proteínas terapéuticas y profilácticas que, antes de la era de la biotecnología moderna, solo podían obtenerse en cantidades muy pequeñas de fuentes inseguras.

Hoy en día, más de 75 proteínas recombinantes se utilizan como productos farmacéuticos, y más de 360 nuevos medicamentos basados en proteínas recombinantes están en desarrollo (www.phrma.org). El impacto de la producción de proteínas recombinantes también se ha extendido al desarrollo de bioinsecticidas, kits de diagnóstico, enzimas con numerosas aplicaciones y procesos de biorremediación, entre muchos otros. En particular, áreas como la producción de detergentes y el procesamiento de alimentos se encuentran entre los éxitos más notables (Palomares et al., s.f.; Demain y Vaishnav, 2009).

2.3 Plataformas de expresión

El primer aspecto para tener en cuenta para la obtención de una proteína por vía recombinante es la correcta selección del sistema o plataforma de expresión. Un sistema de expresión lo conforma un organismo hospedero y un vector de expresión que contiene los elementos génicos necesarios para realizar los

procesos de transcripción y traducción del gen de interés en dicho organismo hospedero (Gonzáles y Fillat, 2018).

La elección del mecanismo ideal para la expresión de proteínas recombinantes depende de la proteína diana, así como de su función y aplicación. Las aplicaciones de las proteínas recombinantes incluyen la industria alimentaria, la terapia génica, el desarrollo de anticuerpos recombinantes de diagnóstico o kits de antígenos, y la fabricación de nuevos fármacos (Morbioli et al., 2016).

Las proteínas terapéuticas recombinantes se han producido tradicionalmente en células de mamíferos, insectos, bacterias, levaduras y plantas. Las células de mamíferos son los sistemas de expresión preferidos para producir proteínas glicosiladas complejas (Swiech et al., 2012).

2.4 Bacterias

Los sistemas de expresión bacterianos se utilizan ampliamente para la expresión de productos obtenidos mediante la tecnología de ADN recombinante. Este tipo de plataformas bacterianas ofrecen diversas ventajas, como un alto nivel de expresión de proteínas recombinantes, una rápida multiplicación celular y un sencillo requerimiento de medios. Sin embargo, presentan algunas limitaciones, como la acumulación intracelular de proteínas heterólogas, el plegamiento inadecuado del péptido, la ausencia de modificaciones postranscripcionales, la posibilidad de degradación del producto debido a trazas de impurezas de proteasas y la producción de endotoxinas (Balamurugan et al., 2006).

2.5 Plantas

2.5.1 Expresión estable

Las plantas son biofábricas de proteínas diversas y complejas y ofrecen diversas ventajas. Permiten una producción escalable y rentable gracias a su capacidad para ser cultivadas en grandes cantidades y producir una gran biomasa. Las células vegetales poseen la notable capacidad de procesar proteínas postranscripcionales para crear estructuras de glicanos a medida (modificación postraducciona) y un plegamiento correcto, lo que proporciona una ventaja en la producción de proteínas recombinantes con patrones de glicosilación específicos, la única desventaja es que el proceso de

transformación estable puede tomar varias semanas (Venkataraman et al., 2023).

2.5.2 Expresión transitoria

Existen diversas estrategias de expresión génica que pueden utilizarse para producir proteínas específicas en plantas. Con la expresión transitoria (ET), se inserta una secuencia génica en las células vegetales mediante virus vegetales, métodos balísticos (pistola génica) u otros, sin incorporar el nuevo material genético al cromosoma vegetal. Los sistemas de ET pueden implementarse rápidamente y producir grandes cantidades de proteínas, pero, dado que el ADN no cromosómico no se copia durante la mitosis o la meiosis, la expresión génica no es permanente ni hereditaria.

Si bien los sistemas de ET son muy útiles para la investigación y el desarrollo, y podrían ser útiles para la producción de fármacos, requieren la producción de nuevas plantas transformadas con cada siembra y pueden ser menos atractivos para la producción de proteínas a largo plazo o en grandes volúmenes (Goldstein y Thomas, 2004).

2.6 Levaduras

La levadura, un microorganismo unicelular con la capacidad de procesar proteínas como los eucariotas, es decir, ensamblaje, plegamiento y modificaciones postraduccionales aunque puede generar hiperglicosilaciones. Ha sido usado frecuentemente como sistema de expresión debido a su fácil manipulación de genes y a sus eficientes tasas de crecimiento. Además, no poseen oncogenes ni endotoxinas (Sahreen et al., 2023).

2.7 Células de mamíferos

Las células de mamíferos tienen la capacidad de expresar proteínas recombinantes de gran tamaño y complejas. Las modificaciones post traduccionales están presente en líneas celulares de mamíferos; sin embargo, su patrón de glicosilación es diferente al de la glicosilación humana. Desafortunadamente, el cultivo de estas células a escala comercial aún se encuentra en fase de desarrollo. Otras desventajas de este sistema incluyen la contaminación con virus animales. Los medios de cultivo para una línea celular son complejos y caros, ya que requiere varios componentes (Tripathi y Shrivastava, 2019).

2.8 Animales transgénicos

Se están utilizando animales transgénicos para la producción de proteínas recombinantes en leche, clara de huevo, sangre, orina, plasma seminal y capullos de gusanos de seda. Hasta el momento, la leche y la orina parecen ser las mejores. Uno de los puntos negativos de la producción de proteínas por animales transgénicos es el tiempo necesario para evaluar el nivel de producción. Este tarda 3.5 meses en ratones, 15 meses en cerdos, 28 meses en ovejas y 32 meses en vacas (Demain y Vaishnav, 2009). A continuación, se presenta una tabla de comparación de las diferentes plataformas de expresión.

Tabla 2. Comparación de proteínas recombinantes en plantas, levaduras y sistemas mamíferos. Tabla traducida de Goldstein y Thomas, 2004.

Característica	Plantas transgénicas	Virus de plantas	Levaduras	Bacterias	Cultivos celulares de mamíferos	Animales transgénicos
Costo/almacenamiento	Barato / temperatura ambiente	Barato / -20 °C	Barato / -20 °C	Barato / -20 °C	Caro	Caro
Distribución	Fácil	Fácil	Factible	Factible	Difícil	Difícil
Tamaño del gen	No limitado	Limitado	Desconocido	Desconocido	Limitado	Limitado
Glicosilación	¿“Correcta”?	¿“Correcta”?	Incorrecta	Ausente	“Correcta”	“Correcta”
Ensamblaje de proteínas multiméricas	Sí	No	No	No	No	Sí
Costo de producción	Bajo	Bajo	Medio	Medio	Alto	Alto
Escala de producción	Mundial	Mundial	Limitada	Limitada	Limitada	Limitada
Vehículo de producción	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Propagación	Fácil	Factible	Fácil	Fácil	Difícil	Factible
Precisión en el plegamiento de proteínas	¿Alta?	¿Alta?	Media	Baja	Alta	Alta
Homogeneidad de proteínas	¿Alta?	Media	Media	Baja	Media	Alta
Rendimiento de proteína	Alto	Muy alto	Alto	Medio	Medio–alto	Alto
Percepción pública de riesgo	Alta	Alta	Media	Baja	Alta	Alta
Seguridad	Alta	Alta	Desconocida	Baja	Media	Alta
Costos de escalamiento	Bajos	Bajos	Altos**	Altos**	Altos**	Altos**
*Riesgo terapéutico **	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Alto	Sí	Sí
Tiempo requerido	Medio	Bajo	Medio	Bajo	Alto	Alto
* Riesgo de secuencias virales residuales, oncogenes, endotoxinas. ** Fermentadores grandes y costosos.						

2.9 Microalgas como plataformas de expresión

Desde hace algunos años las microalgas han sido de gran interés para ser utilizadas como plataforma de expresión para la producción de proteínas recombinantes. Se han reportado resultados exitosos mediante la manipulación genética de microalgas para la producción de antígenos para vacunas, anticuerpos, inmunotoxinas, hormonas y agentes antimicrobianos (Castiglia et al., 2021).

Las microalgas proporcionan una plataforma de fabricación para la expresión de genes foráneos debido a su rápido crecimiento en condiciones fotoautotróficas y su bajo costo de mantenimiento, en comparación con las plantas terrestres, las células de mamíferos, las levaduras y las bacterias (Doron et al., 2016). Además, son consideradas como GRAS (generalmente considerada segura) para uso humano, tienen la posibilidad de escalado en biorreactores cerrados y controlados, y la capacidad de ensamblar proteínas multisubunitarias (Dehghani et al., 2020). A diferencia de otros hospederos como los microbianos, las microalgas tienen la habilidad de realizar modificaciones postraduccionales y una síntesis y maduración proteica compleja, incluyendo la capacidad de glicosilación y la formación de enlaces disulfuro (Muñoz-Solórzano et al., 2024). La expresión de las proteínas recombinantes en esta plataforma de expresión se da principalmente en el cloroplasto o en el núcleo. En el cloroplasto, el nivel de expresión transgénica puede alcanzar el 20% de la proteína soluble total (PST). La expresión en el cloroplasto solo es adecuada para proteínas no glicosiladas debido a su origen bacteriano. Las proteínas recombinantes expresadas desde el núcleo, por otro lado, pueden dirigirse a la vía de secreción mediante la adición de péptidos señal específicos a la secuencia de aminoácidos recombinante, lo que resulta en la secreción y glicosilación de la proteína recombinante. Desafortunadamente, la expresión nuclear produce rendimientos muy bajos debido a la integración aleatoria, la baja eficiencia de transformación y los mecanismos de silenciamiento génico (Barolo et al., 2020). Sin embargo, la ingeniería de proteínas recombinantes en microalgas se ha enfocado a mejorar la inserción estratégica de un gen exógeno que codifica la proteína deseada en el genoma del alga sin que se silencie, lo que permite que la proteína se exprese en altos niveles y se dirija a una región subcelular específica de las células de la microalga (Sproles et al., 2021). *Chlamydomonas reinhardtii* es la microalga

modelo en la que se han identificado elementos potentes de expresión, como promotores, terminadores y sus correspondientes regiones no traducidas (UTR) 5' y 3', para el establecimiento de una fuerte expresión heteróloga constitutiva o inducible (Perozeni y Baier, 2023).

Los avances en la investigación sobre genes de selección exógenos, promotores eficientes, métodos y condiciones de transformación adecuados, optimización de codones, etc., han mejorado la eficiencia de la transferencia de ADN exógeno al núcleo de *C. reinhardtii*, lo que podría mejorar la eficiencia de *Chlamydomonas* como organismo hospedero en la producción de nuevas proteínas bioactivas (Zhang et al., 2021).

2.10 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son pequeñas moléculas polipeptídicas, generalmente compuestas de entre 12 y 50 aminoácidos, que se encuentran en todas las clases de organismos vivos (Rima et al., 2021). Los PAMs antibacterianos son los más estudiados hasta la fecha y la mayoría son catiónicos y también son anfipáticos, con dominios hidrofílicos e hidrofóbicos. Estas estructuras les confieren la capacidad de unirse a componentes lipídicos (región hidrofóbica) y a grupos fosfolípidos (región hidrofílica) (Bahar y Ren, 2013).

La diversidad de PAMs naturales dificulta su clasificación. Los PAMs se clasifican según (1) su origen, (2) su actividad, (3) sus características estructurales y (4) su especie rica en aminoácidos como se muestra en la Figura 4 (Huan et al., 2020).

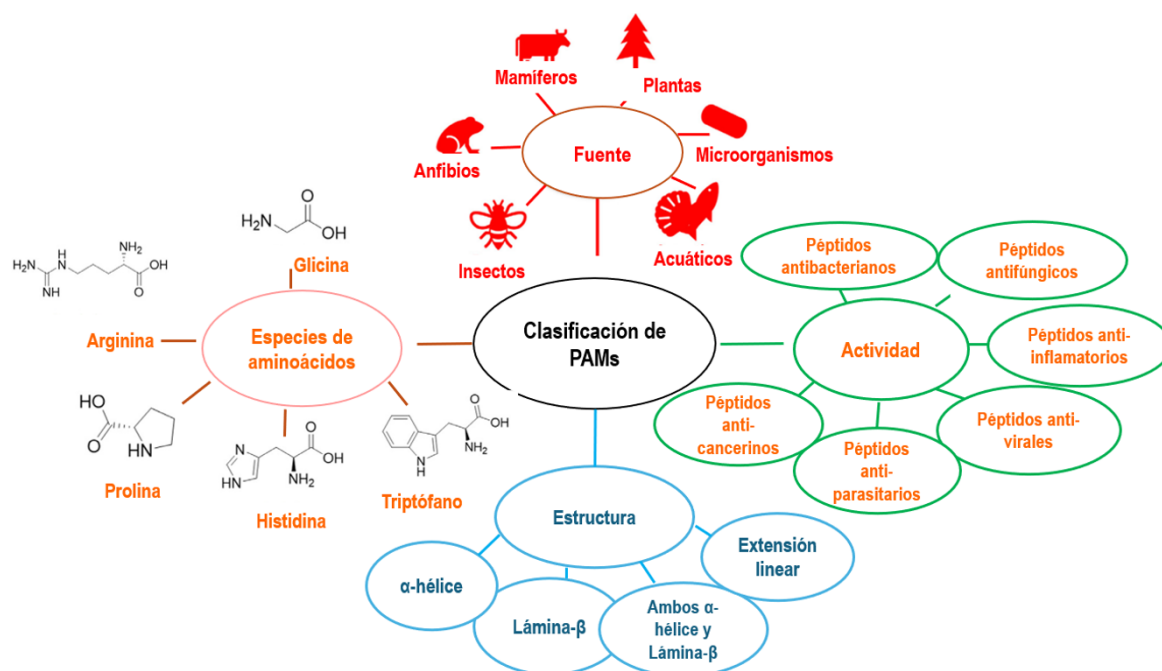


Figura 4. Clasificación de los péptidos antimicrobianos (PAMs) de acuerdo con su fuente, actividad, estructura y especies de aminoácidos. Imagen traducida de Huan et al., 2020.

A diferencia de las proteínas de gran tamaño mencionadas previamente, algunos péptidos antimicrobianos pueden obtenerse mediante síntesis química. No obstante, este método presenta limitaciones importantes: su producción a gran escala es costosa y el precio se incrementa aún más cuando los péptidos contienen enlaces disulfuro, lo que dificulta la obtención eficiente de estas moléculas (Parachin et al., 2012).

2.11 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente y producidos por bacterias, y pueden tener un espectro amplio o estrecho de actividad inhibitoria. Las bacteriocinas son compuestos antimicrobianos prometedores con posibles aplicaciones en entornos alimentarios, veterinarios y clínicos (Soltani et al., 2022).

A pesar de la diversidad entre las bacteriocinas, generalmente se pueden clasificar en dos grupos, si experimentan o no modificaciones postraduccionales.

Las bacteriocinas de clase I (modificadas) se han subdividido en los siguientes subgrupos: lantibióticos, linaridinas, péptidos lineales que contienen azol(in)a, cianobactinas, tiopéptidos, péptidos lazo, sactibióticos, glicocinas y microcinas modificadas. Las bacteriocinas de clase II (sin modificar) se dividen en cinco subgrupos: cuatro corresponden a bacteriocinas de bacterias lácticas (BAL) sin modificar y uno a microcinas sin modificar, incluyendo las clases IIa (similares a la pediocina), IIb (bacteriocinas de dos péptidos), IIc (bacteriocinas circulares), IId (bacteriocinas lineales, no similares a la pediocina) y Ile (bacteriocinas similares a la microcina E492) (Hegarty et al., 2016).

Tabla 3. Clasificación de bacteriocinas. Traducida de Zimina et al., 2020.

Microorganismo	Clase	Tamaño (kDa)	Ejemplos
Bacterias Gram-negativas	Colicinas	30–80	Colicinas A, B, E2, E3
	Bacteriocinas tipo colicina	30–80	S-piocinas, klebicinas
	Bacteriocinas, similares a colas de fagos	20–100	R- y F-piocinas
	Microcinas	<10	Microcina C7, microcina B17, colicina V
Bacterias Gram-positivas	Clase I	<5	Nisina, mersadicina, lacticina 3147
	Clase II	<10	Pediocina RA1, carnobacteriocina B2
	Clase II	>10	Helvecina, enterocina AS-48
Arqueas	Halocinas	>5	Halocina A4, C8, H1, H4
	Sulfolobaceae	~20	Sulfolobaceae

2.12 Mecanismo de acción general de los péptidos

En general, los PAMs eliminan a los microbios alterando la integridad de la membrana (a través de las membranas celulares con carga negativa), inhibiendo la síntesis de ADN, ARN y proteínas, a veces interactuando con componentes intracelulares.

Los PAMs catiónicos son un tipo de péptidos que a diferencia de los antibióticos tradicionales, estos PAMs interactúan con las membranas celulares bacterianas (Figura 5) neutralizando la carga, penetrando a través de las membranas bacterianas y causando la muerte bacteriana, reduciendo así la posibilidad de resistencia bacteriana a los fármacos (Lei et al., 2019). Por otro lado, los PAMs no solo matan directamente a los microorganismos patógenos invasores, sino que también los pueden matar indirectamente al activar el sistema inmunológico como se observa en la Figura 6 (Zhang et al., 2021).

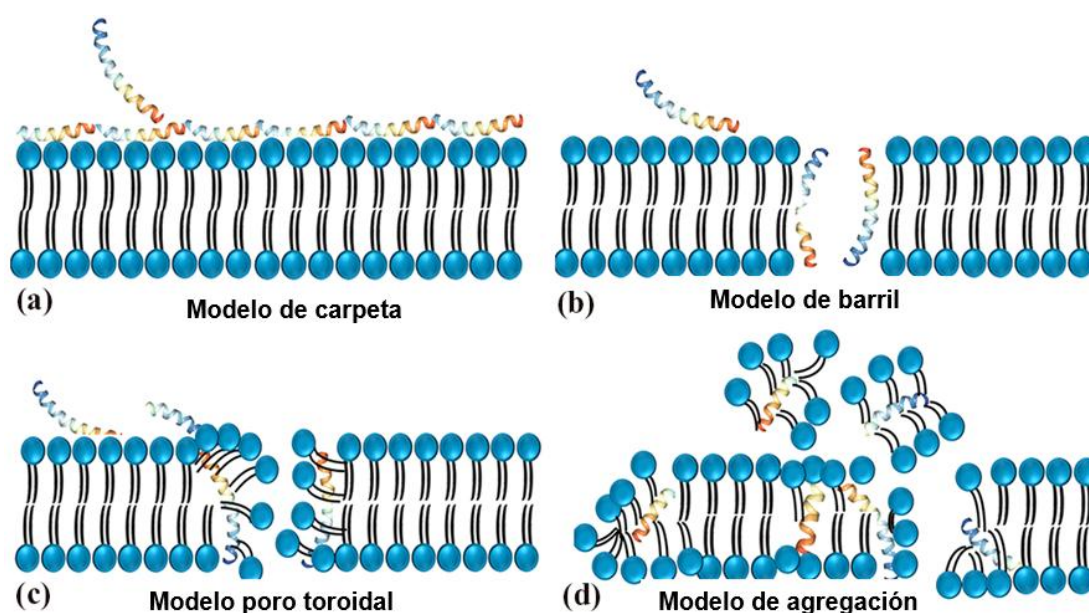


Figura 5. Representación esquemática del mecanismo potencial de disrupción y/o translocación de la membrana por péptidos antimicrobianos. (a) Modelo de alfombra: una de las caras de la membrana es cubierta por los PAMs formando una “alfombra”, y la membrana sufre cierta perturbación y deformación. (b) Modelo de barril: los PAMs interactúan lateralmente y forman poros transmembrana. (c) Modelo de poro toroidal: los PAMs penetran la bicapa de la membrana y forman un toroide de alta curvatura. (d) Modelo de agregados. Imagen traducida de (Ramazi et al., 2022)

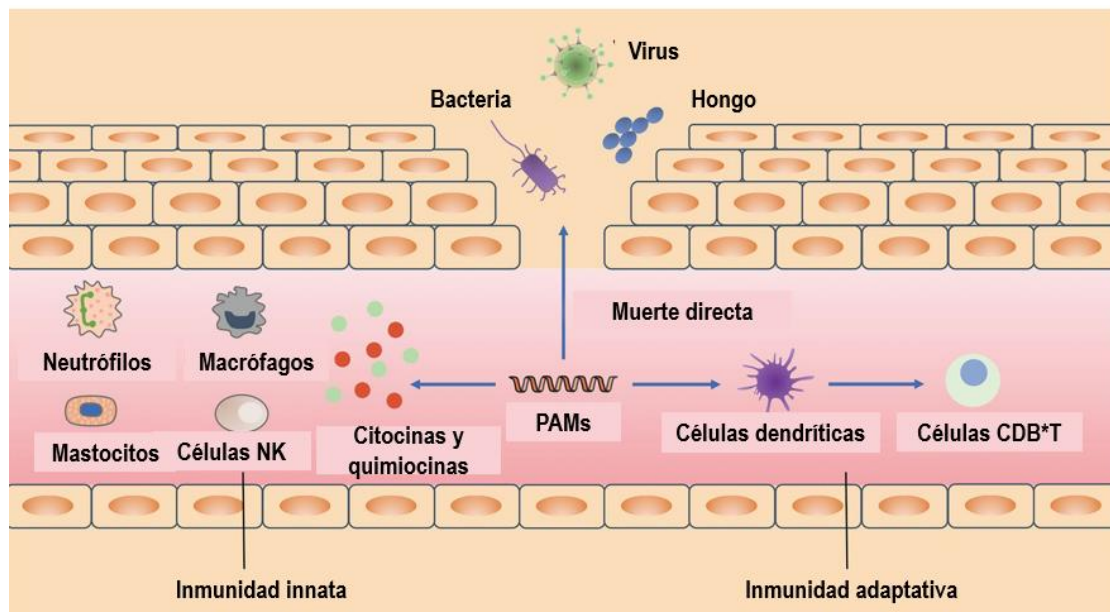


Figura 6. Mecanismos inmunomoduladores de los PAMs.

Los PAMs no solo erradican directamente a los microorganismos patógenos invasores, sino que también los eliminan indirectamente al activar el sistema inmunológico. Por un lado, los PAMs pueden activar células inmunitarias como neutrófilos, macrófagos, mastocitos y células NK en el sistema inmunológico innato e inducir la producción de citocinas y quimiocinas para engullir las bacterias patógenas y matarlas. Por otro lado, los PAMs también son capaces de activar respuestas inmunitarias adaptativas, presentar antígenos a las células T al activar células dendríticas (DCs) e inducir la activación de células T citotóxicas para matar bacterias patógenas. Imagen traducida de Zhang et al., 2021.

2.13 Nisina

Nisina es uno de los péptidos antimicrobianos mejor caracterizados, es secretada de forma natural por *Lactococcus lactis* y perteneciente a la clase I de los PAMs, este péptido se ha utilizado como conservante de alimentos durante más de cincuenta años (Abts et al., 2011). Existen varias variantes naturales de la nisina (nisina A, Z y Q) con secuencias de aminoácidos ligeramente diferentes, pero con una estructura secundaria conservada (Weixler et al., 2022). El péptido maduro consta de 34 aminoácidos, en su estructura (Figura 7) se encuentran

cuatro aminoácidos inusuales: deshidroalanina (DHA), deshidrobutirina (DHB), lantionina y β -metillantionina, que forman puentes tioéter en cinco posiciones.

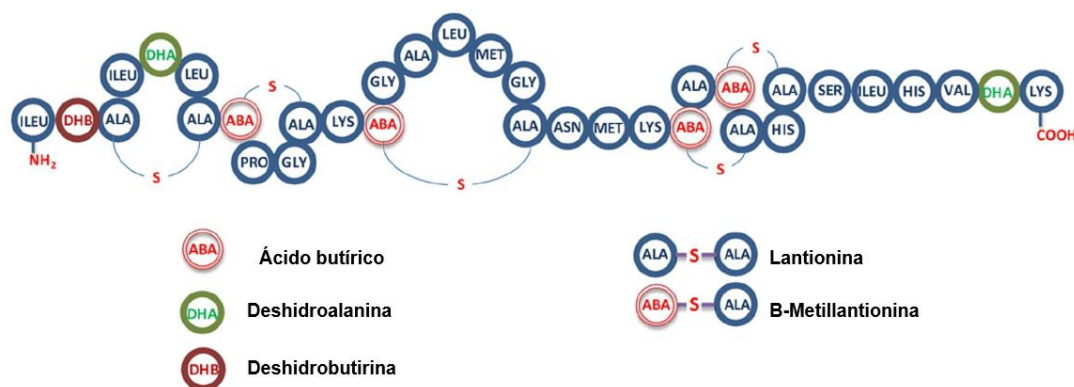


Figura 7. Estructura del péptido nisina. Imagen traducida de Khelissa et al., 2021.

La actividad antibacteriana (Figura 8) de nisina se atribuye a su interacción con lípidos aniónicos en la membrana citoplasmática de las células bacterianas, lo que provoca la perturbación de la membrana plasmática. El poro formado por la interacción de la nisina con los lípidos aniónicos provoca la salida de Adenosín trifosfato (ATP), aminoácidos y rubidio preacumulado, o el colapso de los gradientes iónicos vitales, lo que provoca la muerte celular (Tong et al., 2014).

En primer lugar, la nisina se une al lípido II con los dos anillos de lantionina de su extremo N-terminal, formando así una jaula de pirofosfato alrededor del grupo de cabeza del lípido II. La región bisagra flexible en el centro de la molécula de nisina permite la inserción de su extremo C-terminal en la membrana, probablemente acompañada de un cambio de orientación del péptido de paralela a transmembrana (Scherer et al., 2015).

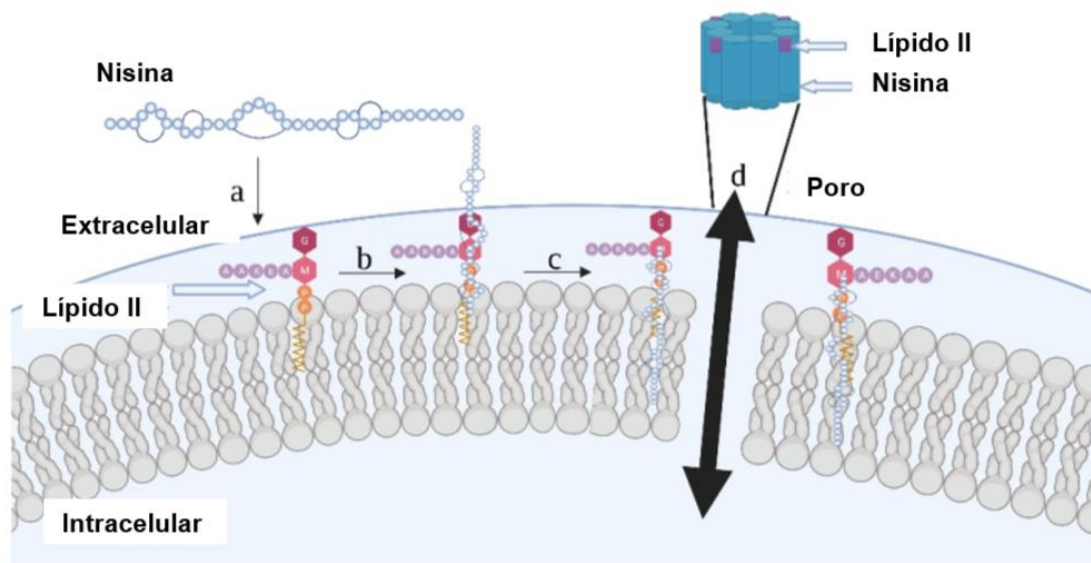


Figura 8. Mecanismo antimicrobiano de la nisina dependiente del lípido II.

Mecanismo antimicrobiano de la nisina dependiente del lípido II. Cuando la nisina alcanza la superficie de la membrana celular (a), los anillos A y B en el extremo N-terminal de la nisina se unen al grupo pirofosfato del lípido II (b). La región C-terminal se inserta en la membrana para formar un poro mediante un mecanismo de bisagra flexible (c). El complejo del poro tiene una estequiometría de cuatro moléculas de lípido II por ocho moléculas de nisina (d) (Zheng et al., 2022).

La producción industrial de nisina implica un sistema de fermentación por lotes en el que las células de *Lactococcus lactis* productoras de nisina A, se cultivan en un medio suplementado de suero o leche, y el producto se purifica parcialmente. El alto costo de la producción industrial de nisina restringe el uso generalizado de esta bacteriocina en los sistemas alimentarios debido al bajo rendimiento de producción de las células productoras, lo cual se debe a factores de inhibición por retroalimentación que dependen de las condiciones de fermentación y de la sensibilidad de los organismos productores a la nisina (Özel et al., 2018). En la Tabla 4 se presentan algunos enfoques innovadores que se han utilizado para aumentar la producción del péptido antimicrobiano nisina en su organismo productor, *L. lactis*.

Tabla 4. Enfoques innovadores recientes que resultan en una alta producción de nisina. Tabla traducida de Burcu Özel et al., 2018

Productores de nisina	Producción de nisina	Enfoques innovadores
<i>L. lactis</i> ATCC11454	7,900 UI mL ⁻¹	El gen <i>aox1</i> fue clonado y el productor recombinante de nisina fue inducido a respiración oxidativa.
<i>L. lactis</i> ATCC11454	14,000 UI mL ⁻¹	El gen <i>aox1</i> se clonó junto con los genes <i>pfk13</i> y <i>pkaC</i> para aumentar la actividad glucolítica, así como la respiración oxidativa.
<i>L. lactis</i> PLAC7	10,500 UI mL ⁻¹	El dominio de unión a quitina fue clonado en el productor <i>L. lactis</i> y se utilizó en un sistema de fermentación continua en presencia de quitina.
<i>L. lactis</i> YF11	4,023 UI mL ⁻¹	Se aplicó barajado genómico (genome shuffling) para mejorar la producción de nisina Z en <i>L. lactis ssp. lactis</i> YF11 mediante fusión protoplástica recursiva.
<i>L. lactis</i> N8	5,410 UI mL ⁻¹	La fermentación alimentada (fed-batch) se realizó con hemina bajo condiciones aeróbicas.
<i>L. lactis</i> ATCC11454	4,657 UI mL ⁻¹	La nisina fue recuperada mediante fraccionamiento con espuma a partir del medio de fermentación.

<i>L. lactis</i> LD2	15,400 UI mL ⁻¹	La nisina se produjo en un sistema de fermentación alimentada aireada con una tasa de alimentación variable.
<i>L. lactis</i> F44	5,560 UI mL ⁻¹	Los genes <i>hdeAB</i> , <i>ldt</i> y <i>murF</i> fueron clonados y expresados simultáneamente para mejorar la tolerancia ácida del productor <i>L. lactis</i> .
<i>L. lactis</i> F44A	5,346 UI mL ⁻¹	La tolerancia ácida fue aumentada mediante la sobreexpresión del gen <i>asnH</i> en el productor de nisina <i>L. lactis</i> .
<i>L. lactis</i> UTM106	10,800 UI mL ⁻¹	Este productor fue usado junto con <i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC18942 en el sistema de fermentación.

2.14 Antecedentes directos

Previo a este proyecto en el año 2019 en el laboratorio de Biotecnología Molecular de Células Vegetales de la UASLP, se transformó el núcleo de las microalgas de estudio *Nannochloropsis oculata* CCAP 849/7, *Scenedesmus acutus* UTEX 72 y *Chlorella vulgaris* OW-01 con el vector de expresión pChlamy-Nis. La transformación nuclear de las microalgas se realizó mediante co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens* utilizando higromicina B como agente de selección, demostrando la funcionalidad de estas microalgas como plataformas de expresión del péptido antimicrobiano Nisina.

3. Justificación

Una de las principales problemáticas a nivel mundial es la resistencia antimicrobiana la cual ha aumentado a lo largo de los años y se estima que esta sea la principal causa de muerte para el 2050 si no se toman medidas preventivas y activas frente al problema. Una alternativa para atacar esta situación es la investigación y desarrollo de nuevos fármacos y péptidos antimicrobianos para erradicar bacterias resistentes. Es por ello que en este proyecto se propone evaluar la actividad biológica del péptido antimicrobiano transgénico nisina producida en las microalgas *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*, con la finalidad de valorar su eficacia y proponerlo como una posible alternativa frente a la resistencia antimicrobiana.

4. Hipótesis

El péptido nisina producido mediante la tecnología del ADN recombinante en microalgas presenta actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos, sin causar citotoxicidad.

5. Objetivo general

Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana y los efectos citotóxicos del péptido nisina producido en microalgas.

5.1 Objetivos específicos

- Confirmar la expresión del péptido antimicrobiano nisina por transformación nuclear de *Nannochloropsis oculata* CCAP 849/7, *Scenedesmus acutus* UTEX 72 y *Chlorella vulgaris* OW-01.
- Identificar y cuantificar el péptido recombinante nisina en las líneas transgénicas.
- Realizar ensayos antimicrobianos con la proteína recombinante frente a cepas ATCC y cepas provenientes de aislados clínicos.
- Determinar la citotoxicidad del péptido antimicrobiano mediante su evaluación en células THP-1 (ATCC TIB-202), a través de la cuantificación de las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10, y un ensayo cualitativo de hemaglutinación.

8. Bibliografía

- Abts, A., Mavaro, A., Stindt, J., Bakkes, P. J., Metzger, S., Driessen, A. J. M., Smits, S. H. J., y Schmitt, L. (2011). Easy and rapid purification of highly active nisin. *International Journal of Peptides*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/175145>
- Arias-Gómez, C. L. (2012). *Caracterización de la ruta de N -glicosilación de proteínas en el sistema de endomembranas del alga verde. [Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid]*. Repositorio institucional UNAM. https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/11627/57615_Tesis%20Doctoral%20C.Arias%20G%C3%B3mez%20Mayo%202012.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Álvarez-Martínez, F. J., Barraón-Catalán, E., y Micol, V. (2020). Tackling antibiotic resistance with compounds of natural origin: A comprehensive review. In *Biomedicines* (Vol. 8, Issue 10, pp. 1–30). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8100405>
- Bahar, A. A., y Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
- Barolo, L., Abbriano, R.M., Commault, A.S., George, J., Kahlke, T., Fabris, M., et al. (2020). Perspectives for glyco-e of recombinant biopharmaceuticals from microalgae. *Cells* 9(3):633. doi:10.3390/cells9030633
- Begde, D., Bundale, S., Mashitha, P., Rudra, J., Nashikkar, N. y Upadhyay, A. (2011), Immunomodulatory efficacy of nisin—a bacterial lantibiotic peptide. *Journal of Peptide Science*, 17: 438-444. <https://doi.org/10.1002/psc.1341>
- Browne, K., Chakraborty, S., Chen, R., Willcox, M. D. P., Black, D. S., Walsh, W. R., y Kumar, N. (2020). A new era of antibiotics: The clinical potential of antimicrobial peptides. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 19, pp. 1–23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21197047>
- Reygaert, W. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>

- Campos-Quevedo, N., Rosales-Mendoza, S., Paz-Maldonado, L.M.T., Martínez-Salgado, L., Guevara-Arauza, J.C. y 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: 217–225. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0261-3>
- Castiglia, D., Landi, S., Esposito, S. (2021). Advanced applications for protein and compounds from microalgae. *Plants (Basel)*, 10(8):1686. Published 2021 Aug 16. doi:10.3390/plants10081686
- Cresti, L., Cappello, G. y Pini, A. (2024). Antimicrobial peptides towards clinical application—A long history to be concluded. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25, Issue 9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms25094870>
- Dávalos-Guzmán, S., Martinez-Gutierrez, F., Martínez-González, L., Quezada-Rivera, J.J., Lorenzo-Leal, A.C., Bach, H., Morales-Domínguez, J.F., y Soria-Guerra, R.E. (2023). Antimicrobial activity of the Flo peptide produced in *Scenedesmus acutus* and *Nannochloropsis oculata*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 39: 211. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03664-7>
- Dadar, M., Shahali, Y., Chakraborty, S. *et al.* Antiinflammatory peptides: current knowledge and promising prospects. *Inflammation Research*. **68**, 125–145 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1208-x>
- Demain, A. L., y Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. En *Biotechnology Advances* (Vol. 27, Issue 3, pp. 297–306). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
- Doron, L., Segal, N. y Shapira, M. (2016). Transgene expression in microalgae—from tools to applications. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1–24. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00505>
- Field, D., Fernandez De Ullivarri, M., Ross, R. P., y Hill, C. (2023). After a century of nisin research-where are we now? In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 47, Issue 3). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad023>

- Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Morfín-Otero, M. del R., Torres-López, F. J., y Alcántar-Curiel, M. D. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta Médica de México*, 156(2). <https://doi.org/10.24875/gmm.20005624>
- Harris, E. H. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Molecular Biology*, 52(1), 363–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.363>
- Hegarty, J.W., Guinane, C.M., Ross, R.P., Hill, C., Cotter, P.D. (2016). Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait?. *F1000Res.*, 5:2587. Published 2016 Oct 27. doi:10.12688/f1000research.9615.1
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H. y Yi, H. (2020). Antimicrobial peptides: Classification, design, application and research progress in multiple fields. *Frontiers in Microbiology* 11:582779. doi: 10.3389/fmicb.2020.582779
- Jensen, C., Li, H., Vestergaard, M., Dalsgaard, A., Frees, D., y Leisner, J. J. (2020). Nisin damages the septal membrane and triggers DNA condensation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01007>
- Joo, N.E., Ritchie, K., Kamarajan, P., Miao, D., y Kapila, Y.L. (2012). Nisin, an apoptogenic bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHAC1. *Cancer Medicine*, 1 (3), 295–305. <https://doi.org/10.1002/cam4.35>
- Khelissa, S., Chihib, N. E., y Gharsallaoui, A. (2021). Conditions of nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and its main uses as a food preservative. In *Archives of Microbiology* (Vol. 203, Issue 2, pp. 465–480). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02054-z>
- Komal, R., Sharma, R., Preet, S. (2019). Augmented therapeutic efficacy of 5-fluorouracil in conjunction with lantibiotic Nisin against skin cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 520: 551-559. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.10.058>
- Lin, L., Chi, J., Yan, Y., Luo, R., Feng, X., Zheng, Y., Xian, D., Li, X., Quan, G., Liu, D., Wu, C., Lu, C., y Pan, X. (2021). Membrane-disruptive

- peptides/peptidomimetics-based therapeutics: Promising systems to combat bacteria and cancer in the drug-resistant era. In *Acta Pharmaceutica Sinica B* (Vol. 11, Issue 9, pp. 2609–2644). Chinese Academy of Medical Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.07.014>
- Lei J, Sun L, Huang S, et al. (2019). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*. 11(7):3919-3931.
- Małaczewska, J., y Kaczorek-Łukowska, E. (2021). Nisin—A lantibiotic with immunomodulatory properties: A review. In *Peptides* (Vol. 137). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.170479>
- Morbioli, G. G., Mazzu-Nascimento, T., Aquino, A., Cervantes, C., y Carrilho, E. (2016). Recombinant drugs-on-a-chip: The usage of capillary electrophoresis and trends in miniaturized systems – A review. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 935, pp. 44–57). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.019>
- Munita, J. M., y Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Muñoz-Solórzano, L., Willis-Ureña, K., Valverde-Rojas, S., Jarquín-Cordero, M. y Barboza-Fallas, L. (2024). Microalgae as expression systems for recombinant protein production. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, No especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág. 38-53. <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7608>
- Naghavi, M., Vollset, S. E., Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Gray, A. P., Wool, E. E., Robles Aguilar, G., Mestrovic, T., Smith, G., Han, C., Hsu, R. L., Chalek, J., Araki, D. T., Chung, E., Raggi, C., Gershberg Hayoon, A., Davis Weaver, N., Lindstedt, P. A., Smith, A. E., ... Murray, C. J. L. (2024). Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, 404(10459), 1199–1226. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1)
- Nordström, R., Nyström, L., Andrén, O. C. J., Malkoch, M., Umerska, A., Davoudi, M., Schmidtchen, A., y Malmsten, M. (2018). Membrane interactions of microgels as

- carriers of antimicrobial peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 513, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.11.014>
- O'Flaherty, R., Bergin, A., Flampouri, E., Mota, L. M., Obaidi, I., Quigley, A., Xie, Y., y Butler, M. (2020). Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. In *Biotechnology Advances* (Vol. 43). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107552>
- OMS (2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Overton, T. W. (2014). Recombinant protein production in bacterial hosts. In *Drug Discovery Today* (Vol. 19, Issue 5, pp. 590–601). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.008>
- Özel, B., Şimşek, Ö., Akçelik, M., y Saris, P. E. J. (2018). Innovative approaches to nisin production. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 102, Issue 15, pp. 6299–6307). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9098-y>
- Palomares, L. A., Estrada-Mondaca, S., y Ramírez, O. T. (s.f.). *Production of Recombinant Proteins Challenges and Solutions*. www.phrma.org
- Parachin, N. S., Mulder, K. C., Viana, A. A. B., Dias, S. C., y Franco, O. L. (2012). Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. In *Peptides* (Vol. 38, Issue 2, pp. 446–456). <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.020>
- Perozeni, F. y Baier, T. (2023). Current nuclear engineering strategies in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Life*, 13, 1566. <https://doi.org/10.3390/life13071566>
- Prestinaci, F., Pezzotti, P. y Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. In *Pathogens and Global Health* (Vol. 109, Issue 7, pp. 309–318). Maney Publishing. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>

- Ponce-Alonso J. (2019). *Expresión del péptido antimicrobiano nisina en microalgas*. [Tesis maestría], Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Ramazi, S., Mohammadi, N., Allahverdi, A., Khalili, E., y Abdolmaleki, P. (2022). A review on antimicrobial peptides databases and the computational tools. In *Database* (Vol. 2022). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/database/baac011>
- Rasala, B. A., Muto, M., Lee, P. A., Jager, M., Cardoso, R. M. F., Behnke, C. A., Kirk, P., Hokanson, C. A., Crea, R., Mendez, M., y Mayfield, S. P. (2010). Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnology Journal*, 8(6), 719–733. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00503.x>
- Reyes-Barrera, K. L., Soria-Guerra, R. E., López-Martínez, R., Huerta, L., Salinas-Jazmín, N., Cabello-Gutiérrez, C., y Alpuche-Solís, Á. G. (2021). The entry blocker peptide produced in *Chlamydomonas reinhardtii* inhibits influenza viral replication *in vitro*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 641420.
- Rima, M., Rima, M., Fajloun, Z., Sabatier, J.-M., Bechinger, B., y Naas, T. (2021). Antimicrobial peptides: A potent alternative to antibiotics. *Antibiotics*, 10, 1095. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091095>
- Roopashri, A. N., y Savitha, J. (2022). Screening of freshwater microalgae species for occurrence of lectins and their carbohydrate-binding specificity. *Journal of Applied Biological Sciences E*, 16(1), 24–34. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5826031>
- Rosales-Mendoza, S., Paz-Maldonado, L. M. T., y Soria-Guerra, R. E. (2012). *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: Current status and perspectives. *Plant Cell Reports*, 31(3), 479–494. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1186-8>
- Rosales-Mendoza, S., Solís-Andrade, K.I., Márquez-Escobar, V.A., González-Ortega, O. y Bañuelos-Hernandez, B. (2020) Current advances in the algae-made biopharmaceuticals field. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 20: 751–766. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1739643>

- Sahreen, S., Sharif, S., Ahmad, H., y Mukhtar, H. (2023). Comparison of host expression systems used for efficient recombinant proteins production. In *Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences: Part B* (Vol. 60, Issue 1, pp. 5–28). Giunti. [https://doi.org/10.53560/PPASB\(60-1\)731](https://doi.org/10.53560/PPASB(60-1)731)
- Sampaio de Oliveira, K. B., Leite, M. L., Rodrigues, G. R., Duque, H. M., da Costa, R. A., Cunha, V. A., de Loiola Costa, L. S., da Cunha, N. B., Franco, O. L., y Dias, S. C. (2020). Strategies for recombinant production of antimicrobial peptides with pharmacological potential. In *Expert Review of Clinical Pharmacology* (Vol. 13, Issue 4, pp. 367–390). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17512433.2020.1764347>
- Stenvinkel, P., Ketteler, M., Johnson, R.J., Lindholm, B., Pecoits-Filho, R., Riella, M., Heimbürger, O., Cederholm, T., y Girndt, M. (2005). IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney international*, 67(4): 1216–1233. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00200.x>
- Scherer, K.M., Spille, J.H., Sahl, H.G., Grein, F., & Kubitscheck, U. (2015). The lantibiotic nisin induces lipid II aggregation, causing membrane instability and vesicle budding. *Biophysical Journal*, 108(5):1114-1124. doi:10.1016/j.bpj.2015.01.020
- Sproles, A.E., Fields, F. J., Smalley, T. N., Le, C. H., Badary, A., Mayfield, S. P. (2021). Recent advancements in the genetic engineering of microalgae. *Algal Research*, 53, 2211-9264. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102158>.
- Soltani, S., Boutin, Y., Couture, F. *et al.* (2022). *In vitro* assessment of skin sensitization, irritability and toxicity of bacteriocins and reuterin for possible topical applications. *Scientific Reports* **12**, 4570. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08441-4>
- Sun Y, and Shang D (2015) Inhibitory Effects of antimicrobial peptides on lipopolysaccharide-induced inflammation. *Mediators of inflammation*, 167572. <https://doi.org/10.1155/2015/167572>

- Tong, Z., Ni, L., y Ling, J. (2014). Antibacterial peptide nisin: a potential role in the inhibition of oral pathogenic bacteria. *Peptides*, 60:32-40. doi:10.1016/j.peptides.2014.07.020
- Tripathi, N. K., y Shrivastava, A. (2019). Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: Expression hosts and process development. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 7). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420>
- Weixler, D., Berghoff, M., Ovchinnikov, KV., et al. (2022). Recombinant production of the lantibiotic nisin using *Corynebacterium glutamicum* in a two-step process. *Microbial Cell Factories*. 2022;21(1):11. Published 2022 Jan 15. doi:10.1186/s12934-022-01739-y
- Zaschke-Kriesche, J., Reiners, J., Lagedroste, M., y Smits, S. H. J. (2019). Influence of nisin hinge-region variants on lantibiotic immunity and resistance proteins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(17), 3947-3953. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.014>.
- Zhang, MP., Wang, M. y Wang, C. (2021) Nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A review. *Biochimie* 181: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.11.016>.
- Zheng, Y., Du, Y., Qiu, Z., Liu, Z., Qiao, J., Li, Y., y Caiyin, Q. (2022). Nisin variants generated by protein engineering and their properties. In *Bioengineering* (Vol. 9, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9060251>
- Zimina, M., Babich, O., Prosekov, A, et al. (2020). Overview of global trends in classification, methods of preparation and application of bacteriocins. *Antibiotics (Basel)*, 9(9):553. Published 2020 Aug 28. doi:10.3390/antibiotics9090553

9. Anexos

10.1 Extracción de ADN de microalgas

Se centrifugaron 5 mL de microalgas a 16,000 g durante 2 minutos, una vez que se tenía suficiente biomasa se siguió el protocolo de (Doyle, 1991). Se agregaron 700 µL de buffer de Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Tris-HCl 100 mM pH 8; EDTA 20 mM; NaCl 1.4 M; CTAB 2%; 2-Mercaptoetanol 0.2%; Metabisulfito de sodio 0.1%; Polivinilpirrolidona 0.1%) previamente calentado a 65 °C en baño maría. Se mezcló en vortex por 50 segundos e incubó por 30 minutos a 65 °C mezclando en vortex cada 4 minutos. Enseguida se colocó la muestra en hielo y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga nuevo. Se agregaron 0.4 µL de RNasa a 100 mg/mL y se mezcló por inversión, después se incubó por 20 minutos a 37°C. Se agregaron 500 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó por inversión. Se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante en un tubo de microcentrífuga nuevo. Se agregó 1 volumen igual de isopropanol frío y se mezcló por inversión. La mezcla se incubó a -20 °C durante 45 minutos o toda la noche. Se centrifugó a 15,000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de buffer de lavado frío (acetato de sodio 10 mM pH 4.8; etanol 76%) y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se conservó la pastilla a la cual se le agregó 1 mL de etanol al 70% frío y se mezcló por inversión. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y la pastilla se secó a -40 °C por 10 minutos y se resuspendió en agua destilada. Finalmente, la calidad del ADN se verificó mediante una electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1% a 100 V por 15 minutos.

9.2 Preparación de gel de poliacrilamida

Gel concentrador al 4% (Para 1 gel 4 mL)	
Acrilamida	0.198 mL
Agua	0.904 mL
Tris 0.5M pH6.8	0.375 mL

SDS 10%	0.025 mL
PSA 10%	0.025 mL
TEMED	0.0025 mL

Gel separador al 12% (Para 1 gel 4 mL)	
Acrilamida	2.474 mL
Agua	1.200 mL
Tris 1.5 M pH 8.8	1.250 mL
SDS 10%	0.060 mL
PSA 10%	0.050 mL
TEMED	0.005 mL

10.3 Preparación de medios de cultivos y soluciones

Medio Tris Acetato Fosfato (TAP) para 1L

Tris base	2.42 g
K(PO) ₄	0.375 mL
Solución de metales	1 mL
Sales TAP	25 mL
Agar	20 g

Medio Luria Bertani (LB) para 1L

Triptona	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
Ajustar pH 7.5 y esterilizar 15 psi durante 15 min	



Expression of nisin in *Scenedesmus acutus* and evaluation of its antimicrobial activity

Julietta Ponce-Alonso · Luzmila Martínez-González ·
Ángel Gabriel Alpuche-Solis · Fidel Martínez-Gutiérrez ·
Ana Cecilia Lorenzo-Leal · Horacio Bach · Ruth Elena Soria-Guerra

Received: 12 November 2024 / Revised: 19 May 2025 / Accepted: 26 May 2025
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2025

Abstract

Objectives The study aimed to express a synthetic nisin gene in the nucleus of the green microalga *Scenedesmus acutus* UTEX 72 and evaluate its antimicrobial activity in vitro against *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), and *Listeria monocytogenes* (ATCC 19118). **Results** Nuclear transformation of *S. acutus* was achieved through co-culture with *Agrobacterium tumefaciens*. PCR analysis confirmed the presence of the *Nis* gene in the transformant lines, while ELISA quantified the total protein content. Results showed that nisin was predominantly expressed in the total

soluble protein fraction, with the highest yield reaching 2.24 µg/µl. Antimicrobial assays demonstrated growth inhibition in all three tested Gram-positive bacteria. *S. aureus* and *L. monocytogenes* were inhibited after 60 min of exposure to 14.3 µg/ml of transgenic nisin, whereas *E. faecalis* needed 55 µg/ml and 180 min for inhibition. No antimicrobial activity was observed with wild-type *S. acutus* total soluble protein.

Conclusions Nisin was successfully expressed in the nucleus of *S. acutus*, exhibiting antimicrobial activity against *S. aureus*, *L. monocytogenes*, and *E. faecalis*. These findings highlight *S. acutus* as a promising platform for the production of transgenic antimicrobial peptides, offering a potential alternative for combating pathogenic bacteria.

J. Ponce-Alonso · L. Martínez-González ·
F. Martínez-Gutiérrez · R. E. Soria-Guerra (✉)
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma
de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava No.6, Zona
Universitaria, C.P. 78210 San Luis Potosí, México
e-mail: ruth.soria@uaslp.mx

Á. G. Alpuche-Solis
Instituto Potosino de Investigación Ciencia y Tecnología,
A.C. Camino a La Presa San José 2055, Col. Lomas 4
Sección, C.P. 78216 San Luis Potosí, México

F. Martínez-Gutiérrez
Centro de Investigación en Ciencias de La Salud y
Biomédicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí,
San Luis Potosí, México

A. C. Lorenzo-Leal · H. Bach
Division of Infectious Diseases, Department of Medicine,
University of British Columbia, Vancouver, Canada

Keywords *Agrobacterium tumefaciens* ·
Antimicrobial peptide · Expression platform · Nisin ·
Nuclear transformation · Microalga

Introduction

Antimicrobial resistance is a global crisis driven by multiple factors, including the overuse of antibiotics, contaminated water sources, and improper antibiotic usage. Antimicrobial peptides (AMPs) have attracted considerable attention as potential alternatives to conventional antibiotics due to their structural diversity and rapid, broad-spectrum antimicrobial

