



**Somos calidad,  
somos USC**

**Evaluación de la actividad antimicrobiana de péptidos obtenidos a partir de la hidrolisis enzimática de la albumina**

**Autores**

**Maria Jose Buitrago Carabali  
Angie Melissa Méndez Lopez**

**Título por el que opta  
Microbiólogo (a)**

**Director**

**Jose Fernando Oñate Garzón  
MSc, PhD**

**Grupo de Investigación**

**Grupo de Investigación en Química y Biotecnología (QUIBIO)**

**Línea de Investigación**

**Desarrollos Tecnológicos y Biotecnológicos**

**Facultad de Ciencias Básicas**

**Microbiología**

**Universidad Santiago de Cali**

**Santiago de Cali - Colombia**

**2026**

## IMPACTOS

Relacione el (los) impacto(s) que presentó el Trabajo de Grado

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico		
Responsabilidad social		
Científico	Generar compuestos peptídicos a través de la hidrólisis enzimática de la albumina y determinar su potencial de actividad antimicrobiana	Universidades, comunidad científica, estudiantes de microbiología
Indicadores de Gestión	Desarrollo del informe de tesis como producto académico, utilizado posteriormente como base para un artículo científico	Programa académico, grupos de investigación
Tecnológico		
Técnico		
Ambiental		
Social		
Cultural		

# EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PÉPTIDOS OBTENIDOS A PARTIR DE LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LA ALBUMINA

Maria Jose Buitrago Carabali<sup>1</sup> , Angie Melissa Méndez López<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>estudiantes de Microbiología, Email: maria.buitrago06@usc.edu.co<sup>1</sup>, Email: angie.mendez00@usc.edu.co<sup>2</sup>, Grupo de Investigación de la USC QUIBIO. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Santiago de Cali. Campus Pampalinda calle 5# 62-00. Santiago de Cali. Colombia

## RESUMEN

La creciente resistencia a los antimicrobianos, exacerbada por el uso inadecuado de antibióticos, plantea una grave amenaza para la salud pública global, con millones de infecciones y miles de muertes anuales atribuibles a bacterias resistentes como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En este contexto, los péptidos bioactivos derivados de la hidrólisis de proteínas como la albumina emergen como prometedoras alternativas terapéuticas, gracias a sus propiedades antimicrobianas y su baja propensión a inducir resistencia. Este estudio propone investigar la actividad antimicrobiana de los péptidos obtenidos mediante hidrólisis enzimática de la albumina con proteasa V8 de *Staphylococcus aureus*, explorando su potencial como agentes antimicrobianos. Al optimizar procesos naturales como la hidrólisis enzimática, se busca no solo contribuir a la lucha contra la resistencia antimicrobiana, sino también promover prácticas sostenibles y económicas en la producción de nuevos agentes antimicrobianos.

**Palabras clave:** *Hidrolisis; proteasa; actividad antimicrobiana; albumina.*

## EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PEPTIDES OBTAINED FROM THE ENZYMATIC HYDROLYSIS OF ALBUMIN

### ABSTRACT

Growing antimicrobial resistance, exacerbated by inappropriate antibiotic use, poses a serious threat to global public health, with millions of infections and thousands of deaths annually attributable to resistant bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. In this context, bioactive peptides derived from the hydrolysis of proteins such as albumin emerge as promising therapeutic alternatives, thanks to their antimicrobial properties and low propensity to induce resistance. This study proposes to investigate the antimicrobial activity of peptides obtained by enzymatic hydrolysis of albumin with Staphylococcal V8 protease, exploring their potential as antimicrobial agents. By optimizing natural processes such as enzymatic hydrolysis, we seek not only to contribute to the fight against antimicrobial resistance, but also to promote sustainable and economical practices in the production of new antimicrobial agents.

**Keywords:** *Hydrolysis; protease; antimicrobial activity; albumin.*

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, los antibióticos han representado uno de los pilares fundamentales para la prevención y tratamiento de infecciones microbianas, salvando millones de vidas a nivel mundial. Sin embargo, el uso inadecuado y prolongado de estos fármacos ha favorecido la emergencia y propagación de bacterias resistentes, fenómeno que la Organización Mundial de la Salud reconoce como una de las principales amenazas para la salud pública global. Se estima que en 2019 las infecciones bacterianas estuvieron asociadas a 7,7 millones de muertes, siendo *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* responsables de una proporción significativa de los casos, con más de 1,1 millones de muertes atribuibles a *S. aureus* [1] [2] [3]

La resistencia antimicrobiana no solo incrementa la mortalidad y la morbilidad, sino que también genera un alto impacto económico debido al aumento en la duración de las hospitalizaciones y los tratamientos más costosos y prolongados [4]. En este contexto, se hace necesaria la búsqueda de alternativas eficaces, seguras y sostenibles que puedan complementar o sustituir a los antibióticos convencionales.

En los últimos años, se ha incrementado el interés por los péptidos antimicrobianos (AMPs), los cuales son secuencias cortas de aminoácidos capaces de desestabilizar membranas bacterianas, inhibir procesos metabólicos esenciales lo que les permite combatir infecciones de manera efectiva. Estos compuestos pueden obtenerse a partir de proteínas de origen natural ya sea animal o vegetal y se activan tras procesos como la hidrólisis enzimática, un proceso que consiste en la ruptura de enlaces peptídicos a través de enzimas específicas permite liberar fragmentos bioactivos, estos a diferencia de la síntesis química, preserva aminoácidos sensibles y reduce la formación de subproductos secundarios indeseados [5] [6].

Dentro de las proteínas de interés alimentarias y biotecnológicas, la albúmina sérica bovina (BSA) se considera una fuente versátil para la obtención de péptidos bioactivos, debido a su alta disponibilidad, estabilidad estructural y riqueza en aminoácidos como el aspártico y el glutámico. La BSA es una proteína globular de aproximadamente 66 kDa compuesta por 583 aminoácidos, presenta una alta solubilidad y estabilidad térmica, características que facilitan su manipulación experimental. Además, su composición rica en aminoácidos polares y cargados, la convierten en un sustrato adecuado para procesos de hidrólisis enzimática orientados a la generación de péptidos con potencial antimicrobiano [7] [8]. Algunos estudios han demostrado que la hidrólisis de la albúmina genera péptidos con propiedades antimicrobianas y antioxidantes, incrementando su relevancia como insumo biotecnológico para la industria farmacéutica [9] [10]

La proteasa V8, también conocida como endoproteinasa Glu-C, producida por *Staphylococcus aureus*, constituye una herramienta clave en este proceso. Su alta especificidad para hidrolizar enlaces peptídicos en residuos de ácido glutámico y aspártico favorece la generación de péptidos definidos y funcionales, lo que permite mayor control sobre la producción y un mejor aprovechamiento de la ovoalbúmina como fuente proteica [11] [12].

En este marco, el presente estudio propone evaluar la actividad antimicrobiana de los péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática de la albúmina sérica bovina empleando proteasa V8, analizando su eficacia frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, se busca optimizar las condiciones del proceso de hidrólisis para favorecer la producción de péptidos bioactivos, contribuyendo así a la generación de nuevo conocimiento científico y a la exploración de alternativas naturales y sostenibles frente al desafío global de la resistencia antimicrobiana.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Obtención de la enzima y proteína

La proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* (endoproteinasa Glu-C) en forma liofilizada y la albúmina sérica bovina (BSA) se obtuvieron de la compañía Sigma-Aldrich. La proteasa V8 se reconstituyó en buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7,8) para obtener una concentración final de 0,2 mg/mL.

## 2.2. Cuantificación de proteína por método BCA

La cuantificación de la proteína se realizará mediante el método de ácido bicinonínico (BCA), siguiendo el protocolo del proveedor del reactivo SIGMA-ALDRICH. Para esto se realizará una curva de calibración a partir de concentraciones conocidas de Seroalbúmina Bovina (BSA). Para la curva de calibración se preparará el BSA en diferentes concentraciones (2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL y 0,10 mg/mL). Posteriormente se tomarán 6 tubos eppendorf y a cada uno se le agregara 1 mL de BCA preparado en una relación 1:50 del reactivo A con el reactivo B y 10 mL de las diferentes muestras de la proteína de BSA, los tubos se llevarán a incubar 30 minutos a 37 °C, para posteriormente determinar la absorbancia en el espectrofotómetro a 562nm [13].

## 2.3. Hidrólisis enzimática de proteína de la albumina

Para la hidrólisis enzimática de la albumina se realizarán relaciones 1:10 y 1:50 de enzima-proteína, partiendo de las concentraciones obtenidas en la curva de calibración, para realizar la mezcla de las soluciones en 1mL. Estas muestras se prepararán en tubos falcom de 15 mL, asimismo, se preparará un control con las mismas relaciones de agua-proteína. Los cuatro tubos de ensayo se incubarán en un Multi-Therm (Benchmark) a 37 °C durante 2 horas. Pasado el tiempo, la reacción se deberá detener mediante inactivación térmica (tratamiento de calor y frío), luego, se llevarán a un proceso de centrifugación a 10.000 rpm a 4 °C durante 15 minutos en una centrifugadora refrigerada y posteriormente a un proceso de ultrafiltrado para cada tubo de ensayo, finalmente, se recupera el sobrenadante de cada muestra y se almacenara a -20 °C para su posterior análisis.

## 2.4. Determinación del grado de hidrolisis (DH)

El grado de hidrolisis se determinó siguiendo la metodología de Holey y Merrit [14], con algunas modificaciones. La base de este método es medir la relación de proteínas solubles en la solución blanco con respecto a todas las proteínas de la muestra. Después de detener la hidrólisis enzimática por inactivación térmica y realizar la cuantificación de los péptidos obtenidos, se calculó el DH mediante la ecuación,

$$DH\% = \frac{(PS2 - PS1)}{PS\ total} \times 100$$

en donde PS2 es la cantidad de proteína soluble en la solución después de la hidrolisis enzimática; PS1 es la cantidad de proteína soluble en la solución antes de la hidrolisis enzimática (blanco); y PS total es la cantidad total de proteína en la muestra.

## 2.5. Análisis in silico de péptidos derivados de la hidrólisis

Los péptidos generados por hidrólisis enzimática fueron analizados mediante el predictor de péptidos antimicrobianos APD6 (University of Nebraska Medical Center), el cual estima la probabilidad de actividad antimicrobiana basada en características estructurales y fisicoquímicas. Se evaluaron las secuencias con longitud entre 8 y 30 aminoácidos, derivadas de los cortes teóricos de la albúmina por proteasa V8 bajo condiciones en buffer Tris.

## 2.6. Actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. aureus*.

La prueba de actividad antimicrobiana se realizará de acuerdo con el protocolo del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) con algunas modificaciones. Las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922 se inocularán en agar nutritivo y se incubarán por 18-24 horas a 37 °C. posteriormente se realizará un estándar de MacFarland a 0.5 para ambas cepas aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/ml, estas deberán tener una O.D. de 0.08 a 0.1 a una longitud de onda de 625 nm. Luego, se deberá diluir 10  $\mu$ L del inóculo en 9990  $\mu$ L de Caldo Müeller Hinton (MHB) para obtener aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/ml. Luego, se tomarán 50  $\mu$ L de los cultivos bacterianos

y se incubarán con 50 µL de péptidos filtrados con concentraciones mayores y menores a 2 µL/mL para *E. coli* y concentraciones mayores y menores de 0,5 µL/mL para *S. aureus*, durante 20-24 horas a 37 °C. Como controles negativos se utilizará el medio MHB, buffer fosfato y ampicilina. Posteriormente a las 20 horas de Incubación a 37°C, se observará la turbidez de cada muestra en un plato de 96 pocillos, esto representará el crecimiento bacteriano en cada muestra, permitiendo analizar las concentraciones mínimas inhibitorias, evaluando la susceptibilidad antimicrobiana. [15]

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Cuantificación de proteína mediante el ensayo BCA

Se construyó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de 0–2000 µg/mL. Las absorbancias fueron registradas a 562 nm y se incrementaron de manera proporcional a la concentración del estándar. El análisis de regresión lineal produjo la siguiente ecuación:

$$y=0.00075x+0.1898$$

En donde y correspondió a la absorbancia a 562 nm y x a la concentración de proteína (µg/mL). Esta ecuación se empleó para calcular la concentración de proteína en las muestras sometidas a hidrólisis enzimática con proteasa V8.

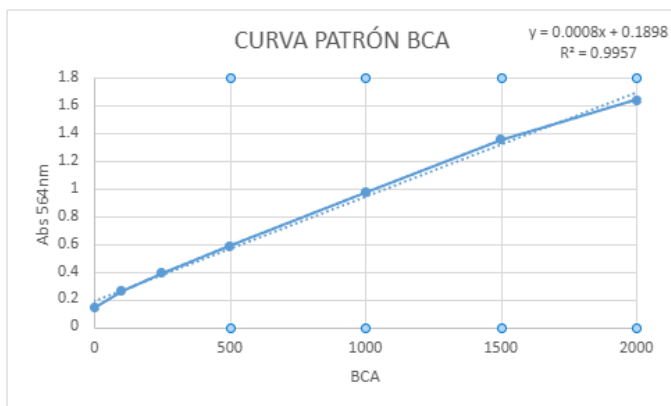


Figura 1. Curva de calibración obtenida mediante el ensayo BCA a 562 nm.

#### 3.2. Hidrólisis enzimática de proteína de la albumina

La hidrólisis enzimática de la albúmina se llevó a cabo bajo tres condiciones experimentales que variaron en la relación enzima:sustrato (E:S), la temperatura de incubación y el tiempo de reacción (Tabla 1). Todas las reacciones se realizaron en tampón Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0 ± 0,2) y se mantuvieron en agitación constante durante el periodo establecido. Al finalizar el tiempo de reacción, las muestras fueron sometidas a inactivación térmica (tratamiento de calor y frío) y posteriormente ultrafiltradas para separar los péptidos solubles del remanente proteico no hidrolizado, cada condición se evaluó en una única corrida (sin réplicas biológicas).

En las condiciones A y C (35 °C y 50 °C respectivamente), se observó una baja o nula liberación de péptidos, evidenciada por la ausencia de turbidez en la mezcla después de la incubación, lo cual sugiere una actividad enzimática limitada o ineficiente a dichas temperaturas. Por otro lado, la condición B (37 °C) mostró una hidrólisis más evidente, caracterizada por una mayor turbidez en la mezcla.

Tabla 1. Condiciones experimentales de la hidrólisis

CONDICIÓN	RELACIÓN (E: S)	TEMPERATURA (°C)	pH	TIEMPO DE REACCIÓN (h)
A	1:10	35	8 +/-0.2	3
Control A	1:10 Agua-proteína	35	8 +/-0.2	3
B	1:10	37	8 +/-0.2	3
Control B	1:10 Agua-proteína	37	8 +/-0.2	3
C	1:50	50	8 +/-0.2	4
Control C	1:50 Agua-proteína	50	8 +/-0.2	4

### 3.3. Determinación del grado de hidrólisis (DH)

El grado de hidrólisis (%DH) se determinó para las tres condiciones experimentales empleadas. En la condición A y C no se registraron valores apreciables de hidrólisis, lo cual coincidió con la ausencia de coloración durante la cuantificación. Estas observaciones indicaron que la liberación de péptidos fue mínima o inexistente bajo dichas condiciones.

Por el contrario, la condición B presentó un grado de hidrólisis del 11,9 %, evidenciado por la presencia de una ligera coloración morada durante la cuantificación, lo que confirmó una mayor liberación de péptidos solubles en comparación con las otras condiciones.

En conjunto, los resultados demostraron que la hidrólisis enzimática de la albúmina dependió de manera significativa de la temperatura, siendo la condición a 37°C la que permitió una hidrólisis más eficiente.

### 3.4. Análisis in silico de péptidos derivados de la hidrólisis

El análisis bioinformático de los péptidos obtenidos tras la hidrólisis enzimática de la albúmina con proteasa V8 permitió identificar un conjunto de 34 péptidos con longitudes entre 8 y 25 aminoácidos, pesos moleculares comprendidos entre 889 y 2880 Da, y valores de GRAVY que oscilaron entre 1.26 y 0.78, indicando una diversidad estructural que abarca desde péptidos hidrofílicos hasta altamente hidrofóbicos.

En cuanto a la carga neta, se observó una proporción considerable de péptidos catiónicos, los cuales podrían presentar potencial antimicrobiano, ya que la carga positiva favorece la interacción electrostática con las membranas bacterianas. Por otro lado, los péptidos con mayor hidrofobicidad podrían facilitar la inserción en la bicapa lipídica, propiedad característica de péptidos con actividad antimicrobiana

### 3.5. Actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. aureus*.

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó únicamente con el péptido obtenido en la condición B, correspondiente al único tratamiento que presentó evidencia de hidrólisis. El ensayo se llevó a cabo mediante la técnica de microdilución en placa de 96 pocillos, empleando concentraciones comprendidas hasta 54 µg/mL.

No se observó una inhibición completa del crecimiento microbiano en ninguno de los microorganismos evaluados. Sin embargo, en *Escherichia coli* se evidenció una ligera reducción en la turbidez del medio en comparación con el control de crecimiento, lo que sugiere un efecto parcial sobre la proliferación bacteriana. Por otro lado, en *Staphylococcus aureus* se detectó cambios muy mínimos en la densidad celular, manteniéndose un crecimiento similar al control negativo (Imagen 1).



Imagen 1. Actividad antimicrobiana mediante microdilución péptidos Condición B

#### 4. DISCUSIÓN (O ANÁLISIS DE RESULTADOS)

En este estudio se buscó obtener péptidos bioactivos a partir de hidrolisis enzimática de la albumina sérica bovina (BSA) con proteasa v8 para evaluar su actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. A partir de los resultados obtenidos fue posible identificar las condiciones que favorecieron la liberación de péptidos, considerando tanto los aciertos experimentales como las limitaciones presentes en el diseño y desarrollo del estudio.

En primer lugar, la curva estándar del ensayo BCA construida con albumina sérica bovina (BSA) presento una buena correlación lineal ( $R^2 = 0,9957$ ) reflejando una relación consistente entre la concentración de proteína y la absorbancia dentro del rango analizado. Este tipo de respuestas es característico de métodos colorimétricos bien establecidos como el BCA, ampliamente utilizados en protocolos de cuantificación proteica por su sensibilidad y tolerancia a diferentes condiciones experimentales. [13] [7] [10].

Entre las condiciones evaluadas solo la condición B (37 °C, relación enzima:sustrato 1:10) permitió una liberación apreciable de péptidos alcanzando un grado de hidrolisis del 11,9% en cambio las condiciones A (35 °C) y C (50 °C) no mostraron signos claros de actividad enzimática esta variabilidad puede atribuirse a la sensibilidad de la proteasa V8 a los cambios de temperatura que puede afectar tanto su estabilidad estructural como la accesibilidad al sustrato [11]. La obtención de péptidos bioactivos ocurre bajo condiciones moderadas en donde se mantiene un equilibrio adecuado entre actividad enzimática y la integridad estructural del sustrato. [9] [8]. Estudios recientes indican que mantener temperaturas y proporciones enzima:sustrato adecuadas es clave para preservar la estabilidad de ambos favoreciendo la liberación controlada de péptidos con propiedades antimicrobianas y antioxidantes [6] [7] [10] [17].

Por otro lado, el análisis in silico de los péptidos obtenidos tras la hidrolisis enzimática permitió complementar los hallazgos experimentales, proporcionando una caracterización preliminar de sus propiedades fisicoquímicas y su potencial funcional. Se identificaron 34 péptidos con longitudes entre 8 y 25 aminoácidos, en rango relevante donde se encuentran péptidos bioactivos con actividad microbiana permitiendo una interacción eficaz con las membranas celulares bacterianas [17].

El análisis in silico mostro una diversidad que incluyo tanto péptidos hidrofílicos como hidrofóbicos, con valores entre 1.26 y 0.78, esta variabilidad es significativa pues la hidrofobicidad contribuye a la capacidad de los péptidos

para insertarse en bicapas lipídicas mientras que la presencia de residuos cargados favorece la atracción electrostática hacia las membranas bacterianas [9].

Respecto a la carga neta se observó una proporción considerable de péptidos con carga positiva frecuentemente asociada con propiedades antimicrobianas. Esta carga facilita la unión de bacterias Gram positivas como Gram negativas lo que puede conducir a la desestabilización de la membrana y a la inhibición del crecimiento microbiano [9], [17]. Las propiedades fisicoquímicas observadas en los péptidos derivados de la albúmina sugieren su potencial funcional siendo coherentes con parámetros que favorecen la actividad microbiana donde este análisis predictivo contribuye a la selección racional de los péptidos con potencial bioactivo para futuras pruebas funcionales, optimizando los recursos experimentales [18].

Finalmente, la evaluación de actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mostro un efecto inhibitorio observable únicamente en las muestras obtenidas bajo la condición B (37 °C), lo que coincide con los resultados del grado de hidrólisis y el análisis in silico. La eficacia parcial de los péptidos en inhibir el crecimiento resalta el potencial de la albúmina como fuente de compuestos bioactivos obtenidos mediante la hidrólisis controlada, no obstante el efecto inhibitorio observado fue leve evidenciando una ligera reducción en el crecimiento de *E.coli* y mínima en *S.aureus* estos resultados sugieren que aunque los péptidos derivados de la albumina (BSA) presentaron propiedades estructurales compatibles con la actividad antimicrobiana, donde las condiciones experimentales empleadas no fueron suficientes para generar una inhibición completa del crecimiento bacteriano [19].

La limitada actividad observada podría atribuirse a diversos factores. En primer lugar, la concentración utilizada (54 µg/ml) puede no haber alcanzado el umbral necesario para ejercer un efecto bactericida ya que estudios previos han demostrado que la eficacia depende de la pureza el tamaño y la estabilidad de los péptidos generados [20] [21]. Aunque las muestras fueron sometidas a un proceso de ultrafiltración es posible que la mezcla final tuviera fragmentos de baja actividad lo que atenuó la respuesta antimicrobiana.

Otro aspecto relevante es la naturaleza de las bacterias evaluadas *E.coli* al ser Gram negativa presenta una membrana externa rica en polisacáridos que actúa como barrera frente a moléculas hidrofóbicas, mientras que *S.aureus* aunque es Gram positiva posee una capa más gruesa de peptidoglicano que también dificulta la penetración de compuestos bioactivos [22]. Estas diferencias estructurales explicarían la variabilidad en la respuesta antimicrobiana observada.

Los resultados evidencian la importancia de optimizar las condiciones de hidrólisis enzimática para maximizar la liberación de péptidos bioactivos con potencial aplicación en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos y estrategias terapéuticas frente a bacterias resistentes. Entre las limitaciones del estudio se incluye la necesidad de evaluar la pureza y la estabilidad de los péptidos además de considerar la concentración de la proteasa V8 utilizada pudo no haber sido suficiente para generar la cantidad optima de fragmentos activos.

Se recomienda, en futuros trabajos explorar técnicas de purificación adicionales como cromatografía líquida de alta resolución con el fin de aislar péptidos con mayor actividad antimicrobiana asimismo sería adecuado ajustar la cantidad de enzima además de explorar distintas concentraciones y combinaciones de péptidos evaluando su eficacia frente a otros patógenos clínicamente relevantes. La implementación de estos métodos permitirá identificar fragmentos con mayor potencial terapéutico fortaleciendo el uso de la albumina sérica bovina como fuente de péptidos bioactivos y contribuyendo a alternativas para el desarrollo efectivas frente a la creciente resistencia bacteriana.

## 5. CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación muestran que la hidrólisis enzimática de albumina sérica bovina (BSA) utilizando proteasa V8 es un proceso altamente dependiente de las condiciones experimentales especialmente de la temperatura. De las tres condiciones evaluadas, solo la condición B (37 °C) permitió una mayor liberación de péptidos con propiedades fisicoquímicas y compatibles con la actividad antimicrobiana.

El comportamiento observado con la proteasa V8 resalta su sensibilidad a cambios térmicos, lo que destaca la necesidad de optimizar cuidadosamente los parámetros de hidrólisis para asegurar su funcionalidad. La obtención exitosa de péptidos bajo condiciones moderadas sugiere que la proteasa V8 puede ser útil en procesos controlados, pero requiere validación técnica más profunda para aplicaciones a mayor escala.

Por último, el análisis *in silico* permitió identificar péptidos con actividad antimicrobiana, evidenciando la capacidad de la hidrólisis enzimática para generar compuestos funcionales de interés biotecnológico. No obstante, la actividad experimental frente a *E. coli* y *S. aureus* fue limitada, lo cual sugiere que los péptidos obtenidos podrían requerir procesos adicionales de purificación o concentración para alcanzar niveles de inhibición más significativos. Se recomienda, para futuros estudios, optimizar las condiciones de hidrólisis, incorporar técnicas de fraccionamiento y caracterización estructural de los péptidos activos, así como ampliar el espectro de microorganismos evaluados para consolidar su aplicación en el campo farmacéutico.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Se agradece de manera especial a los laboratorios de microbiología e investigación de la Universidad Santiago de Cali, donde se llevaron a cabo todos los análisis experimentales de la presente investigación. De igual manera se reconoce la contribución del tutor del proyecto, José Fernando Oñate, por su constante orientación académica, asesoría técnica y la facilitación de los recursos necesarios para la ejecución de este estudio.

A nivel personal, Maria Jose expresa su profundo agradecimiento a sus padres, Maria Eugenia Carabali y Jose Elver Buitrago, por su amor incondicional, su guía y ejemplo de esfuerzo y perseverancia, pilares fundamentales durante todo este proceso. De igual manera, agradece a su pareja, David Vásquez, por su compañía, comprensión y por estar presente en cada momento de este proceso, por su constante motivación incluso en los momentos más difíciles. Y a su hermana, Jessica Buitrago, por su cariño y apoyo. A cada uno de ellos, gracias por creer en mí, por su apoyo inquebrantable y por ser parte fundamental de este logro.

A nivel personal, Melissa agradece profundamente a su padre José Rodrigo Mendez quien, aunque ya no se encuentra presente, continúa siendo una de sus mayores fuentes de inspiración y motivación. Reconoce asimismo el apoyo incondicional de su madre Monica Lopez que ha sido pilar fundamental y la fuerza que ha acompañado en cada etapa de este proceso. Extiende también su gratitud a su hermana Michelle Mendez por sus constantes palabras de aliento y cariño que siempre le brinda, así como a su pareja Jhon Edwar Quintero por su apoyo y compañía en este proceso.

Finalmente, agradecemos a todas las personas que, de manera directa o indirecta, aportaron con su conocimiento, tiempo o energía al desarrollo de este proyecto, y que hicieron de este proceso una experiencia de crecimiento personal y profesional.

Por último, se declara que no existe conflicto de intereses entre los autores en relación con el desarrollo y los resultados de esta investigación.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] C. Dall, "Report highlights the deadly impact of bacterial infections". *CIDRAP*. Noviembre 2022. (En línea). Disponible en: <https://www.cidrap.umn.edu/antimicrobial-stewardship/report-highlights-deadly-impact-bacterial-infections>

[2] Organización Mundial de la Salud [OMS], "Los alimentos contaminados cuestan 420.000 vidas y 95.000 millones de dólares en pérdidas al año", *Naciones Unidas Noticias* (7, junio 2022). (en línea). Disponible en: <https://news.un.org/es/story/2022/06/1509842>

[3] Y. Gu, K. Hayakawa, A. Hirabayashi, T. Kajihara, S. Less, N. Matsunaga, N. Ohmagari, K. Shibayama, M. Sugai, S. Tsuzuki, y K. Yahara, "National trend of blood-stream infection attributable deaths caused by

Staphylococcus aureus and Escherichia coli in Japan”, *Journal of Infection and Chemotherapy*, Vol. 26, No. 4, Abril 2020. [https://www.jiac-j.com/article/S1341-321X\(19\)30335-6/fulltext](https://www.jiac-j.com/article/S1341-321X(19)30335-6/fulltext)

[4] I. Berger y Z. Loewy, "Antimicrobial Resistance and Novel Alternative Approaches to Conventional Antibiotics". *Antibiotics (MDPI)* Vol. 3, No. 3, pp. 171-182, julio 2024. <https://www.mdpi.com/2674-1334/3/3/12>

[5] S. Taheri-Araghi, "Synergistic action of antimicrobial peptides and antibiotics: current understanding and future directions", *Frontiers in Microbiology*, Vol. 15, Julio 2024. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2024.1390765/full>

[6] J. Ospina, "Valorización de proteínas vegetales mediante hidrólisis enzimática para la obtención de péptidos con propiedades funcionales y biológicas". (Tesis de Doctorado), Departamento de Ingeniería Química, (Universidad de Granada), 2023. <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/89184/89184.pdf?sequence=4&isAllowed=y>

[7] Y. Yang, Z. Pan, T. Yang, H. Yang, L. Li, y B. Li, "Effects of ultrasonic pretreatment on fibrillation kinetics, morphologies, and functional properties of bovine serum albumin fibrils", *Food Hydrocolloids*, Vol. 149, Abril 2024. <https://sciencedirect.proxyusc.elogim.com/science/article/pii/S0268005X23010664>

[8] Q.-Y. Zhang, Z.-B. Yan, Y.-M. Meng, X.-Y. Hong, G. Shao, J.-J. Ma, X.-R. Cheng, J. Liu, y J. Kang, "Antimicrobial peptides: Mechanism of action, activity and clinical potential", *Military Medical Research*, No. 48, septiembre 2021. <https://mmrjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40779-021-00343-2>

[9] R. Aminov, O. Franco, C. Fuente-Núñez, X. Ma, G. Wang, y J. Wang, "Editorial: Antimicrobial peptides and their druggability, bio-safety, stability, and resistance", *Frontiers in Microbiology*, Vol. 15, mayo 2024. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2024.1425952/full>

[10] M. León, M. Millán-Linares, S. Montserrat-De la Paz, y F. Rivero-Pino, "Antimicrobial plant-derived peptides obtained by enzymatic hydrolysis and fermentation as components to improve current food systems", *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 135, pp. 32-42, mayo 2023. [Antimicrobial plant-derived peptides obtained by enzymatic hydrolysis and fermentation as components to improve current food systems - ScienceDirect](https://doi.org/10.1016/j.tfs.2023.103422)

[11] Sigma-Aldrich Endoproteínase Glu-C (V8 Protease), 10791156001 [Ficha de producto]. [En línea]. Disponible en:

[https://www.sigmaaldrich.com/CO/en/product/roche/10791156001?srsId=AfmBOoqrjtREtsq\\_97IzoNcxj4pnKrkD4ITi1D4r\\_QqXFhnmWDdcSEJy](https://www.sigmaaldrich.com/CO/en/product/roche/10791156001?srsId=AfmBOoqrjtREtsq_97IzoNcxj4pnKrkD4ITi1D4r_QqXFhnmWDdcSEJy)

[12] D. Chaput, A. Frey, y C. Neil, "Insight into the human pathodegradome of the V8 protease from *Staphylococcus aureus*", *Cell Reports*, Vol. 35, No. 1, abril 2021. [https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(21\)00244-8?sf244733856=1](https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(21)00244-8?sf244733856=1)

[13] Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit Catalog Numbers: BCA1 AND B9643 [Ficha de producto]. (s.f.). *BCA Protein Assay Kit protocol*. Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/322/296/bca1bul.pdf?srsId=AfmBOoqYT6HFM1hzoXoCGzVO2FZ8Ti8zdUMtZpSgKPTeUWOsY0KTD9iU>

[14] N. Hoyle y J. Merrill, "Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*)", *Journal of Food Science*, vol. 59, enero 1994. <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1994.tb06901.x>

[15] D. González y V. Pilalonga, "Obtención de extractos peptídicos producidos por *Lactobacillus* spp aislados de la leche materna para la evaluación de la actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 Y *Listeria monocytogenes* ATCC BAA-751". (Tesis de pregrado, Universidad Santiago de Cali). Repositorio DSPACEUSC. (2021).

- [16] S. Garcia, A. Cournoyer, Z. Sánchez, y L. Bazinet, "Antimicrobial Peptides from Porcine Blood Cruor Hydrolysates as a Promising Source of Antifungal Activity", *MDPI*, Vol. 14, No. 1, diciembre 2024. <https://www.mdpi.com/2304-8158/14/1/8>
- [17] D. Arizmendi-Cotero, O. Dublán-García, L. Gómez, y G. López-García, "Antioxidant and Antimicrobial Peptides Derived from Food Proteins", *Molecules*, vol. 27, No. 4, febrero 2022. <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/4/1343>
- [18] M. Anahtar, S. Bhatia, C. Martin-Alonso, A. Soleimany, y C. Wang, "Protease Activity Analysis: A Toolkit for Analyzing Enzyme Activity Data", *ACS Omega*, Vol. 7, No. 28, julio 2022. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsomega.2c01559>
- [19] G. Gherardi, "*Staphylococcus aureus* Infection: Pathogenesis and Antimicrobial Resistance", *Molecular Sciences*, Vol. 24, No. 9, mayo 2023. <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/9/8182>
- [20] Z. Abbas, Z. Li, D. Si, Y. Tong, J. Wang, X. Wei, H. Zhang, J. Zhang, R. Zhang, y Y. Zhou, "Isolation, Characterization, and Functional Properties of Antioxidant Peptides from Mulberry Leaf Enzymatic Hydrolysates", *Antioxidants*, vol. 13, No. 7, julio 2024. <https://www.mdpi.com/2076-3921/13/7/854>
- [21] L. Yu, M. Chu, N. Liu, y Y. Sun, "Protein adsorption to poly (ethylenimine)-modified Sepharose FF: IX. Further studies on counterion effects and behavior in therapeutic protein separation", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1741, enero 2025. [Adsorción de proteínas a Sepharose FF modificada con poli\(etilenimina\): IX. Más estudios sobre los efectos y el comportamiento de los contraiones en la separación terapéutica de proteínas - ScienceDirect](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.319854)
- [22] C. Gallina, V. Santos, y K. Melchior, "*Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium", *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 10, diciembre 2020. <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2020.548492/full>