**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA**

**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

---

**Tema:** Evaluación de la capacidad antimicrobiana de la beta-purotionina obtenida de trigo harinero (*Triticum aestivum*) frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus y Listeria monocytogenes*

---

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autora:** Nayeli Stephanie Sánchez Zamora

**Tutora:** Mg. María Daniela Garces Moncayo

**Ambato – Ecuador**

**Julio - 2025**

## APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. María Daniela Garcés Moncayo

**CERTIFICA:**

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 23 de Junio del 2025

Firmado electrónicamente por:
MARIA DANIELA
GARCES MONCAYO
Validar únicamente con FirmaEC

Mg. María Daniela Garcés Moncayo
1803571585
**TUTOR**

## AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Nayeli Stephanie Sánchez Zamora, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Nayeli Stephanie Sánchez Zamora
1804445755
**AUTOR**

## DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Nayeli Stephanie Sánchez Zamora
1804445755
**AUTOR**

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
LORENA DE LOS ANGELES NUNEZ VILLACIS
Validar únicamente con FirmaEC

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

Firmado electrónicamente por:
DANIEL ALBERTO ARMAS REAL
Validar únicamente con FirmaEC

Ing. Mg. Daniel Alberto Armas Real

1803542214

Firmado electrónicamente por:
LILIANA PAULINA LALALEO CORDOVA
Validar únicamente con FirmaEC

Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

1803601853

Ambato, 09 de Julio del 2025

## DEDICATORIA

*Dedico este trabajo con todo mi cariño y gratitud a quienes han sido el pilar fundamental de mi vida.*

*A mi madre Mirian Zamora, por su amor incondicional, por enseñarme con su ejemplo el valor del esfuerzo, la honestidad y la perseverancia. Su apoyo ha sido la fuerza que me ha impulsado a seguir adelante en cada momento de dificultad.*

*A mi padre Noe Sánchez que, aunque ya no puedo verte ni escucharte, siento tu presencia a mi lado, alentándome a cumplir mis sueños y a ser la mejor versión de mí misma. Sé que estarías feliz y emocionado por este logro, y eso me llena de motivación para seguir avanzando.*

*A mi familia, que siempre ha creído en mí, incluso cuando yo misma dudé en especial a mi Tía Norma Zamora. Gracias por brindarme su aliento en los momentos más desafiantes y por acompañarme con paciencia y comprensión a lo largo de este camino.*

*A Anthony Sandoval, gracias por ser mi compañero de vida, mi confidente y mi mayor apoyo. Tu amor incondicional, tu paciencia y tu comprensión han sido un pilar fundamental para mí en este camino.*

*A mis amigos, que han sido un pilar fundamental en este recorrido. Gracias por sus palabras de aliento, por celebrar conmigo cada pequeño logro y por estar ahí en los momentos más difíciles. Su amistad ha sido un tesoro invaluable.*

*A mis profesores y mentores, cuya guía y conocimientos han sido luz en mi formación académica y personal.*

*Y a mí misma, por no rendirme, por confiar en mis capacidades y por haber dado lo mejor en cada paso de este proceso. Esta dedicatoria también es un recordatorio de que los sueños se alcanzan con constancia, pasión y fe.*

*Gracias a todos ustedes por ser parte de esta etapa tan importante de mi vida. Su amor, apoyo y guía han sido fundamentales para llegar hasta aquí, y les estaré eternamente agradecida.*

## AGRADECIMIENTO

*A lo largo del desarrollo de este trabajo de titulación, he contado con el apoyo, la guía y el acompañamiento de personas e instituciones que fueron fundamentales para alcanzar este logro. Es por ello que quiero expresar mi más sincero agradecimiento.*

*En primer lugar, agradezco profundamente a* ***Dios****, por brindarme la fortaleza, paciencia y salud para culminar esta etapa académica. A mi familia, en especial a mis padres, por su amor incondicional, por creer en mí incluso en los momentos más difíciles y por enseñarme el valor del esfuerzo y la perseverancia. Sin su apoyo moral, emocional y económico, este logro no habría sido posible.*

*A mi* ***tutora de tesis****, Ing. María Daniela Garcés, por su valiosa orientación, compromiso y conocimientos compartidos a lo largo del proyecto. Su experiencia y disposición fueron clave para el desarrollo de este trabajo. También extiendo mi gratitud a los docentes y autoridades de la facultad, quienes aportaron con enseñanzas que han marcado mi formación profesional.*

*Agradezco a los distintos laboratorios de la Universidad Técnica de Ambato donde se llevaron a cabo los ensayos experimentales, por facilitarme el espacio, los equipos y los insumos necesarios para realizar la investigación. A mis compañeros y colegas de laboratorio, gracias por su colaboración, compañerismo y por compartir conmigo esta etapa de aprendizaje.*

*Finalmente, a todas aquellas personas que, de una u otra forma, formaron parte de este proceso: gracias por ser parte de este logro que marca el cierre de una etapa y el inicio de nuevos retos profesionales.*

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

**APROBACIÓN DEL TUTOR** ..... **II**

**AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN** ..... **III**

**DERECHOS DE AUTOR** ..... **IV**

**APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO** ..... **V**

**DEDICATORIA** ..... **VI**

**AGRADECIMIENTO** ..... **VII**

**RESUMEN EJECUTIVO** ..... **XIII**

**ABSTRACT** ..... **XIV**

**CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO** ..... **1**

**CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA** ..... **8**

**CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN** ..... **19**

**CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES** ..... **37**

**4.2 Recomendaciones** ..... **38**

**CAPÍTULO V.- Referencias Bibliográficas** ..... **39**

**ANEXOS** ..... **45**

## ÍNDICE DE TABLAS|

**Tabla 1** Reactivos, material fungible y equipos utilizados durante la investigación .....8
**Tabla 2** Crecimiento de *E. coli* BL21 sin plásmido .....24
**Tabla 3** Cinética del replegamiento de la proteína .....28
**Tabla 4** Perfil de purificación de β-purotionina en columnas Ni-NTA.....30
**Tabla 5** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de β-purotionina .....35
**Tabla 6** Concentración mínima bactericida (CMB) de β-purotionina .....35

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1** Representación de la gráfica de la placa de microtitulación .....17
**Figura 2** Representación de la metodología de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). .....18
**Figura 3** Representación de la metodología de Concentración Mínima Bactericida (CMB).....18
**Figura 4** Diseño del vector pET-31b(+)_β-purotionina .....21
**Figura 5** Eficiencia del proceso de transformación en *E. coli* BL21 .....23
**Figura 6** Curva de crecimiento de *E. coli* BL21(DE3) sin plasmido .....25
**Figura 7** Análisis SDS-PAGE luego de la lisis celular .....26
**Figura 8** Curva de absorbancia durante el replegamiento de proteína .....28
**Figura 9** Análisis SDS-PAGE luego del replegamiento de la proteína.....31
**Figura 10** Análisis SDS-PAGE luego de Escisión química.....32
**Figura 11** Reactivación de cepas bacterianas.....33
**Figura 12** Evaluación de la capacidad mínima inhibitoria (CMI) .....34

## ÍNDICE DE ECUACIONES

**Ecuación 1** Volumen de plásmido .....22
**Ecuación 2** Número de unidades formadoras de colonias.....24
**Ecuación 3** Eficiencia de Transformación .....24
**Ecuación 4** Ley de Lambert-Beer.....29

## ÍNDICE DEANEXOS

**Anexo 1** Siembra de *E. coli* BL21 (DE3) en agar McConkey.....45
**Anexo 2** Transformación con el plásmido recombinante .....45
**Anexo 3** Inserción por choque termico.....45
**Anexo 4** Selección de transformante .....46
**Anexo 5** Numero de colonias después del proceso de transformación.....46
**Anexo 6** Inducción de la expresión del péptido antimicrobiano.....47
**Anexo 7** Lisis celular.....47
**Anexo 8** Solubilización en condiciones desnaturalizantes.....47
**Anexo 9** Replegamiento de la proteína.....48
**Anexo 10** Purificación de sobrenadante con columnas de Ni-NTA HisPur™ .....48
**Anexo 11** Escisión química de KSI/BETA-PUROTIONINA/His mediante bromuro de cianógeno (CNBr).....48
**Anexo 12** Siembra de *E. coli, S. aureus, B. cereus y L. monocytogenes* .....49
**Anexo 13** Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....49
**Anexo 14** Placa de microdilución de β-purotionina frente a cepas bacteriana .....49
**Anexo 15** Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para L. monocytogenes .....50
**Anexo 16** Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para S. aureus. .....50

## RESUMEN EJECUTIVO

La creciente aparición de bacterias resistentes a múltiples fármacos ha impulsado el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas con actividad antimicrobiana. Para ello, se diseñó un sistema de expresión recombinante en *E. coli* BL21, utilizando un vector con fusión KSI y una cola de histidinas para facilitar la purificación por afinidad mediante columnas Ni-NTA. Posteriormente, se realizó la escisión del péptido con bromuro de cianógeno y se evaluó su efecto antimicrobiano mediante pruebas de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB), utilizando resazurina como indicador metabólico. Los resultados obtenidos demostraron que la Beta-purotionina logró inhibir el crecimiento de las cuatro cepas bacterianas analizadas, mostrando mayor efectividad frente a bacterias Gram positivas, como *S. aureus* y *L. monocytogenes*. Además, en concentraciones superiores, evidenció actividad bactericida. Este estudio aporta evidencia experimental sobre el potencial uso de péptidos vegetales recombinantes como herramientas innovadoras para combatir infecciones bacterianas y se pudo concluir que este péptido posee un alto potencial como agente antimicrobiano, lo cual contribuiría en el desarrollo de tratamientos alternativos a los antibióticos tradicionales. Además, contribuye al fortalecimiento del conocimiento en el área de la biotecnología y biomedicina, representando un avance en el diseño de soluciones frente al desafío global de la resistencia bacteriana.



Palabras claves: Vector de expresión, Recombinante, Actividad inhibitoria, SDS-PAGE, Elución proteica.

**ABSTRACT**

The increasing emergence of multidrug-resistant bacteria has driven the development of new therapeutic alternatives with antimicrobial activity. To this end, a recombinant expression system was designed in *E. coli* BL21, using a KSI-fusion vector with a histidine tag to facilitate affinity purification using Ni-NTA columns. The peptide was subsequently cleaved with cyanogen bromide, and its antimicrobial effect was evaluated using minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) tests, using resazurin as a metabolic indicator. The results demonstrated that beta-purothionine inhibited the growth of the four bacterial strains analyzed, showing greater effectiveness against Gram-positive bacteria such as S. aureus and L. monocytogenes. Furthermore, at higher concentrations, it demonstrated bactericidal activity. This study provides experimental evidence on the potential use of recombinant plant peptides as innovative tools to combat bacterial infections. It was concluded that this peptide has significant potential as an antimicrobial agent, which would contribute to the development of alternative treatments to traditional antibiotics. Furthermore, it contributes to strengthening knowledge in the areas of biotechnology and biomedicine, representing a breakthrough in the design of solutions to the global challenge of bacterial resistance.

Keywords: Expression vector, Recombinant, Inhibitory activity, SDS-PAGE, Protein elution.

# CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

## 1.1. Antecedentes Investigativos

### 1.1.1 Justificación

Cada año, la resistencia a los antibióticos causa infecciones difíciles de tratar en millones de personas, lo que representa una crisis de la salud mundial en crecimiento **(Garnacho-Montero & Amaya-Villar, 2022).** Ante la amenaza de que los antibióticos tradicionales pierdan eficacia, la búsqueda de alternativas antimicrobianas innovadoras es urgente. Diversas investigaciones han señalado que ciertos péptidos antimicrobianos, como las tioninas presentes en plantas del género *Triticum*, pueden inhibir el crecimiento de patógenos, como *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Salmonella spp* y *Candida albicans* **(Oliveira et al., 2024),** lo que sugiere su posible uso como nuevos agentes antimicrobianos. Explorar la efectividad de estos péptidos contra bacterias resistentes a los antibióticos, a través de su expresión en *E. coli*, podría abrir tratamientos antimicrobianos alternativos. Por lo tanto, esta investigación busca evaluar la capacidad antimicrobiana de las tioninas obtenidas de *Triticum aestuvym* frente a cepas ATCC.

Diversos estudios han demostrado que los péptidos antimicrobianos de origen vegetal, como las tioninas, pueden desestabilizar las membranas de patógenos, logrando una inhibición significativa en el crecimiento de bacterias multirresistentes, con tasas de inhibición que en algunos casos superan el 80% **(Parisi etal., 2024).** La expresión heteróloga de estos péptidos en *E. coli* facilita su producción en cantidades suficientes para realizar pruebas extensivas, permitiendo replicar estos efectos en el laboratorio **(Abbas et al., 2024).**

En el estudio realizado por **Boonpa et al. (2019),** se hizo un análisis in silico de las 44 tioninas del arroz (*Oryza sativa*) (OsTHIONs), sugiriendo su participación en respuestas al estrés biótico, abiótico y nutricional. Se seleccionó un péptido recombinante de OsTHION15 (LOC_Os06g32600) producido en *Escherichia coli*, el cual mostró actividades inhibitorias significativas: 112,6 µg/ml contra *Xanthomonas oryzae* (con un

porcentaje de inhibición del 100%) y 14,1 µg/ml contra *Pectobacterium carotovorum* (también con un 100% de inhibición). Además, se observó una inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Helminthosporium oryzae*, lo que sugiere el potencial de OsTHION15 en el control de enfermedades vegetales.

Se plantea que las tioninas de *Triticum aestivum*, expresadas en *E. coli*, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de cepas ATCC. Este estudio busca confirmar su potencial como alternativa frente a cepas resistentes a antibióticos. Al demostrar su eficacia, se abrirían nuevas posibilidades para el desarrollo de tratamientos nuevos. Además, se implementará controles de las condiciones experimentales, incluyendo la temperatura, la humedad y el tiempo de incubación. Por medio de la concentración mínima inhibitoria como metodología estándar que facilita la comparación de la actividad antimicrobiana, para evaluar el potencial de las tioninas como agentes antimicrobianos **(Parapouli et al., 2020)**

### 1.1.2 Resistencia Antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana es un fenómeno global que ha alcanzado proporciones alarmantes, representando una de las mayores amenazas para la salud pública mundial **(Salam et al., 2023).** Los organismos patógenos resistentes a múltiples antibióticos, como *Escherichia coli*, están involucrados en infecciones de diversa gravedad, lo que hace urgente la búsqueda de nuevos tratamientos antimicrobianos **(Zumbado et al., 2022).** Uno de los enfoques emergentes para combatir esta resistencia son los péptidos antimicrobianos, que son sustancias bioactivas producidas por organismos vivos, tales como plantas, bacterias y hongos. Estos péptidos poseen la capacidad de alterar las membranas celulares de las bacterias, lo que provoca su muerte **(Mahlapuu et al., 2016).** Entre estos, tioninas extraídas de plantas como *Triticum aestivum* se han destacado por sus propiedades antimicrobianas, debido a su capacidad para interferir con las membranas de las bacterias.

#### 1.1.2.1 Clasificación de los péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos son esenciales en la defensa innata de los organismos y se clasifican en varias categorías. Según su estructura secundaria, se dividen en péptidos α-helicoidales (magaininas), β-hidrofóbicos (defensinas) y en bucle (catelicidinas)

**(Mihaylova-Garnizova et al., 2024).** En términos de composición de aminoácidos, se destacan aquellos ricos en cisteína (defensinas), en arginina y lisina (LL-37), y los hidrofóbicos (melitina). Por origen, pueden ser de origen animal (temporinas), vegetal (tioninas) o microbiano (lantibióticos). Su mecanismo de acción incluye inhibidores de la síntesis de pared celular (nisin), disruptores de membrana (melitina) e inhibidores de la síntesis de proteínas (micrococina). Finalmente, se clasifican por **tamaño**, siendo los péptidos pequeños (menos de 20 aminoácidos, como magaininas) y grandes (más de 20 aminoácidos, como defensinas) **(Chen & Jiang, 2023)**. Esta diversidad estructural y funcional resalta la importancia de los PAM en la defensa contra patógenos y su potencial en aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas.

### 1.1.2.2 Mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos

La efectividad de los péptidos antimicrobianos se debe a varios mecanismos de acción. Tienen la capacidad de inducir la disrupción de membranas celulares formando poros, lo que provoca la muerte celular **(Erdem Büyükkiraz & Kesmen, 2022).** También inhiben la síntesis de la pared celular, debilitando su estructura y bloquean la síntesis de proteínas al unirse a ribosomas **(Kamal et al., 2023).** Además, algunos PAM modulan la respuesta inmune, activando células inmunitarias, pueden interferir con la replicación de ácidos nucleicos. Estos mecanismos subrayan su potencial terapéutico frente a la resistencia a los antibióticos.

La mayoría de los péptidos antimicrobianos poseen una estructura catiónica que les permite interactuar con las membranas de las células bacterianas, que generalmente son cargadas negativamente debido a su contenido de fosfolípidos **(Travkova et al., 2017).** Esta interacción causa alteraciones en la integridad de la membrana, provocando la formación de poros que desestabilizan la célula bacteriana y conducen a la lisis celular. Este mecanismo de acción no es específico en un solo tipo de bacteria, sino que puede tener un espectro amplio de acción que incluye bacterias grampositivas y gramnegativas **(Chen & Jiang, 2023).**

### 1.1.3.1 Péptidos antimicrobianos de origen vegetal.

Los péptidos de origen vegetal son compuestos bioactivos que protegen a las plantas de patógenos y tienen un gran potencial como antimicrobianos. Con longitudes de entre 10

y 50 aminoácidos, estos péptidos actúan alterando las membranas celulares de los microorganismos e inhibiendo procesos metabólicos esenciales **(Li et al., 2021)**. Ejemplos como las defensinas, que forman poros en las membranas, y las thioninas, que muestran actividad antimicrobiana, destacan en su eficacia. Ante la creciente resistencia a los antibióticos **(Lima et al., 2022)**, los PAM se investigan como alternativas viables tanto en la agricultura como en el tratamiento de infecciones bacterianas resistentes, ofreciendo soluciones innovadoras ante los desafíos actuales en el manejo de patógenos.

#### 1.1.3.2 Tioninas

Las tioninas son pequeñas proteínas, generalmente de 5 a 20 kDa, que se encuentran en diversas plantas y desempeñan un papel crucial en la defensa contra patógenos, mostrando actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos y virus. Su estructura, rica en cisteína, les permite formar enlaces disulfuro, lo que contribuye a su estabilidad **(Höng et al., 2021).** Actúan perturbando las membranas celulares de los microorganismos, lo que lleva a la muerte celular. Se han identificado diferentes tipos de tioninas en especies como arroz y trigo, y su potencial se investiga tanto en biotecnología agrícola como en medicina, donde podrían servir como biopesticidas y agentes terapéuticos contra infecciones resistentes.

#### 1.1.3.3 Beta-purotionina

La beta-purotionina proveniente del trigo es un potente péptido antimicrobiano que se inactiva por iones metálicos. A través de simulaciones de dinámica molecular en agua explícita, se han estudiado sus propiedades estructurales y mecanismos de inhibición y se ha evaluado el impacto de la temperatura y los iones metálicos. Demostrando que el plegamiento global y la hélice alfa1 son estables térmicamente, mientras que la hélice alfa2 se despliega con cambios de temperatura y en presencia de iones metálicos. La red de residuos conservados, como Arg30 y Lys5, es sensible a estas variaciones, lo que provoca el desplegamiento. Las regiones de bucle son altamente flexibles, pero también se ven afectadas por los iones metálicos, proporcionando así información sobre el mecanismo de inhibición basado en estos iones **(Oard & Karki, 2006).**

1.1.3.4 Beneficios de las tioninas

El uso de tioninas de plantas ha ganado atención debido a su capacidad para inducir la

muerte celular bacteriana de manera eficiente. La investigación sobre estas proteínas ha demostrado que, además de su capacidad antimicrobiana, las tioninas también tienen efectos antioxidantes y antiinflamatorios, lo que las hace interesantes no solo en el campo de la microbiología, sino también en la medicina y la farmacología **(Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2023).**

Aunque existen investigaciones sobre los efectos antimicrobianos de las tioninas, los estudios centrados en su capacidad frente a cepas multirresistentes son limitados. La mayoría de los estudios previos se han centrado en cepas de laboratorio no resistentes, lo que plantea la necesidad de evaluar más a fondo su potencial contra patógenos resistentes (J. Li et al., 2021)**.** Esta es la brecha que el presente estudio busca abordar, al evaluar de manera sistemática la efectividad de las tioninas producidas en *E. coli* BL21 frente a cepas ATCC.

### 1.1.3 Expresión y producción de péptidos antimicrobianos.

#### 1.1.4.1 Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana

En la actualidad, la evaluación de la actividad antimicrobiana se realiza a través de diversos métodos estandarizados que permiten medir la efectividad de los agentes antimicrobianos de manera precisa y

confiable, entre los cuales destacan la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y las pruebas de actividad en tiempo real (J. Li et al., 2021)**.** Este procedimiento es esencial para evaluar la eficacia de diferentes compuestos antimicrobianos y desempeña un papel critico en el desarrollo de nuevos antibióticos, así como la evaluación de resistencia bacteriana. En cuanto a sus aplicaciones prácticas, la determinación de la MIC se utiliza en el tratamiento de infecciones comunes causadas por patógenos conocidos, como *Escherichia coli***,** *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.*

#### 1.1.4.2 *E. coli* BL21 (DE3): El huésped ideal para la expresión de proteínas recombinantes.

Esta cepa de *E. coli* es reconocida como el mejor huésped para la expresión de proteínas

recombinantes, destacándose por su sistema promotor T7 inducible que permite un control eficiente de la expresión, esta cepa ha sido optimizada para reducir la degradación de proteínas mediante la eliminación de proteasas, lo que mejora la estabilidad y recuperación de las proteínas producidas **(Zhu et al., 2021).** Su fácil manipulación genética y rápido crecimiento la convierten en una herramienta esencial en biotecnología, facilitando la producción de proteínas terapéuticas y antígenos para vacunas.

#### 1.1.4.3 Importancia de las cepas ATCC

La utilización de cepas ATCC sirve como referencia en estudios microbiológicos, es clave para la evaluación estandarizada de la actividad antimicrobiana. Estas cepas permiten obtener datos precisos y reproducibles, facilitando la comparación de resultados con otras investigaciones en el campo **(Oliveira Rosas et al., 2019).**

#### 1.1.4.4 Cepas ATCC.

Las cepas ATCC son considerados un recurso fundamental en la microbiología y en la biotecnología, debido a que desempeñan un papel muy importante en investigaciones científicas y en el desarrollo de productos biotecnológicos **(Oliveira Rosas et al., 2019)**. La colección América de Cultivos (ATCC) se ha encargado de distribuir microorganismos rigurosamente caracterizados y estandarizados, dando confiabilidad a los cultivos celulares utilizados.

Estandarizar cepas bacterianas garantiza la identidad y la pureza de cada cultivo, en este proceso se caracterizan de manera fisiológica, morfológica y genética, permitiendo a los investigadores que utilicen las cepas como un punto de referencia para estudios microbiológicos.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad antimicrobiana de la beta-purotionina obtenida de trigo harinero (*Triticum aestivum*) frente *a cepas de Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus y Listeria monocytogenes*.

### 1.2.2 Objetivos específicos

1. Expresar el gen de Beta-purotionina en *Escherichia coli* BL21.
2. Purificación de Beta-purotionina con columnas de Ni-NTA HisPur™**.**
3. Evaluar la actividad antimicrobiana de Beta-purotionina frente a cepas bacterianas de *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus y Listeria monocytogenes.*

# CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

## 2.1 Materiales

El presente trabajo de titulación fue de tipo experimental y se llevó a cabo en los Laboratorios de la UODIDE de la Universidad Técnica de Ambato. Para la evaluación de la capacidad antimicrobiana de la beta-purotionina obtenida de trigo harinero (*Triticum aestivum*) frente a cepas de *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus y Listeria monocytogenes*, se emplearon diversas técnicas tanto microscópicas como moleculares, requiriendo una serie específica de materiales, reactivos y equipos. En la **Tabla 1**, se enlistan los reactivos, material fungible y equipos que se utilizaron durante la investigación.

***Tabla 1***

*Reactivos, material fungible y equipos utilizados durante la investigación.*

| Categoría | Material | Cantidad |
|---|---|---|
| **Reactivos** | Medio Luria Bertani (LB) | 100 g |
| | IPTG (isopropil-B-tiogalactopiranósido) | 1.5 g |
| | Marcador de Proteína | 1 mL |
| | SDS (Dodecilsulfato sódico) | 25 g |
| | Tampón Tfb I | 100 mL |
| | Tampón Tfb II | 100 mL |
| | Ampicilina | 100 mg |
| | Acrilamida | 100 g |
| | Glucosa | 10 mL |
| | Alcohol 70% | 4 L |
| | Alcohol 90% | 3 L |
| | Azul de Coomassie | 12 g |
| | Tampón de Lisis | 10 mL |
| | Kanamicina | 50 mg |
| | Glicerol estéril | 100 mL |
| | $CaCl_2$ | 50 g |
| | Imidazol | 25 g |
| | Reactivo de Bradford | 100 mL |
| **Material** | Vasos de precipitación | 15 |

| | | |
|---|---|---|
| **fungible** | Varillas de Agitación | 3 |
| | Espátula | 3 |
| | Cajas Petri | 100 |
| | Agitadores Magnéticos | 4 |
| | Asas de Incubación | 2 |
| | Botellas de tapa azul (1 Litro) | 5 |
| | Cubetas UV/VIS | 15 |
| | Gradillas para tubos de microcentrífuga | 2 |
| | Mecheros de Alcohol | 2 |
| | Criovial 2 mL | 60 |
| | Columnas de níquel-NTA | 5 |
| | Matraces Erlenmeyer (1L) | 5 |
| | Puntas de micropipeta de 20,200 y 100 µL | 50 C/U |
| | Pipetas de 5 y 10 mL | 2C/U |
| | Tubos Eppendorf | 50 |
| | Tubos Falcon 15 mL | 40 |
| | Tubos Falcon 50 mL | 25 |
| | Papel filtro | 1 |
| | Papel aluminio | 1 |
| **Equipos** | Baño maría | 1 |
| | Incubadora | 1 |
| | Agitador incubador orbital Shaker mini-Benchmarle | 1 |
| | Autoclave Hirayma/HV-110 | 1 |
| | Pro/OHAUS | 1 |
| | Cabina de electroforesis SDS PAGE | 1 |
| | Cámara de flujo laminar Tipo I | 1 |
| | Balanza analítica | 1 |
| | Micropipeta 2-20 µL | 1 |
| | Micropipeta 100-1000 µL | 1 |
| | Centrifuga | 1 |
| | Congelador (-2˚ C) | 1 |
| | Espectrofotómetro | 1 |
| | Nevera (4˚ C) | 1 |

| | | |
|---|---|---|
| | Potenciómetro | 1 |
| | Planchas de agitación | 1 |
| | Sonicador | 1 |
| | Ultracongelador (-80˚C) | 1 |
| | Vortex | 1 |

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Expresión del péptido antimicrobiano mediante recombinación en el sistema *Escherichia coli* BL21.

#### 2.2.1.1. Optimización e identificación de la secuencia para Beta-purotionina.

Para la identificación y selección de la secuencia del péptido antimicrobiano Beta-Purotionina, se utilizó la base de datos Protein Data Bank (PDB) en la cual se realizó una búsqueda exhaustiva siendo 1BHP su código de identificación, "KSCCKSTLGRNCYNLCRARGAQKLCANVCRKLTSGLSCPKDFPK" tal y como lo describe X. Li et al. (2022). Para ello, se tomó en cuenta su amplio espectro antimicrobiano, su estabilidad estructural, bajo peso molecular y al no ser una secuencia compleja.

La secuencia codificante de aminoácidos del péptido antimicrobiano 1BHP se optimizó utilizando la herramienta GenSmart Codon Optimization que ofrece la empresa GENSCRIPT, de acuerdo con las preferencias de codones que posee el sistema de expresión *E. coli* BL21. La cepa de *E. coli* BL21 fue donada por un investigador externo para el desarrollo de este proyecto de investigación.

#### 2.2.1.2. Construcción del vector pET - 31b(+).

La síntesis del plásmido pET-31b (+) y la inserción de la secuencia optimizada de 47 aminoácidos del gen Beta-purotionina fue encomendada la empresa GENE UNIVERSAL. La construcción incluía una cola de histidinas en el extremo N-terminal del péptido, el plásmido recombinante fue recibido en forma liofilizada para su posterior transformación en células competentes de *E.coli* BL21.

2.2.1.3. Preparación de células competentes de *E. coli* BL21

Para la preparación de las células competentes se seguirá el protocolo propuesto por **(Green & Rogers, 2013)**,

La obtención de células competentes se realizó siguiendo el protocolo de (Green & Rogers, 2013), se reactivó la cepa de *E. coli* BL21 en un periodo de 14 horas hasta obtener biomasa, luego se seleccionaron colonias aisladas y se transfirieron a tubos con 10 mL de caldo LB, incubando a 37°C hasta alcanzar una DO (A600) de 0,45. Posteriormente, las células se enfriaron en hielo hasta alcanzar los 0°C durante 5 minutos y para recuperar la células se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C, una vez descartado el sobrenadante se resuspendió en 5 mL de $CaCl_2$. Luego se incubo en hielo por 30 minutos y ce centrifugó nuevamente a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C, se resuspendió el pellet en un volumen de solución de $CaCl_2$ frío con 15% de glicerol. Por último, se conservaron 100 uL en tubos estériles y se almacenaron a -80°C.

**2.2.1.4. Transformación con el plásmido recombinante**

Para la transformación del plásmido recombinante se descongelaron las células en hielo durante 30 minutos, teniendo cuidado de no realizar movimientos bruscos, pues las células son demasiadas sensibles. Luego, se añadieron 5 µL del plásmido con una concentración aproximada de 100 ng, incubándose nuevamente en hielo durante 30 minutos **(Chan et al., 2013).**

**2.2.1.5. Inserción por choque térmico**

Para el proceso de choque térmico se precalentó el baño maría a 42°C, se colocaron los tubos estériles con el plásmido pET-31b(+)-Beta-purotionina y las células hospederas en el baño maría durante 45 segundos sin realizar movimientos bruscos. Posteriormente, se dejó reposar en hielo por 5 minutos. Luego, se añadieron 250 µL de medio LB a cada tubo estéril y se incubaron a 37°C en agitación durante 1 hora **(Tian et al., 2019).**

**2.2.1.6. Selección de transformantes**.

Se sembraron 200 µL de la bacteria transformada mediante dispersión en un medio de cultivo LB suplementado con ampicilina (80µg/mL), incubando a 37°C durante toda la

noche. Las colonias azules identificadas reflejaron una transformación exitosa y se conservaron a -80 °C **(Sinha & Shukla, 2019).**

### 2.2.1.7. Inducción de la expresión del péptido.

Para la inducción de la expresión del péptido antimicrobiano se realizó un precultivo como lo menciona **(Barashkova et al., 2023).** Para esto se tomaron colonia aisladas de la bacteria transformada y se inocularon en 10 mL de caldo LB, el mismo que contenia 80 µg/mL de ampicilina, se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm durante toda la noche. En cuanto al cultivo, se realizó tomando una alícuota de 5mL y se inoculará en 100 mL de caldo LB suplementado con ampicilina 80 µg/mL y glucosa 1% v/v. Se cultivo durante toda la noche a 200 rpm hasta alcanzar una DO(A600) = 0,6. Se añadió 1 mM de IPTG (Isopropil ß-D-1- tiogalactopiranósido) para inducir la expresión y se incubo durante toda la noche a 37°C. Las células se recolectaron por centrifugación a 5000 g por 4°C por 20 minutos y el pellet se almacenó a -80°C.

### 2.2.1.8. Lisis celular.

Para la lisis celular se tomó el pellet obtenido en el paso previo y se resuspendió en 5 mL de tampón lisis (300 mM de NaCl, 50 mM de tampón $NaOH_2$, $PO_4$y 10 mM de imidazol; pH 8), se incubó en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se realizó la sonicación con una configuración de 40% de amplitud y un proceso de 10 ciclos con pulsos de 10 segundos y pausas de 10 segundos, este proceso se llevó a cabo en frio para evitar la formación de espuma. El lisado se centrifugó a 14000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se recuperó el componente soluble y posteriormente se evaluó mediante SDSPAGE **(Wu et al., 2022).**

### 2.2.1.9. Solubilización en condiciones desnaturalizantes.

Las proteínas insolubles obtenidas tras la lisis celular, principalmente presentes en cuerpos de inclusión, se solubilizaron mediante la incubación en un buffer desnaturalizante. El pellet resultante se resuspendió en una solución que contenía urea 8 M, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM y DTT 10 mM. Esta combinación tiene como objetivo desnaturalizar completamente las proteínas, romper los enlaces disulfuro y

disolver agregados proteicos. La resuspensión se realizó empleando vortex o agitación mecánica suave hasta lograr una mezcla homogénea, la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, con agitación constante. En algunos casos, se aplicaron ciclos cortos de sonicación en hielo para facilitar la ruptura de agregados persistentes. Una vez completado el proceso de solubilización, la muestra se centrifugó a 14,000 × g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante, que contiene las proteínas en estado desnaturalizado, se recuperó con cuidado y se almaceno a –20°C hasta su uso en ensayos de purificación (**A. Singh et al., 2015**).

#### 2.2.1.10. Replegamiento de la proteína.

Tras la solubilización de los cuerpos de inclusión en una solución desnaturalizante, se realizó la refuncionalización de la proteína mediante una estrategia de dilución lenta. Este método permitió reducir gradualmente la concentración del agente desnaturalizante, facilitando que la proteína recupere su conformación nativa funcional y minimizando la formación de agregados no deseados (**S. M. Singh & Panda, 2005)**.

El buffer de refolding se preparó con Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), NaCl 300 mM, la solución desnaturalizada de proteína se añadió lentamente al buffer de refolding preenfriado a 4 °C, bajo agitación constante. La adición se realizó gota a gota manteniendo una proporción de dilución de 1:20 (una parte de proteína desnaturalizada por cada 20 partes de buffer). Este proceso se extendió durante 1 a 2 horas para asegurar una transición gradual del ambiente desnaturalizante a condiciones favorables para el plegamiento. Posteriormente, la mezcla se incubó a 4 °C durante 12–16 horas bajo agitación suave para permitir un plegamiento completo. Finalmente, se centrifugó a 14,000 × g durante 20 minutos a 4 °C para eliminar agregados no plegados. El sobrenadante, que contenía a la proteína refuncionalizada, se recolectó cuidadosamente y se almaceno a –20°C.

### 2.2.2 Purificación de Beta-purotionina en *E. coli* BL21 con columnas de Ni-NTA HisPur™.

#### 2.2.2.1. Purificación de sobrenadante con columnas de Ni-NTA HisPur™.

El proceso de purificación de la beta-purotionina recombinante expresada en células de Escherichia coli BL21 involucró varios pasos clave. Primero, se cultivó el microorganismo y se cosecharon las células mediante centrifugación a 4,000-6,000 rpm durante 10 minutos. El pellet celular resultante se resuspendió en un buffer de lisis que contenía 20 mM de Tris-HCl a pH 7.5, 500 mM de NaCl. Para facilitar la ruptura de las células, se utilizó sonicación o un homogeneizador **(Alves et al., 2017)**. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 12,000 rpm durante 20 minutos a 4°C con el fin de obtener el sobrenadante, el cual contenía la proteína de interés.

A continuación, se equilibró una columna de afinidad de Ni-NTA (níquel-ácido nitrilotriacético) con 5-10 volúmenes de un buffer de unión que consistía en 20 mM de Tris-HCl a pH 7.5, 500 mM de NaCl y 10 mM de imidazol. Posteriormente, el sobrenadante se cargó lentamente en la columna, permitiendo que la proteína recombinante con etiqueta de histidina se uniera de manera específica a la matriz. Para eliminar las proteínas no unidas, se lavó la columna con 5-10 volúmenes de un buffer de lavado que contenía 20 mM de Tris-HCl a pH 7.5, 500 mM de NaCl y 20-50 mM de imidazol, monitoreando la absorbancia a 280 nm.

Finalmente, la proteína purificada se eluyó utilizando un buffer de elución que consistía en 20 mM de Tris-HCl a pH 7.5, 500 mM de NaCl y 250 mM de imidazol. Se recolectaron fracciones de 1 ml y se midió la absorbancia a 280 nm para identificar las fracciones que contenían la proteína de interés. Por último, se cuantificó la concentración de la proteína purificada mediante un ensayo de SDS-PAGE.

#### 2.2.2.2. Determinación del peso molecular mediante electroforesis SDS-PAGE.

El peso molecular del péptido recombinante se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), según el protocolo establecido por **(Brunelle & Green, 2014).** Para ello, se mezcló una alícuota de muestra con buffer de carga en una porción 1:2, el cual contiene Tris-HCl 120 mM, pH 6,8, SDS, Glycerol 20%, β-mercaptoethanol 750 mM, Azul de bromofenol 0.05%. El gel se corrió rn una cámara de electroforesis con un buffer de corrida compuesto por 25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0,1% SDS. Luego, se colocaron alícuotas 20 µL de muestra junto con el marcador de peso molecular, la corrida se realizó a 200 V durante 1 hora. Se estimó que la banda correspondiente a Beta-Purotionina y la cola de histidinas era de aproximadamente 6668

Da.

### 2.2.2.3. Escisión química de KSI/BETA-PUROTIONINA/His mediante bromuro de cianógeno (CNBr).

El producto de fusión KSI/BETA-PUROTIONINA/His fue dializado previamente con agua destilada durante toda la noche para eliminar posibles interferencias salinas. Después, se disolvió la muestra en ácido fórmico al 70% a una concentración de 10-20 mg/mL, se añadió bromuro de cianógeno (CNBr) a la solución y el tubo fue sellado herméticamente e incubado en obscuridad a temperatura ambiente durante 20 horas.

Luego de concluir con la reacción de escisión, la mezcla fue concentrada mediante evaporación rotatoria hasta eliminar completamente el disolvente. El material gelatinoso formado se resuspendio en 20 mM $KH_2PO_4$, 100 mM NaCl y el pH se ajustó a 7,4 con 1 M de $NaHCO_3$. La mezcla se agitó durante toda la noche bajo una atmosfera de nitrógeno ($N_2$) a temperatura ambiente en la obscuridad. Finalmente, la suspensión se centrifugó a 18928 g durante 45 min a 4°C y se recuperó cuidadosamente el sobrenadante, que contenía el péptido escindido (Fouani et al., 2019a).

### 2.2.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de Beta-purotionina frente a cepas bacterianas *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus y Listeria monocytogenes.*

### 2.2.3.1. Siembra de *E. coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*

Se prepararon medios de cultivo selectivos para favorecer el crecimiento de distintas cepas bacterianas, utilizando Agar Manitol Salado para *Staphylococcus aureus* ATCC® 12600 TM* y Agar Sangre para *Listeria monocytogenes* ATCC® 19115 TM*. En el caso de los cocos Gram negativos, como *Escherichia coli* ATCC® 11775 TM* y *Bacillus cereus* ATCC® 10876 TM* utilizamos Agar MacConkey. Las siembras se realizaron mediante estriado por agotamiento utilizando un asa bacteriológica, asegurando una distribución uniforme de las bacterias en la superficie del medio. Posteriormente, se Incubaron las placas a 37°C durante 48 horas para *S. aureus*, y *L. monocytogenes*, y entre 24 horas para *Escherichia coli* ATCC® 11775 TM* y *Bacillus cereus* ATCC® 10876

TM* **(Nocera et al., 2022).**

### 2.2.3.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

#### 2.2.3.2.1. Preparación de diluciones del péptido antimicrobiano.

Se disolvió el péptido antimicrobiano en agua peptonada para preparar una solución stock concentrada, de la cual se realizarán diluciones en tubos Eppendorf estériles, para obtener concentraciones de 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL y 100 µg/mL. Cada dilución fue homogenizada con un vórtex a 30 revoluciones por minuto durante 10 segundos, repitiendo este proceso por triplicado para cada concentración **(Amiri et al., 2022).**

#### 2.2.3.2.2. Preparación del inóculo bacteriano.

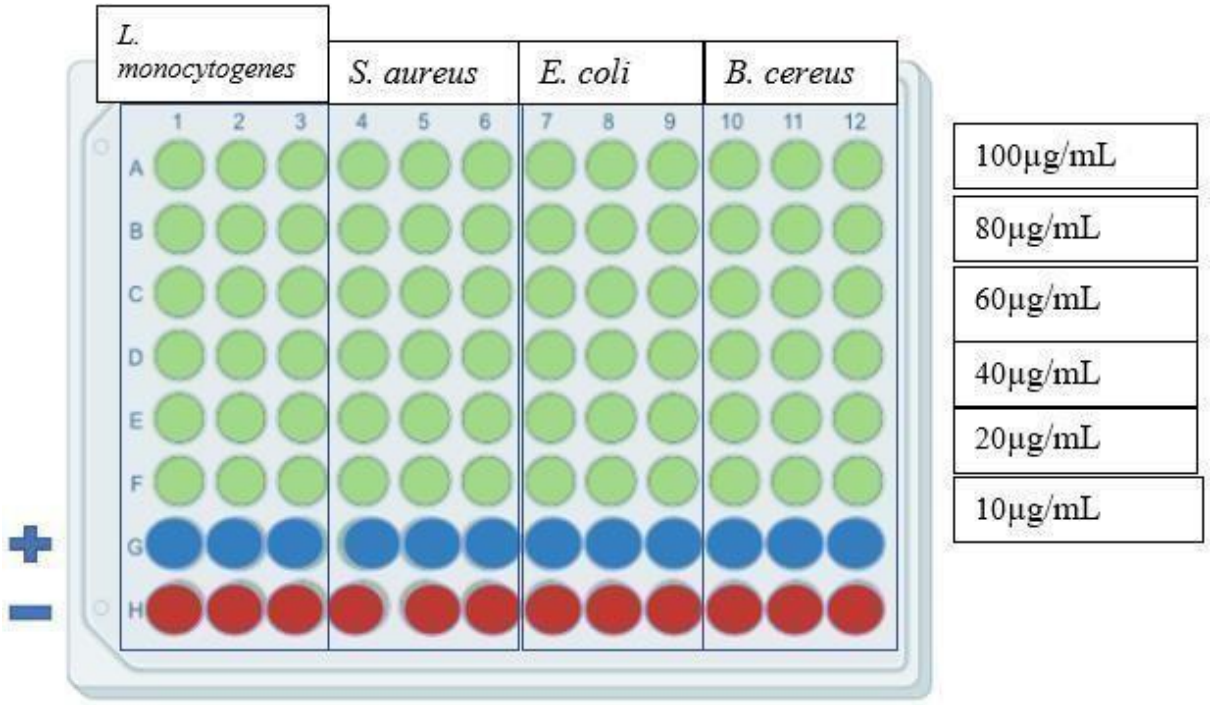
Las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 12600 TM*, *Listeria monocytogenes* ATCC® 19115 TM*, *Escherichia coli* ATCC® 11775 TM* y *Bacillus cereus* ATCC® 10876 fueron cultivadas siguiendo la metodología de (Aliakbarpour et al., 2012)**,** ajustando la densidad bacteriana hasta alcanzar una turbidez equivalente al patrón 0,5 en la escala de McFarland, equivalente a una concentración aproximada de 1,5 x 10^8 UFC/mL.

#### 2.2.3.2.3. Ensayo de microdilución en placas.

Se utilizó una placa de microtitulación de 96 pocillos tal como se observa en la **Figura 1** en la cual se añadieron 100 µL del inóculo estandarizado a cada pocillo, seguido de 100 µL de las diferentes concentraciones del péptido antimicrobiano. Para el control positivo, se añadió 100 µL de ampicilina junto al inóculo, y para el control negativo, agua peptonada. Las placas fueron selladas e incubadas a 37°C durante 24 horas, cada procedimiento fue realizado por triplicado para cada concentración y para cada bacteria **(S. Li et al., 2020).**

***Figura 1***

*Representación de la gráfica de la placa de microtitulación.*



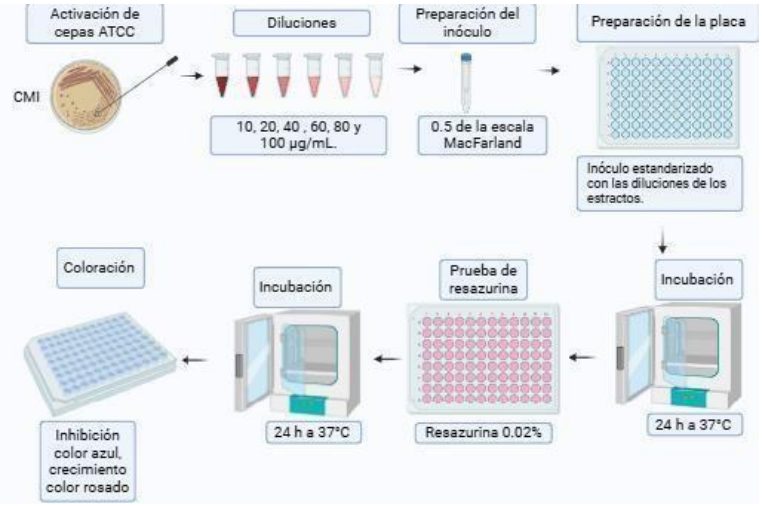

**Fuente:** Elaboración propia

**2.2.3.2.4. Lectura y análisis de la CMI.**

Después de la incubación, se añadió resazurina al 0.02% a cada pocillo para evaluar la viabilidad bacteriana. Las placas fueron inoculadas por dos horas más en condiciones de oscuridad. Al cabo de las dos horas se evaluó el cambio de color en los pocillos para evaluar el crecimiento (coloración purpura) o muerte (coloración azul) de las bacterias que se evaluarán. En los pocillos con inhibición parcial, se realizaron diluciones adicionales en los pocillos para afinar la determinación de la CMI. La concentración mínima en la cual no se observó crecimiento bacteriano visible fue considerada como la CMI. Además, se registró la absorbancia de cada pocillo mediante espectrofotometría a 570 nm.

***Figura 2***

*Representación de la metodología de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).*



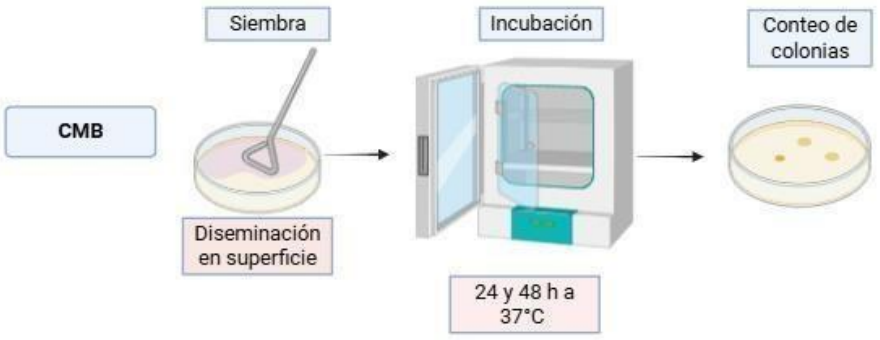

**Fuente**. Elaboración Propia

### 2.2.3.3. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Para establecer la CMB, se seleccionaron los pocillos que no mostraron crecimiento bacterisida (color azul) en el ensayo de microdilución, se tomó el contenido homogenizado de los pocillos seleccionados y se sembraron sobre la superficie de las placas de medio de cultivo utilizando un asa de Drigalsky. Las placas se incubaron a 37°C y se realizaron lecturas a las 24, 48 y 72 horas. Se consideró como CMB la concentración más baja del péptido en la que no se observaron colonias bacterianas en el medio sólido, de acuerdo con la metodología descrita por **(Mah, 2014).**

***Figura 3***

*Representación de la metodología de Concentración Mínima Bactericida (CMB).*




Fuente. Elaboración Propia

# CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 3.1. Análisis y discusión de los resultados

### 3.1.1 Expresión del péptido antimicrobiano mediante recombinación en el sistema *Escherichia coli* BL21.

#### 3.1.1.1 Optimización e identificación de la secuencia para Beta-purotionina.

Para el diseño de un sistema de expresión eficiente para la producción de la Beta-purotionina, se realizó un análisis exhaustivo en su secuencia de aminoácidos. Este péptido, pertenece al grupo de las tioninas de tipo β y tiene la capacidad de alterar la permeabilidad de las membranas celulares de cepas bacterianas, defendiendo de forma natural a las plantas frente a patógenos **(Stec, 2006)**.

En términos estructurales, la β-purotionina está compuesta por una cadena de 45 aminoácidos que incluye ocho residuos de cisteína, los cuales forman cuatro puentes disulfuro intramoleculares que le otorgan una arquitectura extremadamente estable, resistente a condiciones de desnaturalización como variaciones de pH, presencia de agentes químicos o exposición a temperaturas elevadas. Según lo reportado por Florack & Stiekema (1994), posee un punto isoeléctrico (pi) de 9.64 clasificándolo como un péptido de naturaleza básica, es decir que a pH inferiores al pi presenta una carga negativa, favoreciendo su actividad antimicrobiana al unirse con las membranas bacterianas que suelen tener carga negativa debido a la presencia de fosfolípidos aniónicos, ácido lipoteicoino o lipopolisacáridos, facilitando su adhesión, penetración y purificación.

La β-purotionina posee una superficie polarizada presentando regiones hidrofóbicas que le permiten insertarse en las bicapas lipídicas. Además, contiene zonas cargadas positivamente que favorecen su interacción electrostática con las membranas bacterianas, especialmente aquellas ricas en fosfolípidos aniónicos como fosfatidilglicerol y cardiolipina. Estudios adicionales revelaron la presencia de sitios de unión específicos para glicerol y grupos fosfato, lo que sugiere un mecanismo de acción centrado en la alteración de la estabilidad y organización de las membranas celulares de los patógenos,

facilitando la formación de poros, despolarización, pérdida de contenido celular o incluso activación de rutas de muerte celular en bacterias **(Richard et al., 2005).**

Desde un punto de vista funcional, la β-purotionina ha mostrado un amplio espectro de acción antimicrobiana, abarcando bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, así como bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y, en menor grado en *Pseudomonas aeruginosa*. También se ha documentado su efecto inhibidor frente a algunas levaduras y hongos filamentosos, aunque esta actividad parece estar influenciada por factores como la composición de la membrana del patógeno o el medio de cultivo **(Richard et al., 2002)**. Esta versatilidad ha generado interés en diversos campos, incluyendo la industria alimentaria, donde se investiga su posible uso como conservante natural, y en la medicina, como agente terapéutico complementario frente a infecciones resistentes.

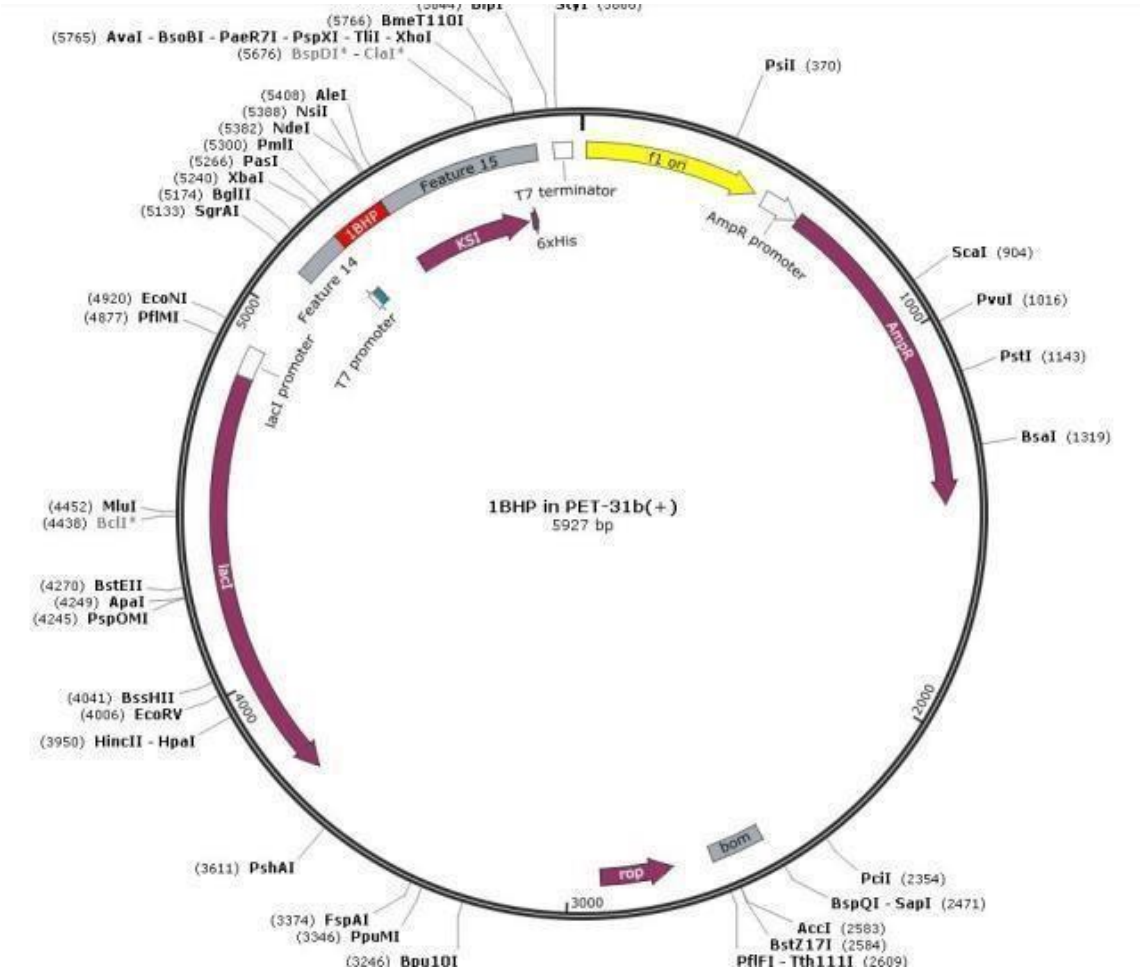
### 3.2.1.2. Construcción del vector pET - 31b(+)

La construcción del vector de expresión recombinante se realizó en base a la integración de la secuencia del gen β-purotionina, correspondiente al péptido 1BHP con 5927 pares de bases, en el interior del plásmido de expresión pET-31b(+), la secuencia fue optimizada con los codones necesarios para adaptarse al sistema de expresión *E. coli* BL21 y se sintetizó por la empresa GENE UNIVERSAL. En la **Figura 4**, se observó que el diseño presentaba una cola de histidinas (His-tag) en el extremo N-terminal, con la finalidad de facilitar la purificación del producto proteico. Además, poseía un promotor T7 de alta eficiencia que aseguraba la transformación tras la inducción con IPTG.

El vector incluía una secuencia codificante para la proteína de fusión KSI que se localizaba antes del sitio de inserción, mejorando la expresión de las proteínas difíciles de expresar, como es el caso de la β-purotionina. Además, contenía el gen bla resistente a la ampicilina, facilitándonos la selección positiva de colonias transformadas. Asimismo, se identificaron diversos sitios de restricción (EcoRI, BamHI, Ndel, Hindlll) brindando una flexibilidad en las manipulaciones genéticas **(Gladilina et al., 2023**). La organización funcional e inserción del gen optimizado de manera exitosa establecieron una base sólida para la expresión recombinante de la β-purotionina en *E. coli* BL21, mejorando su producción y purificación para ensayos funcionales.

***Figura 4***

*Diseño del vector pET-31b(+)_β-purotionina.*




*Nota.* Mapa esquemático del plásmido recombinante pET-31b(+) con la secuencia del gen 1BHP, entre los elementos claves para su expresión heteróloga en *E. coli* BL21 se visualiza al promotor T7, una región de inserción incluye una fusión con la proteína KSI y una etiqueta de histidinas **(Gene Universal, 2025).**

### 3.2.1.3. Preparación de células competentes de *E. coli* BL21

La producción de células competentes en *E. coli* BL21 se realizó de manera exitosa, obteniendo un lote homogéneo y viable para el proceso de transformación, se cultivaron colonias seleccionada en caldo LB en condiciones controladas de agitación y temperatura, permitiéndonos alcanzar una fase de crecimiento logarítmico a una densidad óptica de 0.45 a 600 nm. Para aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática y facilitar la acción del agente químico, las células fueron enfriadas con hielo hasta alcanzar los 0°C.

Los pellets obtenidos de cada ciclo se trataron en solución fría de cloruro de calcio que neutralizaba las cargas negativas facilitando la entrada de ADN exógeno, en la segunda resuspención, se adicionó glicerol al 15% como crioprotector, con la finalidad de mantener la integridad celular durante el almacenamiento a baja temperatura.
Las alícuotas obtenidas presentaban una apariencia homogénea y sin formación de agregados visibles, evidenciando su viabilidad y preparación adecuada para ser utilizadas en los procesos de transformación **(Yang et al., 2022).**

### 3.2.1.4. Transformación con el plásmido recombinante

Para el proceso de transformación se utilizó el método de choque térmico, en el cual, las células previamente almacenadas fueron descongeladas lentamente para evitar el estrés térmico y comprometer la viabilidad de las células que presentaban membranas altamente sensibles debido al tratamiento con cloruro de calcio **(Liu et al., 2018)**. De acuerdo con el cálculo realizado en la **Ecuación 1**, se añadieron 2 µL del plásmido recombinante a una concentración de 100 ng, se incubo en hielo por 30 minutos para que la unión del ADN plasmídico y las superficies celulares se preparen para el ingreso.

***Ecuación 1***

*Volumen de plásmido*

$$Volumen\ de\ plásmido = \frac{(Valor\ esperado\ x\ Volumen\ de\ celulas\ competentes)}{(Concentración\ stock\ x\ 100\ \mu L)}$$

$$Volumen\ de\ plásmido = \frac{(\ 100\ ng\ x\ 200\ \mu L)}{(100\ ng/\mu L\ x\ 100\ \mu L)} = 2\mu L$$

- Valor esperado: 100 ng x 100 µL de células
- Volumen de células: 200 µL
- Concentración stock: 100 µL/mL = 100,00 ng/mL

### 3.2.1.5. Inserción por choque térmico

El método de choque térmico consistía en colocar las células a 42°C por 45 segundos, este cambio brusco de temperatura generó una alteración transitoria en la fluidez de la membrana plasmática, permitiendo el ingreso del ADN recombinante al interior de las

células y para evitar comprometer la viabilidad celular no se realizaron movimientos bruscos. Los tubos se mantuvieron en hielo por 5 minutos para estabilizar nuevamente a las membranas y minimizar los daños estructurales. Se añadieron 200 µL de caldo LB para proporcionar los nutrientes necesarios para la recuperación celular causado tras el método del estrés térmico y comiencen a expresar el gen de resistencia a la ampicilina en el plásmido.

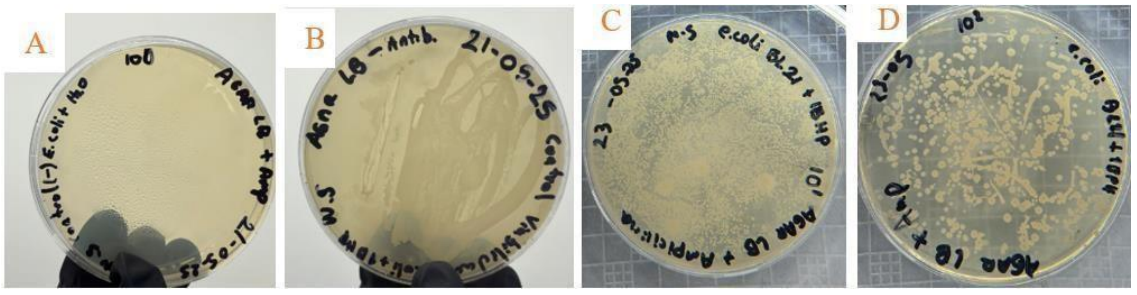
La incubación realizada a 37 °C favoreció la expresión basal de los genes del plásmido antes de ser sometidas a medio de cultivo con antibiótico, la siembra en placas con ampicilina nos permitió confirmar la efectividad del proceso de inserción mediante choque térmico.

### 3.2.1.6. Selección de transformantes

Luego de realizar el proceso de transformación, sembramos 200 µL del cultivo celular en medio de cultivo LB suplementado con ampicilina a una concentración de 80 µg/mL, distribuyendo homogéneamente. Se incubaron las placas a 37°C por 24 horas, observando múltiples colonias definidas, evidenciando la expresión de las bacterias transformadas en la **Figura 5.**

***Figura 5***

*Eficiencia del proceso de transformación en E. coli BL21.*




***Nota.*** (A) Control negativo para la transformación sin crecimiento de colonias, (B) Control de viabilidad de células competentes, (C) Presencia de colonias transformadas en agar LB suplementado con ampicilina, (D) Colonias transformadas en dilución 1:10.

Para determinar la eficiencia de la transformación se calcula el número de unidades formadoras de colonias producidas por 1 µg de ADN plasmídico, para ello usamos la siguiente formula:

***Ecuación 2***

*Número de unidades formadoras de colonias*

$$TC = \frac{N.colonias\ x\ relación\ de\ dilución\ x\ volumen\ de\ transformación\ orginal}{Volumen\ sembrado\ en\ la\ placa}$$

$$TC = \frac{95\ x\ 100\ x\ 1\ ml}{0.2\ ml} = 47500\ cfu$$

Y para conocer la eficiencia de la transformación realizada:

***Ecuación 3***

*Eficiencia de Transformación*

$$TE = \frac{TC}{Cantidad\ de\ ADN\ plasmídico\ \mu g}$$

$$TE = \frac{47500\ cfu}{0{,}1\ \mu g} = 475000\ cfu/\mu g$$

Por lo tanto, nuestra transformación fue eficiente debido a que el valor obtenido se encuentra dentro del rango establecido, evidenciando que las células competentes fueron capaces de incorporarse y expresar el plásmido **(Liu et al., 2018).**

### 3.2.1.7. Inducción de la expresión del péptido

De acuerdo con Shendge & D'Souza. (2022), para la evaluación del sistema recombinante de expresión del péptido antimicrobiano, realizamos el precultivo a partir de las colonias transformadas en 10 mL de caldo LB con ampicilina al 80 µg/mL, incubado a 37 °C, permitiendo la activación metabólica de las células y la preparación del inóculo para la fase de producción.

Para el cultivo, se transfirieron 5 mL del precultivo en 100 ml de caldo LB suplementado con ampicilina y glucosa al 1% (v/v), incubándose por 4 horas hasta alcanzar densidad óptica de 0.695 según se observó en la **Tabla 2** que indicaba las fases de crecimiento de *E. coli* BL21.

***Tabla 2***

*Crecimiento de E. coli BL21 sin plásmido.*

| Tiempo (h) | $DO_{600}$ | Fase de crecimiento |
|---|---|---|
| 0 | 0.055 | Lag |

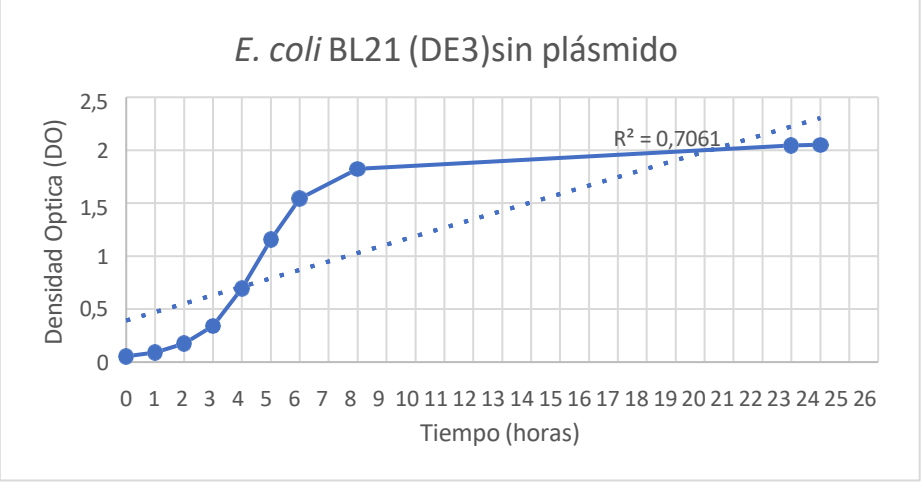
| | | |
|---|---|---|
| 1 | 0.089 | Lag-log |
| 2 | 0.174 | Log inicial |
| 3 | 0.342 | Log |
| 4 | 0.695 | Log |
| 5 | 1.158 | Log tardío |
| 6 | 1.542 | Estacionaria inicial |
| 8 | 1.825 | Estacionaria |
| 23 | 2.045 | Estacionaria tardía |
| 24 | 2.052 | Estacionaria |

**Nota:** La tabla nos muestra los datos obtenidos del monitoreo del crecimiento bacteriano del cultivo realizado sin plásmido en un medio LB a 37°C a una densidad óptica de 600nm, alcanzando su punto máximo de 0.695 en la cuarta hora, esta curva de crecimiento nos sirve de referencia para determinar el momento óptimo de inducción de IPTG.

Después, añadimos 1mM de IPTG para inducir el promotor T7 para iniciar la expresión del péptido antimicrobiano tal como se visualiza en la **Figura 6**. Por último, se recolectaron las células para centrifugar a 5000g durante 20 minutos a 4°C, el aumento significativo de la biomasa tras la inducción sugiere una producción activa de proteínas bajo el sistema de expresión inducido.

***Figura 6***

*Curva de crecimiento de E. coli BL21(DE3) sin plasmido.*




**Nota:** La gráfica muestra la evolución de la densidad óptica del cultivo, permitiéndonos identificar las fases del crecimiento bacteriano con una tasa máxima de 0,71 h-1 a las 4 horas.

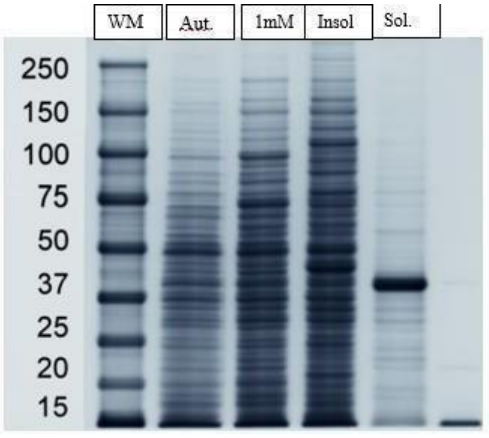
### 3.2.1.8 Lisis celular

El pellet obtenido del proceso de inducción del péptido fue sometido a un proceso de lisis para liberar las proteínas recombinantes, para ello, resuspendimos cuidadosamente en 5 ml de tampón lisis compuesto por 300 mM de NaCl, 50 mM de tampón $NaOH_2$, $PO_4$y 10 mM de imidazol, esta suspensión fue incubada en hielo por 10 minutos para estabilizar las condiciones antes del tratamiento mecánico. Después, realizamos una sonicación para realizar una disrupción celular eficiente a bajas temperaturas para evitar la desnaturalización térmica de las proteínas, realizamos una centrifugación para separar el componente soluble de los posibles cuerpos de inclusión presentes en el pellet **(Connor et al., 2023).**

Para confirmar en donde se encuentra la proteína se realizó un análisis de SDS-PAGE, en la **Figura 7** se observó que en el carril WM, el patrón de bandas del marcador de peso molecular sirve como referencia para estimar el tamaño de las proteínas en las muestras, en el carril Aut, se aprecia una banda con una intensidad de 37, lo que indica que el nivel basal de expresión de la proteína antes de la inducción. En cuanto al carril etiquetado como 1mM, se observan dos bandas intensas con una intensidad de 100 cada una, demostrando un notable aumento en la expresión de la proteína de interés después de la inducción con 1mM del agente inductor. En el carril Sol, se observó la fracción de la proteína luego de realizar la lisis celular, mientras que el carril Insol, presentó una banda intensa con una intensidad de 150, correspondiente a la fracción insoluble que contiene cuerpos de inclusión que retienen a la proteína de interés.

***Figura 7***

*Análisis SDS-PAGE luego de la lisis celular.*




**Nota:** La gráfica muestra la ubicación de la proteína en la fracción soluble e insoluble,

además de la presencia de la proteína antes y después de la inducción a una concentración de 1 mM de IPTG.

#### 3.2.1.9 Solubilización bajo condiciones desnaturalizantes

La urea es un desestabilizador proteico que en altas concentraciones desnaturalizan principalmente por efecto caotrópico y en bajas concentraciones tiende a estabilizar a la estructura de la diana **(Yamaguchi & Miyazaki, 2014)**. El pellet obtenido del proceso anterior que aparentemente contenía cuerpos de inclusión debido a la naturaleza de la secuencia de ADN fue sometido a un tratamiento desnaturalizante para recuperar las proteínas mal plegadas. Para ello, realizamos una solución que contenía urea 8M, Tris-HCL 50 Mm, 300mM Na Cl con un pH de 8.0 para romper los enlaces disulfuro y disolver agregados proteicos y resuspendimos el pellet con agitación suave hasta obtener una mezcla homogénea y sin precipitados visibles, incubamos a temperatura ambiente por 60 minutos y centrifugamos para recuperar el sobrenadante rico en proteínas desnaturalizadas.

#### 3.2.1.10 Replegamiento de la proteína

La proteína solubilizada bajo condiciones desnaturalizantes se refuncionalizó a través de una dilución lenta para permitir el correcto replegamiento de su estructura tridimensional, se utilizó un buffer compuesto por 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl con un pH de 8.0 a 4°C, la solución desnaturalizada fue añadida gota a gota en una proporción 1:20, reduciendo gradualmente la concentración de urea y minimizando la formación de agregados.

Después, se incubó la mezcla por 16 horas a 4°C para favorecer el establecimiento de puentes disulfuro adecuados y reordenar la estructura para su funcionalidad, en la **Tabla 3** podemos observar que a una Densidad óptica de 280nm se va desnaturalizando la proteína, mientras que la absorbancia a 340nm nos muestra la formación de cuerpos de inclusión, a medida que el replegamiento y a medida que comienza el replegamiento, la absorbancia a 280nm disminuye debido al replegamiento correcto de la proteína, mientras que la absorbancia a 340nm aumenta debido a la aparición de agregados **(S. M. Singh & Panda, 2005).**

***Tabla 3***

*Cinética del replegamiento de la proteína*

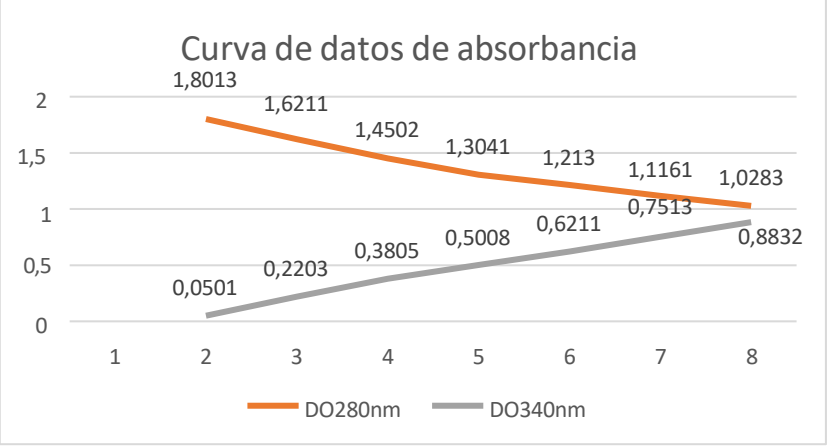
| Tiempo (h) | $DO_{280nm}$ | $DO_{340nm}$ | Estado de la proteína |
|---|---|---|---|
| 0 | 1.8013 | 0.0501 | Proteína desnaturalizada |
| 2 | 1.6211 | 0.2203 | Inicio de replegamiento |
| 4 | 1.4502 | 0.3805 | Replegamiento activo |
| 6 | 1.3041 | 0.5008 | Replegamiento intermedio |
| 8 | 1.2130 | 0.6211 | Replegamiento avanzado |
| 12 | 1.1161 | 0.7513 | Replegamiento tardío |
| 16 | 1.0283 | 0.8832 | Replegamiento final |

Nota: La tabla de datos nos presenta los valores de absorbancia a 280nm y 340nm medidos a lo largo del tiempo durante el proceso de replegamiento de la proteína, estos datos cuantitativos son fundamentales para analizar la cinética y la evaluación del replegamiento de la proteína.

Además, la **figura 8** nos permite visualizar de manera clara la cinética y eficiencia del proceso de replegamiento de la proteína de interés. Por último, se centrifugó la solución para eliminar los posibles agregados no plegados y el sobrenadante obtenido transparente y libre de turbidez con la β-purotionina en su forma funcional se almacenó para los posteriores procesos de purificación.

***Figura 8***

*Curva de absorbancia durante el replegamiento de proteína.*




**Nota:** En la gráfica se puede observar la evolución de absorbancia a 280n, que indica la

cantidad de proteína soluble, y la absorbancia a 340nm, refleja la formación de agregados durante el proceso de replegamiento de la β-purotionina desnaturalizada, las diferentes etapas del proceso de replegamiento se reflejan en la evolución de los datos de las dos curvas.

### 3.2.2 Purificación de β-purotionina en *E. coli* BL21 con columnas de Ni-NTA HisPur™.

#### 3.2.2.1. Purificación de sobrenadante con columnas de Ni-NTA HisPur™.

El sobrenadante inicial obtenido del replegamiento de la proteína mostró una absorbancia de 1.2 a una Densidad Óptica de 280nm, indicando una alta concentración de proteínas totales, luego se cargó el sobrenadante en la columna de Ni-NTA y se realizaron una serie de lavados para eliminar las proteínas no unidas a la resina, reflejando una disminución progresiva de la absorbancia a 280 nm en las fracciones de lavado 1 y 2, tal cual se observa en la **Tabla 4**. Para la determinación de la concentración de proteína presente en cada fase de la purificación se utilizó la ley de Lambert-Beer la cual establece una relación directa entre la absorbancia de una solución y la concentración del analito presente que en este caso es la β-purotionina. Esta ley se expresa matemáticamente como:

***Ecuación 4***

*Ley de Lambert-Beer*

$$A = \varepsilon * b * c$$

Donde:

A: Absorbancia (adimensional)

ε: Coeficinete de extinción molar de la β-purotionina: $50{,}000L * mol^{-1} * cm^{-1}$

Longitud del camino óptico (b): 1 cm

Por lo tanto, la concentración de la β-purotionina en el sobrenadante inicial sería:

$c = \frac{1{,}2}{(50{,}000L*mol^{-1}*cm^{-1})(1cm)} = 2.4x10^{-5}\text{mol}/L^{-1}$

Concentración total= c*Volumen

Concentración total= $(2.4x10^{-5}\text{mol}/L^{-1})$(10L)= 0.00024mol

(Oshina & Spigulis, 2021)

***Tabla 4***

*Perfil de purificación de β-purotionina en columnas Ni-NTA.*

| **Fracción** | **Absorbancia a 280 nm** | **Volumen (mL)** | **Concentración** (mol/$L^{-1}$) | **Concentración total** |
|---|---|---|---|---|
| Sobrenadante | 2.4 | 10 | 2.4 x $10^{-5}$ | 0.00024 mol |
| Lavado 1 | 0.6 | 5 | 6.0 x $10^{-6}$ | 0.000030 mol |
| Lavado 2 | 0.2 | 5 | 2.0 x $10^{-6}$ | 0.000010 mol |
| Elución 1 | 0.166 | 1 | 1.66 x $10^{-6}$ | 0.0000166 mol |
| Elución 2 | 0.026 | 1 | 0.50 x $10^{-6}$ | 0.0000050 mol |
| Elución 3 | 0.112 | | 0.26 x $10^{-6}$ | 0.0000026 mol |

**Fuente.** Elaboración propia.

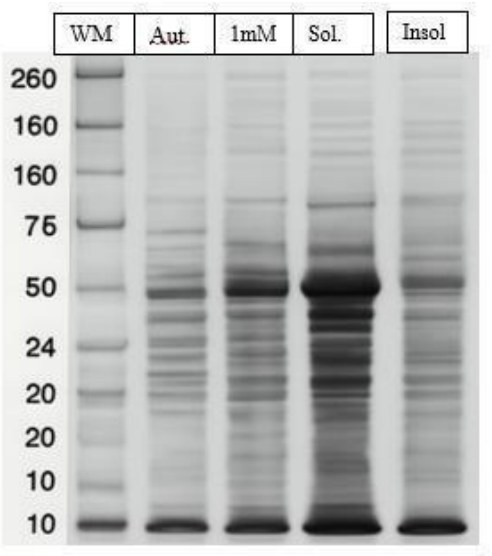
La disminución en el proceso de lavado evidencia la eliminación de las proteínas que no se unieron a la resina y por lo tanto se logró separa la proteína de interés de otras presentes en la muestra inicial. En cuanto a las fracciones de elución, la baja concentración de proteína en la Elución 3 (0.0000026 mol) es un indicativo de que el proceso de cromatografía por afinidad ha sido efectivo en la purificación de la β-purotionina, dejando pocos remanentes en las últimas fracciones de elución.

### 3.2.2.2. Determinación del peso molecular mediante electroforesis SDS-PAGE.

Para confirmar que el replegamiento se haya realizado con éxito, se analizó la muestra mediante SDS-PAGE, como se observa en la **Figura 9** hubo un incremento en el peso molecular presente en la parte soluble y disminución en la formación de cuerpos de inclusión.

***Figura 9***

*Análisis SDS-PAGE luego del replegamiento de la proteína.*



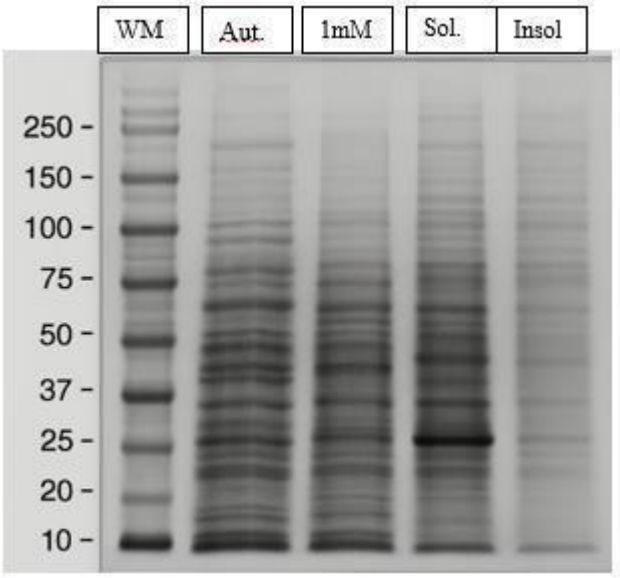

**Nota:** La gráfica muestra la ubicación de la proteína en la fracción soluble e insoluble, además presentó un incremento en la fracción soluble.

### 3.2.2.3. Escisión química de KSI/BETA-PUROTIONINA/His mediante bromuro de cianógeno (CNBr)

Para separar nuestra proteína de interés del resto de la construcción, se realizó un proceso de escisión química utilizando bromuro de cianógeno (CNBr), para eliminar posibles interferencias de sales presentes en la muestra se realizó una diálisis con agua destilada por toda la noche, luego se disolvió en ácido fórmico al 70% con una concentración de 10mg/mL. A esta solución se le agregó el reactivo CNBr y se incubó a temperatura ambiente y en obscuridad por 20 horas, en este tiempo el CNBr reaccionó y separó a la β-purotionina del resto de la construcción de fusión **(Fouani et al., 2019b)**. Finalmente, la centrifugación final a alta velocidad ayudó a recuperar eficientemente el sobrenadante con la β-purotionina escindida, minimizando las pérdidas durante la purificación. Para conservar su estructura y actividad biológica nativa, no se realizaron variaciones en las condiciones como pH y temperatura en todo el proceso. En la **Figura 10** se pudo observar que la escisión química fue favorable debido a que teníamos a la proteína sin ninguna etiqueta**.**

***Figura 10***

*Análisis SDS-PAGE luego de Escisión química*




**Nota:** La gráfica muestra la ubicación de la proteína en la fracción soluble e insoluble, además presentó la Beta-purotionina sin ninguna etiqueta.

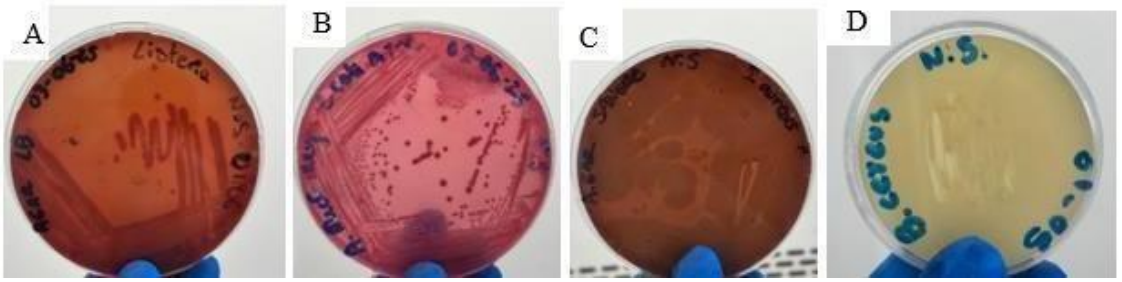
### 3.2.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de Beta-purotionina frente a cepas bacterianas *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus y Listeria monocytogenes.*

#### 3.2.3.1. Siembra de *E. coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes.*

Para realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana de la β-purotionina contra diversos patógenos, se utilizaron cuatro cepas bacterianas de importancia clínica, las cepas fueron sembradas por estriado en medios de cultivo adecuados para su crecimiento. En el caso de Staphylococcus aureus ATCC® 12600 TM* utilizamos agar Manitol Salado, para Listeria monocytogenes ATCC® 19115 TM* Agar Sangre, Escherichia coli ATCC® 11775 TM* se sembró en Agar MacConkey y para Bacillus cereus ATCC® 10876 TM* utilizamos Agar nutritivo. Las incubamos a 37°C durante 18-24 horas para obtener cultivos bacterianos en fase exponencial en crecimiento, tal cual se observa en la **Figura 11.**

***Figura 11***

*Reactivación de cepas bacterianas.*




**Nota:** La figura muestra los resultados de cuatro placas de cultivo bacteriano, cada una correspondiente a una cepa diferente: *Listeria monocytogenes* (A), *E. coli* (B), *Staphylococcus aureus* (C) y *Bacillus cereus* (D), estas cepas fueron utilizadas en el ensayo de actividad antimicrobiana del péptido de interés.

### 3.2.3.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

#### 3.2.3.2.1. Preparación de diluciones del péptido antimicrobiano

Los ensayos de microdilución en placa nos han permitido determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se prepararon diluciones seriadas del péptido antimicrobiano en agua estéril, obteniendo concentraciones finales de 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL y 100 µg/mL. Las diluciones se homogenizaron mediante vórtex a 30 rpm por 10 segundos, repitiendo este proceso por triplicado para asegurar la uniformidad de las muestras **(Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021).** Además, ajustamos la densidad del inóculo hasta alcanzar una turbidez equivalente al patrón 0,5 de la escala de McFarland equivalente a una concentración aproximada de $1{,}5 \ x \ 10^8$ UFC/mL, realizamos ensayos mediante la adición de resazurina al 0,02% como agente colorimétrico.

***Figura 12***

*Evaluación de la capacidad mínima inhibitoria (CMI).*



**Nota:** Carrieles 1-3 pertenecientes a *L. monocytogenes*, carrieles 4-6 de *S. aureus*, los carrieles 7-9 correspondientes a *E. coli* y los carrieles 10-12 a *B. cereus.* Se observaron los controles positivos (+) y negativos (-) de cada cepa bacteriana.

Los resultados obtenidos de la placa de microtitulación visualizada en la **Figura 12**, detallan que nuestro péptido antimicrobiano presenta mayor actividad inhibitoria contra bacterias Gram positivas, como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* en comparación con las bacterias Gram negativas. En la **Tabla 5** se pudo observar que para *L. monocytogenes*, la concentración mínima inhibitoria se encuentra en el rango de 60-80 µg/mL, lo que indica que a estas concentraciones el péptido logró inhibir efectivamente el crecimiento de esta bacteria, de manera similar, la MIC del péptido para *S. aureus* es de aproximadamente 80 µg/mL .

Mientras que para *E. coli* y *B. cereus* no se observó inhibición del crecimiento bacteriano a ninguna de las concentraciones evaluadas, este hallazgo sugiere que la β-purotionina no presenta actividad inhibitoria significativa para estas bacterias en las condiciones experimentales realizadas.

***Tabla 5***

*Concentración mínima inhibitoria (CMI) de β-purotionina*

| Cepa | Valor de CMI (µg/mL) |
|---|---|
| *L. monocytogenes* | 60 - 80 µg/Ml |
| *S. aureus* | 80 µg/mL |
| *E. coli* | No hay inhibición |
| *B. cereus* | No hay inhibición |

**Nota.** Concentraciones necesarias para inhibir el crecimiento en las cepas bacterianas estudiadas. Elaboración propia.

Estas diferencias observadas en cuanto a la eficacia del péptido pueden estar relacionadas con la composición y la estructura de la pared celular de las cepas bacterianas, las bacterias Gram positivas poseen una pared celular más simple y permeable, lo que facilita la inserción y acción del péptido antimicrobiano, sin embargo, las bacterias Gram negativas poseen una pared celular más compleja con una membrana externa adicional, dificultando la interacción de la β-purotionina.

### 3.2.3.3 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

En la **Tabla 6** podemos observar las concentraciones mínimas bactericidas para cada cepa bacteriana estudiada, evidenciando que la β-purotionina tiene mayor actividad bactericida contra *L. monocytogenes,* requiriendo una concentración de 80 µg/mL para erradicar el crecimiento de esta bacteria Gram positiva, por el contrario, para *S. aureus* se necesita una concentración ligeramente mayor (100 µg/mL0). Sin embargo, no se pudo establecer la CMB para las bacterias Gram negativas *E. coli* y *B. cereus.*

***Tabla 6***

*Concentración mínima bactericida (CMB) de β-purotionina.*

| Cepa | Concentración Mínima Bactericida (CMB) |
|---|---|
| *L. monocytogenes* | 80 µg/mL |
| *S. aureus* | 100 µg/mL |
| *E. coli* | No se determinó CMB |

| | |
|---|---|
| *B. cereus* | No se determinó CMB |

Nota. Los datos de la tabla presentan la concentración mínima bactericida la cual varía según la cepa y la concentración, sin embargo, no se visualizó la CMB para *E. coli* y *B. cereus.* Elaboración propia.

# CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 4.1 Conclusiones

El desarrollo del sistema de expresión heteróloga de β-purotionina en *Escherichia coli* BL21 demostró ser eficiente y reproducible, pese a su incompatibilidad nativa. La construcción del vector Pet-31b(+) con la secuencia optimizada del gen 1BHP con 5927 pb, que incluye elementos clave como el promotor T7, la proteína de fusión KSI y la etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal, favoreció la expresión del péptido antimicrobiano. Además, se alcanzó una eficiencia de 475000 cfu/µg superando significativamente los estándares mínimos requeridos, confirmando la competencia celular adecuada y a su vez la viabilidad del plásmido recombinante. El proceso de inducción con IPTG 1Mm a una densidad óptica de 0.695 resultó en un incremento notable de biomasa, indicando una expresión activa de la proteína. Para recuperar la funcionalidad de la β-purotionina se realizó la solubilización y replegamiento con urea 8M, además, se monitoreó mediante espectrofotómetro y se confirmó su correcto plegamiento proteico y la minimización de agregados no funcionales.

En cuanto a los ensayos de actividad antimicrobiana se reveló un patrón de selectividad marcado por la β-purotionina hacia bacterias Gram positivas, en el cual su mecanismo de acción alteró la permeabilidad de las membranas celulares. Para *Listeria monocytogenes* ATCC® 19115 TM*, se determinó una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en el rango de 60-80 µg/mL y una Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 80 µg/mL, demostrando tanto su actividad bacteriostática como bactericida a concentraciones relativamente bajas, en el caso de para *Staphylococcus aureus* ATCC® 12600 TM*, la CMI fue de 80 µg/mL con un a CMB de 100 µg/mL, reflejando una sensibilidad ligeramente menor pero aun significativa. Dicha diferencia puede deberse a la composición lipídica de las membranas y la presencia de diferentes fosfolípidos aniónicos como los fosfatidilglicerol y las cardiolipina, que constituyen sitios de unión preferenciales para β-purotionina. Sin embargo, las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC® 11775 TM* y *Bacillus cereus* ATCC® 10876 TM* no mostraron inhibición del crecimiento en ninguna de las concentraciones evaluadas, que puede ser por la presencia de una membrana externa adicional que actúa como una barrera física, limitando el acceso

del péptido antimicrobiano a la membrana citoplasmática.

Los resultados obtenidos confirman el potencial de la β-purotionina como un agente antimicrobiano de origen natural y con aplicaciones prometedoras en múltiples sectores, su actividad especifica contra patógenos Gram positivos de relevancia clínica y alimentaria como *L. monocytogenes* y *S. aureus* posiciona a este péptido como candidato viable para el desarrollo de bioconservantes alimentarios y agentes terapéuticos complementarios. La estabilidad estructural conferida por los cuatro puentes disulfuro intramoleculares y su resistencia a condiciones adversas de pH, temperatura y agentes químicos, representa una ventaja adicional para su implementación industrial.

## 4.2 Recomendaciones

- Evaluar distintas concentraciones de inducción como el tiempo, temperatura y la concentración de IPTG para mejorar el rendimiento de la Beta-purotionina expresada en *E. coli* BL21.

- Ampliar el espectro de cepas bacterianas ensayadas a cepas multirresistentes o clínicas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* para incrementar la relevancia del estudio frente a la problemática actual de salud pública, demostrando el potencial del péptido frente a cepas bacterianas con mayor resistencia.

- Evaluar el uso de diversos vectores que contengan promotores más eficientes con promotores como T7-lac o arabinosa-inducibles que permitan un mayor control y rendimiento en la expresión de péptidos con una cadena pequeña como la Beta-purotionina.

## CAPÍTULO V.- Referencias Bibliográficas


Abbas, A., Jabran, M., Zahoor, A., Hawamda, A. I. M., Habib, A., Jamil, S., Tanveer, M. H., & Ali, M. A. (2024). Plant Proteomic Approaches, Expression of Simple Peptides to Complex Proteins. *Trends in Plant Biotechnology*, 135–155. https://doi.org/10.1007/978-981-97-0814-7_5

Aliakbarpour, H. R., Chamani, M., Rahimi, G., Sadeghi, A. A., & Qujeq, D. (2012). The Bacillus subtilis and lactic acid bacteria probiotics influences intestinal mucin gene expression, histomorphology and growth performance in broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *25*(9), 1285–1293. https://doi.org/10.5713/AJAS.2012.12110

Alves, N. J., Turner, K. B., DiVito, K. A., Daniele, M. A., & Walper, S. A. (2017). Affinity purification of bacterial outer membrane vesicles (OMVs) utilizing a His- tag mutant. *Research in Microbiology*, *168*(2), 139–146. https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2016.10.001

Amiri, S., Rezaei Mokarram, R., Sowti Khiabani, M., Rezazadeh Bari, M., & Alizadeh Khaledabad, M. (2022). Characterization of antimicrobial peptides produced by Lactobacillus acidophilus LA-5 and Bifidobacterium lactis BB-12 and their inhibitory effect against foodborne pathogens. *LWT*, *153*, 112449. https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112449

Barashkova, A. S., Ryazantsev, D. Y., Zhuravleva, A. S., Sharoyko, V. V., & Rogozhin, E. A. (2023). Recombinant Fusion Protein Containing Plant Nigellothionin Regulates the Growth of Food-Spoiling Fungus (Aspergillus niger). *Foods (Basel, Switzerland)*, *12*(16). https://doi.org/10.3390/FOODS12163002

Boonpa, K., Tantong, S., Weerawanich, K., Panpetch, P., Pringsulaka, O., Roytrakul, S., & Sirikantaramas, S. (2019). In Silico Analyses of Rice Thionin Genes and the Antimicrobial Activity of OsTHION15 Against Phytopathogens. *Phytopathology*, *109*(1), 27–35. https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-17-0217-R

Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods in Enzymology*, *541*, 151–159. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4

Chan, W. T., Verma, C. S., Lane, D. P., & Gan, S. K. E. (2013). A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of Escherichia coli. *Bioscience Reports*, *33*(6). https://doi.org/10.1042/BSR20130098

Chen, N., & Jiang, C. (2023). Antimicrobial peptides: Structure, mechanism, and modification. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *255*, 115377. https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2023.115377

Connor, A., Wigham, C., Bai, Y., Rai, M., Nassif, S., Koffas, M., & Zha, R. H. (2023). Novel insights into construct toxicity, strain optimization, and primary sequence design for producing recombinant silk fibroin and elastin-like peptide in *E. coli*. *Metabolic Engineering Communications*, *16*, e00219. https://doi.org/10.1016/J.MEC.2023.E00219

Erdem Büyükkiraz, M., & Kesmen, Z. (2022). Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *Journal of Applied Microbiology*, *132*(3), 1573–1596. https://doi.org/10.1111/JAM.15314

Florack, D. E. A., & Stiekema, W. J. (1994). Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Molecular Biology*, *26*(1), 25–37. https://doi.org/10.1007/BF00039517/METRICS

Fouani, M. H., Nikkhah, M., & Mowla, J. (2019a). Straightforward and Cost-Effective Production of RADA-16I Peptide in Escherichia coli. *Iranian Journal of Biotechnology*, *17*(2), e2125. https://doi.org/10.21859/IJB.2125

Fouani, M. H., Nikkhah, M., & Mowla, J. (2019b). Straightforward and Cost-Effective Production of RADA-16I Peptide in Escherichia coli. *Iranian Journal of Biotechnology*, *17*(2), e2125. https://doi.org/10.21859/IJB.2125

Garnacho-Montero, J., & Amaya-Villar, R. (2022). The problem of multi-resistance in gram-negative bacilli in intensive care units: Treatment and prevention strategies. *Medicina Intensiva (English Edition)*, *46*(6), 326–335. https://doi.org/10.1016/J.MEDINE.2022.04.006

Gene Universal. (2025). *Construct Map 1BHP*. https://www.dropbox.com/scl/fi/26lomzzr3zgcn0xb85de9/7A09532.zip?e=30&file_subpath=%2F7A09532%2F7A09532-1%281BHP%29%2F1BHP+QA+report.pdf&rlkey=2j5ojx2i6h1758lmbaf55u3nb&dl=0

Gladilina, Y. N. ; A. ;, Zhdanov, D. D., Sancho, J., Cutruzzola, F., Shishparenok, A. N., Gladilina, Y. A., & Zhdanov, D. D. (2023). Engineering and Expression Strategies for Optimization of L-Asparaginase Development and Production. *International Journal of Molecular Sciences 2023, Vol. 24, Page 15220*, *24*(20), 15220. https://doi.org/10.3390/IJMS242015220

Green, R., & Rogers, E. J. (2013). Transformation of chemically competent *E. coli*. *Methods in Enzymology*, *529*, 329–336. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00028-8

Höng, K., Austerlitz, T., Bohlmann, T., & Bohlmann, H. (2021). The thionin family of antimicrobial peptides. *PloS One*, *16*(7). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0254549

Kamal, I., Ashfaq, U. A., Hayat, S., Aslam, B., Sarfraz, M. H., Yaseen, H., Rajoka, M. S. R., Shah, A. A., & Khurshid, M. (2023). Prospects of antimicrobial peptides as an alternative to chemical preservatives for food safety. *Biotechnology Letters*, *45*(2), 137–162. https://doi.org/10.1007/S10529-022-03328-W

Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*, *10*(2), 165. https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10020165

Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C., & Yang, X. (2021). Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. *Botanical Studies 2021 62:1*, *62*(1), 1–15. https://doi.org/10.1186/S40529-021-00312-X

Li, S., She, P., Zhou, L., Zeng, X., Xu, L., Liu, Y., Chen, L., & Wu, Y. (2020). High-Throughput Identification of Antibacterials Against Pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 591426. https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.591426/FULL

Li, X., Zuo, S., Wang, B., Zhang, K., & Wang, Y. (2022). Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. *Molecules 2022, Vol. 27, Page 2675*, *27*(9), 2675. https://doi.org/10.3390/MOLECULES27092675

Lima, A. M., Azevedo, M. I. G., Sousa, L. M., Oliveira, N. S., Andrade, C. R., Freitas, C. D. T., & Souza, P. F. N. (2022). Plant antimicrobial peptides: An overview about classification, toxicity and clinical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *214*, 10–21. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.06.043

Liu, J., Chang, W., Pan, L., Liu, X., Su, L., Zhang, W., Li, Q., & Zheng, Y. (2018). An Improved Method of Preparing High Efficiency Transformation Escherichia coli with Both Plasmids and Larger DNA Fragments. *Indian Journal of Microbiology*, *58*(4), 448. https://doi.org/10.1007/S12088-018-0743-Z

Mah, T. F. (2014). Establishing the Minimal Bactericidal Concentration of an Antimicrobial Agent for Planktonic Cells (MBC-P) and Biofilm Cells (MBC-B). *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *83*, 50854. https://doi.org/10.3791/50854

Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *6*(DEC), 194. https://doi.org/10.3389/FCIMB.2016.00194

Mazurkiewicz-Pisarek, A., Baran, J., & Ciach, T. (2023). Antimicrobial Peptides: Challenging Journey to the Pharmaceutical, Biomedical, and Cosmeceutical Use. *International Journal of Molecular Sciences 2023, Vol. 24, Page 9031*, *24*(10), 9031. https://doi.org/10.3390/IJMS24109031

Mihaylova-Garnizova, R., Davidova, S., Hodzhev, Y., & Satchanska, G. (2024). Antimicrobial Peptides Derived from Bacteria: Classification, Sources, and Mechanism of Action against Multidrug-Resistant Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences 2024, Vol. 25, Page 10788*, *25*(19), 10788. https://doi.org/10.3390/IJMS251910788

Nocera, F. P., Ferrara, G., Scandura, E., Ambrosio, M., Fiorito, F., & De Martino, L. (2022). A preliminary study on antimicrobial susceptibility of staphylococcus spp. And enterococcus spp. grown on mannitol salt agar in european wild boar (sus scrofa) hunted in campania region—italy. *Animals*, *12*(1), 85. https://doi.org/10.3390/ANI12010085/S1

Oard, S., & Karki, B. (2006). Mechanism of beta-purothionin antimicrobial peptide inhibition by metal ions: molecular dynamics simulation study. *Biophysical Chemistry*, *121*(1), 30–43. https://doi.org/10.1016/J.BPC.2005.12.004

Oliveira Rosas, C., Rodrigues, J. M., Campino de la Cruz, M. H., dos Reis Lopes, S. M., da Silva Soares Souto, A., Lima Brandão, M. L., & de Filippis Capasso, I. R. V. (2019). Microbiological reference material (bacterial and fungal domains): Definition, production rules, use and need for establishment in Brazil. *Brazilian Journal of Food Technology*, *22*, 1–11. https://doi.org/10.1590/1981-6723.20817

Oliveira, S. S. S., Cherene, M. B., Taveira, G. B., de Oliveira Mello, É., de Oliveira Carvalho, A., & Gomes, V. M. (2024). Plant Antimicrobial Peptides and Their Main Families and Roles: A Review of the Literature. *Current Issues in Molecular Biology 2025, Vol. 47, Page 1*, *47*(1), 1. https://doi.org/10.3390/CIMB47010001

Oshina, I., & Spigulis, J. (2021). Beer–Lambert law for optical tissue diagnostics: current state of the art and the main limitations. *Journal of Biomedical Optics*, *26*(10), 100901. https://doi.org/10.1117/1.JBO.26.10.100901

Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). Saccharomyces cerevisiae and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, *6*(1), 1.

https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2020001

Parisi, M. G., Ozón, B., Vera González, S. M., García-Pardo, J., & Obregón, W. D. (2024). Plant Protease Inhibitors as Emerging Antimicrobial Peptide Agents: A Comprehensive Review. *Pharmaceutics*, *16*(5), 1–16. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16050582

Richard, J. A., Kelly, I., Marion, D., Auger, M., & Pézolet, M. (2005). Structure of β-purothionin in membranes: A two-dimensional infrared correlation spectroscopy study. *Biochemistry*, *44*(1), 52–61. https://doi.org/10.1021/BI048443T,

Richard, J. A., Kelly, I., Marion, D., Pézolet, M., & Auger, M. (2002). Interaction between beta-Purothionin and dimyristoylphosphatidylglycerol: a (31)P-NMR and infrared spectroscopic study. *Biophysical Journal*, *83*(4), 2074. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)73968-4

Salam, M. A., Al-Amin, M. Y., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A., & Alqumber, M. A. A. (2023). Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare 2023, Vol. 11, Page 1946*, *11*(13), 1946. https://doi.org/10.3390/HEALTHCARE11131946

Shendge, A. A., & D'Souza, J. S. (2022). Strategic optimization of conditions for the solubilization of GST-tagged amphipathic helix-containing ciliary proteins overexpressed as inclusion bodies in *E. coli*. *Microbial Cell Factories*, *21*(1), 1–22. https://doi.org/10.1186/S12934-022-01979-Y/FIGURES/9

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/TABLES/3

Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *99*(4), 303–310. https://doi.org/10.1263/JBB.99.303

Sinha, R., & Shukla, P. (2019). Antimicrobial Peptides: Recent Insights on Biotechnological Interventions and Future Perspectives. *Protein and Peptide Letters*, *26*(2), 79. https://doi.org/10.2174/0929866525666181026160852

Stec, B. (2006). Plant thionins--the structural perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *63*(12), 1370–1385. https://doi.org/10.1007/S00018-005-5574-5

Tian, L., Zhang, D., Su, P., Wei, Y., Wang, Z., Wang, P. X., Dai, C. J., & Gong, G. L. (2019). Design, recombinant expression, and antibacterial activity of a novel hybrid

magainin-thanatin antimicrobial peptide. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *49*(5), 427–434. https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1476875

Travkova, O. G., Moehwald, H., & Brezesinski, G. (2017). The interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Advances in Colloid and Interface Science*, *247*, 521–532. https://doi.org/10.1016/J.CIS.2017.06.001

Wu, C. L., Chih, Y. H., Hsieh, H. Y., Peng, K. L., Lee, Y. Z., Yip, B. S., Sue, S. C., & Cheng, J. W. (2022). High Level Expression and Purification of Cecropin-like Antimicrobial Peptides in Escherichia coli. *Biomedicines*, *10*(6). https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10061351

Yamaguchi, H., & Miyazaki, M. (2014). Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules*, *4*(1), 235. https://doi.org/10.3390/BIOM4010235

Yang, Y., Liu, M., Wang, T., Wang, Q., Liu, H., Xun, L., & Xia, Y. (2022). An Optimized Transformation Protocol for Escherichia coli BW3KD with Supreme DNA Assembly Efficiency. *Microbiology Spectrum*, *10*(6), e02497-22. https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.02497-22

Zhu, W., Hu, L., Wang, Y., Lv, L., Wang, H., Shi, W., Zhu, J., & Lu, H. (2021). A hemolysin secretion pathway-based novel secretory expression platform for efficient manufacturing of tag peptides and anti-microbial peptides in Escherichia coli. *Bioresources and Bioprocessing*, *8*(1). https://doi.org/10.1186/S40643-021-00471-6

Zumbado, R., Barquero, A., & Hidalgo, O. (2022). Resistencia a los antibióticos: Una Revisión Bibliográfica. *Revista Ciencia y Salud Integrando Conocimientos*, *6*(3), 145–153. https://doi.org/10.34192/cienciaysalud.v6i3.500

## ANEXOS

### *Anexo 1*

*Siembra de E. coli BL21 (DE3) en agar McConkey*



*Nota*. Crecimiento de la cepa de *E. coli* BL21 en agar McConkey.

### *Anexo 2*

*Transformación con el plásmido recombinante.*



*Nota*. Crioviales con células competentes y plásmido con una concentración de 100ng.

### *Anexo 3*

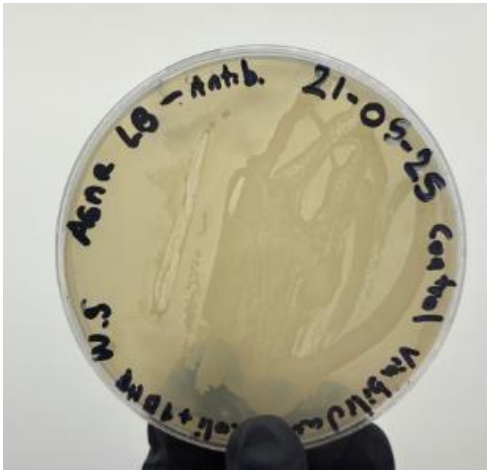
*Inserción por choque termico.*




*Nota*. Crioviales con células competentes y 5 µL del plásmido en baño maría a 42°C.

***Anexo 4***

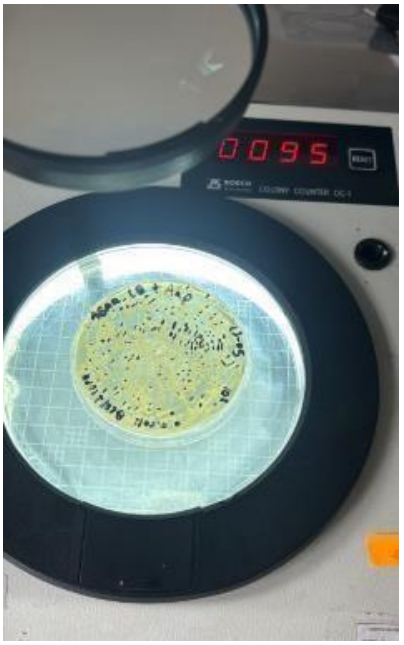
*Selección de transformante.*



*Nota*. Cultivo de células transformadas en un medio de cultivo LB suplementado con ampicilina a una concentración 80µg/mL.

***Anexo 5***

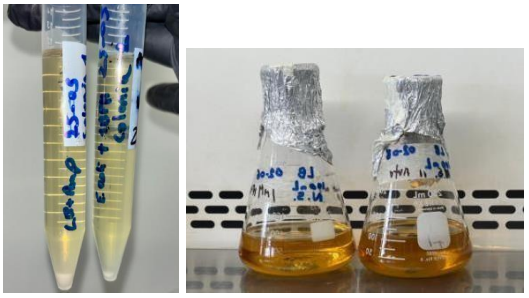
*Numero de colonias después del proceso de transformación*




*Nota*. El cultivo realizado presenta 95 colonias de células transformadas.

***Anexo 6***

*Inducción de la expresión del péptido antimicrobiano.*



*Nota*. Cultivo y Precultivo de colonias aisladas de la bacteria transformada.

***Anexo 7***

*Lisis celular.*



*Nota*. Pellet del proceso de inducción, proceso de sonicación, centrifugación final.

***Anexo 8***

*Solubilización en condiciones desnaturalizantes.*



*Nota*. Pellet del proceso de inducción, proceso de sonicación, centrifugación final.

***Anexo 9***

*Replegamiento de la proteína.*



*Nota*. Sobrenadante con proteínas desnaturalizadas y sobrenadante con proteína refuncionalizada.

***Anexo 10***

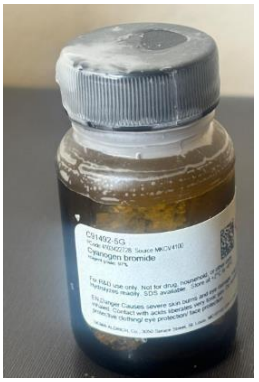
*Purificación de sobrenadante con columnas de Ni-NTA HisPur™.*



*Nota*. Columnade de Ni-NTA HisPur™ y columna cargada con el sobrenadante.

***Anexo 11***

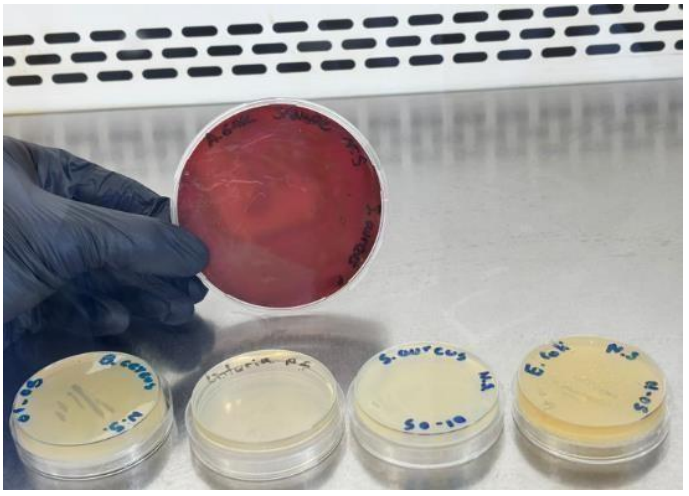
*Escisión química de KSI/BETA-PUROTIONINA/His mediante bromuro de cianógeno (CNBr).*



*Nota*. Reactivo utilizado parala escisión química y eliminación de KSI.z

***Anexo 12***

*Siembra de E. coli, S. aureus, B. cereus y L. monocytogenes*



*Nota*. Reactivación de las cepas bacterianas en medios de cultivos adecuados.

***Anexo 13***

*Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).*



*Nota*. Microplacas de 96 pocillos con los inóculos y con resazurina al 0.02%.

***Anexo 14***

*Placa de microdilución de β-purotionina frente a cepas bacteriana.*

| | L. monocytogenes | | | S. aureus | | | *E. coli* | | | *B. cereus* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| µg/mL | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 100 | – | – | – | – | – | – | + | + | + | + | + | + |
| 80 | – | – | – | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 60 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 40 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 20 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 10 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Negativo | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ |
| Positivo | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

**Nota.** Análisis de la placa de microdilucion de 96 pocillos en la cual el signo negativo - demuestra la ausencia de crecimiento bacteriano y por el contrario, el signo positivo + describe el crecimiento en cada uno de los pocillos a diferentes concentraciones. Elaboración propia.

***Anexo 15***

*Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para L. monocytogenes*

| Concentración | 80µg/mL | 60 µg/mL |
|---|---|---|
| *L. monocytogenes* |  |  |

*Nota*. Presencia y ausencia de colonias bacterianas en distintas concentraciones.

***Anexo 16***

*Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para S. aureus.*

| Concentración | 100 µg/mL | 80 µg/mL |
|---|---|---|
| *S. aureus* |  |  |

*Nota*. Presencia y ausencia de colonias bacterianas en distintas concentraciones