



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Uso de peptidoglucan hidrolasas recombinantes para la eliminación de biopelículas en la industria alimentaria”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Maestra en Ciencias

PRESENTA

Q. A. Katya Paola Ibarra Domínguez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Amelia Farrés González Saravia
[Facultad de Química, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Bertha González Pedrajo
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Dr. José Adelfo Escalante Lozada
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Ciudad de México. Diciembre, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

“Uso de peptidoglucan hidrolasas recombinantes para la eliminación de biopelículas en la industria alimentaria”

que presenté para obtener el grado de ----Maestría ----- es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Katya Paola Ibarra Domínguez

No. de cuenta 313266889

USO DE PEPTIDOGLUCAN HIDROLASAS RECOMBINANTES PARA LA ELIMINACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Sergio Sánchez Esquivel	IIB, UNAM
Vocal: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	FQ, UNAM
Vocal: Dr. José Luis Puente García	IBT, UNAM
Vocal: Dr. Ricardo Oropeza Navarro	IBT, UNAM
Secretario: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra	FQ, UNAM

Sitio donde se desarrolló el tema

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 312 del Conjunto E, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor: Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González-Saravia FQ, UNAM

Sustentante: Q. A. Katya Paola Ibarra Domínguez

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 312 del Conjunto E, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González-Saravia. Durante la realización del mismo se contó con el apoyo técnico de M en C. Cindy Estrada Hernández y M en C. Sandra Pérez Munguía.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero del CONACYT (beca de maestría, CVU: 1146260), además de recibir apoyo económico por parte del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para la asistencia al XX Congreso de Biotecnología y Bioingeniería de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB) en Ixtapa Zihuatanejo, México. El trabajo ganó el primer lugar en la categoría de Exposición de cartel en el área de Biotecnología Microbiana. Se contó con el apoyo del programa PAPIIP-Facultad de Química 5000-9095.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por otorgarme la oportunidad de ser parte de ella, por ser mi segunda casa, por brindarme una formación tanto personal como profesional.

A CONAHCYT, al pueblo de México por costear la realización de este proyecto a través del Programa de Becas de Posgrado.

A la Dra. Amelia Farrés, por su dirección, generosidad y confianza a lo largo del proyecto, así como también por sus aportaciones y consejos para mi desarrollo académico. Siempre recordaré su predisposición a ayudar, la amabilidad y bondad con la que me trató constantemente.

A los miembros del comité tutorial, la Dra. Bertha González y al Dr. Adelfo Escalante, por su gran asesoramiento, así como la buena disposición para la realización del proyecto.

A la Facultad de Química, por abrirme las puertas al conocimiento, por brindar los recursos para la realización del trabajo de investigación en sus instalaciones.

A la M en C. Cindy Estrada Hernández, Técnico de Laboratorio durante la realización de este proyecto por su continua disposición para ayudar a los demás, así como también a la M en C. Sandra Pérez Munguía por compartir sus conocimientos, así como su apoyo, paciencia y guía.

A los miembros del Jurado, por su entusiasmo e interés para revisar el trabajo de investigación, así como por las observaciones y sugerencias para enriquecer su contenido.

Dedicatorias

A mis padres Jesús y Rocío, por el amor incondicional, la orientación y el apoyo que me han brindado día a día. Gracias por inculcarme valores que me han guiado en la vida, por enseñarme la importancia del esfuerzo y la disciplina, por apoyarme en todas mis decisiones, su confianza en mí me ha llevado a lograr cada uno de mis objetivos. Su ejemplo como padres ha sido un faro en mi camino y siempre estaré agradecida por ello.

A mi hermano Kevin, gracias por hacerme reír y por saber que decir en cada situación, eres el mejor amigo que siempre quise tener. Tu presencia ha sido muy importante para alcanzar este logro y espero que sigamos creciendo juntos en este camino del conocimiento.

A las maravillosas familias a las que pertenezco: Ibarra (mis tíos Abraham, Daniel, Mónica y Rodri) y Domínguez (mi abuelita Lulú, mis tías Angélica, Alejandra y Josefina, mis tíos Ismael, Jorge, Guillermo y Rodrigo) su apoyo incondicional siempre ha sido muy valioso para mí, agradezco profundamente su presencia, sus recomendaciones, así como su amor.

A Francisco, por haberme acompañado en este camino, por creer en mí y por alentarme a seguir adelante. Eres mi ola favorita en un mar de cosas buenas, espero seguir compartiendo contigo muchos más momentos de alegría y crecimiento.

A mis amigos del 312, Fernanda y Adriana por el apoyo académico, emocional y su cariño, por mostrarme lo que es una sincera amistad entre mujeres; así como también Augusto, Eric, Rafael, Marco y Daniel por sus consejos, aportaciones y su humor tan genial. A todos ustedes y las experiencias que hemos vivido juntos, las llevaré siempre en mi corazón.

Índice

1. Introducción	13
1.1 Contaminación microbiana en los alimentos	13
1.2 Biopelículas	14
1.3 Formación de biopelículas	14
1.4 Métodos de control	16
1.5 Tratamiento enzimático contra biopelículas	19
1.6 Peptidoglucano hidrolasas	20
1.7 Clasificación de peptidoglucano hidrolasas	21
1.8 Aplicación en alimentos	22
2. Antecedentes	23
2.1 Enzimas líticas de <i>Pediococcus acidilactici</i>	23
2.2 Subclonación de la proteína bifuncional	25
3. Justificación	28
4. Hipótesis	29
5. Objetivo general	29
5.1 Objetivos específicos	29
6. Metodologías	30
6.1 Generación de las clonas recombinantes	31
6.1.1 Cepas y plásmidos	31
6.1.2 Extracción de plásmido de las construcciones deseadas	31
6.1.3 Preparación de células competentes	31
6.1.4 Transformación	31
6.1.5 Análisis de las transformantes	32
6.1.6 Conservación de cepas	33
6.2 Producción de enzimas recombinantes	33
6.2.1 Inducción de la expresión de la proteína recombinante en <i>E. coli</i> Rosetta	33
6.2.2 Cuantificación de proteína	34
6.2.3 Determinación del perfil proteico	34
6.2.4 Western Blot	34
6.2.5 Determinación de la actividad lítica en zimograma con <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	35
6.2.6 Determinación de la actividad lítica en zimograma con microorganismos modelo	35
6.2.7 Determinación de actividad específica	35
6.2.8 Concentración mínima inhibitoria (CMI)	36
6.3 Caracterización bioquímica de las proteínas recombinantes	36
6.3.1 pH de máxima actividad	36
6.3.2 Estabilidad a pH	36
6.3.3 Temperatura de máxima actividad	37
6.3.4 Estabilidad térmica	37

6.4 Purificación parcial de las PGH.....	37
6.5 Selección del microorganismo modelo	38
6.5.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo	38
6.5.2 Curvas de crecimiento de microorganismos.....	38
6.6 Propiedades del microorganismo modelo	39
6.6.1 Ensayo de motilidad por punción	39
6.6.2 Hidrofobicidad de la superficie celular (CSH)	39
6.7 Formación de biopelículas	39
6.8 Selección de condiciones óptimas de biopelículas	40
6.8.1 Cuantificación de biomasa total	40
6.8.2 Cuantificación de células viables	41
6.9 Tratamiento enzimático de biopelículas	41
7. Resultados	42
7.1 Clonación en <i>E. coli</i> Rosetta	42
7.2 Producción de enzima recombinantes.....	43
7.3 Caracterización bioquímica del extracto soluble	45
7.4 Purificación parcial de las proteínas recombinantes	48
7.5 Selección de microorganismos para formación de biopelícula.....	51
7.6 Caracterización de biopelículas formadas	52
7.6.1 Cuantificación de biomasa total	54
7.6.2 Determinación de Unidades Formadoras de Colonia	57
7.7 Selección de microorganismo modelo para formación de biopelícula	58
7.8 Propiedades del microorganismo modelo	60
7.9 Tratamiento enzimático	62
8. Conclusiones	70
9. Perspectivas.....	71
10. Bibliografía.....	72
11. Anexos	80
11.1 Producción de enzimas recombinantes en diversas fracciones celulares.....	80
11.2 Curvas de crecimiento de microorganismos modelos	82
11.3 Formación de biopelículas	83
11.4 Cuantificación de biomasa total.....	86
11.5 Condiciones de temperatura para el tratamiento enzimático contra biopelículas	87
11.6 Análisis estadístico de los parámetros individuales del tratamiento enzimático	88
11.7 Tratamiento enzimático evaluando la influencia de todos los parámetros.....	90
11.8 Tratamiento enzimático con mayor reducción de viabilidad celular	95

Índice de figuras

Figura 1. Principales fuentes de contaminación en la industria de alimentos	13
Figura 2. Etapas de formación de la biopelícula microbiana	14
Figura 3. Degradación enzimática de biopelícula madura	19
Figura 4. Esquema detallado del peptidoglucano (PG) y las diversas peptidoglucano hidrolasas implicadas en el procesamiento del peptidoglucano	20
Figura 5. Secuencia en aminoácidos de la enzima de 99-kDA codificada en el genoma de <i>P.acidilactici</i> 7_4	24
Figura 6. Subclonas de N-acetilmuramil-L-alanina amidasa y N-acetilglucosaminidasa	25
Figura 7. Detección de actividad lítica de las subclonas en zimogramas contra <i>M.lysodeikticus</i>	26
Figura 8. Comparación de la actividad inhibitoria de las subclonas de ambos dominios y la mezcla de las mismas por el método de difusión en agar	27
Figura 9. Diagrama de la metodología experimental general	30
Figura 10. Análisis de las transformantes para ambos dominios catalíticos	42
Figura 11. Expresión de la proteína recombinante AMI 123 en el sobrenadante del cultivo de <i>E. coli</i> Rosetta DE3, así como la determinación de actividad lítica y su inmunodetección	43
Figura 12. Expresión de la proteína recombinante GLU 32 en el sobrenadante del cultivo de <i>E. coli</i> Rosetta DE3, así como la determinación de actividad lítica y su inmunodetección	44
Figura 13. Determinación del pH de máxima actividad de las PGH recombinantes AMI 123 y GLU 32	46
Figura 14. Estabilidad a distintos pH de las PGH recombinantes AMI 123 y GLU 32	46
Figura 15. Determinación de la temperatura de actividad máxima de las PGH recombinantes AMI 123 y GLU 32	47
Figura 16. Estabilidad a distintas temperaturas de las PGH recombinantes AMI 123 y GLU 32	48
Figura 17. Purificación parcial de AMI 123	49
Figura 18. Purificación parcial de GLU 32	49
Figura 19. Curva de crecimiento de bacterias modelo	51
Figura 20. Evaluación de la formación de biopelícula de <i>Escherichia coli</i> EAEC a distintas temperaturas con diferentes medios de cultivo a las 24 h, 48 h y 72 h	52
Figura 21. Evaluación de la formación de biopelícula de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a distintas temperaturas con diferentes medios de cultivo a las 24 h, 48 h y 72 h	52
Figura 22. Evaluación de la formación de biopelícula de <i>Listeria innocua</i> a distintas temperaturas con diferentes medios de cultivo a las 24 h, 48 h y 72 h	53
Figura 23. Cuantificación de biomasa total con la metodología A con toma de alícuota y siembra en medio fresco de <i>Escherichia coli</i> EAEC	54
Figura 24. Cuantificación de biomasa total con la metodología A con recambio de medio de cultivo de <i>Escherichia coli</i> EAEC	55
Figura 25. Evaluación de motilidad con prueba de punción en medio semisólido	60
Figura 26. Evaluación del % de hidrofobicidad de <i>L. innocua</i> de acuerdo a la temperatura de crecimiento	61
Figura 27. Influencia de la temperatura en la eficiencia del tratamiento enzimático con proteínas recombinantes en la reducción de la viabilidad celular en la biopelícula de <i>L. innocua</i>	63
Figura 28. Influencia de la concentración de proteína en el tratamiento enzimático con proteínas recombinantes en la reducción de la viabilidad celular en la biopelícula de <i>L. innocua</i>	64
Figura 29. Influencia del tiempo de exposición en la reducción de viabilidad celular en la biopelícula de <i>L. innocua</i> provocada por el tratamiento enzimático con enzimas recombinantes	65
Figura 30. Comparación del tratamiento enzimático entre enzimas recombinantes (AMI 123 y GLU 32) y comerciales (Lisozima y Proteinasa K) y su efecto en la reducción de la viabilidad celular de la biopelícula de <i>Listeria innocua</i>	67

Figura S1. Perfil proteico de diversas fracciones celulares de las proteínas recombinantes AMI 123 y GLU 32	80
Figura S2. Actividad enzimática de diversas fracciones de las proteínas recombinantes AMI 123 y GLU 32	80
Figura S3. Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> EAEC	82
Figura S4. Curva de crecimiento de <i>Listeria innocua</i> CFQ-B 232	82
Figura S5. Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	82
Figura S6. Curva de crecimiento de microorganismos modelo formadores de biopelícula	83
Figura S7. Evaluación de la formación de biopelícula de <i>Escherichia coli</i> EAEC a distintas temperaturas con diferentes medios de cultivo a las 24 h, 48 h y 72 h	83
Figura S8. Evaluación de la formación de biopelícula de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a distintas temperaturas con diferentes medios de cultivo a las 24 h, 48 h y 72 h	84
Figura S9. Evaluación de la formación de biopelícula de <i>Listeria innocua</i> a distintas temperaturas con diferentes medios de cultivo a las 24 h, 48 h y 72 h	84
Figura S10. Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	85
Figura S11. Cinética de crecimiento de <i>Listeria innocua</i>	85
Figura S12. Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	85
Figura S13. Cuantificación de biomasa total biopelícula <i>Escherichia coli</i>	86
Figura S14. Cuantificación de biomasa total biopelícula de <i>Listeria innocua</i>	86
Figura S15. Cuantificación de biomasa total biopelícula de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	86
Figura S16. Estabilidad de la enzima AMI 123 a distintas temperaturas	87
Figura S17. Estabilidad de la enzima GLU 32 a distintas temperaturas	87
Figura S18. Influencia de la temperatura, concentración de proteína y tiempo de exposición en la reducción de viabilidad celular en la biopelícula de <i>L. innocua</i> provocada por el tratamiento enzimático con AMI 123	91
Figura S19. Influencia de la temperatura, concentración de proteína y tiempo de exposición en la reducción de viabilidad celular en la biopelícula de <i>L. innocua</i> provocada por el tratamiento enzimático con GLU 32	92
Figura S20. Influencia de la temperatura, concentración de proteína y tiempo de exposición en la reducción de viabilidad celular en la biopelícula de <i>L. innocua</i> provocada por el tratamiento enzimático con Lisozima	93
Figura S21. Influencia de la temperatura, concentración de proteína y tiempo de exposición en la reducción de viabilidad celular en la biopelícula de <i>L. innocua</i> provocada por el tratamiento enzimático con Proteinasa K	94
Figura S22. Evaluación del tratamiento enzimático con AMI 123 por 4h a 22°C contra la biopelícula de <i>L. innocua</i>	95
Figura S23. Evaluación del tratamiento enzimático con GLU 32 por 4h a 22°C contra la biopelícula de <i>L. innocua</i>	95
Figura S24. Evaluación del tratamiento enzimático con Lisozima por 4h a 22°C contra la biopelícula de <i>L. innocua</i>	96
Figura S25. Evaluación del tratamiento enzimático con Proteinasa K por 4h a 22°C contra la biopelícula de <i>L. innocua</i>	96

Índice de tablas

Tabla 1. Composición de la matriz extracelular de biopelículas	15
Tabla 2. Métodos de control de biopelículas para su uso en la industria alimentaria	17
Tabla 3. Combinación de enzimas para degradar biopelículas	19
Tabla 4. Clasificación de las PGH de acuerdo al enlace que hidrolizan	21
Tabla 5. Espectro antimicrobiano de algunas PGH	22
Tabla 6. Inhibición del crecimiento de distintas especies bacterianas por PGHs provenientes de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	24
Tabla 7. Subclonas generadas para ambos dominios	26
Tabla 8. Descripción de las cepas y plásmidos usados	31
Tabla 9. Condiciones térmicas de la PCR	32
Tabla 10. Cepas bacterianas y sus respectivos medios de cultivo	38
Tabla 11. Condiciones de formación de biopelículas	40
Tabla 12. Condiciones de tratamiento enzimático	41
Tabla 13. Actividad específica de las proteínas recombinantes	45
Tabla 14. Tabla de purificación de AMI 123	50
Tabla 15. Tabla de purificación de GLU 32	50
Tabla 16. Clasificación de bacterias productoras de biopelículas de acuerdo a la mejor condición del ensayo CV	56
Tabla 17. Determinación de precisión de cuantificación de biomasa total	57
Tabla 18. Concentración mínima inhibitoria de las enzimas recombinantes sobre <i>L. innocua</i>	58
Tabla 19. Condiciones de tratamiento enzimático contra biopelículas	62
Tabla 20. Concentración mínima inhibitoria de lisozima sobre <i>L. innocua</i>	66
Tabla 21. Actividad específica de las enzimas recombinantes AMI 123 y GLU 32 de diversas fracciones celulares del equipo de trabajo	81
Tabla 22. ANOVA del factor concentración de enzima para la enzima AMI 123	88
Tabla 23. ANOVA del factor concentración de enzima para la enzima GLU 32	88
Tabla 24. ANOVA del factor temperatura para la enzima AMI 123	88
Tabla 25. ANOVA del factor temperatura para la enzima GLU 32	89
Tabla 26. ANOVA del factor tiempo de exposición para la enzima AMI 123	89
Tabla 27. ANOVA del factor tiempo de exposición para la enzima GLU 32	89
Tabla 28. ANOVA de los factores concentración de proteína y temperatura para la enzima AMI 123	89

Resumen

Las biopelículas formadas por microorganismos patógenos son un problema permanente en la industria alimentaria, al tener una mayor resistencia a los agentes de limpieza y desinfección. Los tratamientos químicos y con antibióticos presentan el problema de generar efectos adversos o de ineficacia por la creciente resistencia a los antibióticos.

Actualmente el uso de antimicrobianos (de naturaleza proteica), se utiliza como alternativa (o como complemento) a los antibióticos para el tratamiento de infecciones asociadas a biopelículas en el caso clínico, así como en la industria alimentaria. Por lo que se ha planteado el uso de enzimas líticas tales como la proteína de 99-kDa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, una bacteria ácido láctica con actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos patógenos, con el fin de desestabilizar la biopelícula al hidrolizar el peptidoglucano de las bacterias que la componen, así como también la degradación de otros componentes que la conforman.

El presente proyecto tiene como objetivo estudiar el proceso de formación de biopelículas en superficies utilizadas en la industria alimenticia, y el efecto del tratamiento con peptidoglucan hidrolasas recombinantes de *P. acidilactici*. La superficie de trabajo seleccionada fue el poliestireno (material de empaque muy utilizado), siendo el microorganismo modelo *Listeria innocua* (sustituto no patógeno de *Listeria monocytogenes*), se determinó su condición óptima de formación de biopelícula en la superficie para su posterior tratamiento enzimático con las subclonas recombinantes AMI 123 y GLU 32 de la proteína de 99-kDa, obteniendo una disminución del % de viabilidad celular relacionada con la degradación de la biopelícula, ambos dominios catalíticos tuvieron distinto comportamiento debido a la distinta afinidad por los componentes de la biopelícula

1.Introducción

1.1 Contaminación microbiana en los alimentos

Diversos microorganismos están presentes en la industria alimentaria a través de fuentes como agua, alimentos crudos, animales, así como la manipulación o equipos (Figura 1) y pueden persistir en los equipos de procesamiento por largos periodos de tiempo. Por lo tanto, los alimentos pueden contaminarse en cualquier etapa de la producción y empaque de estos, aunque se apliquen los protocolos de limpieza recomendados. Además, los microorganismos pueden formar biopelículas debido a las diferentes condiciones ambientales a pesar de que, tradicionalmente, las células bacterianas se identifican como células de vida libre.

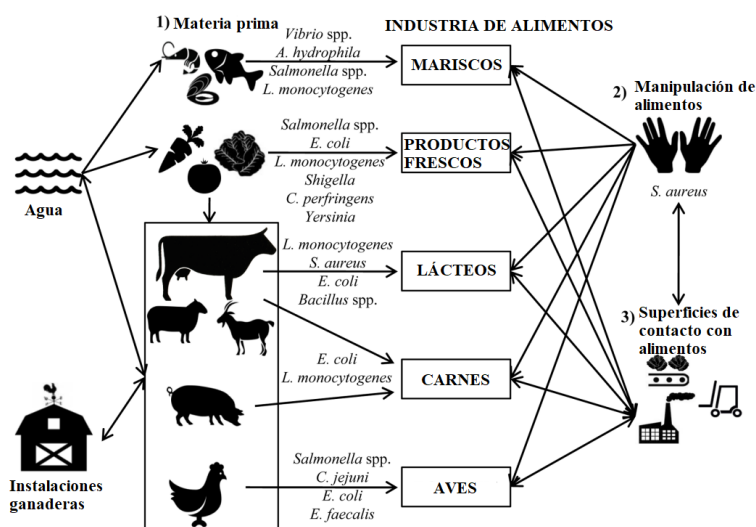


Figura 1. Principales fuentes de contaminación en la industria de alimentos. Se indican las bacterias más comunes detectadas en cada etapa de la producción y empaque de diversos productos alimenticios de la industria alimenticia. (Gutiérrez et al., 2016).

Las biopelículas pueden ser tanto beneficiosas como perjudiciales para la sociedad humana según su ubicación y las especies involucradas. Un estudio sobre el impacto a nivel internacional de biopelículas (Cámara et al., 2022) que abarcó los sectores de la salud, la seguridad alimentaria, la seguridad del agua, la resistencia a los antimicrobianos y la energía encontró que su impacto económico global estimado tiene un valor de más de \$ 5 billones de dólares anuales. En cuanto al sector alimentario, se estima que tienen un impacto global de \$ 324 mil millones anualmente. Su presencia es motivo de preocupación comercial, porque están involucradas en la obstrucción y corrosión de tuberías en los sistemas de producción, entre otros. Otros estudios se refieren a su presencia en alimentos tales como mariscos y lácteos, provocando intoxicaciones que pueden llevar a la muerte (Eraso-Cadena et al., 2016).

1.2 Biopelículas

Las biopelículas son ecosistemas microbianos complejos formados por una o más especies inmersas en una matriz extracelular cuya composición varía según el tipo de entorno de fabricación de alimentos y de la especie colonizadora. La matriz extracelular está compuesta principalmente por polisacáridos, proteínas o ADN exógeno (Galié et al., 2018). Esta matriz puede fijarse a superficies duras (equipamiento de la industria alimentaria, superficies de transporte, distribución y almacenamiento, suelo, etc.) o a estructuras biológicas (verduras, carne, huesos, frutas, etc.). La formación de biopelículas confiere muchas ventajas a las células microbianas en un entorno de la industria alimentaria, como la resistencia física (contra la desecación), la resistencia mecánica (contra corrientes líquidas en tuberías) y la protección química (contra productos químicos, antimicrobianos y desinfectantes utilizados en la industria). Dependiendo de la industria de procesamiento de alimentos, el tipo de bacteria y la ruta de acceso a los alimentos difiere (Gutiérrez et al., 2016).

1.3 Formación de biopelículas

El desarrollo de la forma de vida planctónica (en estado libre) en una forma de biopelícula (comunidad microbiana) implica diferentes etapas (Figura 2):

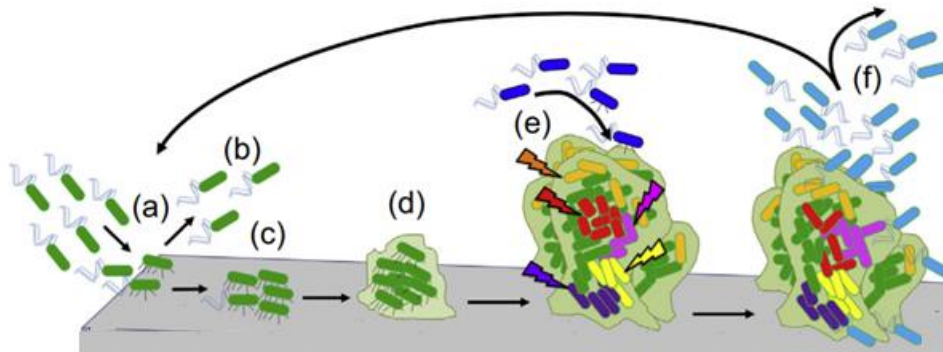


Figura 2. Etapas de formación de la biopelícula microbiana. La imagen de la superficie (rectángulo gris) representa una superficie abiótica, que sirve como sustrato para la unión bacteriana. Adhesión bacteriana: (a) representa la unión inicial de bacterias a la superficie a través de interacciones de proteínas adhesivas, fibras o compuestos no proteicos con la superficie. (b) Inicialmente, la unión a la superficie puede ser reversible hasta que los cambios dependientes del contacto en la bacteria indiquen que se vuelve (c) irreversible. (d) Formación de microcolonias: las bacterias adherentes a la superficie comienzan a replicarse, comienzan a producir y secretar una matriz extracelular (MEC) que encapsula las bacterias, formando una microcolonia en la superficie. (e) Maduración: las bacterias dentro de la biopelícula se replican o a medida que las bacterias se agregan a la biomasa del entorno circundante (indicado por bacterias de color azul oscuro que se adhieren a la superficie de la biopelícula). (f) Dispersión de la biopelícula: las señales provenientes del exterior y del interior

de la biopelícula pueden desencadenar la dispersión de bacterias de la biomasa (indicadas por bacterias de color azul claro). Estas bacterias pueden restablecer la biopelícula en otros lugares o establecer una infección independientemente de la formación de la biopelícula. (Floyd et al., 2017).

Adhesión o anclaje: las células planctónicas que flotan libremente identifican una superficie e inician el proceso de unión. La unión de las células planctónicas a la superficie no es permanente. Se lleva a cabo con ayuda de los flagelos (desplazamiento) y los pili (como estructuras de anclaje), que todavía están presentes en la célula bacteriana durante esta etapa. El cambio desde la adhesión reversible a irreversible se produce por la transición desde una interacción débil de la célula con el sustrato hasta un enlace permanente, frecuentemente mediado por la presencia de polímeros y apéndices extracelulares (Floyd et al., 2017).

Colonización: cuando la unión de las células bacterianas a la superficie del sustrato es irreversible, comienza un proceso de multiplicación y división de células microbianas, iniciado a través de señales químicas particulares (quorum sensing), además se favorece la biosíntesis de los principales componentes de la matriz extracelular, como EPS y proteínas. Este proceso conduce luego a la formación de micro-colonias (Jamal et al., 2018).

Maduración: se expresan ciertos productos génicos importantes para la formación de EPS. Dado que el EPS es el material principal en la estructura tridimensional de la biopelícula, se producen canales en la matriz. Estos canales están llenos de agua y actúan como un sistema circulatorio, utilizado para distribuir nutrientes importantes y eliminar los productos de desecho de las comunidades de microcolonias en la biopelícula (Jamal et al., 2018).

Desprendimiento: se observa el desprendimiento y la dispersión de las células de la biopelícula y el inicio de la formación de una nueva biopelícula. Durante el proceso de desprendimiento, las comunidades microbianas dentro de la biopelícula producen diferentes enzimas que ayudan a liberar la superficie de los microorganismos en una nueva área para la colonización. Las células dispersas son morfológicamente más similares a las células planctónicas que a las células de biopelícula maduras, que son cruciales para volver a convertirse en una nueva biopelícula (Arunasri et al., 2019).

Dependiendo del microorganismo, la matriz extracelular será diferente, en la Tabla 1 se presenta la composición de ésta en algunos patógenos:

Tabla 1. Composición de matriz extracelular de biopelículas (Elaboración propia)

Microorganismo	Matriz extracelular	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	Tres exopolisacáridos principales: polímero de β -1,6-N acetil-D-glucosamina (PGA), celulosa y ácido colánico. Otros componentes los lipopolisacáridos y los polisacáridos capsulares.	Sharma et al., 2016
<i>Listeria monocytogenes</i>	Principal exopolisacárido: poli- β -(1,4)- N - acetilmanosamina (poli-NAM), presencia de ácidos teicoicos, así como proteínas que ayudan a la adhesión y ADN extracelular.	Colagiorgi et al., 2017
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mezcla viscosa de polisacáridos extracelulares, principalmente Psl, Pel (rico en glucosa) y alginato (ácido α -D-manurónico y ácido glucurónico). También hay proteínas como CdrA y eDNA.	Rasamiravaka et al., 2017

Se han reportado como factores que facilitan la creación de biopelículas, la composición química, la estructura de la superficie y su rugosidad. También el grado de hidrofobicidad de la superficie celular influye en las interacciones hidrofóbicas entre las células y la superficie que median la unión bacteriana; además de la movilidad de la cepa que favorezca la adhesión a superficies (Eraso-Cadena et al., 2016). Los factores ambientales que rodean a la biopelícula también desempeñan un papel importante (Eraso-Cadena et al., 2016). Por ejemplo, un medio que contiene glucosa en altas concentraciones afectará la capacidad de acoger microorganismos y captarlos en esa matriz extracelular, pues provocará cambios en la expresión de genes implicados en procesos de adherencia, además de la biosíntesis y metabolismo de aminoácidos que acompañan la estabilización y el mantenimiento de la biopelícula a través del tiempo y el espacio.

1.4 Métodos de control

Actualmente se utilizan varios métodos físicos (como vapor caliente, ultrasonidos) y compuestos químicos (como hipoclorito de sodio, soluciones de hidróxido de sodio, peróxido de hidrógeno, ácido peracético, etc.) para controlar la formación de biopelículas en la industria alimentaria. Se han implementado nuevas estrategias para prevenir la formación de

biopelículas, que eviten que las bacterias desarrollen resistencia a los desinfectantes en los entornos de procesamiento de alimentos, entre las que se encuentra el uso de bacteriófagos, bacteriocinas, inhibidores de “quorum sensing”, aceites esenciales, entre otros (Coughlan et al., 2016). Los métodos más utilizados se presentan en la Tabla 2:

Tabla 2. Métodos de control de biopelículas para su uso en la industria alimentaria (Elaboración propia)

Método	Mecanismo de acción	Ejemplo	Referencia
Tratamiento químico	Oxidación de estructuras celulares. Pueden afectar la superficie sobre la cual se aplican.	hipoclorito de sodio, soluciones de hidróxido de sodio, peróxido de hidrógeno, ácido peracético	Ban et al., 2016
Aceites esenciales	Inhibición de motilidad al reducir la síntesis de estructuras de anclaje, se consideran irritantes.	Citral, carvacrol	Friedman et al., 2014
Tratamiento físico	Efecto bactericida, puede modificar características sensoriales de la matriz alimentaria.	Radiación UV, ultrasonido	Nica et al., 2017
Biosurfactantes	Inhibición de la adhesión bacteriana al modificar las características hidrofóbicas de la superficie.	Surfactina	Zhang et al., 2017
Revestimientos	Disminución de la adhesión bacteriana.	Superficies repelentes	Jindal et al., 2016
Inhibición QS	Regulación de la expresión de genes relacionados con la adhesión	Inhibición de síntesis de señales de quorum sensing, inhibición de receptores	Coughlan et al., 2015

Tratamiento enzimático	Ruptura de la matriz extracelular	Glicosidasas, Celulasas, proteasas, DNAsas	Coughlan et al., 2016
Bacteriófagos	Lisis celular	Fago P100	Fister et al., 2016
Bacteriocinas	Alteración de la membrana celular	Nisina	Stempel et al., 2015

En las plantas de fabricación de alimentos se llevan a cabo procesos diarios de desinfección para eliminar los microorganismos que han entrado, y tienen como objetivo evitar la colonización o persistencia. Las medidas involucradas incorporan procesos mecánicos, químicos, térmicos, entre otros para eliminar las biopelículas de la manera más eficiente posible.

La mejor estrategia para erradicar las biopelículas bacterianas de los entornos relacionados con los alimentos es prevenir su formación. Esto se puede lograr excluyendo a las bacterias formadoras de biopelículas en áreas críticas, por ejemplo, fabricación en condiciones asépticas o esterilización terminal de preparaciones y equipos. Es importante que los agentes anti-biopelícula utilizados en las instalaciones de procesamiento de alimentos cumplan con los requisitos de seguridad establecidos por los organismos reguladores apropiados. Los agentes que se consideren exitosos en el laboratorio también deben probarse y demostrar que son seguros para su aplicación en superficies en contacto con alimentos, especialmente, si dichos agentes deben agregarse al producto alimenticio en sí. Además, la calidad del producto es una prioridad para los fabricantes de alimentos, por lo que los inhibidores de biopelículas no deben influir en el sabor, la textura o la palatabilidad de los alimentos de ninguna manera (Galié et al., 2018).

Como las biopelículas son comunidades complejas, sus características únicas aumentan la posibilidad de resistencias químicas y físicas, dificultando en algunos casos su eliminación y favoreciendo su persistencia en el entorno industrial. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos enfoques antimicrobianos es muy importante en este sector industrial.

1.5 Tratamiento enzimático contra biopelículas

Las enzimas son un tipo de tratamiento biológico que también incluye a los bacteriófagos y bacteriocinas. Las enzimas están directamente involucradas en la producción de EPS, la comunicación de célula a célula, la maduración de la biopelícula y el proceso de dispersión (Coughlan, 2016).

Las enzimas anti-biopelícula están dirigidas contra las células bacterianas incrustadas en la matriz y promover la lisis celular (Figura 3). Sin embargo, su blanco principal es el EPS, donde rompen el enlace de célula a célula y, al separar continuamente las células, degradan las macromoléculas de la matriz y aceleran la alteración de la biopelícula objetivo.

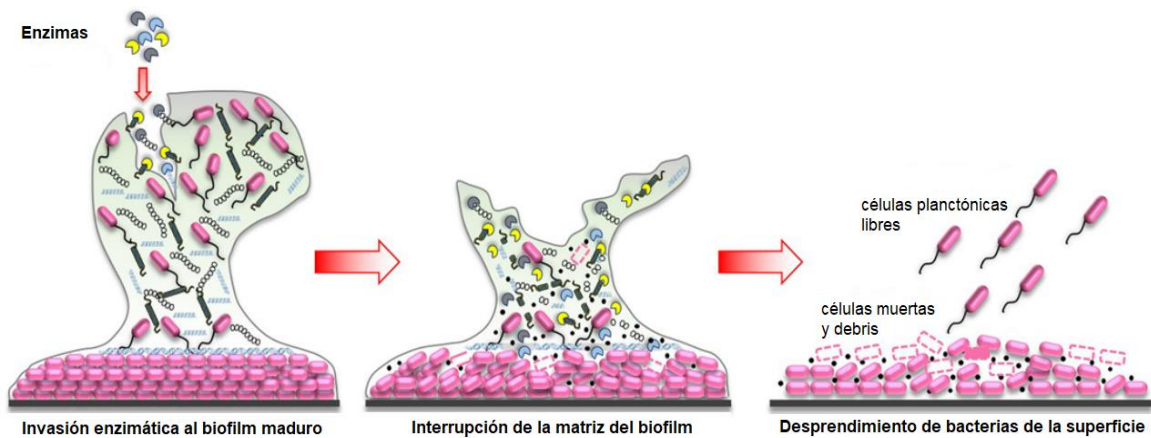


Figura 3. Degradación enzimática de biopelícula madura. Se muestra el mecanismo general de la actividad enzimática en una biopelícula madura donde la estructura de la biopelícula se descompone al ser perturbada por la presencia de enzimas, por lo que las bacterias regresan a su estado planctónico (Nahar et al., 2018).

Las enzimas son específicas del sustrato y el contenido de la matriz de EPS también varía de una especie a otra. Por tanto, se puede utilizar una determinada concentración de hidrolasa de polisacárido, proteasa, bacteriocina (como la nisina), peptidoglucan hidrolasa (por ejemplo, la lisostafina o endolisinas, etc.) y / o DNasa para degradar los polisacáridos extracelulares, proteínas y / o DNA extracelular de una matriz de biopelícula bacteriana (Nahar et al., 2018). En la Tabla 3 se presentan algunos ejemplos de mezclas de enzimas con distinta actividad para la degradación de biopelículas:

Tabla 3. Combinación de enzimas para degradar biopelículas (Elaboración propia)

Enzimas	Superficie	Especie formadora de biopelícula	Referencia
Lisostafina + Nisina	Poliestireno	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ceotto-Vigoder et al., 2016
Endolisina LysH5 + Nisina	Poliestireno, leche pasteurizada	<i>Staphylococcus aureus</i>	García et al., 2010
Dnasa + Proteinasa K	Poliestireno y acero inoxidable	<i>Listeria monocytogenes</i>	Nguyen et al., 2014

1.6 Peptidoglucano hidrolasas

Las peptidoglucano hidrolasas (PGH) son enzimas con propiedades antimicrobianas que están involucradas en varias funciones, incluyendo la maduración del peptidoglucano, recambio, reciclaje, autólisis, escisión del septum durante la división celular y resistencia a antibióticos (Alcorlo et al., 2017). También participan en el crecimiento de la pared celular bacteriana y su regulación y también en diferentes fenómenos de lisis.

Debido a que tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces que forman la red del peptidoglucano (Figura 4), componente principal de la pared celular de las bacterias, siendo de gran interés su aplicación como antibacterianos en productos alimenticios, debido a la alta especificidad y acción contra microorganismos patógenos que pueden presentar (Vollmer et al., 2008).

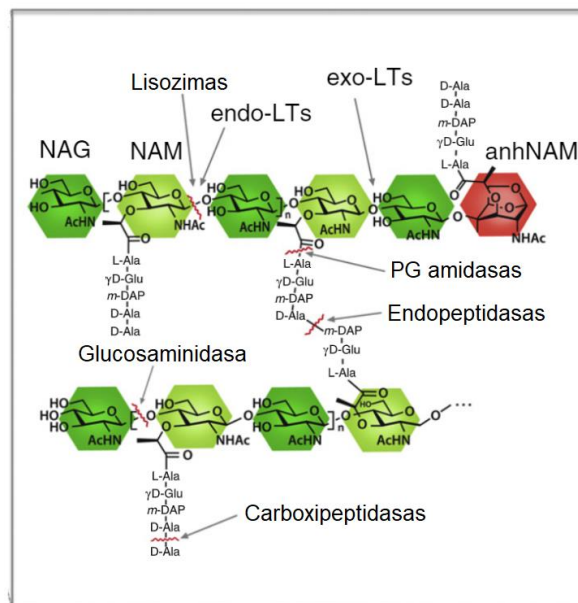


Figura 4. Esquema detallado del peptidoglucano (PG) y las diversas peptidoglucano hidrolasas implicadas en el procesamiento del peptidoglucano. La capa de PG consta de hebras lineales de glucano

entrecruzadas por cadenas laterales de péptidos mediante enlaces peptídicos. Las hebras de glucano están formadas por unidades repetitivas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico (NAG-NAM, verde oscuro y claro respectivamente) que están unidos mediante enlaces glucosídicos (Alcorlo et al., 2017).

Al ser enzimas capaces de escindir enlaces en fragmentos solubles, se dividen en varias clases, definidas en función de su especificidad para los enlaces covalentes (Figura 4). Pueden actuar sobre los enlaces glucosídico (glicosidasas) o peptídico (peptidasas) en el peptidoglucano.

1.7 Clasificación de peptidoglucano hidrolasas

En la Tabla 4 se muestra la clasificación de las PGH de acuerdo al tipo de enlace que hidrolizan en el peptidoglucano (Alcorlo et al., 2017). En cuanto al enlace glucosídico, existen las glicosidasas, que se pueden distinguir subgrupos diferentes: glucosaminidasas, lisozimas y transglicosilasas líticas. Las muramidasas se dividen en lisozimas (enzimas hidrolíticas) y las transglicosilasas líticas (enzimas no hidrolíticas). En cuanto al enlace peptídico, existen las peptidasas, que se pueden distinguir dos grupos diferentes, amidasas y peptidasas, dependiendo de la naturaleza y localización del enlace amida a hidrolizar.

Tabla 4. Clasificación de las PGH de acuerdo al enlace que hidrolizan (Elaboración propia)

Tipo de enzimas	Clasificación	Enlace que hidrolizan	Residuo resultante
GLICOSIDASAS	Glucosaminidasa	Enlace glucosídico (β -1,4) entre NAG y otros monosacáridos	Extremo NAG reductor
	Muramidasa	Enlace β -(1,4) glucosídico entre los residuos de NAG y NAM secuenciales	Lisozima: NAM reductor terminal
			Transglicosilasa lítica: 1,6-anhidro en el residuo de NAM
PEPTIDASAS	Amidasa	Enlace peptídico entre NAM y el N-terminal de la L-Ala	Separa la cadena de glucanos de los péptidos, y libera péptidos de las ramificaciones
	Peptidasa	Enlace peptídico entre péptidos (interno o externo)	Carboxipeptidasa: tetrapéptido al eliminarse L-Ala del extremo
			Endopeptidasa: péptidos variables

1.8 Aplicación en alimentos

Las peptidoglucano hidrolasas tienen el potencial de ser utilizadas en la industria alimentaria para la conservación, en la agricultura para lograr resistencia contra bacterias fitopatógenas y como agentes antibacterianos (Sharma et al., 2016). Podrían convertirse en una nueva clase de agentes antibacterianos para contrarrestar el problema de la resistencia a los antibióticos en organismos patógenos. Considerando la relevancia de la pared celular bacteriana como un objetivo principal de los antibióticos, las PGH serán esenciales en la lucha contra el creciente problema de la resistencia a múltiples fármacos. En la Tabla 5 se presentan algunas PGH que se han utilizado contra patógenos:

Tabla 5. Espectro antimicrobiano de algunas PGHs (Elaboración propia)

Enzimas	Clasificación	Espectro antimicrobiano	Referencia
Lisozima	Muramidasa	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sudagidan et al., 2012
Lisostafina	Endopeptidasa	<i>Staphylococcus aureus</i>	Lister et al., 2014
Dispersina B	Glucosidasa	<i>Escherichia coli</i>	Ghalsasi et al., 2016

Actualmente la única PGH aprobada como aditivo alimentario es la lisozima (muramidasa), aunque se busca que otras enzimas antimicrobianas provengan de bacterias que no sean consideradas patógenas para que sea seguro su consumo (Carrillo, 2013).

2. Antecedentes

2.1 Enzimas líticas de *Pediococcus acidilactici*

El género *Pediococcus* está conformado por bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas, no esporuladas, homofermentativas; la especie *P. acidilactici* se ha utilizado en fermentaciones naturales y controladas de vegetales y embutidos, además esta especie produce compuestos antimicrobianos que pueden utilizarse como cultivos protectores o biopreservantes en alimentos por el uso de los cultivos o sus productos.

Pediococcus acidilactici ATCC 8042 es una BAL utilizada como cultivo iniciador en productos cárnicos maduros en los que ha presentado efecto bioconservador e inhibidor del crecimiento de *S. aureus* y de mesófilos aerobios (Rivera, 2004) dicho efecto bioconservador es conferido por la actividad de peptidoglucano hidrolasa intracelular (García-Cano et al, 2011).

En investigaciones realizadas anteriormente por el grupo de trabajo se reportó la producción de dos proteínas por parte de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 localizadas mayoritariamente en la fracción correspondiente a las proteínas unidas a membrana capaces de hidrolizar células de *Micrococcus lysodeikticus*. En extractos celulares de esta cepa evaluados por zimografía contra *M. lysodeikticus* se reportaron dos bandas con actividad lítica a los 110- y 99-kDa. La actividad antimicrobiana de dichas enzimas en conjunto se determinó con pruebas de difusión en agar contra *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Lactocaseibacillus paracasei*, *S. enterica serovar Typhimurium* y *E. coli*; por turbidimetría, contra *M. lysodeikticus* y por zimograma, contra *Staphylococcus aureus* y *E. coli* con resultados positivos (García-Cano et al., 2011; Velasco Pérez, 2010; García-Cano, 2013).

Ambas proteínas también fueron secuenciadas y se determinó utilizando el programa BLAST que aquella con peso molecular de 99-kDa presentaba dos dominios conservados: uno de N-acetilglucosaminidasa y otro de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (Figura 5), típicos en las peptidoglucano hidrolasas; mientras que la proteína de 110-kDa tenía regiones características de un transportador ABC con un 47% de cobertura y un 100% de identidad

1 MFKSGKKWAF ASIATASLGL VALNTNAEKA HADSDAQANT NSASQLDQQT KTAQVNEKQV
 61 TLAKPATVKA SSAAVTAQSA APAPSAQA AKVNADSTAK ADQHSAAKV GTKATTSSAV
 121 KPAKEAASAN AVKAAPASSA AKKVSTSVAS SAAPSSAASK TVTSAAVKDS AAKEAVSSAA
 181 NVKSSSAAK TSVNSSAVSE AAKKDAKAEK TAEKKTDNSS KDYIDNTYR LADNEGSDQK
 241 TNNKIIVAHA VGQYSSARDV AIYEKREWDS SETYVQYIVG DGGRVYAVGE EGYVAWGAGK
 301 WANENAPVQV ELAQYSDSQ FKKDYQTYVN LLRDSAKKWN IPTLDSDEY TGIKSHVWVT
 361 EHVWGNHVDV YGYLGTGHTG KEQFAHDLAY GFDNDAANDN QNNNQNDNHQ NDNQNNQNNN
 421 HQNDSSNNHG NQNNQSYHVG DKVTIKNSAS HWATGQSIYN GVKGHTYKII QTNGHKLLLD
 481 QVISWINDGD VYKAGSNSGS SNNHNNHTT NNADIKVGTV VTINNNASHW ATGQSIYSGV
 541 KGKSYKVIQT NGRLLLLDKV ISWINKGDVH VPGSNSNNNN SGNQNHNNGN NHHNNNGNTS
 601 IHVGSKVTIN NNAKRWATGQ NIYSGVKGKT YTVIQMNGSR LLLDKVISWI NKGDVHLPGS
 661 NGSQNNNNNN NNHANNNDGT IRVGTNVTIK PSAKRWATGQ NIYYGVKGKT YKVIQMNGNR
 721 LLLDKVISWI NKGDVYVPGS SNNNNSNSNN NHHNNNGSNYH FTNQNWTAQA TNFVNSIASD
 781 VMNVCQNNHL YASVAMAQAV VESAYGASTL AQEAHNLFGI KADSTWHGAT YTKNTQEVIN
 841 GRVVTISAAF RKYDSFKDSI ADYAKKLESR PQYANAFSNH AHNYVESVKA IKAGGYATAP
 901 TYVSSIVNCI NNYGFYKLDG LNSAISL

Figura 5. Secuencia en aminoácidos de la enzima de 99-kDa codificada en el genoma de *P.acidilactici* 7_4. Verde: péptido señal Rojo: dominio de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa Azul: dominio de N-acetilglucosaminidasa [RefSeq: WP_002829921; NCBI] (Campos, 2016)

Posteriormente el gen que codifica para la proteína de 99-kDa se clonó y expresó en el vector pET-19b, la proteína se purificó por medio de columna de exclusión molecular, tras lo que se realizó otro espectro antimicrobiano, en el que disminuyó el número de cepas susceptibles, sobre todo en Gram-negativas (Tabla 6) [García-Cano et al, 2011]

Tabla 6. Inhibición del crecimiento de distintas especies bacterianas por PGHs provenientes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (García- Cano et al, 2011).

Cepa		Extracto con las PGHs 110 y 99-kDa	PGH recombinante de 99-kDa
Gram positivas	<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103	✓	✓
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	✓	✓
	<i>Lactobacillus paracasei</i> CFQ-B-90	✓	✓
	<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	✓	✓
	<i>Enterococcus faecalis</i> QB	✓	✓
	<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B-230	✓	ND
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	✓	ND
Gram negativas	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 27853	✓	ND
	<i>Escherichia coli</i> DH5α	✓	ND
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	ND	ND

ND= no detectable

2.2 Subclonación de la proteína bifuncional

La proteína de 99-kDa se encuentra reportada como peptidoglucano hidrolasa (PGH) bifuncional (GenBank: AKD44141) por presentar dos dominios catalíticos: de N-acetilmuramil-L-alanina amidasa y de N-acetilglucosaminidasa.

Existen reportes de enzimas bifuncionales que contienen los dominios de N-acetilmuramil-L-alanina y N-acetilglucosaminidasa producidas por el género *Staphylococcus* (Yokoi et al, 2008). Existen varios ejemplos de otras enzimas bifuncionales provenientes de distintas bacterias con actividades similares a la PGH bifuncional de 99-kDa, de acuerdo a su espectro antimicrobiano tienen actividad lítica contra algunos microorganismos patógenos de importancia clínica. Estas enzimas presentan una secuencia de aminoácidos entre los dominios catalíticos, las cuales se denominan secuencias repetidas, que se han relacionado con el anclaje a membrana celular (Figura 6). Algunos autores han generado proteínas recombinantes con un solo dominio catalítico variando la longitud de la región intermedia, y además han mostrado que estas enzimas tienen actividad lítica de manera independiente (Bourgeois et al, 2009).

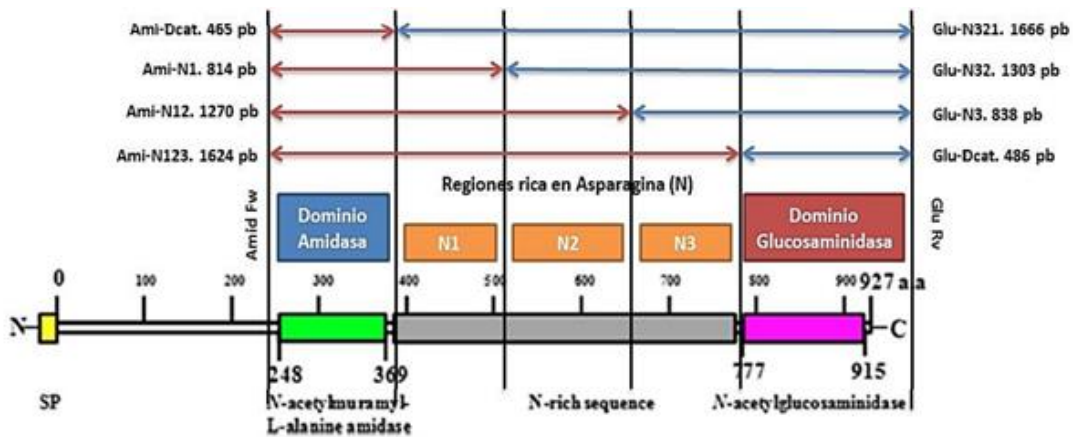


Figura 6. Subclonas de N-acetilmuramil-L-alanina amidasa y N-acetilglucosaminidasa. Se representan las regiones que se amplificaron a partir de la secuencia del gen que codifica para la proteína de 99-kDa, así como el tamaño esperado de cada amplicon. Como se observa se obtendrán distintas subclonas de la misma enzima. (Campos, 2016)

En la clonación y expresión de las proteínas recombinantes se utilizó como vector al plásmido pET-22b el cual cuenta con un tallo de histidinas en el extremo amino terminal y un péptido señal que dirige la proteína recombinante al periplasma, además de presentar una secuencia dentro de este vector que codifica para la resistencia a la ampicilina.

Al momento de nombrar las subclonas generadas se les asignó el prefijo Ami (N-acetilmuramil-L-alanina amidasa) o Glu (N-acetilglucosaminidasa) dependiendo del dominio catalítico que contenían, Dcat si sólo contenía el dominio catalítico y N1, N12 o N123 de acuerdo con la región intermedia que abarcaba la construcción. Así, las construcciones generadas (Tabla 7) fueron las siguientes:

Tabla 7. Subclonas generadas para ambos dominios (Campos, 2016).

Subclona Dominio amidasa	Peso molecular kDa	Subclona Dominio glucosaminidasa	Peso molecular kDa
AmiDcat	20	GluDcat	22
AmiN1	31	GluN3	31
AmiN12	55	GluN32	51
AmiN123	65	GluN321	65

Se demostró que ambos dominios catalíticos (N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa y N-acetilglucosaminidasa) presentan actividad lítica independiente (Figura 7). Del dominio de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa la única subclona que presentó actividad lítica fue AmiN123 y del dominio de N-acetilglucosaminidasa las 3 subclonas que contienen región espaciadora (GluN3, GluN32 y GluN321) presentaron actividad lítica en zimograma contra *M. lysodeikticus* (Campos, 2016).

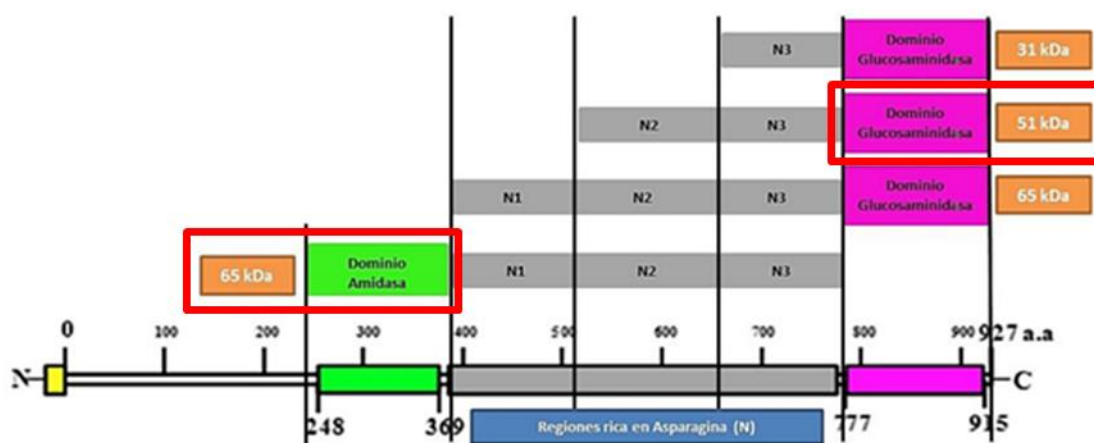


Figura 7. Detección de actividad lítica de las subclonas en zimogramas contra *M. lysodeikticus*. Del dominio de N-acetilmuramil-L-alanina amidasa (recuadro verde) solo se detectó actividad lítica en la subclona AmiN123 y para el dominio de N-acetilglucosaminidasa (recuadro rosa) todas las subclonas tuvieron excepto en GluDcat. Su masa molecular (kDa) se muestra en el recuadro naranja (Campos, 2016). Los recuadros rojos señalan las enzimas recombinantes que se utilizaron posteriormente.

Se seleccionaron las subclonas AmiN123 y GluN32 (Figura 7) para determinación del espectro antimicrobiano al ser las que mostraron mayor actividad lítica en zimogramas, este se comparó con el espectro generado por la proteína recombinante intacta, así como con el de la mezcla de dos enzimas producidas por el microorganismo (110 kDa y 99 kDa) (Ortega, 2017). Por el método de difusión en agar (Figura 8) se encontró actividad antimicrobiana de la subclona GluN32 (en adelante GLU 32), del dominio de N-acetilglucosaminidasa, contra *S. aureus* y *L. monocytogenes* y de la subclona AmiN123 (en adelante AMI 123), del dominio de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, contra *L. paracasei* y *E. faecalis*.

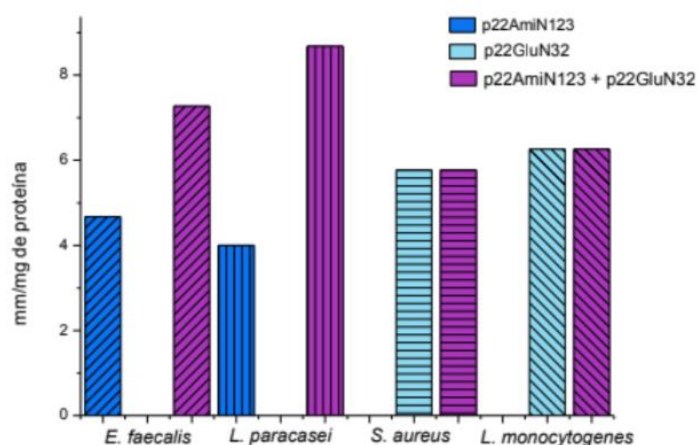


Figura 8. Comparación de la actividad inhibitoria de las subclonas de ambos dominios y la mezcla de las mismas por el método de difusión en agar. El tamaño de los halos de inhibición en relación a la cantidad de proteína adicionada permite tener una idea de la susceptibilidad de los microorganismos a las enzimas, se tomó como positiva la prueba cuando el diámetro del halo de inhibición del microorganismo indicador fue mayor a 1 mm, el que se correlacionó con la concentración de proteína total colocada en cada pozo (Ortega, 2017).

Cuando se mezclaron ambas enzimas hubo un aumento sinérgico en la actividad contra las bacterias ácido lácticas (*L. paracasei* y *E. faecalis*) lo que sugiere que el dominio de N-glucosaminidasa, aunque por sí sólo no tiene efecto contra éstas, si tiene un impacto sobre las mismas. La mezcla de ambas enzimas comparada con la enzima recombinante completa de 99 kDa tiene el mismo espectro, a excepción de que ésta última también tiene actividad contra *P. acidilactici* (Ortega, 2017).

3. Justificación

Los patógenos transmitidos por los alimentos y sus estructuras asociadas, como las biopelículas, son una amenaza constante para las industrias alimentaria, médica, entre otras. Debido a esta gran variedad de microorganismos que tienen la capacidad de producir biopelículas y afectar la salud humana, se hace necesario recopilar información reciente y detallada que aporte un amplio conocimiento de cómo hoy en día las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos más complejos y hacen que sus niveles de patogenicidad aumenten paulatinamente por procesos de simbiosis, se adapten a diferentes medios y se conviertan en un problema emergente para la salud humana. Los efectos adversos de los tratamientos químicos y la creciente resistencia a los antibióticos han fomentado el desarrollo de herramientas para la eliminación de biopelículas.

La erradicación enzimática de las bacterias asociadas a las biopelículas es una estrategia alternativa. En biopelículas de especies mixtas sigue siendo un desafío debido a la naturaleza específica del sustrato de la mayoría de las enzimas. Entonces, la dispersión eficiente de la biopelícula requiere formulaciones multienzimáticas capaces de degradar polisacáridos, ADN extracelular y moléculas QS presentes en la matriz extracelular. Además, los patógenos formadores de biopelículas no desarrollan resistencia a las enzimas, ya que los objetivos de las enzimas son los polisacáridos de la matriz EPS y no los microorganismos. Por lo tanto, se podría lograr una actividad antimicrobiana de amplio espectro combinando estas enzimas con distinta actividad catalítica con fármacos antimicrobianos.

4. Hipótesis

Las enzimas recombinantes con distintos dominios catalíticos de la proteína de 99-kDa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, podrán degradar componentes de las biopelículas al tener afinidad por enlaces presentes en los exopolisacáridos o proteínas; así como degradar el peptidoglucano de los microorganismos modelo de importancia en la industria alimenticia, reduciendo parcialmente su presencia en la superficie de interés.

5. Objetivo general

Evaluar la degradación de biopelículas mediante tratamiento enzimático con las peptidoglucan hidrolasas recombinantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

5.1 Objetivos específicos

1. Transformar la cepa *E.coli* Rosetta con los plásmidos que codifican a las proteínas de interés provenientes de la proteína de 99-kDa y evaluar las condiciones óptimas de producción.
2. Determinar las condiciones óptimas de pH y temperatura para la actividad enzimática de las proteínas recombinantes de 99-kDa, así como su estabilidad.
3. Obtener las biopelículas de bacterias patógenas y sus condiciones óptimas de formación.
4. Evaluar y comparar el efecto de las enzimas recombinantes de 99-kDa de acuerdo a los parámetros de temperatura, concentración de proteína y tiempo de exposición.

6. Metodologías

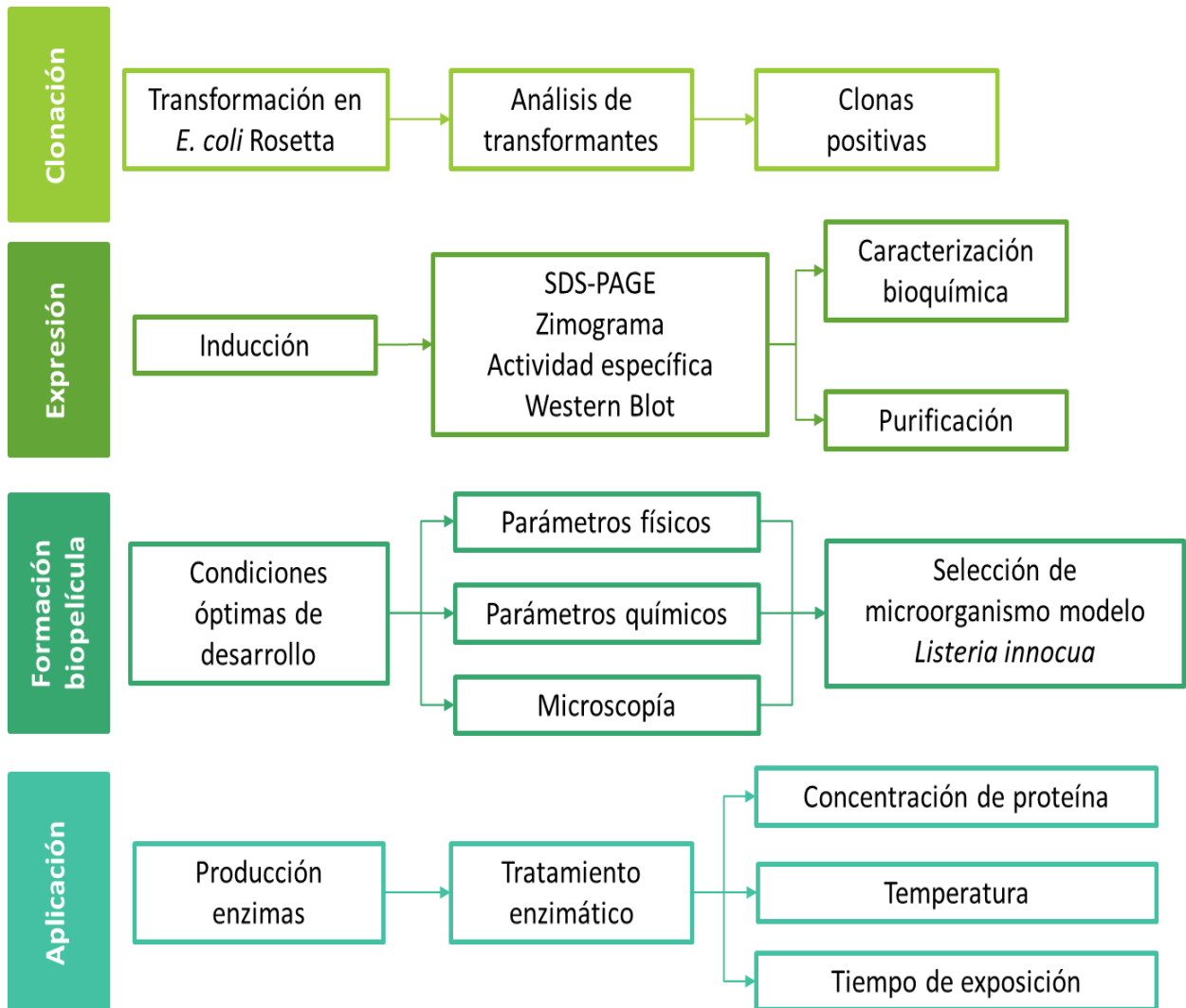


Figura 9. Diagrama de la metodología experimental general

6.1 Generación de las clonas recombinantes

6.1.1 Cepas y plásmidos

Las cepas y plásmidos utilizados en el presente trabajo se muestran en la Tabla 8

Tabla 8. Descripción de las cepas y plásmidos usados

Cepa/Plásmido	Observaciones
<i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	Cepa de colección ATCC
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	Cepa de clonación y expresión. Ampliamente reportada en la expresión de genes tóxicos.
pET-22b	Vector de expresión, resistencia a ampicilina, promotor T7 lac, His-Tag en el amino terminal, péptido señal peIB leader (Novagen, USA).

6.1.2 Extracción de plásmido de las construcciones deseadas

Se extrajo el plásmido de las construcciones Ami123 y Glu32, para lo que se ocupó el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific), siguiendo las especificaciones señaladas por el proveedor. Este plásmido se ocupará para la posterior transformación en la nueva cepa hospedera.

6.1.3 Preparación de células competentes

Se tomaron 200 μ L de células de *E. coli* Rosetta y se adicionaron a un tubo con 5 mL de medio Luria-Bertani se dejó crecer 12 h a 37°C, 200 rpm. Posteriormente, se realizó una resiembra del 1 % del pre-inóculo a 50 mL de medio fresco y se incubó en las mismas condiciones anteriormente descritas, hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.1. Una vez alcanzada esa densidad óptica se centrifugaron los 50 mL de medio a 8,500 rpm, 10 min, 4°C. El pellet se resuspendió en 15 mL de CaCl₂ 100 mM y se incubó en hielo durante 30 min. Después se centrifugó bajo las mismas condiciones, se resuspendió en 2 mL de CaCl₂ 50 mM, y se incubó en hielo por lo menos 2:30 h para obtener células competentes.

6.1.4 Transformación

Se realizó la mezcla de transformación, consistió en tomar 85 μ L de células competentes, más 5 μ L del plásmido extraído, mezcla que se dejó incubar 30 min en hielo. Después se le aplicó un choque térmico, elevando la temperatura a 42°C durante 2 min, e inmediatamente se incubó en hielo durante 5 min. La mezcla de transformación se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se le adicionó 1 mL de medio LB para recuperar las células (37°C, 250 rpm, 2 h). Se

centrifugó el tubo a 8,500 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200 µL de medio LB. Se plaqueó sobre cajas de agar LB con ampicilina (100 µg/mL concentración final) y cloranfenicol (concentración final 34 µg/mL), se incubó durante toda la noche a 37°C. Se seleccionaron colonias al azar las cuales se inocularon en tubos de 5 mL de medio LB con los antibióticos necesarios y se incubaron aproximadamente 12 h a 37 °C y 200 rpm. Posteriormente se extrajo el plásmido de las colonias seleccionadas, para lo que se ocupó el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific), siguiendo las especificaciones señaladas por el proveedor. Este plásmido se ocupará para el posterior análisis de las transformantes.

6.1.5 Análisis de las transformantes

Utilizando como ADN templado los plásmidos extraídos de las colonias seleccionadas para cada construcción, se realizó la PCR con los cebadores universales T7. Para todas las subclonas generadas se utilizaron los cebadores T7 promotor (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y T7 terminador (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'). Se utilizó la enzima Taq polimerasa (Thermo Scientific). Como control negativo se utilizó una transformante la cual contenía el vector de clonación pET-22b sin ningún inserto. Las condiciones térmicas utilizadas se presentan en la Tabla 9 a continuación:

Tabla 9. Condiciones térmicas de la PCR

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30
Alineamiento	54°C	40 s	
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	72°C	10 min	1

El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % (m/v) utilizando amortiguador TAE 1x. Los productos obtenidos de la PCR se mezclaron con amortiguador de carga 6x. La electroforesis se corrió a 90 V durante 1 hora y el gel se reveló con bromuro de etidio al 0.01 % sobre un transiluminador de luz UV.

6.1.6 Conservación de cepas

La conservación de las cepas que contenían las construcciones ya verificadas se realizó haciendo un preinóculo de cada una de ellas en un tubo con 5 mL de medio LB con los antibióticos correspondientes, tomando una alícuota de 200 μ L de los tubos que contenían a las colonias positivas incubando a 37 °C, 200 rpm, durante 12 h. Posteriormente se realizó una resiembra en un tubo con 5 mL de medio LB con el antibiótico adecuado, incubando a las mismas condiciones hasta llegar a una DO_{600nm} = 0.6-0.8. Después se tomaron 0.8 mL del cultivo adicionando 0.2 mL de glicerol al 80 % y se almacenaron a -70 °C.

6.2 Producción de enzimas recombinantes

6.2.1 Inducción de la expresión de la proteína recombinante en *E. coli* Rosetta

Una vez obtenidas clonas positivas de acuerdo a los resultados de amplificación, se procedió a la expresión de la proteína de interés. Campos-Gómez (2015) reportó las mejores condiciones de inducción para este tipo de enzimas (resultan muy tóxicas para la célula hospedera) en la cepa hospedera de *E. coli* Rosetta. También Ibarra y Luna (2022) probaron las diversas condiciones obteniendo mayor actividad específica a menor temperatura (22°C) que la utilizada por Campos de 37°C. De acuerdo a esos resultados, se decidió trabajar con las siguientes condiciones: 22°C de incubación, 3 h de inducción, 0.4 mM de IPTG como inductor. Una vez definidos estos parámetros, se realizó un preinóculo partiendo de la construcción conservada a -70°C, adicionando 200 μ L a un tubo con 5 mL de medio LB más ampicilina, incubado a 37°C, 250 rpm, durante 12 h. De este pre-inóculo se tomaron 250 μ L que fueron adicionados a 100 mL de medio LB más antibiótico y se incubaron a 37°C, 200 rpm hasta llegar a una $D.O._{600nm}$ entre 0.6 y 0.8. Posteriormente se adicionó 0.4 mM de IPTG, y se dejó crecer durante 3 h a 22°C de acuerdo a las condiciones descritas anteriormente.

Al terminar la inducción se obtuvieron dos fracciones: pellet (células) y sobrenadante al centrifugar el medio a 8500 rpm, 15 min a 4°C. El sobrenadante fue concentrado por ultrafiltración (III) utilizando una membrana Amicon® MWCO de 30 kDa hasta obtener aproximadamente el 5 % de volumen inicial. Para las células, se realizó un procedimiento previo a la sonicación (Ibarra-Luna, 2022) que se describe detalladamente en el Anexo 10.2, obteniéndose dos fracciones: citosol y restos celulares, que al final se resuspenden en 300 μ L de Tris-HCl pH=8 100 mM).

6.2.2 Cuantificación de proteína

Se determinó para cada una de las muestras usando el método de Bradford (1976) en el lector de microplacas con un kit comercial (Bradford Protein Assay Bio-Rad®). Se hizo una curva patrón con albúmina sérica bovina.

6.2.3 Determinación del perfil proteico

Cada una de las fracciones se analizó mediante SDS-PAGE según la metodología descrita por Laemmli (1970) y el Manual MINI-PROTEAN 3. El gel se preparó con distintos reactivos (Acrilamida al 30%, Tris-HCl 2 mM pH=8.8, Tris-HCl 1 mM pH=6.8, agua destilada, SDS al 10%, TEMED y APS al 10%), posteriormente se tiñó con azul de coomassie y finalmente se utilizó una solución desteñidora (metanol, ácido acético glacial y agua destilada). A las bandas obtenidas se les determinó el peso molecular por la comparación con el marcador de peso molecular Page-Ruler de 10-180 kDa de Thermo Scientific.

6.2.4 Western Blot

Para confirmar la producción de las enzimas recombinantes, se realizaron ensayos de Western-Blot utilizando un anticuerpo (Anti-His) Mouse Monoclonal Antibody, Alkaline Phosphatase Conjugate, Life technologies, USA) que reconoce al tallo de histidinas que se localiza en el extremo C-terminal. Se corrió un SDS-PAGE y posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) PolyScreen® (Perkin-Elmer, USA) a 100 V durante 1.5 h en un equipo Mini Trans-Blot (Bio-Rad), con un buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 190 mM y metanol al 10 % (v/v)). La membrana fue bloqueada con BSA al 5 % (p/v) en buffer TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH = 7.5) adicionado con Tween-20 al 0.05 % (v/v) dejando en agitación a temperatura ambiente durante 1.5 h. Después de este tiempo, la membrana de PVDF fue lavada con 20 mL de buffer TBS con Tween 20 por lo menos 3 veces durante 15 min y se le adicionó el anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina (1:4500) diluido en el mismo buffer, se incubó durante una noche en agitación suave a 4°C. Al final de este tiempo se lavó la membrana nuevamente con 20 mL de buffer TBS 3 veces durante 15 min y se adicionó la solución reveladora de NBT/BCIP (Perkin-Elmer), que se dejó actuar hasta la aparición de bandas moradas, que indican la presencia de las proteínas con el tallo de histidinas. Todo este procedimiento se realizó a temperatura ambiente.

6.2.5 Determinación de la actividad lítica en zimograma con *Micrococcus lysodeikticus*

Cada una de las fracciones se analizó mediante zimogramas. El gel se preparó de igual forma que el SDS con células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* de acuerdo a la metodología descrita por Leclerc y Asselin (1989) y se incubó con solución renaturalizante (Tris-HCl pH=8 100mM con 1% Triton) por 24 h. Posteriormente se tiñó el gel con azul de metileno al 0.1% por 15 minutos y se destiñó con agua destilada hasta la observación de bandas de actividad lítica.

6.2.6 Determinación de la actividad lítica en zimograma con microorganismos modelo

Las bacterias seleccionadas para la producción de biopelícula se reactivaron, se adicionaron 100 µL de éstas a 50 mL de medio correspondiente y se incubaron a 37°C durante 12 h a 250 rpm. Posteriormente se centrifugaron a 8,500 rpm durante 15 min para obtener un pellet de células. Éstas se lavaron 3 veces con solución salina (30 mL aprox.) y se centrifugaron. Después de los lavados, las células se resuspenden en agua estéril y se ajusta la DO_{600nm}. Posteriormente se realizó un zimograma, como se describió anteriormente.

6.2.7 Determinación de actividad específica

Se determinó la actividad de **N-acetilglucosaminidasa** a la proteína recombinante solubilizada en Tris-HCl pH 8 empleando como control la cepa *E. coli* BL21 ó Rosetta + pET22b vacío, siguiendo el protocolo descrito por Sigma Aldrich® para la detección de enzimas con actividad de N-acetilglucosamidasa y modificado por García Cano (2013). Se utilizó una microplaca de 96 micropozos. Para cada prueba se adicionaron 80 µL de amortiguador de Citrato de Sodio pH 4.8 100 mM, 10 µL de una solución de 4-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamina (1 mg/mL) y 10 µL de la muestra. La actividad enzimática de la muestra se cuantificó en un lector de placas a 405 nm por 30 minutos (EPOCH Biotek), la lectura fue de punto final, los ensayos se hicieron por triplicado.

Se determinó la actividad de **N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa** a la proteína recombinante solubilizada en Tris-HCl pH 8 empleando como control la cepa *E. coli* BL21 ó Rosetta+ pET 22b vacío, siguiendo el protocolo descrito por Sigma Aldrich® y por García Cano et al. (2015) para la detección de enzimas con dicha actividad. Se utilizó una microplaca de 96 micropozos. Para cada prueba se adicionaron 80 µL de buffer Tris-HCl pH 8, 10 µL de una solución de hidrocloreuro de L-alanin-p-nitroanilina (1 mg/mL) y 10 µL de la muestra. La

actividad enzimática de la muestra se midió con un lector de placas a 405 nm por 30 minutos (EPOCH Biotek), la lectura fue de punto final, los ensayos se hicieron por triplicado.

6.2.8 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI es definida como la mínima concentración de antibiótico (o sustancia con actividad inhibitoria) que puede inhibir el crecimiento de un organismo después de ser incubado toda la noche (Andrews, 2001). En la caja petri se colocaron 15 mL de agar BHI al 1.5 %, se dejó solidificar a 4°C durante 15 min, posteriormente a la caja se le adicionaron 10 mL de agar al 0.8 % con 1×10^7 UFC/mL de cada microorganismo modelo. Con un penicilindro se hacen pozos sobre la doble capa de agar, a los cuales se les adicionan diferentes concentraciones de PGH (10 a 400 µg/mL), así como también las enzimas comerciales (lisozima y proteinasa K), las cajas se incuban a 37°C por 24 h. Se determinó el diámetro del halo de inhibición del microorganismo de prueba.

6.3 Caracterización bioquímica de las proteínas recombinantes

6.3.1 pH de máxima actividad

Para obtener el pH óptimo de actividad se utilizó una mezcla de amortiguadores: ácido cítrico 20 mM (intervalo de capacidad amortiguamiento: 2.1-4.1), ácido acético 20 mM (3.8-5.8), MES 20 mM (5.5-6.7), HEPES 20 mM (6.8-8.2), CHES 20 mM (8.6-10), ajustado de cada pH, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. La actividad se determinó con 10 µL del sustrato, 85 µL del cada uno de los amortiguadores. La reacción se inició con la adición de 5 µL de la enzima para evitar una preincubación. Los ensayos se hicieron por triplicado.

6.3.2 Estabilidad a pH

Para los estudios de estabilidad, se utilizó una mezcla de amortiguadores: ácido cítrico 20 mM (intervalo de capacidad amortiguamiento: 2.1-4.1), ácido acético 20 mM (3.8-5.8), MES 20 mM (5.5-6.7), HEPES 20 mM (6.8-8.2), CHES 20 mM (8.6-10), ajustado a cada pH, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Se incubaron 10 µL de la enzima con 85 µL de cada uno de los amortiguadores durante 60 min. Posteriormente se tomaron 10 µL de esta mezcla de reacción y se adicionaron a 80 µL de la mezcla de amortiguadores a pH 7, iniciando la reacción con la adición del sustrato. Como control se utilizó la enzima sin la adición de la mezcla de amortiguadores. Los ensayos se hicieron por triplicado.

6.3.3 Temperatura de máxima actividad

Se tomaron 5 μL de la muestra con actividad lítica y se adicionaron 10 μL del sustrato y 85 μL de la mezcla de amortiguadores pH 7, la mezcla de reacción se incubó por 10 min a diferentes temperaturas (4, 22, 37, 45, 50, 60, 70, 80 y 90°C). Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por al menos 15 minutos la reacción y se leyó a 405 nm en un lector de placas, como anteriormente se describió. Los ensayos se hicieron por triplicado.

6.3.4 Estabilidad térmica

Se tomaron 20 μL de la fracción con la proteína recombinante y se colocaron en tubos de plástico de 0.6 mL, los cuales se sometieron a diferentes temperaturas: 4, 22, 37, 45, 50, 60, 70, 80 y 90°C, y se incuban durante 60 min. Al final de la incubación se tomaron 5 μL de la muestra y se determinaron actividades glucosaminidasa y amidasa. Como control se utilizó a la enzima sin ningún tratamiento térmico. Los ensayos se hicieron por triplicado.

6.4 Purificación parcial de las PGH

La proteína recombinante contiene un tallo de histidinas en el extremo C-terminal proporcionado por el vector, lo que facilita la purificación por cromatografía de afinidad. Debido a que el tallo se une de manera no covalente a iones metálicos quelantes como el Cu^{2+} y el Ni^{2+} , se utilizó una columna de 1 mL de agarosa niquelada. A partir del extracto soluble de las proteínas recombinantes de 99-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 obtenido después de concentrarlos, se realizó una purificación de la proteína de interés con el HisPur™ Ni-NTA Purification Kit (Thermo Scientific). Se utilizó una columna preempacada con resina de Ni-NTA de alto rendimiento y alta capacidad para la purificación por afinidad de proteínas de fusión marcadas con His. Para las distintas etapas se preparan los buffers de los reactivos proporcionados en el kit, de acuerdo a las sugerencias del proveedor. En el equilibrio se utilizó un buffer de Imidazol 10 mM y una vez que se equilibró la columna se añadió la mezcla de reacción, que consta de la PGH y el mismo buffer (2 ml de volumen total). La columna se dejó incubando 30 min a 4°C para permitir la interacción adecuada. Posteriormente se realizaron 3 lavados con 2 mL del buffer de Imidazol 25 mM, y, finalmente, para la elución se utilizaron 2 mL del buffer de Imidazol 250 mM. De cada corrida de purificación se obtuvieron 7 fracciones: (1) proteína que no interacciona, (2) lavado 1, (3) lavado 2, (4) lavado 3, (5) elución 1, (6) elución 1 y (7) elución 3. Para monitorear la presencia de la proteína de interés se midió la absorbancia a 280 nm, y las fracciones

obtenidas se concentraron mediante precipitación con TCA al 30 % (m/v). El precipitado se lavó dos veces con acetona fría y se re-disolvió utilizando una disolución de urea 8 M y CHAPS al 4 % (m/v) y el volumen mínimo necesario de NaOH 1 N para neutralizar la muestra (Nandakumar et. al, 2003). Las fracciones se analizaron por medio de SDS-PAGE. Para evaluar la actividad se realizaron zimogramas con las fracciones previamente ultrafiltradas con una membrana Amicon® MWCO de 30 kDa, se colectó la fracción retenida y se realizaron dos lavados con una disolución amortiguadora de Tris-HCl 25mM (pH 8.0).

6.5 Selección del microorganismo modelo

6.5.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo

Las cepas usadas durante esta investigación, el medio de cultivo y la procedencia se describen en la siguiente tabla (Tabla 10).

Tabla 10. Cepas bacterianas y sus respectivos medios de cultivo

Cepa	Medio de cultivo	Procedencia
<i>Escherichia coli</i> EAEC <i>Escherichia coli</i> HB101	LB	Dr. Carlos Eslava Facultad de Medicina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	TSB	Cepario de Facultad de Química UNAM
<i>Listeria innocua</i> CFQ-B-232	BHI	Cepario de Facultad de Química UNAM

6.5.2 Curvas de crecimiento de microorganismos

Se utilizaron *L. innocua*, *E. coli*, y *P. aeruginosa* como microorganismos formadores de biopelícula. Se realizó un pre-inóculo que se dejó crecer 12 h a la temperatura correspondiente, sin agitación y posteriormente se realizó una resiembra. A un matraz Erlenmeyer con 100 mL de caldo BHI, LB y TSB se adicionó el 5 % del pre-inóculo de cada uno de las cepas y se incubaron a 37°C, sin agitación. Se monitoreó la D.O._{600nm} tomando una alícuota de 1 mL del medio cada 1 h y simultáneamente se tomó una alícuota para medir Unidades Formadoras de Colonias por cada mL (UFC/mL). Además, se tomó una alícuota de 1 mL del medio cada hora por 12 h, se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (Biomate 3 Spectrophotometer, Thermo Scientific) y se determinó el pH (34 pH Meter Beckman).

6.6 Propiedades del microorganismo modelo

6.6.1 Ensayo de motilidad por punción

Las cepas se cultivaron en agar BHI a 37 °C durante 24 h. Después de la incubación, las colonias individuales se inocularon en medio líquido BHI y se cultivaron durante la noche a 37 °C hasta la fase logarítmica. Se utilizó un asa bacteriológica recta para sumergir la suspensión bacteriana y clavarla en tubos semisólidos que contenían el medio con triptona al 1.0% (p/v), cloruro de sodio al 0.5% (p/v) y agar al 0.2% (p/v). Los tubos se cultivaron a 30 °C o 37 °C durante 24 h. La propagación de bacterias alrededor de la línea de punción se observó después de la incubación.

6.6.2 Hidrofobicidad de la superficie celular (CSH)

Se midió a través de la prueba Bacterial Adhesion to Hydrocarbons (BATH) según Fan et al. (2020) con modificaciones menores. Brevemente, la cepa designada como microorganismo modelo *Listeria innocua* se inoculó en medio BHI se cultivaron a 30 °C y 37 °C. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 8500 rpm durante 5 min, se eliminaron los sobrenadantes y los sedimentos se lavaron dos veces y se resuspendieron en PBS. La D.O._{600 nm} de las suspensiones se ajustó a $0,9 \pm 0,05$ utilizando PBS. Cuatro mL de un inóculo estandarizado se cubrieron con 1 ml de xileno. Después de agitar manualmente las mezclas durante 2 min, se equilibraron durante 30 min a temperatura ambiente. Se midió la D.O._{600 nm} de la fase acuosa inferior y se marcó como D.O. 1 y la D.O. 0 es la densidad óptica inicial de la fase acuosa. La hidrofobicidad de la superficie celular se expresó como el porcentaje de células unidas al xileno definido como la proporción de células excluidas de la fase acuosa.

6.7 Formación de biopelículas

Se comparó la formación de biopelícula de ambas cepas mediante el uso de 2 metodologías, según lo descrito por Danese et al. (2000) para la metodología A) y por Villegas et al. (2013) para la metodología B, utilizando 2 medios de cultivo distintos: a) medio de enriquecimiento b) medio de enriquecimiento suplementado con glucosa o sacarosa al 0,5%.

Cada cepa conservada fue reactivada. Se midió la densidad óptica de cada cultivo hasta obtener un valor de 0.5 (1×10^7 UFC/mL). Una alícuota (10 uL) de cada cepa fue sembrada en pocillos que contenían 190 uL de cada medio estéril (proporción final 1:20) en 2 microplacas de poliestireno de 96 pocillos, a las que se denominó A y B de acuerdo con el tipo de intervención que se practicó en ellas 24 h después.

En el caso de la metodología A: se tomaron 10 uL de cada pocillo y se sembraron en nuevos pocillos con 190 uL del medio fresco estéril correspondiente, mientras que en la metodología B: se retiró todo el contenido de los pocillos y se agregaron 200 uL del medio estéril correspondiente. Las microplacas se continuaron incubando de modo estático a 37°C por 24 y 48 h más, de modo que el tiempo de cultivo total hasta la evaluación de la biopelícula fue de 72 h. El control es el pocillo con medio de cultivo correspondiente.

6.8 Selección de condiciones óptimas de biopelículas

La formación de las biopelículas considera distintos parámetros (Tabla 11)

Tabla 11. Condiciones de formación de biopelículas

Parámetros	
Físicos	Químicos
Temperatura de incubación: ambiente, 30 y 37°C	Biomasa total
Tiempo de incubación: 24, 48 y 72 horas	Actividad metabólica (células viables)
Medio de cultivo: Con y sin suplementación	

En cajas de Petri de poliestireno también se probaron las condiciones de la tabla 10, se inoculó el cultivo en su respectivo medio de enriquecimiento (1:20) para visualizar las distintas etapas de formación de biopelículas a distintos tiempos de incubación, se incubó en las condiciones mencionadas antes. Posteriormente se aspiró el medio y se tiñeron las estructuras con cristal violeta, que se examinaron bajo microscopía óptica (Achinas et al., 2020).

6.8.1 Cuantificación de biomasa total

De acuerdo a Stepanovic (2000), se añadieron 250 uL de Cristal Violeta (CV) al 0.5% por pocillo (el control es el medio de cultivo). La placa se incubó durante 30 min a 25 °C antes de retirar la solución de tinción y luego se lavó tres veces con 350 µl de solución de NaCl al 0.9%. Después de retirar la solución de lavado, se añadieron 100 µl de EtOH al 96% por pocillo para disolver el CV unido a la biopelícula, golpeando suavemente la placa. La absorbancia se midió a 570 nm. Basado en las DO producidas por películas bacterianas, las

cepas se clasifican en las siguientes categorías: no productoras de biopelículas, productoras de biopelículas débiles, moderadas o fuertes.

6.8.2 Cuantificación de células viables

De acuerdo a Stiefel (2016), se añadieron a cada pocillo 200 microlitros de medio de cultivo al 30% que contiene 0.5 mg / ml de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio). La placa se incubó durante 2 horas a 37°C. Se retiró el medio y se añadieron 200 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver los cristales de formazán de la biopelícula, golpeando la placa con cuidado. La absorbancia se midió a 570 nm.

6.9 Tratamiento enzimático de biopelículas

Para el tratamiento enzimático (Tabla 12) se utilizaron las enzimas recombinantes (AMI 123 y GLU 32), así como también enzimas comerciales (lisozima y proteinasa K). En cuanto a la concentración de enzima, los valores que se utilizaron estaban de acuerdo con lo obtenido en el ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Respecto a la temperatura, el ensayo se realizó a la temperatura óptima de la enzima, que fue determinada en el ensayo de estabilidad térmica, así como también otras temperaturas de importancia (temperatura ambiente, refrigeración, etc.) en la industria alimenticia. Los intervalos de tiempo en los que se llevó a cabo el tratamiento fueron de 1, 2 y 4 horas, realizando un monitoreo de la actividad metabólica posterior a la adición de la enzima.

Tabla 12. Condiciones de tratamiento enzimático

Parámetros	
Físicos	Químicos
Concentración de proteína: obtenido en CMI	Biomasa total
Temperatura de incubación: 4, 22 y 37°C	Actividad metabólica (células viables)
Tiempo de incubación: 1, 2, 4 horas	

7. Resultados

7.1 Clonación en *E. coli* Rosetta

Para la generación de clonas recombinantes se emplearon las clonas generadas por Campos (2016) correspondientes al dominio N-acetilmuramil-L-alanina-amidasa (AMI 123) y de N-acetilglucosaminidasa (GLU 32). Los plásmidos se emplearon para transformar la cepa hospedera (*E. coli* Rosetta DE3). Fue necesario corroborar después de la transformación sí se encontraba la presencia del inserto de interés por medio de la extracción del DNA plasmídico y PCR (Figura 10).

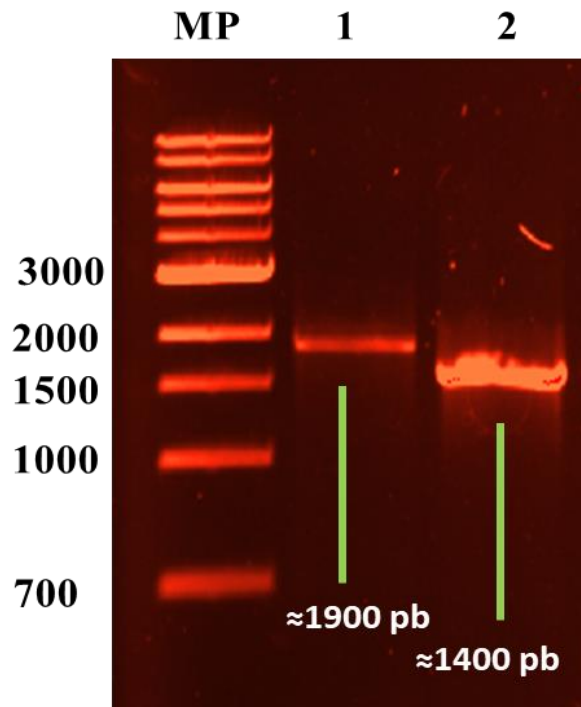


Figura 10. Análisis de las transformantes para ambos dominios catalíticos MP: Marcador de pb. 1. AMI 123. 2. GLU 32. Gel de agarosa al 1 % revelado con bromuro de etidio (0.01 %).

En la Figura 10 se observan los amplicones obtenidos utilizando como ADN molde los plásmidos extraídos de cada una de las construcciones presuntamente positivas, amplificadas con los cebadores universales T7. Para la subclona AMI 123 el tamaño esperado es de 1624 pb y para GLU 32, 1103 pb. Estos cebadores deben amplificar un producto del tamaño de cada inserto más 250 pb de la región de T7 propia del vector utilizado. Como se observa en la imagen, cada una de las 4 construcciones evaluadas presenta los amplicones en el tamaño esperado.

7.2 Producción de enzima recombinantes

Una vez obtenidas clonas positivas de acuerdo a los resultados de amplificación, se procedió a la expresión de la proteína de interés. Se decidió trabajar con las siguientes condiciones: 22°C de incubación, 3 h de crecimiento, 0.4 mM de IPTG como punto de partida para definir las condiciones óptimas de inducción en la nueva cepa de expresión de acuerdo a condiciones reportadas anteriormente por Campos (2016) e Ibarra-Luna (2022). Las proteínas recombinantes AMI 123 y GLU 32 (Figura 11 y 12 respectivamente) tienen mayor actividad en la fracción del extracto soluble (sobrenadante del medio de cultivo) en comparación con las otras fracciones celulares (Anexo 11.1), esto concuerda con lo esperado debido a que el vector pET-22b cuenta con un péptido señal (pelB leader) que direcciona la proteína expresada al periplasma.

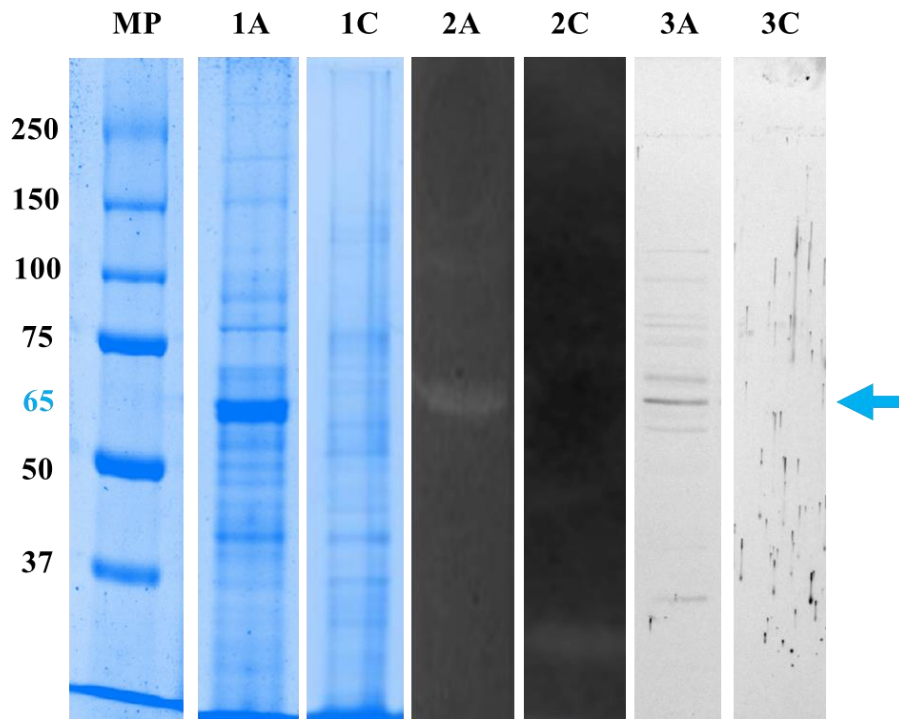


Figura 11. Expresión de la proteína recombinante AMI 123 en el sobrenadante del cultivo de *E. coli* Rosetta DE3, así como la determinación de actividad lítica y su inmunodetección. Inducción realizada por 3 horas, con 0.4 mM de IPTG a 22°C con 250 rpm. MP: Marcador de peso molecular. 1. SDS-PAGE 10%, 2. Zimograma contra *Micrococcus lysodeikticus* y 3. Western-Blot (anticuerpo: AntiHis6x-AP). A: AMI 123 (flecha azul), C: Control negativo *E. coli* Rosetta DE3 pET22-b vacío.

Se observa que la proteína AMI 123 (Figura 11) migra en el peso esperado de 65 kDa. Las bandas de actividad se observan por debajo del peso esperado, lo que se atribuye a una posible degradación por presencia de proteasas. Este supuesto se confirmó con la inmunodetección,

donde se observan varias bandas a pesar de que la señal más intensa sí corresponde con el peso esperado. Probablemente esta enzima sufre alguna proteólisis en el extremo C-terminal, donde se encuentra el tallo de histidinas del vector utilizado (pET-22b). Esto se explica porque el ensayo de Western-Blot se realizó ocupando un anticuerpo que reconocía el tallo de histidinas, lo que indica que la proteína recombinante se traduce de manera correcta, pero que por alguna razón se fragmenta y, aun así, mantiene la actividad lítica, como se observa en el zimograma con bandas de menor peso molecular.

En la Figura 12, se observa que la proteína GLU 32 migra en el peso esperado de 51 kDa. Tanto en el zimograma como en el western blot se observa el mismo comportamiento de degradación que para AMI 123, nuevamente se le atribuye a la proteólisis en el C-terminal del vector de clonación.

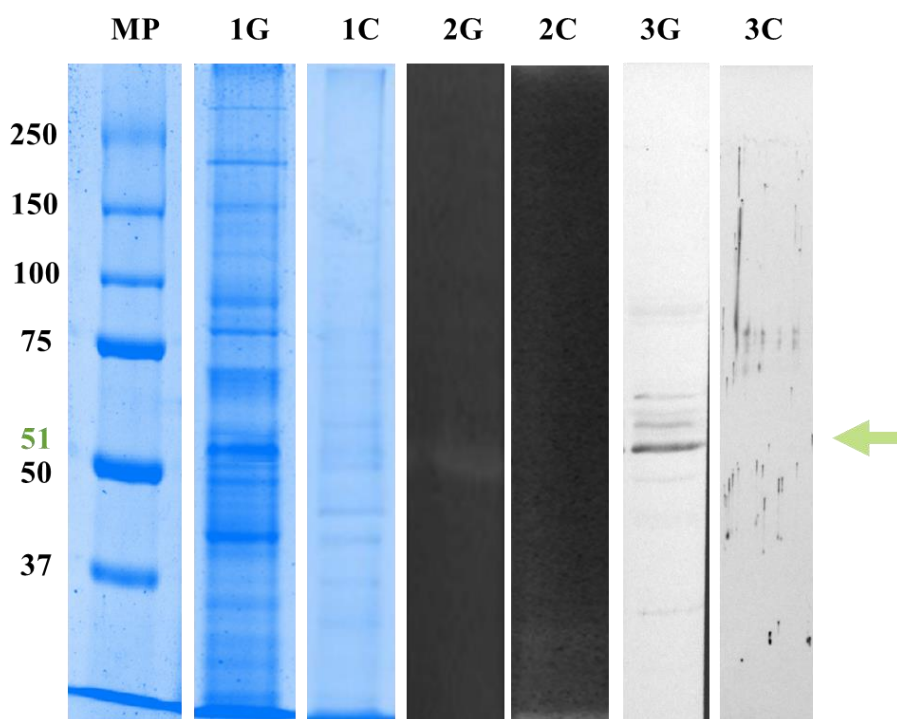


Figura 12. Expresión de la proteína recombinante GLU 32 en el sobrenadante del cultivo de *E. coli* Rosetta DE3, así como la determinación de actividad lítica y su inmunodetección. Inducción realizada por 3 horas, con 0.4 mM de IPTG a 22°C con 250 rpm. MP: Marcador de peso molecular. 1. SDS-PAGE 10%, 2. Zimograma contra *Micrococcus lysodeikticus* y 3. Western-Blot (anticuerpo: AntiHis6x-AP). G: GLU 32 (flecha verde), C: Control negativo *E. coli* Rosetta DE3 pET22-b vacío.

La actividad específica para ambas proteínas recombinantes se presenta en la Tabla 13. Se obtienen valores de actividad específica mayores a los reportados anteriormente en el equipo de trabajo con otras fracciones, como restos celulares o citosol (Anexo 11.1). Como se

observa en la Tabla 13, las subclonas presentaron elevada actividad específica con esta determinación con sustratos análogos, lo cual difiere con los resultados obtenidos en los zimogramas contra *M. lysodeikticus* (Figura 11 y 12) en los que se observan bandas de baja intensidad. Este comportamiento se puede explicar ya que en esta prueba ambos sustratos se encuentran disueltos en el buffer por lo que se encuentran más accesibles para interactuar con los residuos que llevan a cabo la catálisis. Por el contrario, en los zimogramas, en donde se embeben células liofilizadas de *M. lysodeikticus* al gel de poliacrilamida, el sustrato se localiza en la pared celular y no se encuentra del todo accesible para las enzimas, y para acceder al mismo, las proteínas necesitan una manera de reconocer y unirse al peptidoglucano.

Tabla 13. Actividad específica de las proteínas recombinantes

Enzima	Actividad volumétrica (U/mL)	Concentración de proteína (mg/mL)	Actividad específica (U/mg)
AMI 123	7788 ± 890	3.246 ± 0.003	2399 ± 306
GLU 32	5342 ± 690	3.615 ± 0.005	1478 ± 246

7.3 Caracterización bioquímica del extracto soluble

Se realizó la caracterización con el extracto soluble sin purificar para tener una referencia en cuanto a los parámetros fisicoquímicos con los que se está trabajando y así optimizar la producción y actividad de ambas subclonas.

En la Figura 13 se muestra un comportamiento diferente entre las enzimas: para AMI 123 se observa mayor actividad a pH cercanos a la neutralidad mientras que GLU 32 es activa a pH ácido de 4. Considerando que las enzimas provienen de una BAL, y no de un microorganismo extremófilo, el comportamiento corresponde con lo esperado. Al comparar el pH de máxima actividad de la enzima (pH=7) con lo reportado en la base de datos BRENDA (Braunschweig Enzyme Database) para otras amidasas, en el caso de glucosaminidasas no se encontró información acerca de sus características bioquímicas óptimas. Se observa que la mayoría de las analizadas independientemente de su origen son más activas en condiciones cercanas a la neutralidad. Esto puede deberse a que se han encontrado aminoácidos altamente sensibles a los cambios de pH, como el ácido glutámico (Li et al., 2012) o histidina (Toshima et al.,

2003) cerca o en el sitio catalítico de esta enzima, los que, al sufrir protonación o desprotonación a los distintos pH probados, provocan que la enzima pierda actividad.

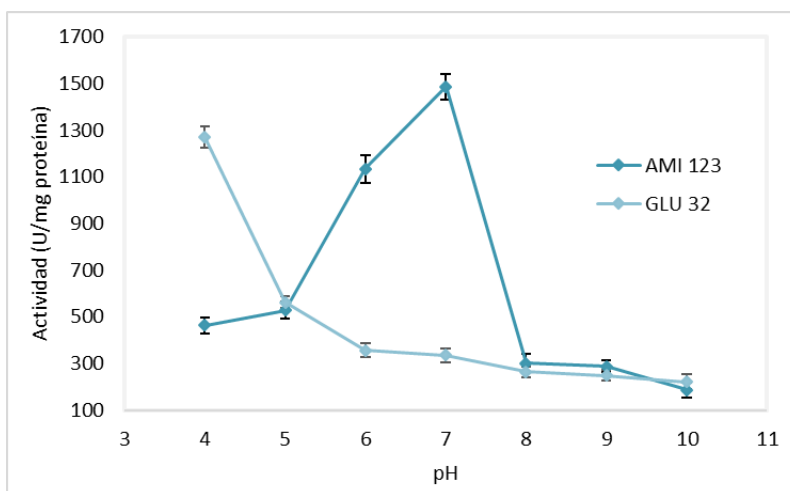


Figura 13. Determinación del pH de máxima actividad de las PGH recombinantes AMI 123 y GLU 32. La medición de las actividades se realizó a 22 °C (temperatura ambiente) por triplicado.

En esta etapa se probó el efecto de distintos pH en las enzimas después de someter a la misma a una hora en cada uno de estos tratamientos, en la Figura 14 se observa que el efecto de la incubación en todos los casos fue reversible y las enzimas presentaron actividad después de transcurrida esta operación teniendo en el caso de las condiciones extremas, pH 4 un 56.2% de actividad relativa de GLU 32 mientras que a pH 10 se obtuvo un 41% de actividad relativa de AMI 123; que concuerda con el comportamiento exhibido en el anterior apartado.

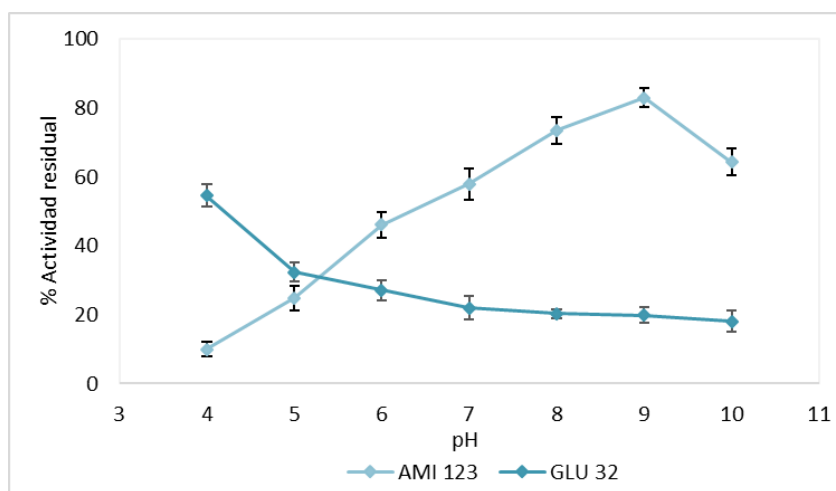


Figura 14. Estabilidad a distintos pH de las PGH recombinantes AMI 123 y GLU 32. La medición de las actividades se realizó a 22 °C (temperatura ambiente) por triplicado. Para el control se consideró a la enzima sin mezcla de amortiguadores como el valor de referencia.

En la Figura 15 se muestra que la enzima AMI 123 es activa entre 37°C y 60°C, mientras que GLU 32 mantuvo actividad entre 60°C y 80°C. La temperatura de mayor actividad determinada en esta etapa fue 60°C para AMI 123 y 60-70°C para GLU 32, valor que era de esperarse si se considera que el microorganismo productor de la enzima nativa es un mesófilo, además de que existen pocos reportes de enzimas PGH con alta resistencia térmica, y en la mayoría de los casos la temperatura óptima está entre 25°C y 60°C.

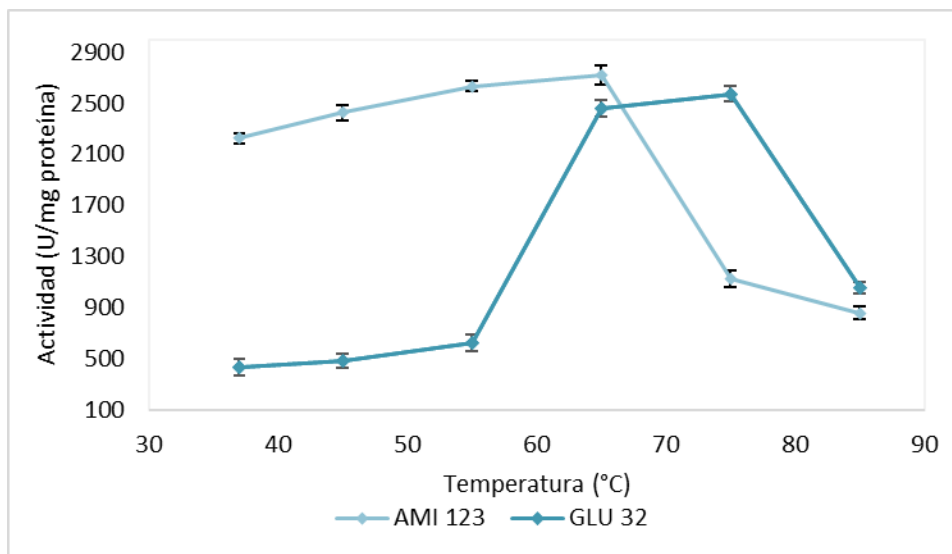


Figura 15. Determinación de la temperatura de actividad máxima de las PGH recombinantes AMI 123 y GLU 32. La medición de las actividades se realizó a pH 7 por triplicado.

En la Figura 16 los resultados indicaron que la enzima AMI 123 es sumamente afectada por la temperatura de almacenamiento ya que al incrementar la temperatura a 50°C por tan sólo una hora, la actividad disminuye al 34.2%, además de acuerdo a las determinaciones de estabilidad en distintas condiciones de almacenamiento se observó que la mejor condición de almacenamiento es la de refrigeración (4°C). Para el caso de GLU 32 se observó un comportamiento completamente diferente ya que la actividad fue mayor conforme se aumentó la temperatura, siendo más estable a 65°C, que concuerda con el comportamiento del apartado anterior. No se descarta la aplicación de estas enzimas en productos refrigerados pues, aunque en estas condiciones la enzima tendría una actividad baja sería más estable y se podría evitar la proliferación de psicrófilos con actividad patogénica o involucrados en la descomposición de los alimentos.

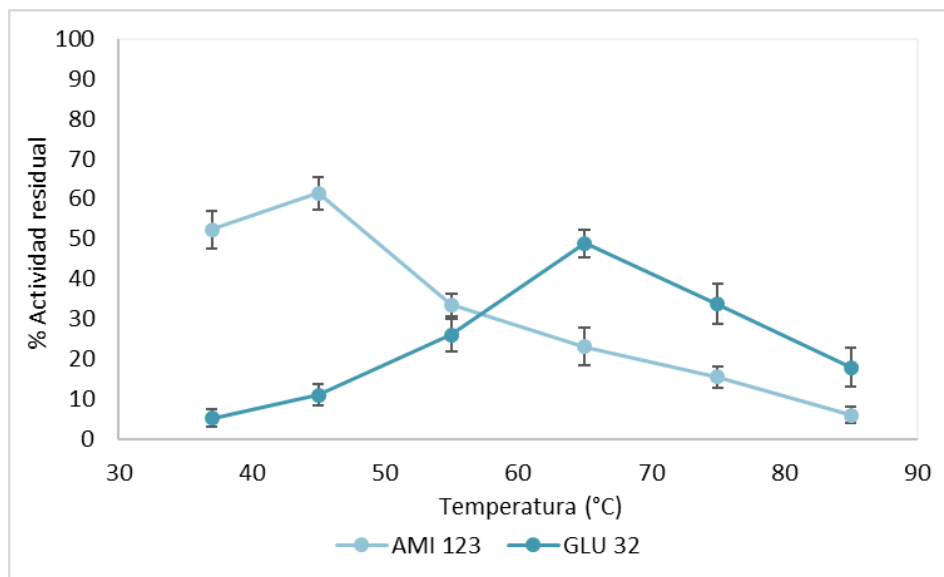


Figura 16. Estabilidad a distintas temperaturas de las PGH recombinantes AMI 123 y GLU 32. La medición de las actividades se realizó a pH 7 por triplicado. Para el control se consideró a la enzima sin tratamiento térmico como el valor de referencia.

7.4 Purificación parcial de las proteínas recombinantes

Posteriormente se purificó la fracción extracelular con ayuda de cromatografía de afinidad contra el tallo de histidinas presente en la proteína recombinante. Se ocupó una resina de Ni-NTA (Thermo Scientific). Como se observa en la Figura 17 y 18, se logró purificar parcialmente a las proteínas recombinantes, porque a pesar de que se observan diversas bandas de distintos tamaños, aparecen las bandas que corresponden a las enzimas de interés. Cabe resaltar que ocurre degradación de ambas proteínas al observar bandas de bajo peso molecular que presentaron actividad en zimogramas contra *M. lysodeikticus* y *L. innocua* por debajo de los 65 y 51 kDa que corresponden con el peso molecular teórico.

Considerando que la proteína de interés presenta el tallo de histidinas y que muchas proteínas recombinantes han sido purificadas utilizando esta propiedad, se realizaron diversos intentos utilizando columnas de Ni²⁺ sin embargo, no se ha logrado purificar la enzima en las condiciones evaluadas. Se esperaba que la enzima recombinante obtenida del extracto soluble (sobrenadante del medio), se uniera a la columna de Ni²⁺ no obstante, en todos los ensayos que se realizaron las proteínas se encontraron en los primeros lavados, lo que indica que no presentó unión a la resina. Esto se corroboró por la detección de la actividad de PGH por zimografía contra *M. lysodeikticus* y *L. innocua* en la fracción de los lavados.

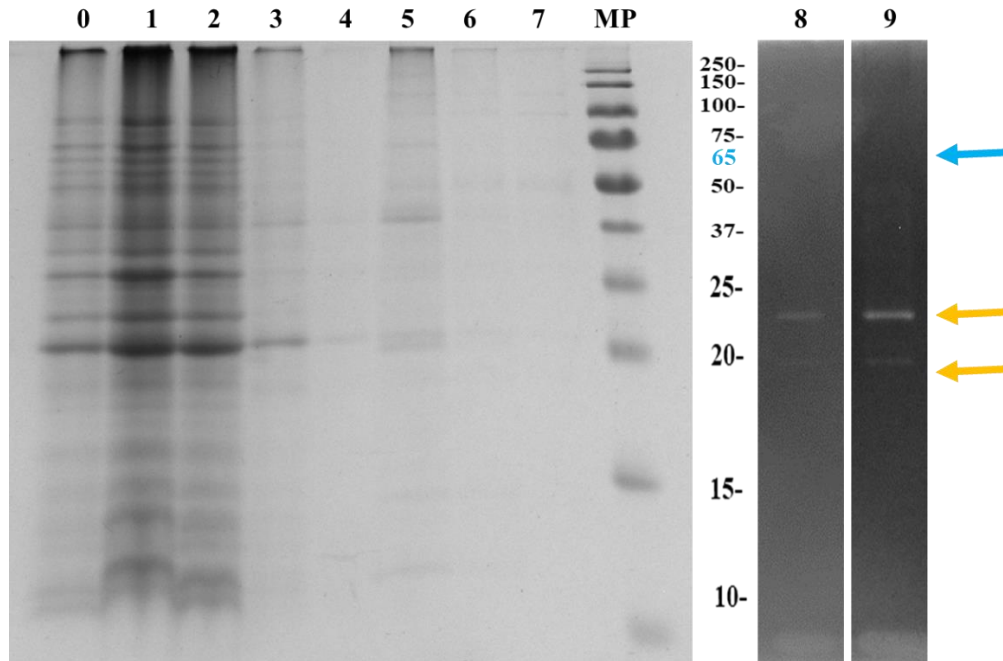


Figura 17. Purificación parcial de AMI 123 del sobrenadante. Se esperaba la banda en el peso de 65 kDa (flecha azul) pero hubo degradación (flechas amarillas). MP: Marcador de peso molecular. **SDS-PAGE 12.5% 0.** Sobrenadante, 1. Proteína que no interacciona, 2. Primer lavado, 3. Segundo lavado, 4. Tercer lavado, 5. Primera elución, 6. Segunda elución, 7. Tercera elución. **Zimograma 12.5%** 8. contra *Micrococcus lysodeikticus* 9. contra *Listeria innocua*

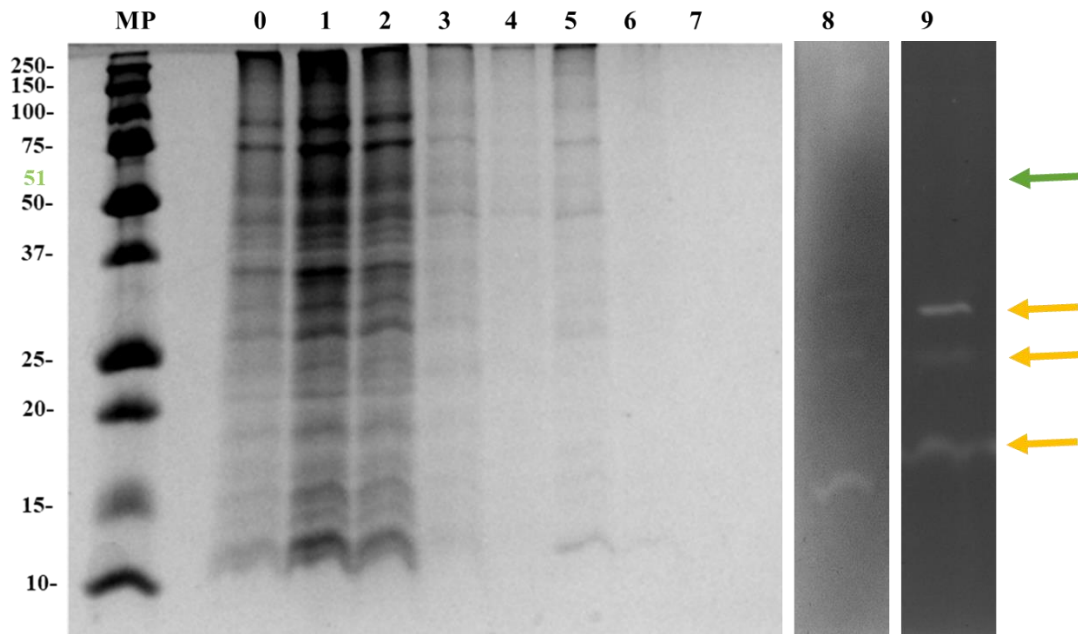


Figura 18. Purificación parcial de GLU 32 del sobrenadante. Se esperaba la banda en el peso de 51 kDa (flecha verde) pero hubo degradación (flechas amarillas).MP: Marcador de peso molecular. **SDS-PAGE 12.5% 0.** Sobrenadante, 1. Proteína que no interacciona, 2. Primer lavado, 3. Segundo lavado, 4. Tercer lavado, 5. Primera elución, 6. Segunda elución, 7. Tercera elución. **Zimograma 12.5%** 8. contra *Micrococcus lysodeikticus* 9. contra *Listeria innocua*

Las PGH recombinante se logró purificar parcialmente de una manera poco eficiente y rápida ya que solo consistió en la ultrafiltración y el paso por la columna de afinidad. La Tabla 14 resume los resultados durante las etapas de purificación para el caso de la purificación de AMI 123, se inició con 5.6 mg de proteína inicial, y posterior a la ultrafiltración se obtuvieron 3.2 mg de proteína total, mientras que la actividad específica aumentó 2 veces. En el último paso de purificación la actividad específica se incrementó casi 6 veces y el rendimiento obtenido fue del 0.2%.

Tabla 14. Tabla de purificación de AMI 123

Fracción	Actividad volumétrica (U/mL)	Concentración de proteína (mg/mL)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Actividad total (U)	Rendimiento
Sobrenadante	8765 ± 510	5.641 ± 0.018	1554 ± 135	1	219 125 ± 10 750	100%
UF 30 kDa	7788 ± 890	3.246 ± 0.003	2399 ± 306	2.3	77 882 ± 7530	36%
Columna Ni-NTA	191 ± 18	0.021 ± 0.01	9095 ± 246	5.8	384 ± 31	0.2%

Para el caso de la purificación de GLU 32 (Tabla 15), se inició con 7.6 mg de proteína inicial, y posterior a la ultrafiltración se obtuvieron 3.6 mg de proteína total, mientras que la actividad específica aumentó cerca de 1.5 veces. En el último paso de purificación la actividad específica se incrementó 7 veces y el rendimiento obtenido fue del 0.3%.

Tabla 15. Tabla de purificación de GLU 32

Fracción	Actividad volumétrica (U/mL)	Concentración de proteína (mg/mL)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Actividad total (U)	Rendimiento
Sobrenadante	7765 ± 510	7.641 ± 0.018	1016 ± 225	1	194 125 ± 11 650	100%
UF 30 kDa	5342 ± 690	3.615 ± 0.005	1478 ± 246	1.5	53 425 ± 6243	28%
Columna Ni-NTA	234 ± 32	0.032 ± 0.02	7325 ± 18	7.2	469 ± 44	0.3%

La purificación enzimática generalmente involucra una serie de pasos para obtener los productos con las especificaciones deseadas en cuanto a un alto factor de purificación y recuperación que conlleva alrededor del 80% de los costos totales del proceso, por lo que para la siguiente etapa que consiste en el tratamiento enzimático se utilizará el extracto soluble sin purificar debido a los bajos rendimientos y la degradación obtenida.

7.5 Selección de microorganismos para formación de biopelícula

Con base en el riesgo que representan para la industria alimentaria y el sector salud, formando comunidades/conglomerados en superficies de procesamiento de alimentos o en los alimentos procesados, se eligieron diversos microorganismos para evaluarlos en términos de crecimiento de acuerdo al medio de cultivo, temperatura y pH (Anexo 11.2). Se seleccionaron 3 microorganismos modelo (Figura 19): *Escherichia coli*, *Listeria innocua* y *Pseudomonas aeruginosa* por su producción de biopelículas y su importancia en la industria alimenticia

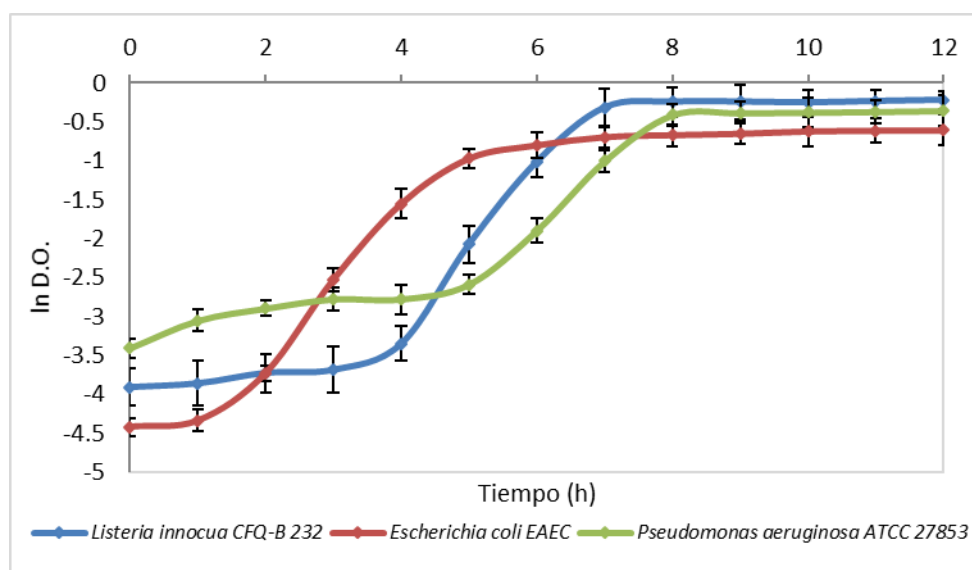


Figura 19. Curva de crecimiento de bacterias modelo. Bacterias patógenas crecieron en medio LB (*E. coli*) y TSB (*P. aeruginosa*), la bacteria no patógena creció en medio BHI (*L. innocua*). Todas crecieron bajo condiciones estáticas a 37°C. Se determinó la D.O._{600nm} por triplicado (promedio) en función del tiempo.

Existen distintos factores que influyen en el crecimiento bacteriano como los nutrientes, temperatura, oxígeno, entre otros. Para obtener las condiciones más adecuadas para favorecer el crecimiento se eligieron medios de enriquecimiento para cada microorganismo, así como su temperatura óptima de crecimiento. Se realizó curva de crecimiento para los microorganismos en estudio con el objetivo de identificar sus fases y establecer el tiempo para

alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Debido a la falta de aireación adecuada (porque el cultivo se mantiene estático), se decidió agregar una mayor cantidad de preinóculo (5% en lugar de 1%). En el caso de las bacterias patógenas (figura 19) su fase exponencial iniciaba a partir de 4-6 h de crecimiento. De cada microorganismo se obtuvo la curva de crecimiento (Anexo 9.1) en sus respectivos medios de cultivo (LB, TSB o BHI). El seguimiento se hizo durante 12 h. En todos los microorganismos hubo decaimiento del pH y el comportamiento de la curva es de tipo sigmoidal.

7.6 Caracterización de biopelículas formadas

Para evaluar la capacidad de formar biopelículas de las bacterias patógenas, se realizaron los ensayos de inducción/cuantificación de biopelículas usando diferentes métodos. Se comparó los efectos de distintas metodologías (A- alícuota o B-recambio de medio), la temperatura (óptima, ambiente o refrigeración) y los medios de cultivo (con o sin suplementación) utilizados sobre la capacidad de formar biopelícula de los microorganismos seleccionados sobre una superficie de poliestireno (cajas petri y microplacas).

Se observó el crecimiento y agregación de los microorganismos a lo largo de 24, 48 y 72 h en las distintas condiciones de incubación (medio, tiempo y temperatura). En la mayoría de las bacterias (Anexo 11.3, Figuras S7-S9) la agregación se daba a partir de las 24 h en medios con suplementación o 48h sin ella, exceptuando a *P. aeruginosa*. Los resultados de la formación de biopelículas se muestran en las siguientes Figuras 20, 21 y 22:

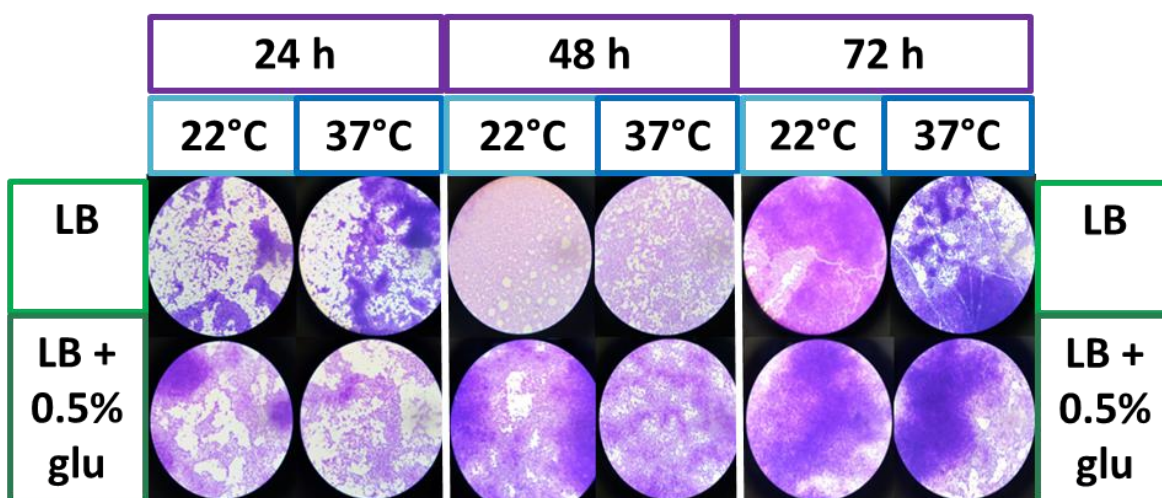


Figura 20. Evaluación de la formación de biopelícula de *Escherichia coli* EAEC a distintas temperaturas con diferentes medios de cultivo a las 24 h, 48 h y 72 h. Biopelículas teñidas con cristal violeta. Imágenes de aumento 100X capturadas con el Microscopio Biológico Binocular Digital de campo claro DMS-653.

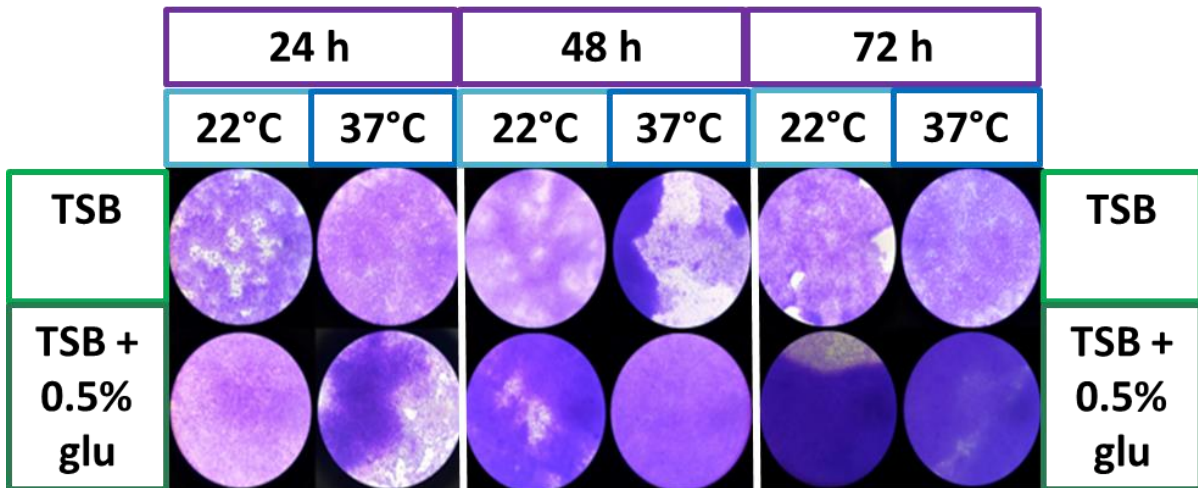


Figura 21. Evaluación de la formación de biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* a distintas temperaturas con diferentes medios de cultivo a las 24 h, 48 h y 72 h. Biopelículas teñidas con cristal violeta. Imágenes de aumento 100X capturadas con el Microscopio Biológico Binocular Digital de campo claro DMS-653.

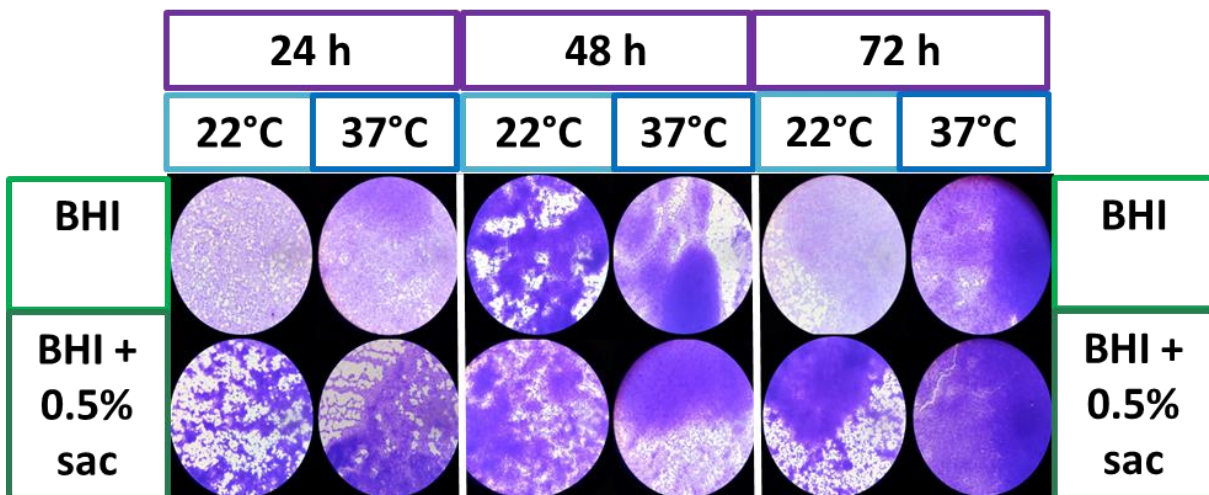


Figura 22. Evaluación de la formación de biopelícula de *Listeria innocua* a distintas temperaturas con diferentes medios de cultivo a las 24h, 48h y 72h. Biopelículas teñidas con cristal violeta. Imágenes de aumento 100X capturadas con el Microscopio Biológico Binocular Digital de campo claro DMS-653.

En los 3 microorganismos se observa que los agregados formados estaban interconectados en un patrón similar a una red, acercándose al fenotipo de panal descrito por Sheikh et al. (2001). A medida que aumentaba el tiempo de incubación, este patrón adoptaba la apariencia de una biopelícula bacteriana madura, caracterizada por un mayor apilamiento vertical de bacterias en las uniones de la conformación en forma de red.

Después de la incubación de 24 h, la biopelícula comprendía agregados gruesos de bacterias en montículos, intercalados con espacios vacíos que carecían de bacterias adheridas. Esta

morfología de biopelícula se ha observado previamente para varios sistemas bacterianos, de acuerdo a Watznick et al. (2000). La reposición del medio y la incubación continua dieron como resultado una acumulación adicional mínima en la biopelícula.

7.6.1 Cuantificación de biomasa total

El cristal violeta permitió medir de forma indirecta a cada una de las cepas y así clasificarlas según la capacidad de adherencia, partiendo de la comparación de cada cepa con el control negativo *E. coli* HB101, la cual no es considerada como cepa formadora de biopelícula. Por lo tanto, las cepas cuya absorbancia fue menor al control negativo fueron consideradas no adherentes. También este método permitió evaluar, en función de la biomasa, diferentes condiciones de crecimiento.

También se realizó la comparación entre las 2 metodologías (Figuras 23 y 24) de los microorganismos en cuanto a la biomasa total (Anexo 11.4, Figuras S13-S15). Para los 3 microorganismos analizados se observó que hubo mayor producción con el recambio de medio (metodología B), esto se atribuye a que al momento de tomar la alícuota (metodología A) hay pérdida de células, por lo que no se favoreció el desarrollo adecuado de la biopelícula. Estos resultados llevaron a que, para los ensayos posteriores se usara la metodología B para el desarrollo de biopelículas.

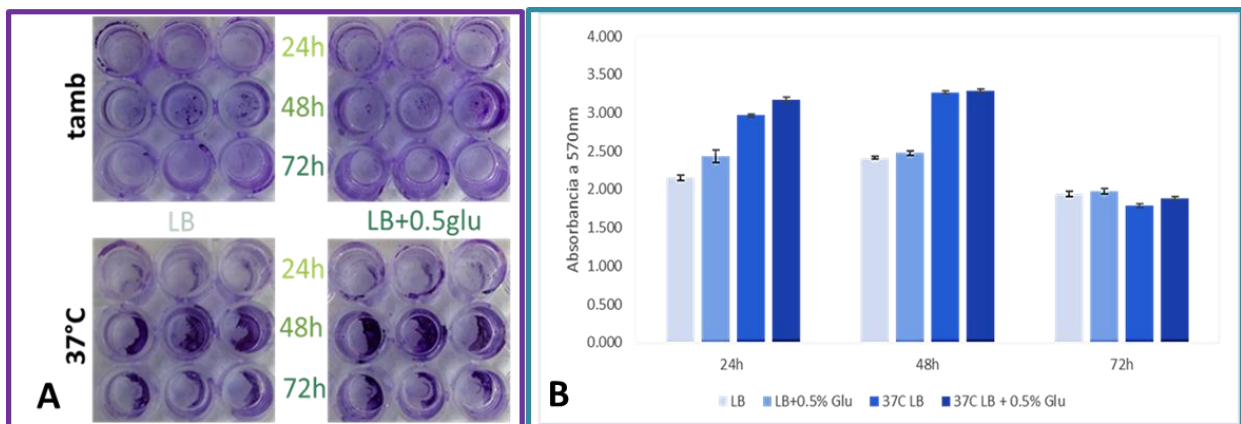


Figura 23. Cuantificación de biomasa total con la metodología A con toma de alícuota y siembra en medio fresco de *Escherichia coli* EAEC. En el panel A se muestra la microplaca con biopelículas teñidas con cristal violeta para la visualización de su formación bajo distintas condiciones de temperatura, medio de cultivo y tiempo de incubación. En el panel B se presenta la cuantificación de la biomasa total de acuerdo a los parámetros evaluados en la microplaca para determinar la condición óptima de formación. Los ensayos se realizaron por triplicado y se usó la cepa *E. coli* HB101 como control negativo.

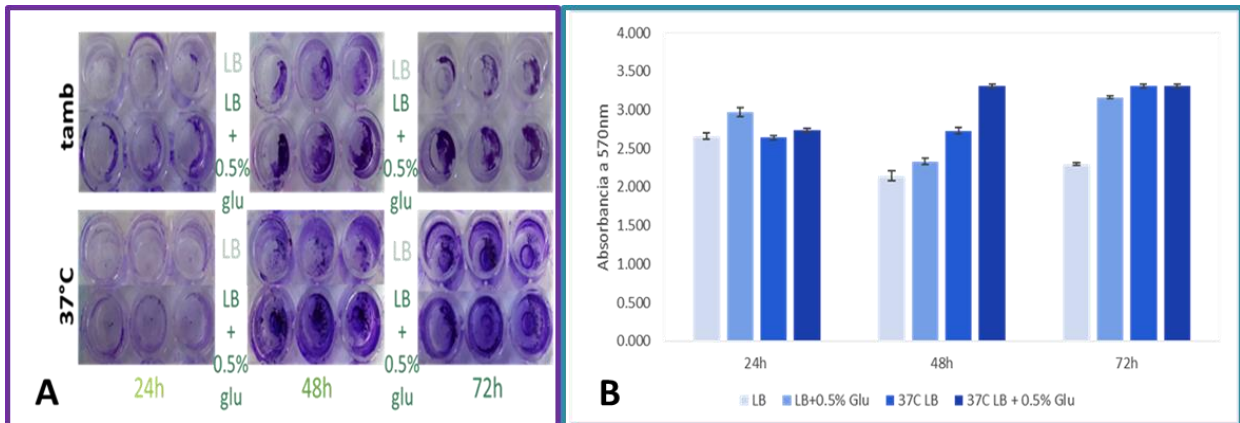


Figura 24. Cuantificación de biomasa total con la metodología A con recambio de medio de cultivo de *Escherichia coli* EAEC. En el panel A se muestra la microplaca con biopelículas teñidas con cristal violeta para la visualización de su formación bajo distintas condiciones de temperatura, medio de cultivo y tiempo de incubación. En el panel B se presenta la cuantificación de la biomasa total de acuerdo a los parámetros evaluados en la microplaca para determinar la condición óptima de formación. Los ensayos se realizaron por triplicado y se usó la cepa *E. coli* HB101 como control negativo.

Como se puede observar en las Figuras 23 y 24, algunos pocillos contienen biopelícula en las orillas, no en el centro como se esperaría. Esto se puede atribuir a que las biopelículas contienen subpoblaciones bacterianas caracterizadas por una amplia distribución de actividad metabólica (Archer et al., 2011). Las subpoblaciones en la periferia de la biopelícula muestran una actividad fisiológica alta, mientras que las subpoblaciones ubicadas en las partes internas de las biopelículas muestran una actividad fisiológica baja o ningún crecimiento. Esta heterogeneidad se debe al consumo de oxígeno y nutrientes por parte de las bacterias metabólicamente activas ubicadas en la periferia del biopelícula, dejando poco o nada de oxígeno y nutrientes a las bacterias ubicadas en el interior del biopelícula (Stewart et al., 2016).

En cuanto a la clasificación, para cada cepa se utilizaron pocillos consecutivos cuyas DO fueron promediadas y corregidas por una DO de corte, obtenida con la suma del promedio de las DO de los pocillos control (3 pocillos de cada medio estéril no inoculado) y 3 veces su desviación estándar. De acuerdo con las DO corregidas, las cepas fueron clasificadas en:

- No formadoras de biopelícula (NFB): $DO_{\text{corregida}} < DO_{\text{corte}}$.
- Débiles formadoras de biopelícula (DFB): $DO_{\text{corte}} \leq DO_{\text{corregida}} < 2DO_{\text{corte}}$.
- Moderadas formadoras de biopelícula (MFB): $2DO_{\text{corte}} \leq DO_{\text{corregida}} < 4DO_{\text{corte}}$.
- Fuertes formadoras de biopelícula (FFB): $DO_{\text{corregida}} > 4DO_{\text{corte}}$.

Para una mejor comprensión de la información, las DO corregidas también se expresaron en porcentajes, tomando como 100% la DO promedio de cada cepa. Los porcentajes de formación de biopelícula para cada ensayo fueron promediados, se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16. Clasificación de bacterias productoras de biopelículas de acuerdo a la mejor condición del ensayo CV

Tinción	Condición óptima de crecimiento			Formación de biopelícula (%)	Clasificación
	Medio de cultivo	Tiempo de incubación	Temperatura de incubación		
<i>E. coli</i> EAEC	LBglu	48h	37°C	85.7	FFB
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	TSBglu	48h	37°C	90.7	FFB
<i>L. innocua</i> CFQ-B-232	BHIsac	24h	37°C	92.2	FFB

De acuerdo a la Tabla 16, se obtiene la clasificación de las biopelículas acorde a la condición óptima de formación. La composición del medio de cultivo en el cual crecen las bacterias posee una gran influencia sobre la formación de biopelículas (Cáceres et al., 2019). La formación y adherencia del biopelícula no ocurre por el mismo mecanismo en los diferentes medios, ya que las cepas usan distintas estrategias y expresan diferentes genes promotores de biopelícula en función de los recursos ambientales disponibles. Esto concuerda con otras investigaciones que han encontrado que esta incorporación (adición de glucosa) resultó favorecedora para el desarrollo de diversas biopelículas, como la de *E. coli* O157:H7 (Villegas et al., 2013), así como con otros patógenos, posiblemente debido a que este carbohidrato (glucosa) serviría como sustrato para la formación de la matriz de exopolisacáridos y, por ende, aumentaría la cuantificación de la biomasa total. También se observó el efecto de la temperatura, ya que se obtuvo una biopelícula más densa en la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo, que a temperatura ambiente o en refrigeración. Este parámetro es muy importante porque puede afectar etapas del desarrollo de las biopelículas como la adhesión irreversible y así tardar más tiempo para generar una matriz más densa.

La variación en el tiempo de incubación también influye en la formación de biopelículas debido a que, dependiendo en la fase de crecimiento que se encuentre se activará la expresión

de distintos genes relacionados con las biopelículas, como el caso de *Escherichia coli*, en su fase estacionaria de crecimiento, la disminución del nitrógeno y del fósforo inducen la expresión de *csgD* (síntesis de fimbria) y por lo tanto la formación de biopelícula (Harrell et al., 2021). Esto podría explicar que la formación de biopelícula sea mayor a las 48 horas que a las 24 horas y en condiciones de menor disponibilidad de nutrientes.

7.6.2 Determinación de Unidades Formadoras de Colonia

Se realizó nuevamente el ensayo de cristal violeta (CV) de los microorganismos modelo, para determinar de forma cuantitativa la pérdida de UFC/mL con la tinción de cristal violeta, al tener la curva de crecimiento de los microorganismos de acuerdo a las UFC/mL (Anexo 11.2, Figura S6). También se monitoreó la formación de biopelícula a lo largo de la cinética (Anexo 11.3, Figura S10-S12), lo que llevó a la decisión de partir de una concentración de 1×10^7 a 1×10^8 UFC para futuras determinaciones al corresponder al inicio de cada etapa exponencial de los microorganismos modelo.

Para el recuento de UFC, se obtuvieron las biopelículas de acuerdo a la condición óptima determinada anteriormente y en cada monitoreo de los ensayos de CV, se añadieron 100 μ L de PBS a los pocillos que contenían la biopelícula. Las placas se protegieron con parafilm y se agitaron durante 5 min para separar las células unidas. Luego, las suspensiones bacterianas (100 μ L) se transfirieron a pocillos profundos que contenían 900 μ L de PBS y se diluyeron en serie y se colocaron en placas como se describió anteriormente. Después las placas de agar se incubaron hasta 24 h a 37°C y se contaron las colonias cultivadas. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 17:

Tabla 17. Determinación de precisión de cuantificación de biomasa total

<i>Microorganismo</i>	Concentración inicial (UFC/mL)	Concentración determinada (UFC/mL)	
		Cristal violeta	
		24 h	48 h
<i>E. coli EAEC</i>	4.1×10^7	6.7×10^8	6.5×10^8
<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>	2.2×10^7	1.4×10^8	1.2×10^8
<i>L. innocua CFQ-B-232</i>	1.9×10^7	1.6×10^8	1.5×10^8

Los resultados son similares a los obtenidos por Han et al (2017), quien demostró que la biomasa total de las biopelículas formadas de *E. coli* en la superficie de poliestireno aumenta

con el tiempo de incubación. Mientras que estudios previos de biopelículas de *Listeria* (Lezzoum-Atek et al., 2019) han demostrado que después de una rápida adhesión inicial a las superficies, las poblaciones bacterianas no aumentan significativamente.

De ambas metodologías propuestas para la cuantificación de biopelículas, se obtuvieron las condiciones óptimas similares para la formación de biopelículas. Para futuros ensayos solo se utilizará el ensayo con cristal violeta debido a que tiene mayor sensibilidad, de acuerdo a Stiefel (2016), también debido a lo obtenido en el recuento de UFC/mL del ensayo CV. Con el cristal violeta (al ser un colorante básico) hay afinidad a las moléculas cargadas negativamente por lo que se puede unir a moléculas de superficie y a los polisacáridos en la matriz del biopelícula. Debido a que se tiñen las células vivas y muertas, así como la matriz, se puede usar cristal violeta para la tinción de biomasa total.

7.7 Selección de microorganismo modelo para formación de biopelícula

Se evaluó el efecto antibacteriano de las PGH recombinantes contra diferentes bacterias patógenas y no patógenas (microorganismos modelos). La prueba se realizó con las enzimas no purificadas, por lo que hay más compuestos que pueden estar interviniendo en la inhibición externos a la acción de las enzimas de interés, como es el caso de AMI 123 que muestra una disminución posterior al punto máximo de inhibición, mientras que para GLU 32 no se observa ese comportamiento. La actividad inhibitoria solo se presentó contra 1 de las bacterias analizadas (Tabla 18), el comportamiento contra *Listeria innocua* es diferente dependiendo la enzima recombinante utilizada.

Tabla 18. Concentración mínima inhibitoria de las enzimas recombinantes sobre *L. innocua*

Proteína (µg / mL)	Halo de inhibición (mm)	
	AMI 123	GLU 32
10	0.5	0
20	0.5	0
30	4.3	0
40	3.8	0
100	4.1	2.5
200	3.2	5.1
400	2.4	5.3

En comparación con el espectro antibacteriano reportado por García-Cano (2013) de las dos PGH (99-kDa y 110-kDa) parcialmente puras y la PGH recombinante (99-kDa), también se obtuvo que ninguna de las proteínas recombinantes presentó inhibición contra bacterias Gram-negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*). Esto puede deberse a que su membrana externa posee una barrera impermeable para moléculas hidrófilas de mucho menor tamaño que estas enzimas, lo que protege a la capa peptidoglucano de la acción lítica de endolisinas (Briers et al, 2015), a pesar de que el peptidoglucano sea más delgado que en las bacterias Gram positivas. Los ensayos incluyeron esas cepas, con el propósito de corroborar que la enzima no tiene efecto lítico sobre las mismas, lo que sugiere que probablemente las enzimas recombinantes de 99-kDa requieran de la presencia de la proteína de 110-kDa para generar una mayor actividad contra los patógenos de interés.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionó a la bacteria *Listeria innocua* como microorganismo modelo para el tratamiento enzimático porque, aunque los 3 microorganismos de estudio tienen exopolisacáridos susceptibles a hidrólisis enzimática, no solo se busca romper la red de la biopelícula, se desea además un efecto bactericida contra los patógenos que sean liberados al perturbar la estabilidad de la biopelícula.

Dado que *L. innocua* no es patógena, podría ser posible emplear esta especie directamente en ensayos para investigar su persistencia y susceptibilidad a los antimicrobianos, lo que generaría datos valiosos para predecir el comportamiento de *L. monocytogenes*. Un análisis filogenético mostró que *L. innocua* y *L. monocytogenes* son especies estrechamente relacionadas (den Bakker et al., 2010). Aunque hay pocos informes que abordan sus diferentes capacidades de formación de biopelículas en los mismos nichos ambientales, de acuerdo a Costa et al. (2018), *L. innocua* podría usarse como sustituto de *L. monocytogenes*, no solo en lo que respecta a la producción de biopelículas, sino también a la susceptibilidad de las biopelículas contra ciertos desinfectantes a base de peróxido de hidrógeno.

A pesar de los diferentes tipos de sistemas modelo de biopelículas descritos en la literatura, ninguno de ellos puede considerarse como el sistema modelo óptimo y universalmente aplicable. Por lo que en el presente proyecto se considera que el comportamiento de *L. innocua* es extrapolable al presentado con la especie patógena *L. monocytogenes*.

7.8 Propiedades del microorganismo modelo

Una vez que se seleccionó al microorganismo modelo, se decidió evaluar ciertas propiedades de la cepa para comprender la influencia de los factores ambientales en la formación de biopelículas de *L. innocua*. Estudios previos (Fan et al., 2020) demostraron que la formación de biopelículas se correlacionó positivamente con la hidrofobicidad y la motilidad de la superficie celular. Las bacterias han desarrollado mecanismos de motilidad activa que les permiten superar las fuerzas electrostáticas e hidrodinámicas repulsivas que se encuentran alrededor de las superficies y, en consecuencia, aumentar sus posibilidades de interactuar con las superficies para formar biopelículas (Beloin et al., 2008).

Motilidad bacteriana

Se realizó una prueba de punción en medio semisólido de *L. innocua* a distintas temperaturas de crecimiento, a 30°C y a 37°C (Figura 25) para observar su comportamiento en cuanto a la movilidad debido a que se espera que tengan distinto comportamiento en cuanto a la formación de biopelículas.

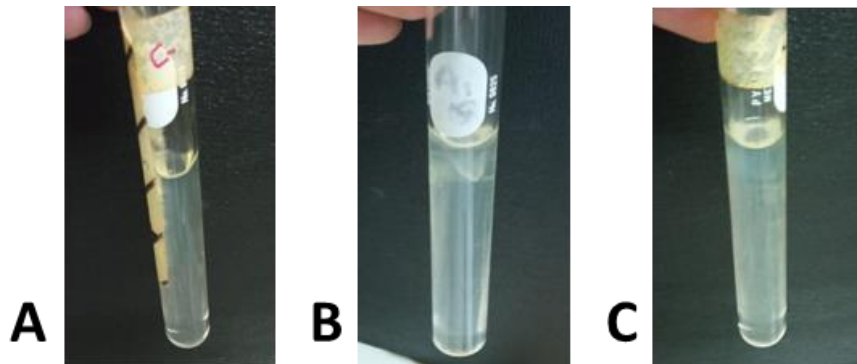


Figura 25. Evaluación de motilidad con prueba de punción en medio semisólido. A. Control negativo B. *Listeria innocua* a 30°C. C. *Listeria innocua* a 37°C.

En la temperatura de 30°C se obtuvo un resultado positivo a movilidad, lo obtenido concuerda con la literatura porque se ha reportado que a esa temperatura se favorece la formación de flagelos. Las bacterias pueden utilizar características de la superficie celular como pili, fimbrias y flagelos para adherirse a diversas superficies (Merritt et al., 2007). No se han descrito pelos ni fimbrias para *L. monocytogenes* u otras especies.

En general, los flagelos se pueden usar directamente para la unión y colonización como adhesina, o indirectamente para proporcionar movimiento de la célula a la superficie a colonizar. Dependiendo de la superficie, *Listeria* utiliza flagelos de forma directa e indirecta

para adherirse y colonizar diferentes superficies. La literatura sugiere que el origen de la cepa, el entorno de nutrientes y el tipo de superficie (vegetal, animal, inerte, etc) pueden desempeñar un papel en el uso de los flagelos para la fijación (Gorski, 2009).

Cuando se empleó la temperatura de 37°C se obtuvo un resultado negativo en cuanto a movilidad, resultado que concuerda con la literatura en cuanto a la inhibición de producción de flagelos, pero se ha reportado que al bloquearse disminuye la unión bacteriana inicial a la superficie, aunque posteriormente conduce a la formación de hiperbiopelículas, comunidades adheridas a la superficie que alcanzan una alta densidad (Todhanakasem et al., 2008). Además, hay reportes de que *Listeria* también puede adherirse a superficies abióticas a través de un proceso de unión independiente de flagelos, que no está afectado con la temperatura (Marchand et al., 2012).

Hidrofobicidad de la superficie celular

La hidrofobicidad de la superficie bacteriana es un determinante importante en la adherencia y colonización de bacterias tanto en superficies vivas como inertes. Esta propiedad se utilizó para caracterizar la adhesión de las bacterias a la superficie de contacto y se determinó midiendo la adhesión de las células bacterianas al xileno. Los resultados se presentan en la Figura 26. De acuerdo a Møretro et al. (2004) la adhesión de *L. monocytogenes* a las superficies de procesamiento de alimentos es una consecuencia de interacciones hidrófobas entre el material de la superficie y los componentes de la superficie exterior de la bacteria.

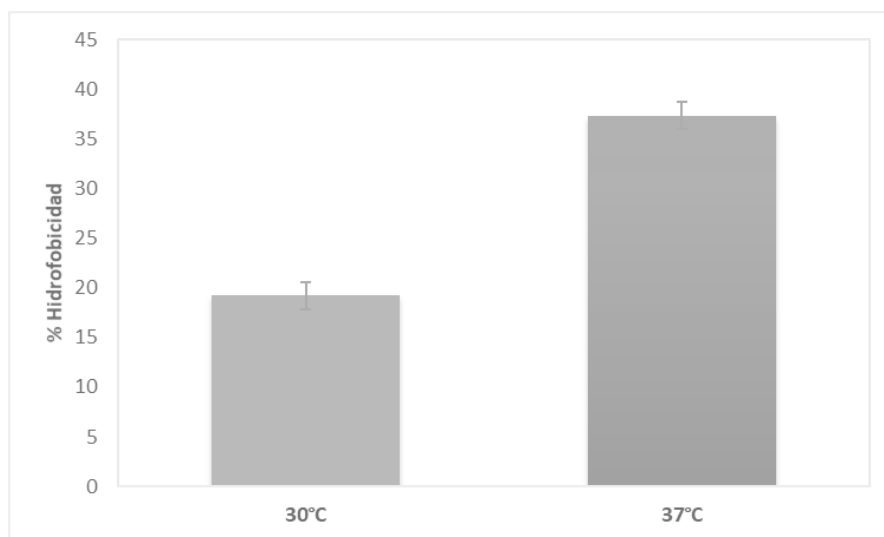


Figura 26. Evaluación del % de hidrofobicidad de *L. innocua* de acuerdo a la temperatura de crecimiento.

Se obtuvo mayor porcentaje de hidrofobicidad a 37°C que a 30°C, alrededor del doble. De acuerdo a Gorski et al. (2009) las cepas con alta hidrofobicidad tienen fuertes propiedades de adhesión, lo que significa que más células pueden adherirse a las superficies, secretar más EPS y, en consecuencia, exhibir biopelículas más fuertes. Entonces, cuanto mayor es la hidrofobicidad de la superficie celular, mayor es la capacidad de formación de biopelículas.

De acuerdo a las propiedades obtenidas, se comprobó que la temperatura de crecimiento más adecuada para el desarrollo de biopelículas del microorganismo modelo es de 37°C, respecto a las propiedades de la cepa, así como también los observados con la determinación de biomasa total con el ensayo de cristal violeta.

7.9 Tratamiento enzimático

Para perturbar la estabilidad de las biopelículas se ha enfocado en la escisión del peptidoglucano, ya que reduce la formación de biopelículas de varias maneras. Por ejemplo, altera la composición de proteínas y ácidos teicoicos presentes en la pared celular. También puede resultar en la liberación de moléculas de señalización que pueden modular la expresión génica relacionada con la biopelícula. Los exopolisacáridos a menudo se han identificado como objetivos terapéuticos atractivos para la interrupción de la formación de biopelículas, lo que deja a las bacterias vulnerables al tratamiento antimicrobiano. *Listeria innocua*, produce como su principal exopolisacárido el poli-β-(1,4)-N-acetilmanosamina (poli-NAM). Se espera que las enzimas recombinantes de 99-kDa de *P. acidilactici* actúen de diferente forma debido a la afinidad por distintos tipos de enlace.

Las condiciones evaluadas se muestran en la Tabla 19, a continuación:

Tabla 19. Condiciones de tratamiento enzimático contra biopelículas

Temperatura	Tiempo	Concentración de proteína
4°C, T amb (22°C), 37°C	1h, 2h, 4h	100 ug/mL, 200 ug/mL

Se eligieron esas condiciones de temperatura al considerarse como las condiciones de trabajo que se tienen en la industria alimentaria (refrigeración, temperatura ambiente, temperatura óptima del patógeno por malos ajustes de temperatura en los equipos). Además, la actividad de las enzimas recombinantes es adecuada a estas temperaturas (Anexo 11.5). Respecto al tiempo, se decidió realizar el tratamiento por intervalos cortos, suponiendo que en la industria no se desea detener la producción por mucho tiempo para lograr la sanitización. Finalmente,

en cuanto a la concentración de proteína se utilizaron los valores obtenidos en la determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Influencia de condiciones del tratamiento enzimático con AMI 123 y GLU 32

En cuanto a la **temperatura del tratamiento** (Figura 27), hay diferencia significativa entre las temperaturas, a 4°C no se favorece la degradación, mientras que a 22°C y 37°C sí. También se esperaba un incremento en el % de células viables que se relaciona con un aumento en el % formación de biopelícula en el control sin tratamiento enzimático a 37°C (Anexo 11.6). A diferencia de lo que ocurre con las demás temperaturas, esto se puede atribuir a que está condición de temperatura favorece el crecimiento de la biopelícula al ser la condición óptima para su desarrollo. Esto se puede atribuir a que las enzimas tienen mayor actividad al incrementarse la temperatura (siendo su actividad máxima por encima de los 37°C), que a bajas temperaturas.

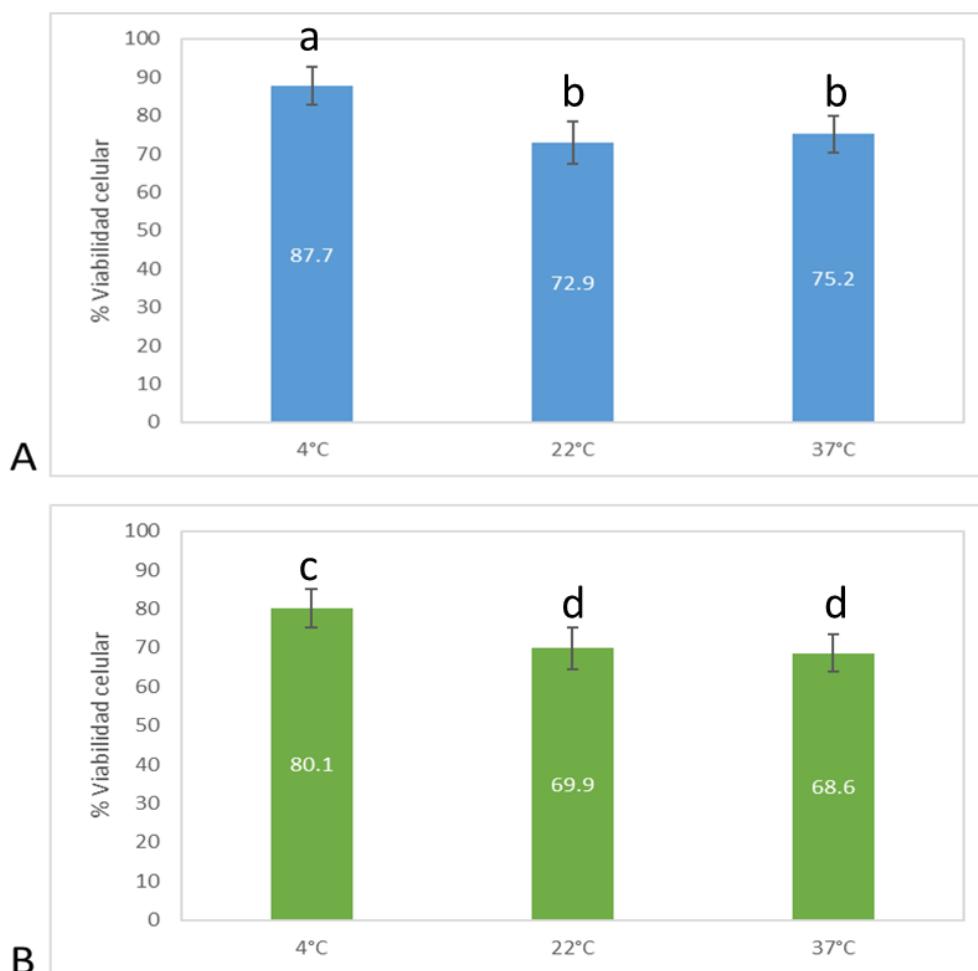


Figura 27. Influencia de la temperatura en la eficiencia del tratamiento enzimático con proteínas recombinantes en la reducción de la viabilidad celular en la biopelícula de *L. innocua*. El tratamiento fue por

2h con 100 µg/mL de enzima. A. AMI 123 y B. GLU 32. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significancia: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significancia.

En cuanto a la **concentración de proteína** (Figura 28), se observa que la diferencia entre 100 µg/mL y 200 µg/mL no es significativa por lo que es posible utilizar menor cantidad de proteína, lo que lleva a reducir costos de producción de las enzimas recombinantes. Esto se puede atribuir a la estabilidad de las enzimas, tienen actividad óptima pero solo por intervalos cortos, por lo que si se prolonga el tratamiento se requerirá mayor concentración de proteína para una mejor degradación de biopelícula.

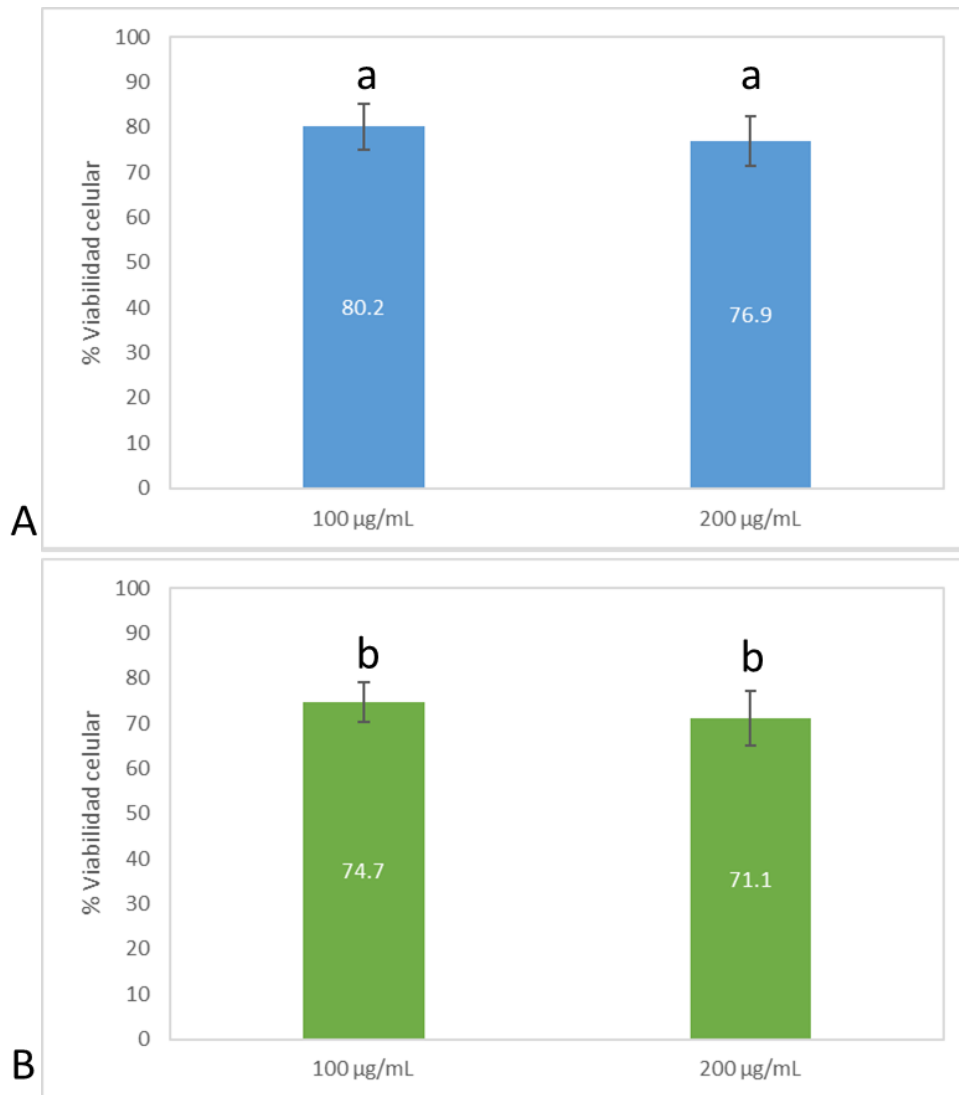


Figura 28. Influencia de la concentración de proteína en el tratamiento enzimático con proteínas recombinantes en la reducción de la viabilidad celular en la biopelícula de *L. innocua*. El tratamiento fue por 2h a 22°C (temperatura ambiente). A. AMI 123 y B. GLU 32. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significancia: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significancia.

En cuanto al **tiempo del tratamiento** (Figura 29), hay diferencia significativa entre los tiempos evaluados, aunque la disminución de células es similar entre enzimas en cada condición, a 4 h se obtiene la mayor disminución de células viables (30-40%).

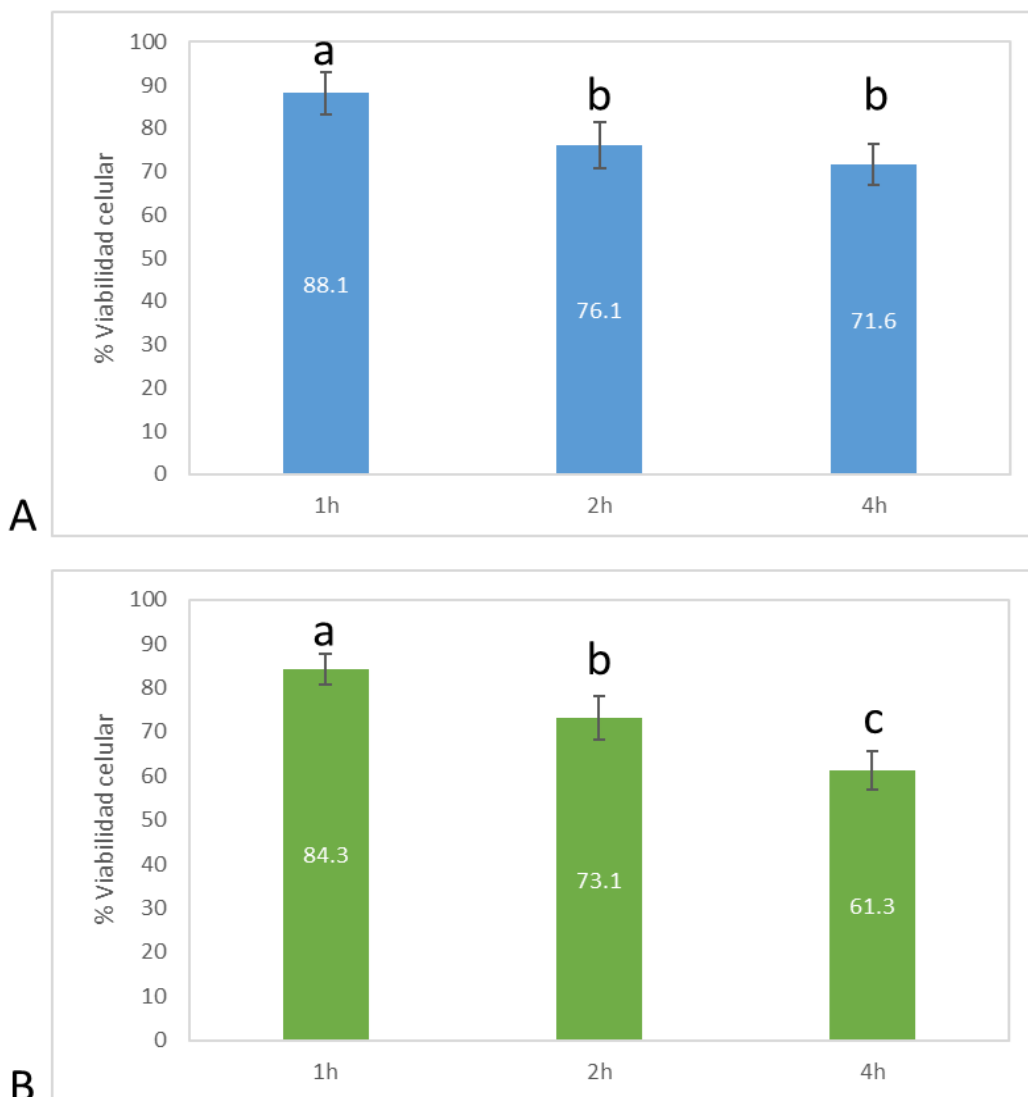


Figura 29. Influencia del tiempo de exposición en la reducción de viabilidad celular en la biopelícula de *L. innocua* provocada por el tratamiento enzimático con enzimas recombinantes. El tratamiento fue a 22°C (temperatura ambiente) con 100 µg/mL de enzima. A. AMI 123 y B. GLU 32. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significancia: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significancia.

Cabe resaltar que en todas las condiciones probadas el % de biomasa total se mantuvo constante, esto se puede atribuir a que la metodología no discrimina entre células vivas o muertas. De acuerdo a los resultados obtenidos y a los análisis de varianza correspondientes, se demuestra que la temperatura y el tiempo de exposición son los principales factores que

afectaron estadísticamente la degradación de biopelículas ($P < 0.05$). Además, se determinó la condición a la cual se obtuvo mayor % de degradación de biopelícula, para el caso de AM 123 es la aplicación por 4 h de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 22°C al reducirse ~35% la viabilidad celular, mientras que en el de GLU 32 se requiere la aplicación por 4 h de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 22°C para reducirse ~45% la viabilidad celular en la biopelícula.

También se busca destruir otros componentes importantes de la matriz extracelular de biopelículas como las proteínas además de los exopolisacáridos, diversas enzimas parecen tener un alto potencial para la degradación de biopelículas, por lo que se optó por probar enzimas comerciales con estas características. Se evaluó el efecto antibacteriano de la lisozima y proteinasa K contra el microorganismo modelo (Tabla 20), se obtuvo que solo una de las enzimas comerciales tuvo actividad contra *L. innocua*.

Tabla 20. Concentración mínima inhibitoria de lisozima sobre *L. innocua*

Proteína ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	mm de inhibición	
	Lisozima	Proteinasa K
10	1.2	0
20	3.1	0
30	3.3	0
40	3.4	0
100	6.1	0
200	7.2	0
400	6.4	0

En cuanto a la despolimerización de los exopolisacáridos, se considera a la lisozima porque no solo cumple con la degradación de EPS en la matriz del biopelícula, sino que ataca a las bacterias directamente al degradar el peptidoglucano de su pared celular. La lisozima también es una PGH con actividad muramidasa que se expresa como parte del sistema inmunitario innato de varios animales y escinde los enlaces β -(1,4) glucosídicos en el peptidoglucano, que a su vez está presente en los exopolisacáridos (poli- β -(1,4)-N-acetilmanosamina) de la biopelícula de *L. innocua*; por lo que con el uso de esta enzima no solo se busca dispersar a la biopelícula sino también desestabilizar la pared celular bacteriana y conducir a la lisis bacteriana de los microorganismos que conforman a la biopelícula. En cuanto a las proteasas, se consideró a la proteinasa K, una serina-proteasa de amplio espectro ampliamente utilizada,

que de acuerdo a la literatura varios investigadores han utilizado esta enzima contra una amplia gama de bacterias formadoras de biopelículas asociadas a los alimentos como *Staphylococcus lentus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros.

Respecto a las condiciones del tratamiento enzimático (Anexo 11.6), ambas enzimas comerciales tienen diferente % de degradación que las recombinantes, por lo que se debe considerar para futuros ensayos con mezclas enzimáticas. Cabe resaltar que la comparación posterior solo se realizó con las mejores condiciones de degradación para las enzimas recombinantes.

Comparación con enzimas comerciales

Se llevó a cabo la comparación de las enzimas recombinantes (AMI 123 y GLU 32) y comerciales (lisozima y proteinasa K), que se muestra en la Figura 30, de acuerdo a la condición en la que se obtuvo menor % de viabilidad celular (representa mayor degradación de biopelícula) de AMI 123 y GLU 32, que fue a 22°C por 4 h con 100 µg/mL (Anexo 11.7).

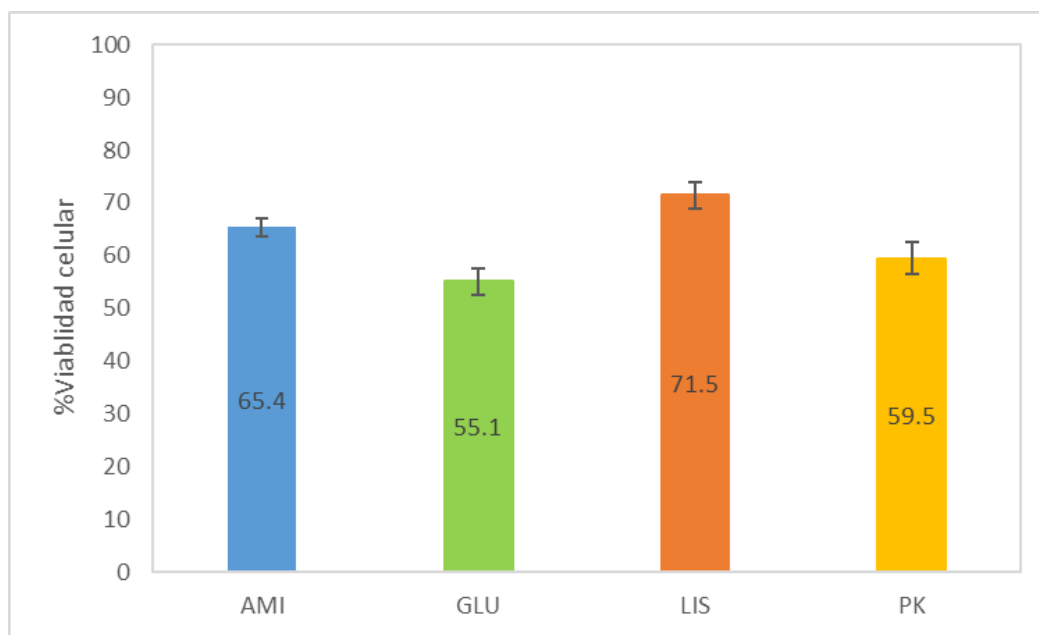


Figura 30. Comparación del tratamiento enzimático entre enzimas recombinantes (AMI 123 y GLU 32) y comerciales (Lisozima y Proteínasa K) y su efecto en la reducción de la viabilidad celular de la biopelícula de *Listeria innocua*. El tratamiento fue a 22°C (temperatura ambiente) con 100 µg/mL de enzima por 4 h.

Al comparar inicialmente ambas enzimas recombinantes se observa que hay mayor pérdida de células viables al usar la enzima GLU 32 que la AMI 123. Esto se puede atribuir a la

afinidad de GLU 32 por hidrolizar enlaces glucosídicos de los polisacáridos de *Listeria*, a diferencia de AMI 123 que tiene afinidad por hidrolizar enlaces peptídicos de las proteínas, que, aunque también afectaría a la matriz extracelular del patógeno por contener proteínas encargadas de la adhesión entre otras, es menor la degradación al no atacar al componente principal (EPS). Aunque los mecanismos de estas enzimas no se han investigado en el contexto de la dispersión de biopelículas, se puede suponer que las enzimas siguen la catálisis ácido-base general que involucra residuos de Asp/Glu conservados para escindir los enlaces glucosídicos de los polisacáridos presentes en la biopelícula (Ramakrishnan et al., 2022). También se considera que en ninguna condición hay una completa degradación debido a que solo se ataca uno de los componentes de la biopelícula en estudio, al aplicarse las enzimas por separado.

Posteriormente al comparar a las enzimas recombinantes con otra PGH, la **lisozima**, se observa que hay mayor viabilidad celular (menor degradación). Esto se puede atribuir a que la enzima a pesar de hidrolizar enlaces glucosídicos probablemente tiene menor afinidad por los presentes en el polímero de *L. innocua*. De acuerdo a Nguyen et al. (2014) la lisozima no tuvo efecto en la formación de biopelícula de *Listeria monocytogenes* con una concentración de 200 ug/mL, la evidencia experimental demuestra otro comportamiento se puede atribuir al tiempo de exposición, en la literatura se prueban distintos intervalos y no hay un consenso.

En cuanto a la **proteínasa K**, se observó que hubo mayor pérdida de viabilidad celular (40% vs 35%) comparado con AMI 123, siendo que ambas tienen acción sobre enlaces peptídicos tienen diferente afinidad. Mientras que al compararse con GLU 32 tuvo menor pérdida de viabilidad celular (~5%), esto se puede atribuir a que la proteínasa K no tuvo un efecto bactericida en la prueba de CMI contra el microorganismo modelo por lo que su degradación solo se enfocó en los componentes de la matriz extracelular y no en la lisis bacteriana.

En otros estudios se han utilizado otro tipo de proteasas como la bromelina y la papaína, para desprender la biopelícula de *L. monocytogenes*. Sin embargo, el efecto de las dos cisteína proteasas fue menor que el de la proteínasa K (Nahar et al., 2018). De acuerdo a la literatura, hay reportes de tratamiento de biopelículas de *L. monocytogenes* con proteínasa K dando como resultado una dispersión total de la biopelícula establecida tanto en poliestireno como en superficies de acero inoxidable, pero al aplicar el tratamiento por 24h (Nguyen et al.,

2014), pero en el caso de vidrio no se observó algún efecto inhibitorio, las diferencias se pueden atribuir al tipo de superficie y las diferentes interacciones que se dan, además de la cepa utilizada que pueden generar estructuras con una matriz más robusta, dificultando su desprendimiento. Ensayos con otro tipo de enzimas como la DNasa I han mostrado una reducción de biopelícula de *L. monocytogenes* del 90% después de 51h en poliestireno, mientras que en vidrio obtuvo una reducción del 80% en tan solo 18h de acuerdo a Harmsen et al. (2010).

Después de la comparación entre las enzimas se han identificado diversos factores que influyen para obtener un mayor % de degradación relacionado con la pérdida de viabilidad celular, inicialmente se requieren intervalos de tiempos más largos de la aplicación de tratamiento enzimático. También es importante identificar la etapa de formación de la biopelícula, mientras más temprana sea la etapa menor será el proceso de remoción y posterior dispersión de la biopelícula; así como también la conformación de la biopelícula (monoespecie o especies mixtas). Además, se debe considerar que el comportamiento será variable dependiendo de la superficie que sea analizada.

8. Conclusiones

Los microorganismos patógenos seleccionados fueron capaces de formar biopelícula sobre superficies de uso cotidiano, como el poliestireno, con mayor intensidad en medios de crecimiento nutritivos que en medios mínimos. La metodología que implicó el recambio del medio de cultivo junto con el uso del medio de enriquecimiento suplementado y un tiempo de incubación de 24-48 h fueron las condiciones más favorables para el desarrollo de biopelículas.

Se seleccionó como microorganismo modelo para el tratamiento enzimático a *Listeria innocua* al ser el único que fue inhibido por ambas enzimas recombinantes de acuerdo a ensayos de difusión en agar. En cuanto a la producción de las enzimas recombinantes, ambas subclonas presentaron actividad lítica contra *Listeria innocua* en diferentes concentraciones. Utilizando métodos espectrofotométricos se obtuvo la cuantificación de biomasa total y el % de viabilidad celular. Las condiciones de reacción, como la concentración, el tiempo de exposición y la temperatura se evaluaron para el tratamiento con enzimas recombinantes y comerciales en el presente trabajo.

En el modelo de biopelícula que se desarrolló en la superficie de interés al tratarse con las enzimas recombinantes se obtuvo una disminución del % de viabilidad celular relacionada con la degradación de la biopelícula, ambos dominios catalíticos tuvieron distinto comportamiento, AMI 123 tuvo alrededor de un 35% mientras que GLU 32 tuvo un 45%; que, al compararlo con la literatura, ambos son un resultado favorable en cuanto al tiempo de exposición evaluado, se espera un mayor % de degradación al aumentar los intervalos de tiempo. Por lo tanto, el tratamiento enzimático es un método alternativo prometedor a los tratamientos tradicionales, para su aplicación en poliestireno.

9. Perspectivas

Por el momento se está trabajando en el tratamiento enzimático con la proteína completa de 99-kDa para su posterior comparación respecto al % de degradación con los fragmentos clonados. También se propone realizar los ensayos con *Listeria monocytogenes* para confirmar el comportamiento predicho por *Listeria innocua*, así como también hacer pruebas con otro tipo de materiales como vidrio, poliestireno, cerámica, entre otras superficies de importancia en la industria alimenticia.

Conociendo las condiciones del tratamiento enzimático de las proteínas recombinantes las que se obtuvo mayor degradación de biopelícula, así como de las comerciales, esto puede servir de base para la construcción de una formulación multienzimática que degraden diversos componentes de la matriz extracelular así como los microorganismos que la conforman, de tal forma que su aplicación sea enfocada en biopelículas polimicrobianas, que son más complejos al estar compuestos por diversas cepas bacterianas. Aunque, es necesario abordar algunos desafíos asociados con la terapia con enzimas microbianas como la inmunogenicidad, la corta vida media in vivo de las enzimas, el costo y la aplicabilidad de las enzimas en la clínica.

10. Bibliografía

- Achinas, S., Yska, S. K., Charalampogiannis, N., Krooneman, J., & Euverink, G. J. W. (2020). A technological understanding of biofilm detection techniques: A Review. *Materials*, 13(14), 3147.
- Alcorlo Martín, Martínez-Caballero S., Molina R., Hermoso J. (2017) Carbohydrate recognition and lysis by bacterial peptidoglycan hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*. 44, 87-100.
- Al-kafaween, MA, Mohd Hilmi, AB, Jaffar, N. et al. (2019). Determination of optimum incubation time for formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pyogenes* biofilms in microtiter plate. *Bull Natl Res Cent* 43, 100.
- Andrews J.M. (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Chemother* 48, 5–16.
- Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E. y Shirtliff, M.E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, 2 (5), 445–459.
- Arunasri, K., & Mohan, S. V. (2019). Biofilms: Microbial life on the electrode surface. *Microbial Electrochemical Technology*, 295–313.
- Ban, G. H., and Kang, D. H. (2016). Effect of sanitizer combined with steam heating on the inactivation of foodborne pathogens in a biofilm on stainless steel. *Food Microbiology* 55, 47–54
- Baker P., Whitfield G., Hill P., Little D., Pestrak M., Robinson H., Wozniak D. and Howell P. (2015) Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* glycoside hydrolase PslG reveals that its levels are critical for Psl polysaccharide biosynthesis and biopelícula formation, *Journal of Biological Chemistry*, 290(47), 28374-28387
- Beloin, C., Roux, A. y Ghigo, JM (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Current topics in microbiology and immunology*, 322, 249–289.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254

- Briers Y., Lavigne R. (2015). Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria. *Future Microbiology Review*. 10 (3): 377-390.
- Bourgeois, I., Camiade, E., Biswas, R., Courtin, P., Gibert, L., Götz, F., Pestel-Caron, M. (2009). Characterization of AtlL, a bifunctional autolysin of *Staphylococcus lugdunensis* with N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase activities. *FEMS Microbiology Letters*, 290(1), 105–113.
- Cámara, M., Green, W., MacPhee, C.E. (2022). Economic significance of biofilms: a multidisciplinary and cross-sectoral challenge. *NPJ Biofilms Microbiomes* 8, 42.
- Campos M. (2016) Caracterización molecular de la peptidoglucano hidrolasa bifuncional de 99 kDa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- Cáceres, M. E., Etcheverría, A. I., & Padola, N. L. (2019). Efectos del medio de cultivo y de la metodología aplicada sobre la formación de biopelículas de 2 cepas de *Escherichia coli* diarreagénicas. *Revista Argentina de Microbiología*.
- Ceotto-Vigoder, H., Marques, S. L., Santos, I. N., Alves, M. D., Barrias, E. S., Potter, A., Alviano, D. S., & Bastos, M. C. (2016). Nisin and lysostaphin activity against preformed biofilm of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Journal of applied microbiology*, 121(1), 101–114.
- Costa, A., Lourenco, A., Civera, T., & Brito, L. (2018). *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* strains from dairy plants behave similarly in biofilm sanitizer testing. *LWT Food Science and technology*, 92, 477–483.
- Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., and Alvarez-Ordóñez, A. (2015). Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. *Frontiers in Microbiology* 6:672.
- Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Alvarez-Ordóñez, A. (2016). New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the Food Industry. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Danese PN, Pratt LA, Dove SL, Kolter R. (2000). The outer membrane protein. Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology*.; 37(2), 424-432.

- Den Bakker, H. C., Cummings, C. A., Ferreira, V., Vatta, P., Orsi, R. H., Degoricija, L., Barker, M., Petrauskene, O., Furtado, M. R., & Wiedmann, M. (2010). Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC genomics*, 11, 688.
- Eraso-Cadena, MP, & Ríos-Osorio, LA (2016). Principales características de las biopelículas relacionadas con procesos patológicos descritos en humanos en los últimos 10 años, revisión sistemática. *Investigaciones Andinas*, 18 (32), 1491-1506.
- Fan, Y., Qiao, J., Lu, Z., Fen, Z., Tao, Y., Lv, F., Zhao, H., Zhang, C., & Bie, X. (2020). Influence of different factors on biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and the regulation of cheY gene. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 137, 109405.
- Fernández Ramírez, M. D., Smid, E. J., Abee, T., & Nierop Groot, M. N. (2015). Characterization of biofilms formed by *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and food spoilage isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 23–29.
- Fister, S., Robben, C., Witte, A. K., Schoder, D., Wagner, M., and Rossmannith, P. (2016). Influence of environmental factors on phage–bacteria interaction and on the efficacy and infectivity of phage P100. *Frontiers in Microbiology* 7:1152.
- Floyd, K. A., Eberly, A. R., & Hadjifrangiskou, M. (2017). Adhesion of bacteria to surfaces and biofilm formation on medical devices. *Biofilms and Implantable Medical Devices*, 47–95.
- Friedman, M. (2014). Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-Isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 7652–7670.
- Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Ghalsasi W. & Sourjik V. (2016). Engineering *Escherichia coli* to disrupt poly-N-acetylglucosamine containing bacterial biofilms. *Current Synthetic and Systems Biology*. 4:130.

- García, P., Martínez, B., Rodríguez, L., & Rodríguez, A. (2010). Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *International journal of food microbiology*, 141(3), 151–155.
- García-Cano I., Velasco-Pérez L., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S., Mendoza-Hernandez G., Farrés A. (2011). Detection, cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Journal of Applied Microbiology*. 111: 607-615.
- García-Cano I. (2013). Peptidoglucano hidrolasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042: Detección, localización celular y evaluación de su potencial como antibacteriano. Tesis de Doctorado. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- Gorski L, Duhé J.M., Flaherty D. (2009). The use of flagella and motility for plant colonization and fitness by different strains of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. *PLoS ONE* 4(4): e5142.
- Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2016). Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Han R, Klu Y.A.K, Chen J. (2017). Attachment and biofilm formation by selected strains of *Salmonella Enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* of fresh produce origin. *J. Food Sci.*;82(6):1461–1466.
- Harmsen, M., Lappann, M., Knøchel, S., & Molin, S. (2010). Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 76(7), 2271-2279.
- Harrell, J. E., Hahn, M. M., D'Souza, S. J., Vasicek, E. M., Sandala, J. L., Gunn, JS y McLachlan, J.B. (2021). Salmonella biofilm formation, chronic infection, and immunity within the intestine and hepatobiliary tract. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 624622.
- Ibarra, K. y Luna, L. (2022). Elementos moleculares y bioquímicos para el análisis de la peptidoglucan hidrolasa bifuncional de 99-kDa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.

- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7–11.
- Jindal, S., Anand, S., Huang, K., Goddard, J., Metzger, L., and Amamcharla, J. (2016). Evaluation of modified stainless steel surfaces targeted to reduce biofilm formation by common milk sporeformers. *Journal of Dairy Science* 99, 9502–9513.
- Köseoğlu, Volkan & Heiss, Christian & Azadi, Parastoo & Topchiy, Elena & Guvener, Z. Tuzun & Lehmann, Teresa & Miller, Kurt & Gomelsky, Mark. (2015). *Listeria monocytogenes* exopolysaccharide: origin, structure, biosynthetic machinery, and c-di-GMP-dependent regulation. *molecular microbiology*. *Molecular microbiology*, 96 (4), 728-743.
- Kubota, H., Senda, S., Tokuda, H., Uchiyama, H., & Nomura, N. (2009). Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149. *Food Microbiology*, 26(6), 592–597.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lezzoum-Atek, S., Bouayad, L., & Hamdi, T. M. (2019). Influence of some parameters on the ability of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Escherichia coli* to form biofilms. *Veterinary world*, 12(3), 459–465.
- Lister, J. L. and Horswill, A. R. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 178.
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., & Herman, L. (2012). Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 133–147.
- Maunders, E., & Welch, M. (2017). Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 364(13).
- Nahar, S., Mizan, M. F. R., Ha, A. J., & Ha, S.-D. (2018). Advances and future prospects of enzyme-based biofilm prevention approaches in the food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* Vol 0, 1-19.

- Nguyen, U. T., & Burrows, L. L. (2014). DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. *International journal of food microbiology*, 187, 26–32.
- Nica, I. C., Stan, M. S., Popa, M., Chifiriuc, M. C., Lazar, V., Pircalabioru, G. G., Dumitrescu, I., Ignat, M., Feder, M., Tanase, L. C., Mercioniu, I., Diamandescu, L., & Dinischiotu, A. (2017). Interaction of new-developed TiO₂-based photocatalytic nanoparticles with pathogenic microorganisms and human dermal and pulmonary fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences* 18(2), 249.
- Ortega, A. (2017). Actividad antimicrobiana de enzimas recombinantes generadas a partir de una proteína bifuncional producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- O'Toole G. and Kolter R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis, *Molecular Microbiology*, 28(3), 449-461
- Ramakrishnan, R., Singh, A. K., Singh, S., Chakravorty, D., & Das, D. (2022). Enzymatic dispersion of biofilms: An emerging biocatalytic avenue to combat biofilm-mediated microbial infections. *The Journal of biological chemistry*, 298(9), 102352.
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & El Jaziri, M. (2015). The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed research international*, 2015, 759348.
- Scheurwater M., Pfeffer M., Clarke, J. (2007) Production and purification of the bacterial autolysin N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase B from *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Expression & Purification*. 56(1) 129 –131.
- Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2016). *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 121(2), 309–319.
- Sheikh, J., Hicks, S., Dall'Agnol, M., Phillips, A. D., & Nataro, J. P. (2001). Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 41(5), 983–997.

- Stepanović, S., Vuković, D., Dakic, I., Savic, B., y Svabic-Vlahovic, M. (2000). Quantification of biopelícula in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. *Journal of Microbiological Methods*, 175-179.
- Stewart, P. S., Zhang, T., Xu, R., Pitts, B., Walters, M. C., Roe, F., Moter, A. (2016). Reaction–diffusion theory explains hypoxia and heterogeneous growth within microbial biofilm associated with chronic infections. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2(1).
- Stiefel, P., Rosenberg, U., Schneider, J., Mauerhofer, S., Maniura-Weber, K., & Ren, Q. (2016). Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(9), 4135–4145.
- Stempel, N., Strehmel, J., and Overhage, J. (2015). Potential application of antimicrobial peptides in the treatment of bacterial biofilm infections. *Current Pharmaceutical Design* 21, 67–84.
- Sudagidan, M., & Yemenicioğlu, A. (2012). Effects of nisin and lysozyme on growth inhibition and biofilm formation capacity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk and cheese samples. *Journal of food protection*, 75(9), 1627–1633.
- Thi, M., Wibowo, D., & Rehm, B. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8671.
- Todhanakasem, T., & Young, G. M. (2008). Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. *Journal of bacteriology*, 190(17), 6030-6034.
- Villegas NA, Baronetti J, Albesa I, Polifroni R, Parma A, Etcheverría A. (2013). Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Scientific World Journal*.; 607258:17.
- Vollmer, W., & Seligman, S. J. (2010). Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends in Microbiology*, 18(2), 59–66.

- Wang, Y., Sun, L., Hu, L., Wang, Z., Wang, X., & Dong, Q. (2022). Adhesion and kinetics of biofilm formation and related gene expression of *Listeria monocytogenes* in response to nutritional stress. *Food Research International*, 156, 111143.
- Watnick, P., & Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2675–2679.
- Xu Z., Islam S., Wood T. K., and Huang Z. (2015) An integrated modelling and experimental approach to study the influence of environmental nutrients on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*, *Biomed Research International*, 2015, 506782.
- Yokoi K., Sugahara K., Iguchi A., Nishitani G., Ikeda M., Shiada T., Inagaki N., Yamakawa A., Taketo A., Kodaria K. (2008). Molecular properties of the putative Atl_{WM} encoded by *Staphylococcus warneri* M: Mutational and biochemical analyses of the amidase and glucosaminidase domains. *Gene*, 416(1-2), 66-76.
- Zhang, Q. X., Zhang, Y., Shan, H. H., Tong, Y. H., Chen, X. J., and Liu, F. Q. (2017). Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* W10. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 25000–25009.

11. Anexos

11.1 Producción de enzimas recombinantes en diversas fracciones celulares

Se probaron las condiciones propuestas por Ibarra-Luna (2022) y Campos (2015) para la inducción de las proteínas recombinantes, encontrando que la condición óptima de producción fue: 0.4mM del inductor IPTG a 22°C, 250 rpm por 3 h. Para saber en qué fracción se localizaban nuestras proteínas de interés se realizaron diversas metodologías (sonicación, choque osmótico, etc) para obtener diversas fracciones celulares (Figura S1 y S2): I. Sobrenadante (medio de cultivo), II. Restos celulares y II. Fracción citosólica y IV. Periplasma.

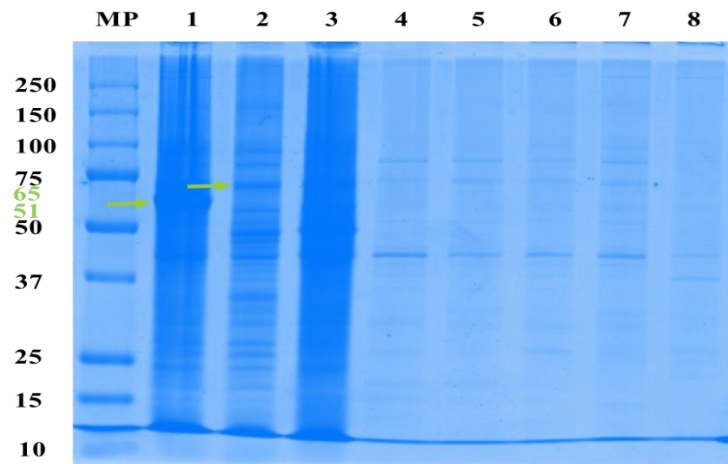


Figura S1. Perfil proteico de diversas fracciones celulares de las proteínas recombinantes AMI 123 y GLU 32. SDS-PAGE 10%. MP: Marcador de peso molecular. RESTOS CELULARES 1. GLU 32, 2. AMI 123 y 3. E. coli Rosetta DE3 +pET22-b vacío. CITOSOL 4. GLU 32, 5. AMI 123 y 6. E. coli Rosetta DE3 +pET22-b. PERIPLASMA 7. GLU 32, 8. AMI 123.

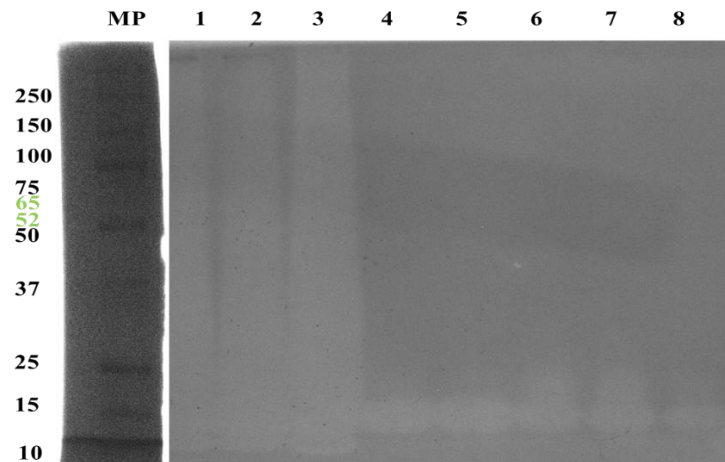


Figura S2. Actividad enzimática de diversas fracciones de las proteínas recombinantes AMI 123 y GLU 32. Zimograma contra *M. lysodeikticus*. MP: Marcador de peso molecular. RESTOS CELULARES 1. GLU

32, 2. AMI 123 y 3. E. coli Rosetta DE3 +pET22-b vacío. CITOSOL 4. GLU 32, 5. AMI 123 y 6. E. coli Rosetta DE3 +pET22-b. PERIPLASMA 7. GLU 32, 8. AMI 123.

En la tabla 21 se muestra la comparación entre valores de actividad específica de cada enzima recombinante de las diversas fracciones celulares obtenidos de los trabajos realizados en investigaciones previas por el equipo de trabajo.

Tabla 21. Actividad específica de las enzimas recombinantes AMI 123 y GLU 32 de diversas fracciones celulares del equipo de trabajo

ENZIMA	Resultados equipo de trabajo	Actividad específica (U/mg) en las fracciones celulares		
		Restos celulares	Citosol	Periplasma
AMI 123	Ibarra (2023)	103 ± 13	40 ± 5	18 ± 2
	Ibarra y Luna (2022)	30	10	4
	Ortega (2016)	NA	20	NA
GLU 32	Ibarra (2023)	73 ± 12	24 ± 2	8 ± 3
	Ibarra y Luna (2022)	50	15	70
	Ortega (2016)	NA	18	NA

NA: No aplica, debido a que no se reportaron valores de otras fracciones

Al hacer la comparación entre fracciones y entre valores de actividad específica del equipo de trabajo se observó que la fracción donde se obtuvo una mayor actividad fue en sobrenadante del medio de cultivo producido por Ibarra (2023), lo que concuerda con lo obtenido en el zimograma (mostrado en la sección de resultados 7.2), donde se obtuvieron las bandas que concuerda con el peso esperado, a diferencia de las otras fracciones en las que aparecían por debajo o había un barrido.

11.2 Curvas de crecimiento de microorganismos modelos

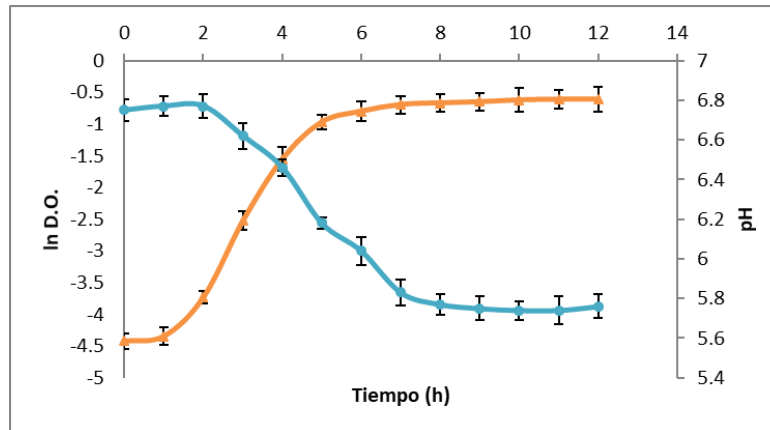


Figura S3. Curva de crecimiento de *Escherichia coli* EAEC. El microorganismo creció bajo condiciones estáticas a 37°C en medio LB. Se determinó la D.O.600nm (naranja) y pH (azul) en función del tiempo por triplicado.

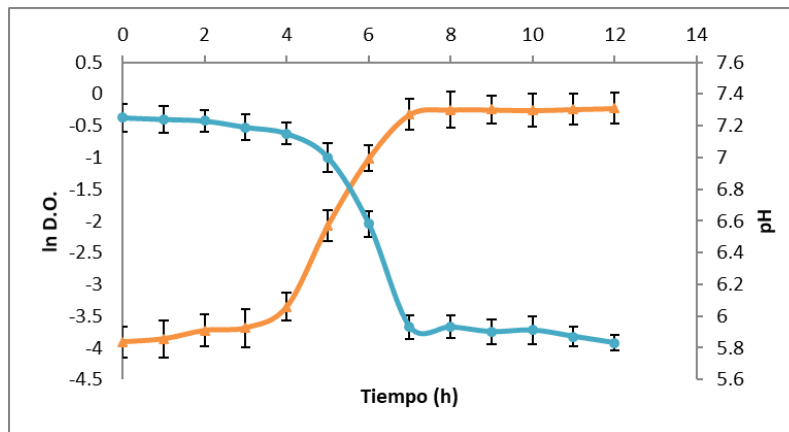


Figura S4. Curva de crecimiento de *Listeria innocua* CFQ-B 232. El microorganismo creció bajo condiciones estáticas a 37°C en medio BHI. Se determinó el logaritmo natural de la D.O.600nm (naranja) y pH (azul) en función del tiempo por triplicado.

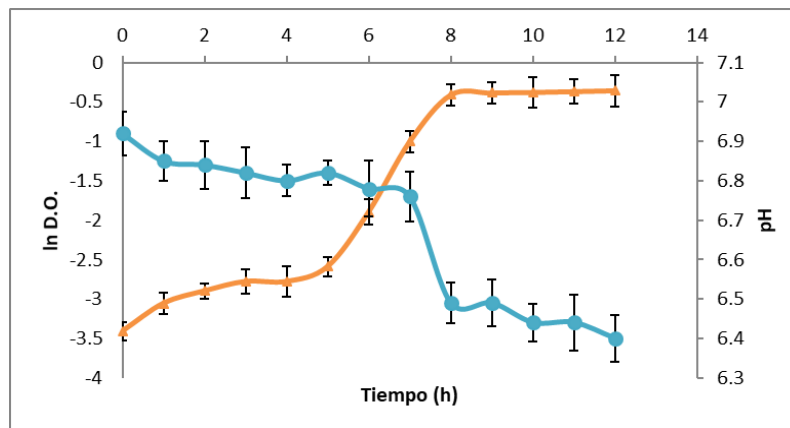


Figura S5. Curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. El microorganismo creció bajo condiciones estáticas a 37°C en medio TSB. Se determinó el logaritmo natural de la D.O.600nm (naranja) y pH (azul) en función del tiempo por triplicado.

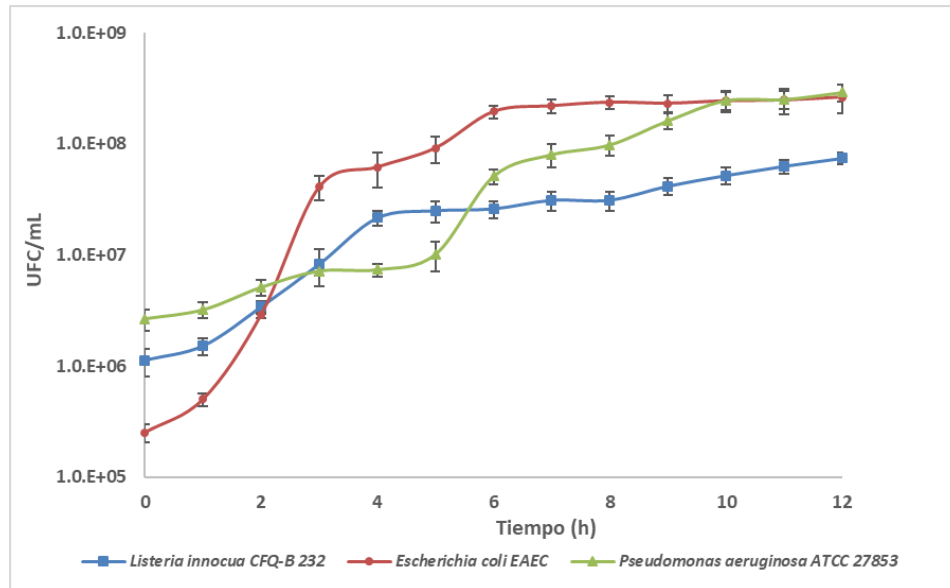


Figura S6. Curva de crecimiento de microorganismos modelo formadores de biopelícula. Se determinó las UFC/mL en función del tiempo. Bacterias patógenas crecieron en medio LB (*E. coli*) y TSB (*P. aeruginosa*), bacteria no patógena creció en medio BHI (*L. innocua*), todas crecieron bajo condiciones estáticas a 37°C.

11.3 Formación de biopelículas

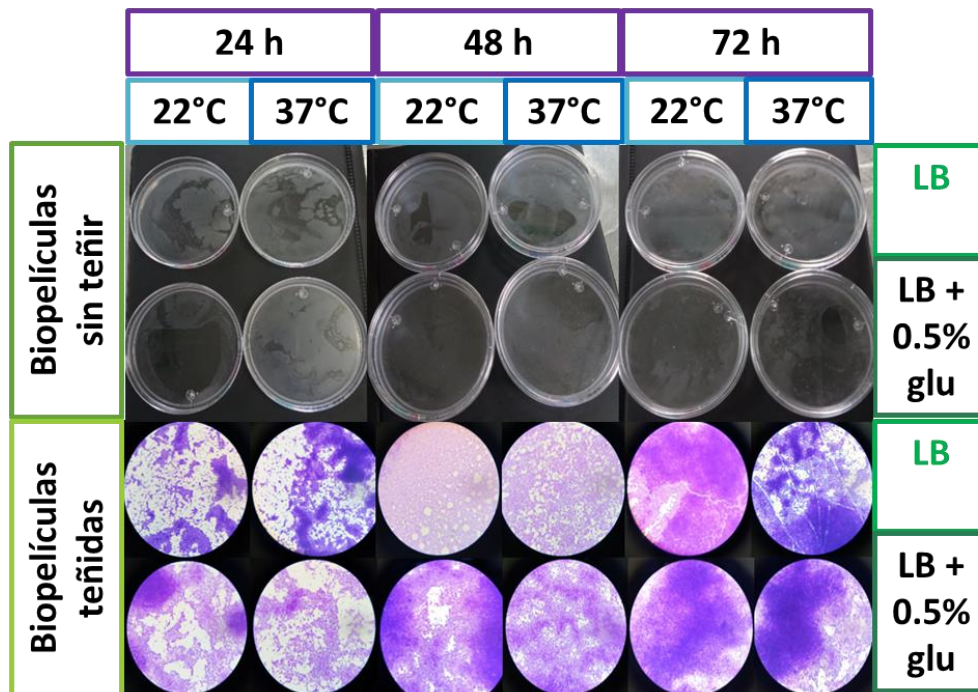


Figura S7. Evaluación de la formación de biopelícula de *Escherichia coli* EAEC a distintas temperaturas con diferentes medios de cultivo a las 24 h, 48 h y 72 h. Biopelículas sin teñir y teñidas con cristal violeta. Imágenes de aumento 100X capturadas con el Microscopio Biológico Binocular Digital de campo claro DMS-653.

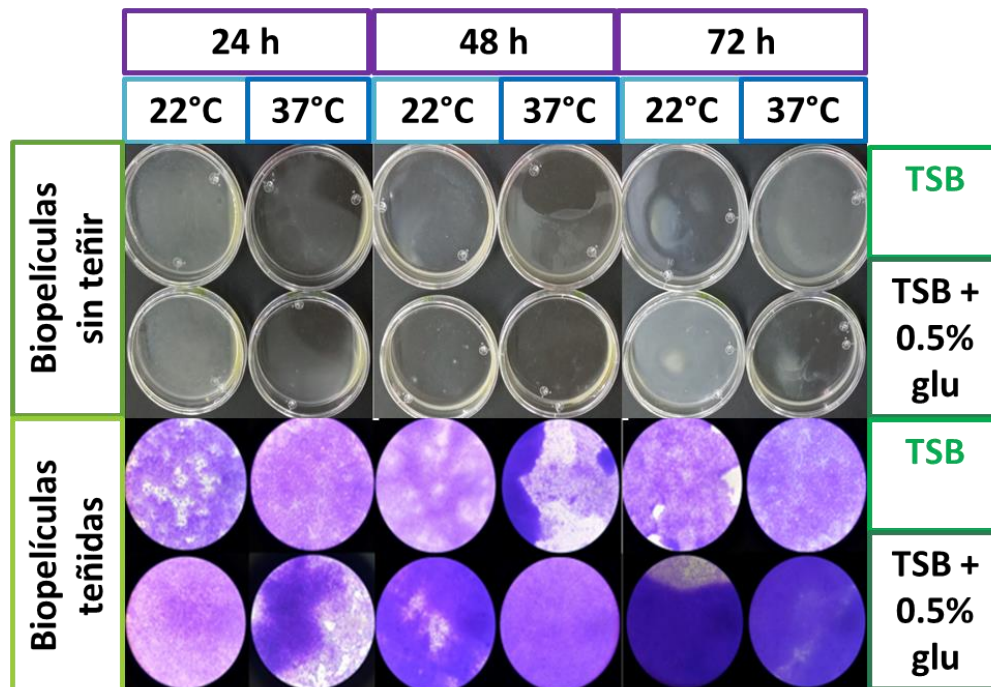


Figura S8. Evaluación de la formación de biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* a distintas temperaturas con diferentes medios de cultivo a las 24 h, 48 h y 72 h. Biopelículas sin teñir y teñidas con cristal violeta. Imágenes de aumento 100X capturadas con el Microscopio Biológico Binocular Digital de campo claro DMS-653.

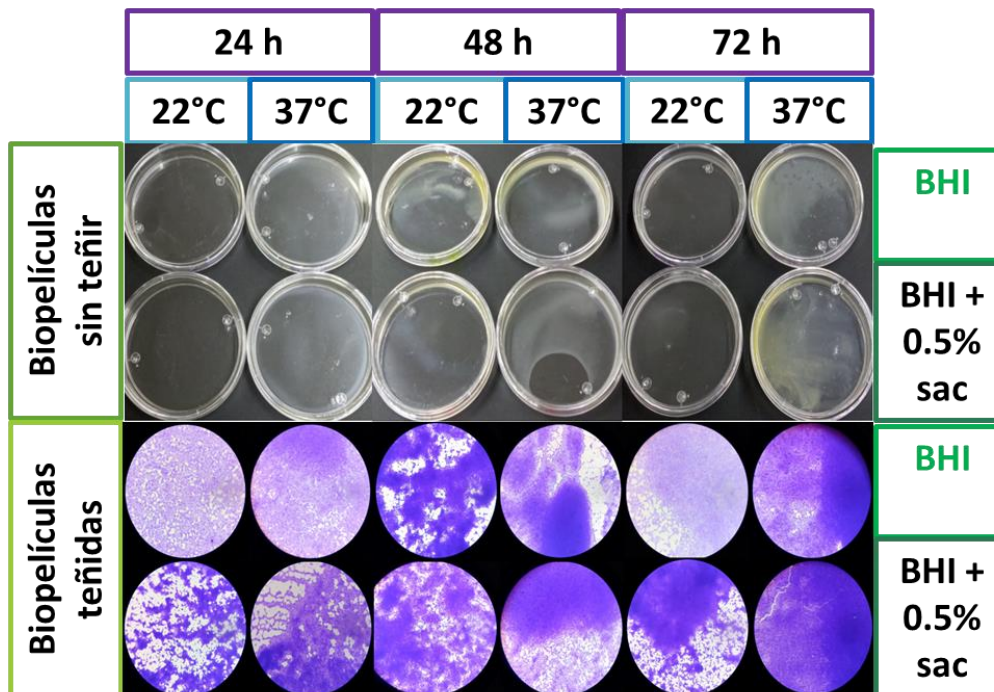


Figura S9. Evaluación de la formación de biopelícula de *Listeria innocua* a distintas temperaturas con diferentes medios de cultivo a las 24 h, 48 h y 72 h. Biopelículas sin teñir y teñidas con cristal violeta. Imágenes de aumento 100X capturadas con el Microscopio Biológico Binocular Digital de campo claro DMS-653.

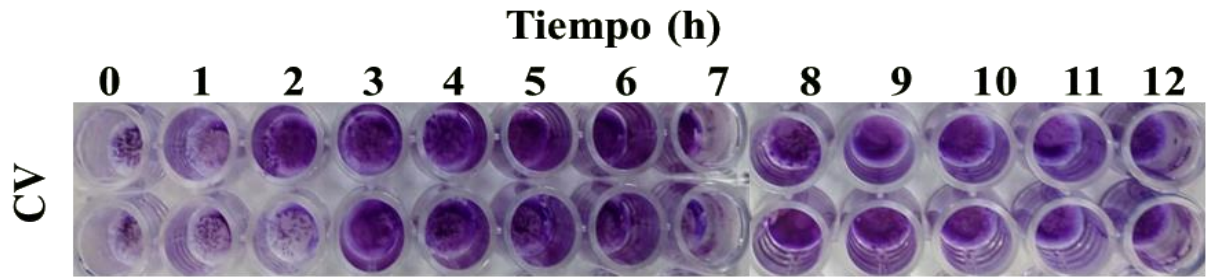


Figura S10. Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* de acuerdo a los ensayos de Cristal violeta (CV).

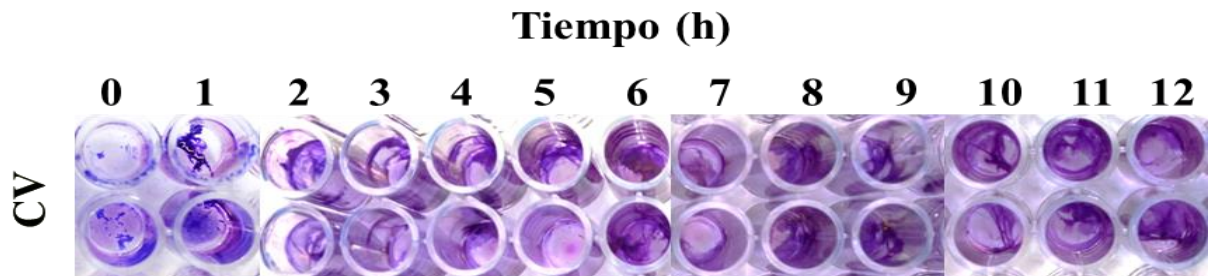


Figura S11. Cinética de crecimiento de *Listeria innocua* de acuerdo a los ensayos de Cristal violeta (CV).

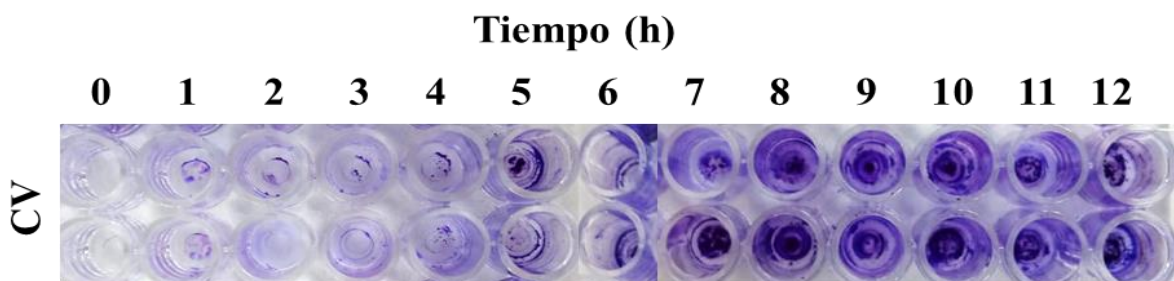


Figura S12. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* de acuerdo a ensayos de Cristal violeta (CV).

11.4 Cuantificación de biomasa total

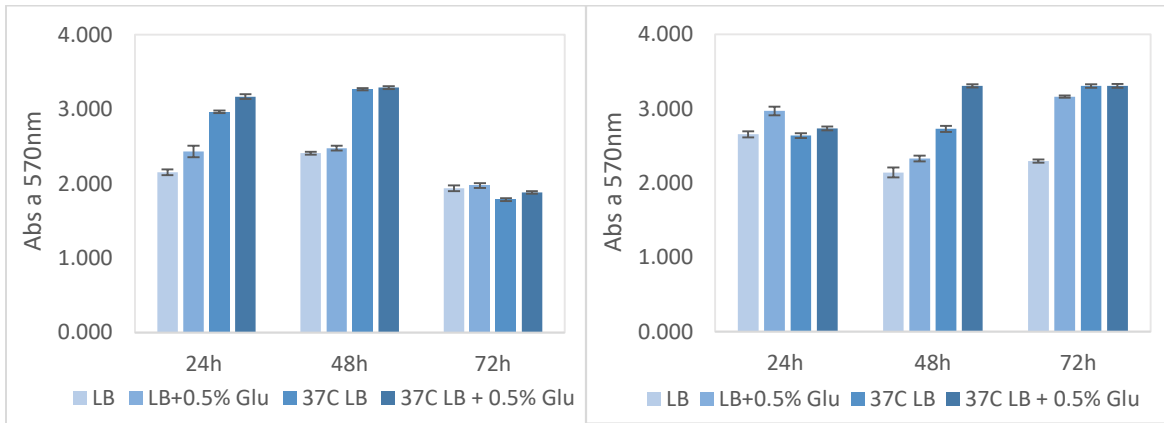


Figura S13. Cuantificación de biomasa total biopelícula *Escherichia coli*. **Izquierda.** Método A. **Derecha.** Método B.

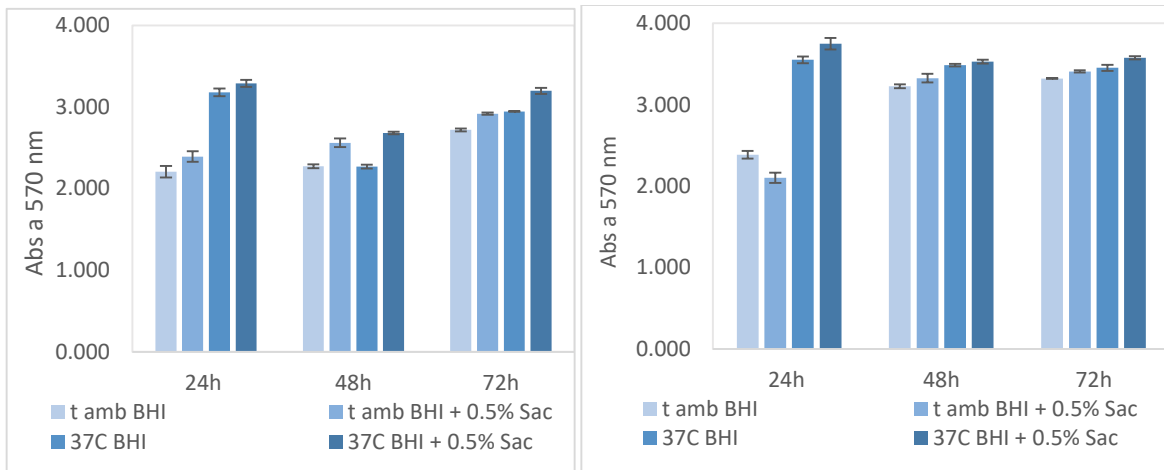


Figura S14. Cuantificación de biomasa total biopelícula de *Listeria innocua*. **Izquierda.** Método A. **Derecha.** Método B.

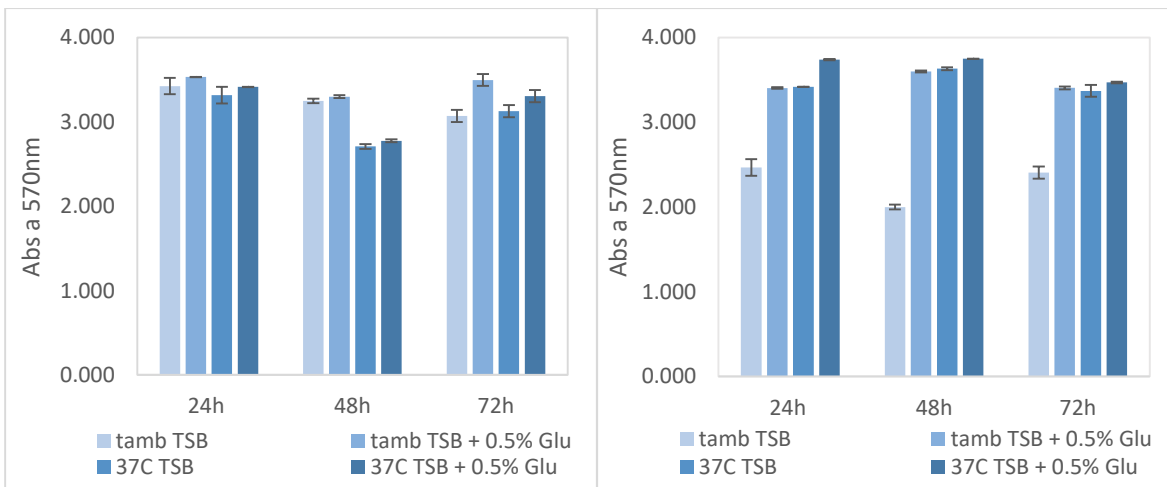


Figura S15. Cuantificación de biomasa total biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*. **Izquierda.** Método A. **Derecha.** Método B.

11.5 Condiciones de temperatura para el tratamiento enzimático contra biopelículas
Se eligieron esas condiciones de temperatura al considerarse como las condiciones de trabajo que se tienen en la industria alimentaria (refrigeración, temperatura ambiente, temperatura óptima del patógeno por malos ajustes de temperatura en los equipos).

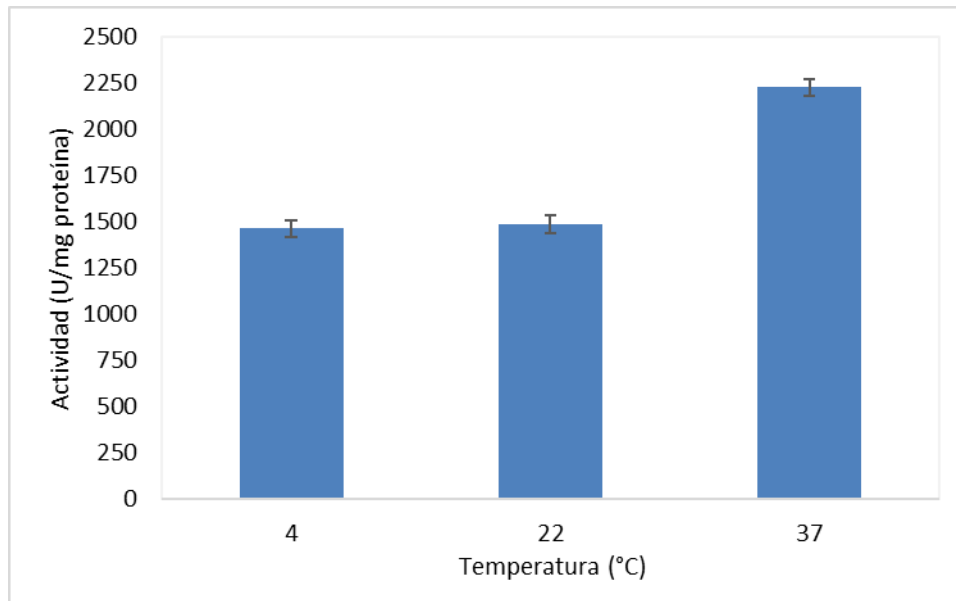


Figura S16. Estabilidad de la enzima AMI 123 a distintas temperaturas. La medición de las actividades se realizó a pH 7. Para el control se consideró a la enzima sin tratamiento térmico como el valor de referencia.

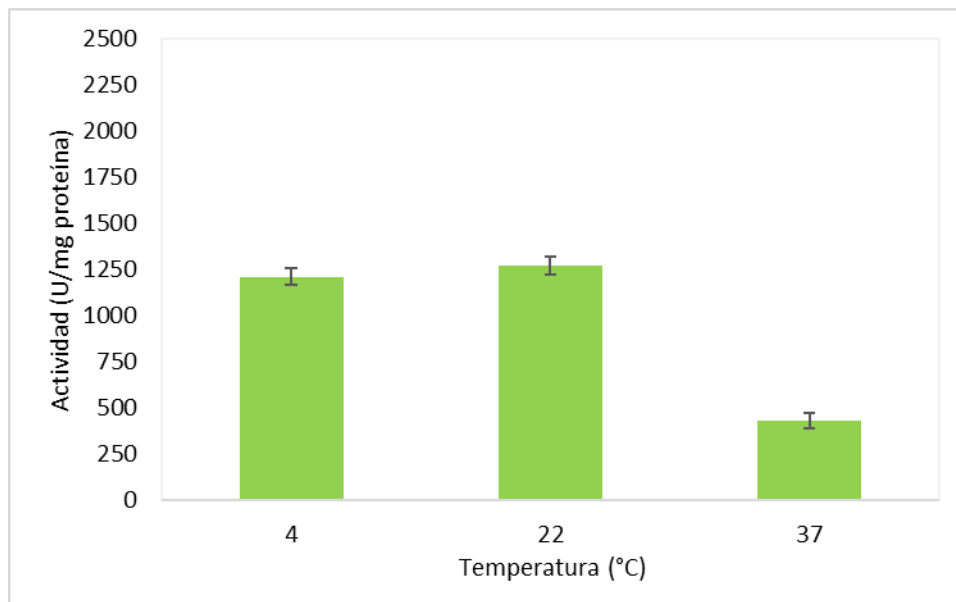


Figura S17. Estabilidad de la enzima GLU 32 a distintas temperaturas. La medición de las actividades se realizó a pH 7. Para el control se consideró a la enzima sin tratamiento térmico como el valor de referencia.

11.6 Análisis estadístico de los parámetros individuales del tratamiento enzimático

ANOVA del factor concentración de proteína

Se realizó un análisis de varianza para evaluar la degradación de biopelícula con las enzimas recombinantes para determinar si hay diferencia significativa en el % de viabilidad celular en respuesta a diferentes cantidades de enzima. Se probaron 2 concentraciones de enzima diferentes: 100 ug/mL y 200 ug/mL. Como hipótesis tenemos:

H_0 : No hay diferencia en el % de viabilidad celular al agregar diferentes concentraciones de proteína de enzima.

H_A : Hay diferencia en el % de viabilidad celular al agregar diferentes concentraciones de proteína de enzima.

Tabla 22. ANOVA del factor concentración de enzima para la enzima AMI 123

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	144.714074	1	144.714074	1.34998167	4.0266314
Dentro de los grupos	5574.24741	52	107.197066		
Total	5718.96148	53			

$F_0 = 1.349 < 4.026$. Se acepta la hipótesis nula. No hay diferencia en el % de viabilidad celular al agregar diferentes concentraciones de proteína de las enzimas recombinantes.

Tabla 23. ANOVA del factor concentración de enzima para la enzima GLU 32

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	175.320185	1	175.320185	1.22938014	4.0266314
Dentro de los grupos	7415.64741	52	142.608604		
Total	7590.96759	53			

$F_0 = 1.229 < 4.026$. Se acepta la hipótesis nula. No hay diferencia en el % de viabilidad celular al agregar diferentes concentraciones de proteína de las enzimas recombinantes.

ANOVA del factor temperatura

Se realizó un análisis de varianza para evaluar la degradación de biopelícula con las enzimas recombinantes para determinar si hay diferencia significativa en el % de viabilidad celular en respuesta a diferentes cantidades de enzima. Se probaron 3 temperaturas diferentes: 4°C, 22°C y 37°C. Como hipótesis tenemos:

H_0 : No hay diferencia en el % de viabilidad celular a diferentes temperaturas.

H_A : Hay diferencia en el % de viabilidad celular a diferentes temperaturas.

Tabla 24. ANOVA del factor temperatura para la enzima AMI 123

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	2280.08926	2	1140.04463	16.9073674	3.17879929

Dentro de los grupos	3438.87222	51	67.4288671		
Total	5718.96148	53			

$F_0 = 16.907 > 3.178$. Se rechaza la hipótesis nula. Hay diferencia en el % de viabilidad celular a diferentes temperaturas.

Tabla 25. ANOVA del factor temperatura para la enzima GLU 32

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	1431.36926	2	715.68463	5.92569745	3.17879929
Dentro de los grupos	6159.59833	51	120.776438		
Total	7590.96759	53			

$F_0 = 5.925 > 3.178$. Se rechaza la hipótesis nula. Hay diferencia en el % de viabilidad celular a diferentes temperaturas.

ANOVA del factor tiempo de exposición

Se realizó un análisis de varianza para evaluar la degradación de biopelícula con las enzimas recombinantes para determinar si hay diferencia significativa en el % de viabilidad celular en respuesta a diferentes tiempos de exposición. Se probaron 3 tiempos diferentes: 1h, 2h y 4h. Como hipótesis tenemos:

H_0 : No hay diferencia en el % de viabilidad celular a diferentes tiempos de exposición.

H_A : Hay diferencia en el % de viabilidad celular a diferentes tiempos de exposición.

Tabla 26. ANOVA del factor tiempo de exposición para la enzima AMI 123

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	2587.56148	2	1293.78074	21.0713476	3.17879929
Dentro de los grupos	3131.4	51	61.4		
Total	5718.96148	53			

$F_0 = 21.071 > 3.178$. Se rechaza la hipótesis nula. Hay diferencia en el % de viabilidad celular a diferentes tiempos.

Tabla 27. ANOVA del factor tiempo de exposición para la enzima GLU 32

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	4754.93815	2	2377.46907	42.7537602	3.17879929
Dentro de los grupos	2836.02944	51	55.6084205		
Total	7590.96759	53			

$F_0 = 42.753 > 3.178$. Se rechaza la hipótesis nula. Hay diferencia en el % de viabilidad celular a diferentes tiempos.

*En aquellos factores que hubo diferencia significativa, se realizó una prueba de Tukey para determinar cual variable era la diferente (en las gráficas de resultados se señala con letras).

11.7 Tratamiento enzimático evaluando la influencia de todos los parámetros

Posteriormente se analizaron los 3 factores mencionados anteriormente en combinación para observar su comportamiento, a continuación, se muestra un ejemplo del análisis de varianza de 2 niveles que se realizó para las posteriores gráficas de las enzimas recombinantes y comerciales que se utilizaron.

ANOVA del factor concentración de proteína y temperatura

Se realizó un análisis de varianza para evaluar la degradación de biopelícula con las enzimas recombinantes para determinar si hay diferencia significativa en el % de viabilidad celular en respuesta a diferentes cantidades de enzima respecto a la temperatura del tratamiento. Se probaron 2 concentraciones de enzima diferentes: 100 ug/mL y 200 ug/mL, en cuanto a las temperaturas se evaluaron a 4, 22 y 37°C. Como hipótesis tenemos:

H₀: No hay diferencia en el % de viabilidad celular al agregar diferentes concentraciones de proteína de enzima a distintas temperaturas de tratamiento.

H_A: Hay diferencia en el % de viabilidad celular al agregar diferentes concentraciones de proteína de enzima a distintas temperaturas de tratamiento.

Tabla 28. ANOVA de los factores concentración de enzima y temperatura para AMI 123

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Concentración de proteína	0.0022	1	0.0022	0.0086	4.74
Temperatura	365.5811	2	710.6328	710.63	3.88
Interacción	14.3477	2	7.1738	27.88	3.88
Dentro del grupo	3.0866	12	0.2572		
Total	383.0178	17			

Respecto a la concentración de proteína:

$F_0 = 0.0086 < 4.74$. Se acepta la hipótesis nula. No hay diferencia en el % de viabilidad celular al agregar diferentes concentraciones de proteína de las enzimas recombinantes.

Respecto a la temperatura:

$F_0 = 710.63 < 3.88$. Se rechaza la hipótesis nula. Hay diferencia en el % de viabilidad celular a diferentes temperaturas.

Respecto a la interacción entre los factores:

$F_0 = 27.88 < 3.88$. Se rechaza la hipótesis nula. Al menos una combinación concentración-temperatura tiene diferencia en cuanto a su % de viabilidad celular.

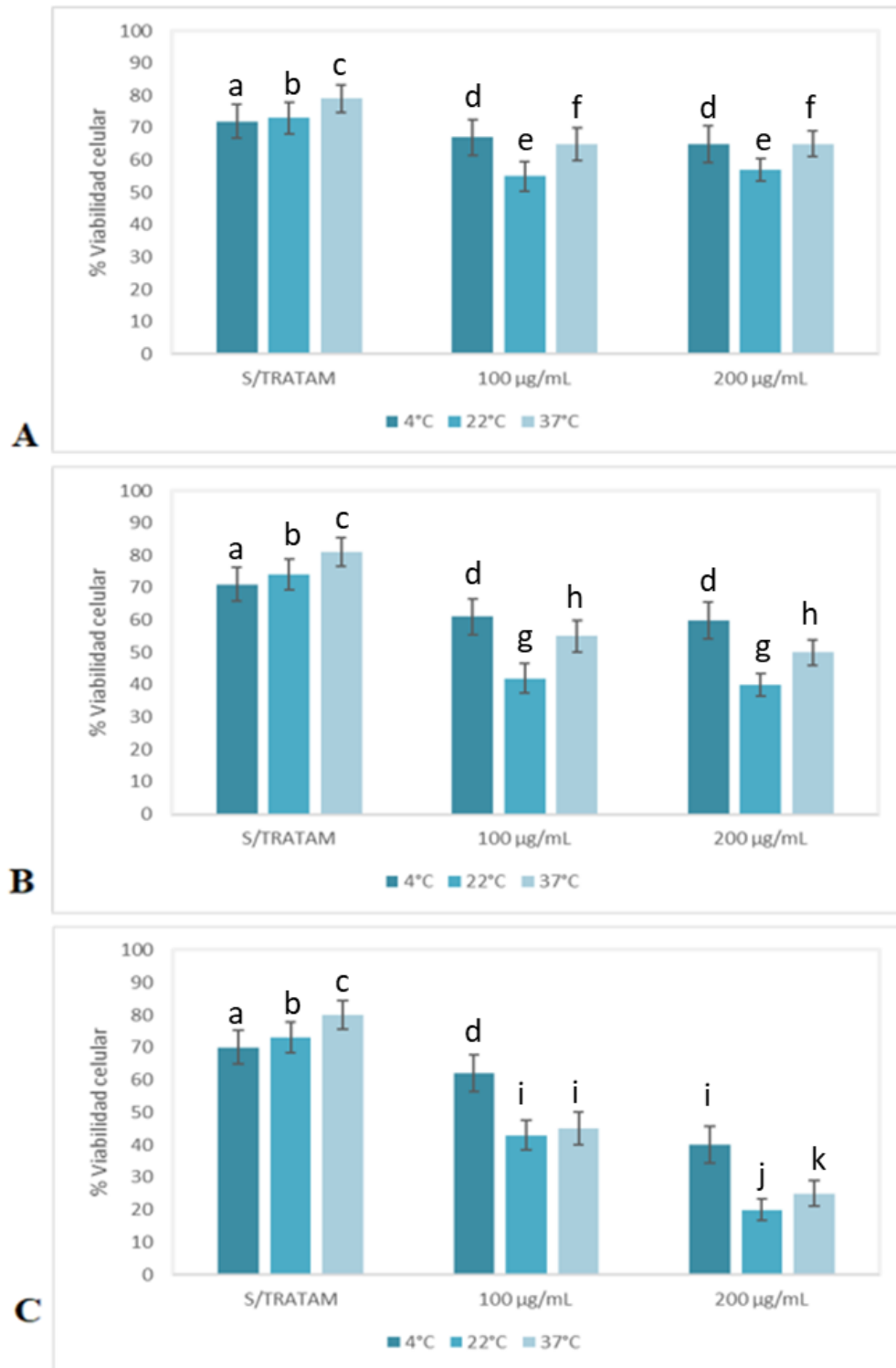


Figura S18. Influencia de la temperatura, concentración de proteína y tiempo de exposición en la reducción de viabilidad celular en la biopelícula de *L. innocua* provocada por el tratamiento enzimático con AMI 123. Duración del tratamiento enzimático A. 1 h, B. 2 h y C. 4 h. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significancia: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significancia.

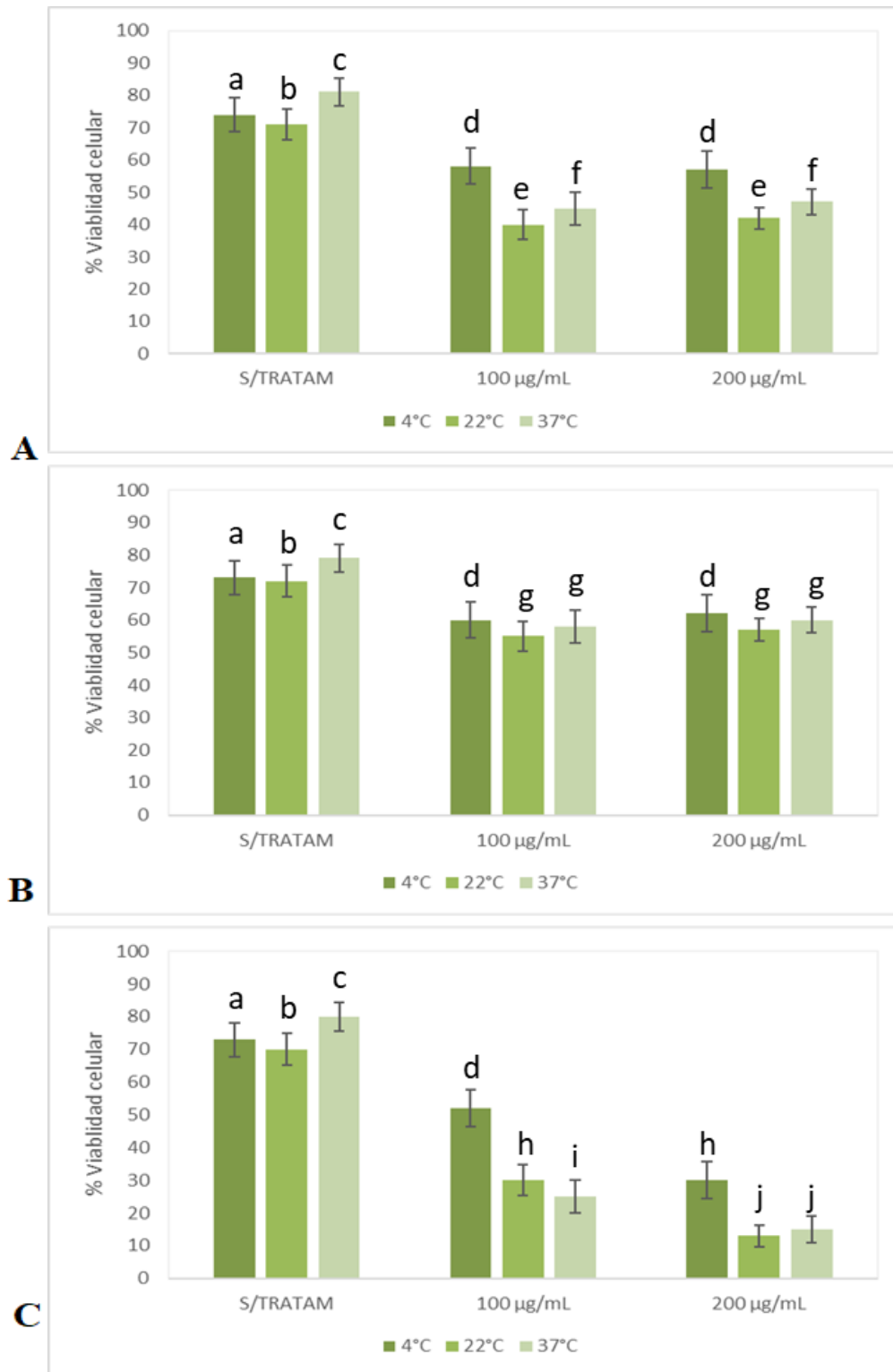


Figura S19. Influencia de la temperatura, concentración de proteína y tiempo de exposición en la reducción de viabilidad celular en la biopelícula de *L. innocua* provocada por el tratamiento enzimático con GLU 32. Duración del tratamiento enzimático A. 1 h, B. 2 h y C. 4 h. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significancia: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significancia.

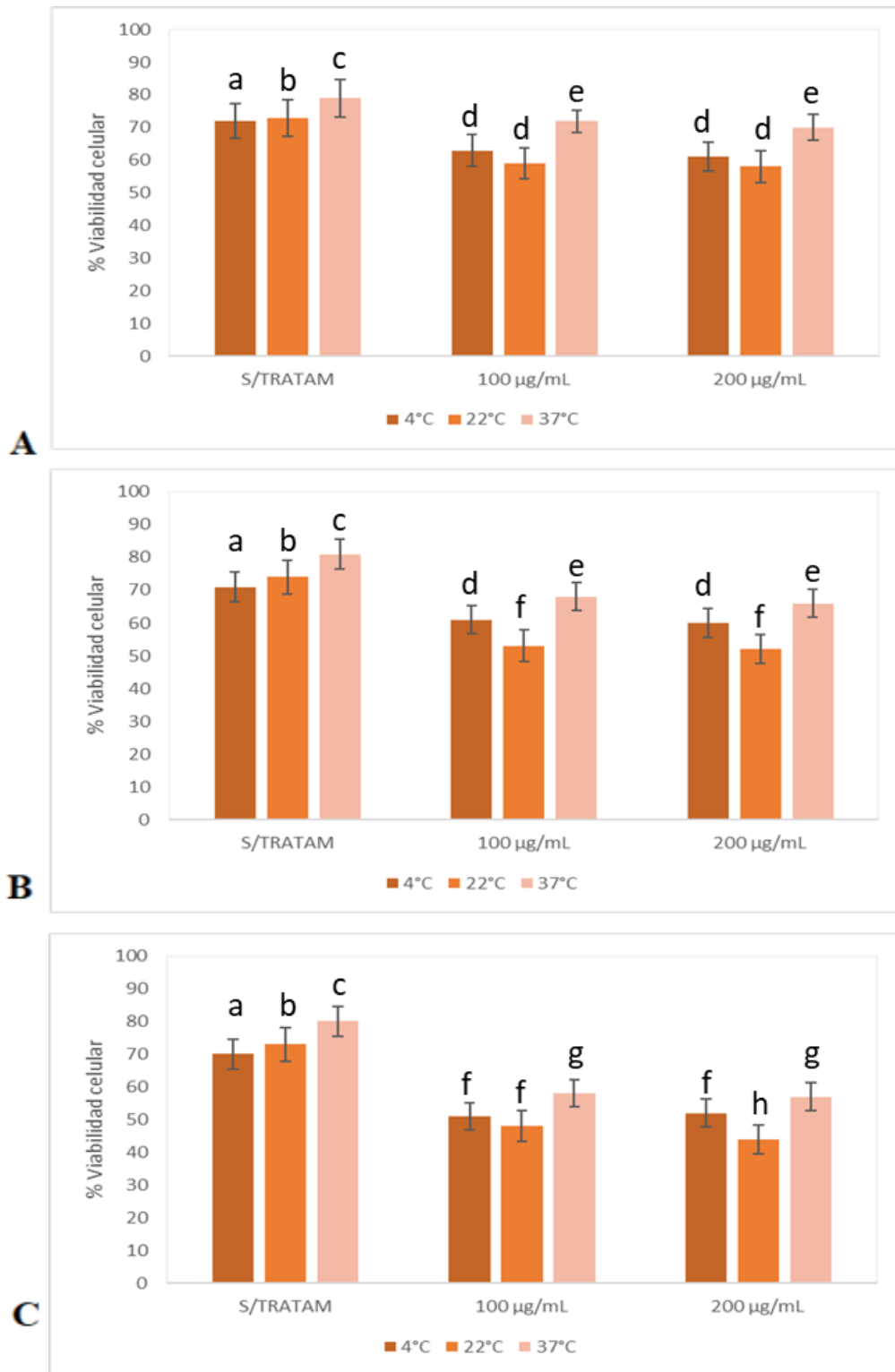


Figura S20. Influencia de la temperatura, concentración de proteína y tiempo de exposición en la reducción de viabilidad celular en la biopelícula de *L. innocua* provocada por el tratamiento enzimático con Lisozima. Duración del tratamiento enzimático A. 1 h, B. 2 h y C. 4 h. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significancia: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significancia.

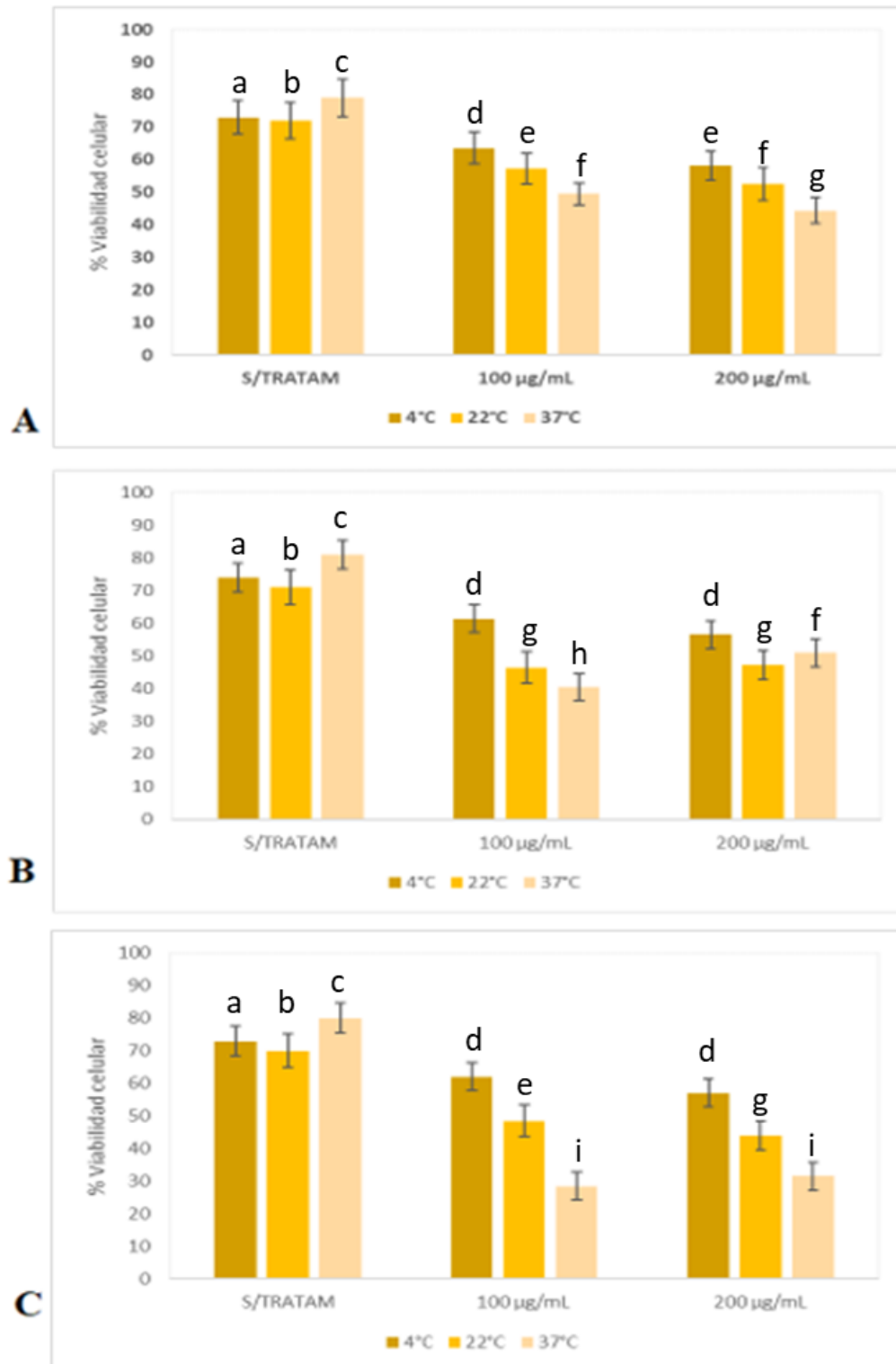


Figura S21. Influencia de la temperatura, concentración de proteína y tiempo de exposición en la reducción de viabilidad celular en la biopelícula de *L. innocua* provocada por el tratamiento enzimático con Proteínasa K. Duración del tratamiento enzimático A. 1 h, B. 2 h y C. 4 h. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significancia: letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos comparados, letras idénticas, ausencia de significancia.

11.8 Tratamiento enzimático con mayor reducción de viabilidad celular

Enzimas recombinantes

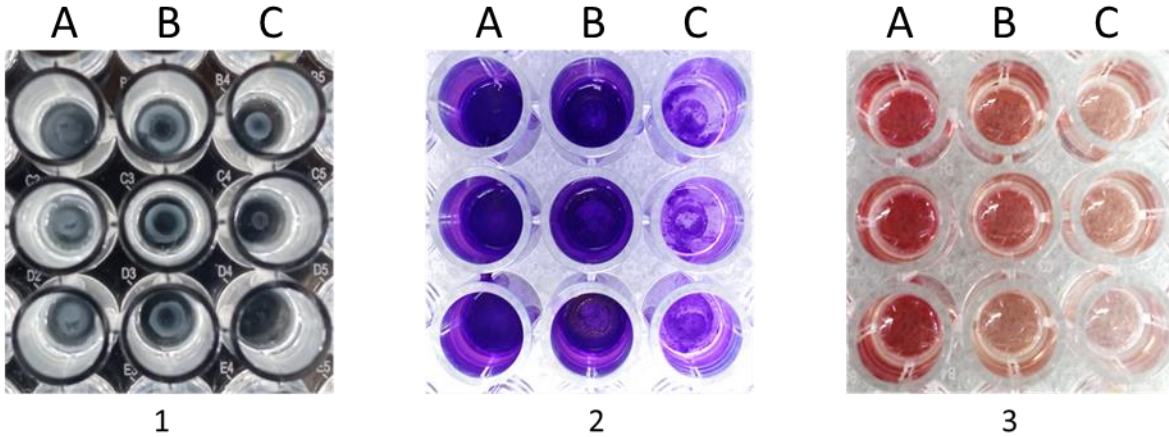


Figura S22. Evaluación del tratamiento enzimático con AMI 123 por 4h a 22°C contra la biopelícula de *L. innocua*. Se presenta la 1. Biopelícula sin teñir. 2. Cuantificación de la biomasa total mediante la tinción con cristal violeta y 3. Determinación de viabilidad celular de acuerdo a la formación de MTT. Carriles A. Biopelícula sin tratamiento enzimático, B. 100 µg/mL de la enzima recombinante y C. 100 µg/mL de la enzima recombinante.

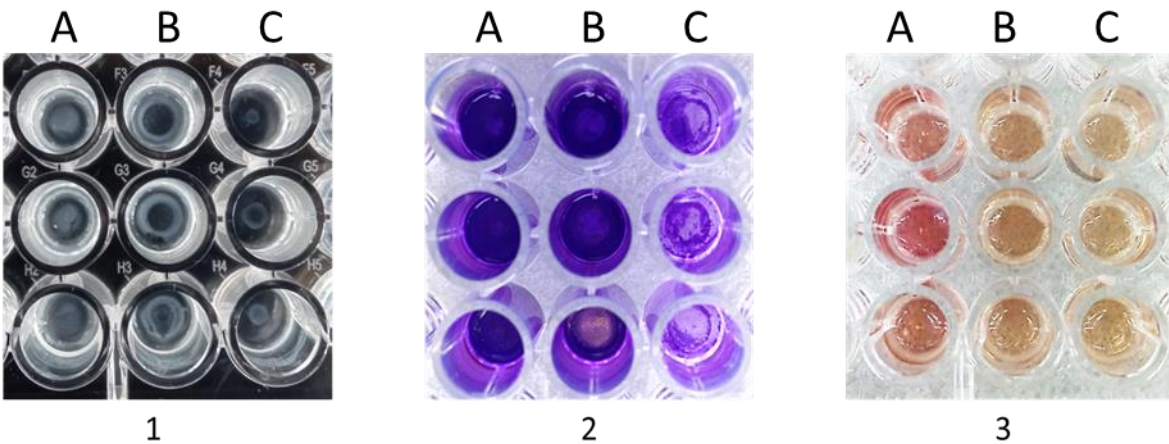


Figura S23. Evaluación del tratamiento enzimático con GLU 32 por 4h a 22°C contra la biopelícula de *L. innocua*. Se presenta la 1. Biopelícula sin teñir. 2. Cuantificación de la biomasa total mediante la tinción con cristal violeta y 3. Determinación de viabilidad celular de acuerdo a la formación de MTT. Carriles A. Biopelícula sin tratamiento enzimático, B. 100 µg/mL de la enzima recombinante y C. 100 µg/mL de la enzima recombinante.

Enzimas comerciales

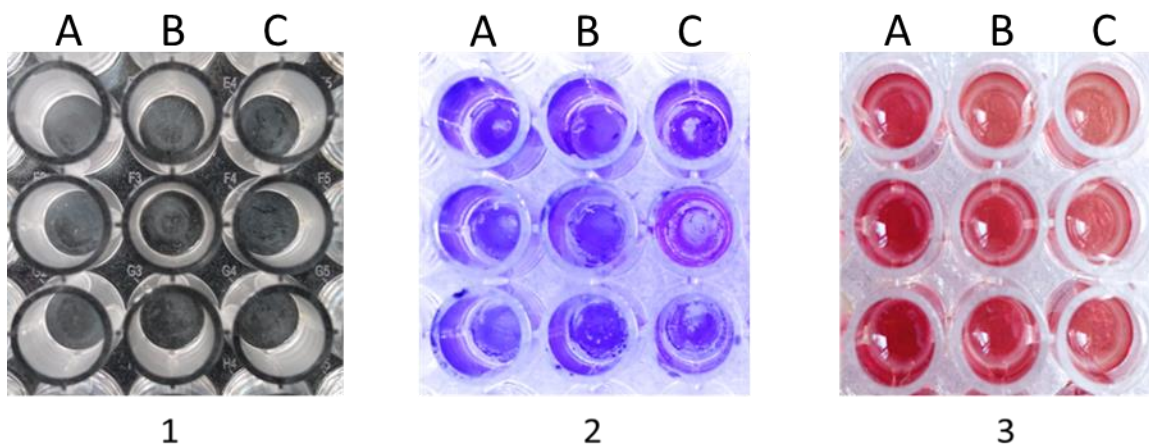


Figura S24. Evaluación del tratamiento enzimático con Lisozima por 4h a 22°C contra la biopelícula de *L. innocua*. Se presenta la 1. Biopelícula sin teñir. 2. Cuantificación de la biomasa total mediante la tinción con cristal violeta y 3. Determinación de viabilidad celular de acuerdo a la formación de MTT. Carriles A. Biopelícula sin tratamiento enzimático, B. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la enzima recombinante y C. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la enzima recombinante.

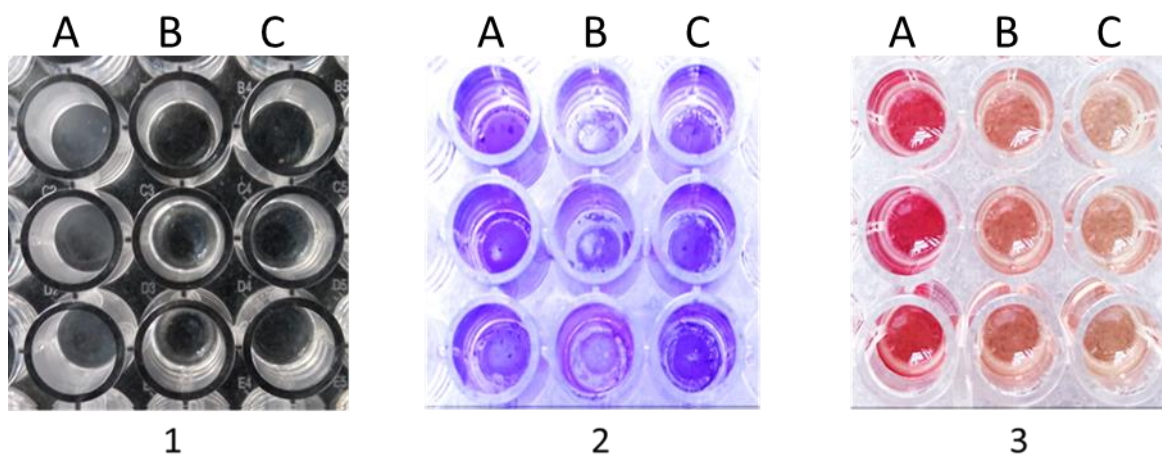


Figura S25. Evaluación del tratamiento enzimático con Proteinasa K por 4h a 22°C contra la biopelícula de *L. innocua*. Se presenta la 1. Biopelícula sin teñir. 2. Cuantificación de la biomasa total mediante la tinción con cristal violeta y 3. Determinación de viabilidad celular de acuerdo a la formación de MTT. Carriles A. Biopelícula sin tratamiento enzimático, B. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la enzima recombinante y C. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la enzima recombinante.