

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología - Microbiología

**Caracterización de la enzima α -glucosidasa de *Geobacillus*
kaustophilus expresado en *Escherichia coli***

TESIS

Presentada por:

Bach. Senayda Yulisandra Quispe Quispe

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA - PERÚ

2024

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS DE PREGRADO N° 423

En la ciudad de Tacna, en el Auditorium de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, siendo las 9:30 horas del día 21 de agosto del 2024, estando presente el Jurado Calificador nominado por Resolución de Facultad N°11014-2024-FACI/UNJBG, conformado por los siguientes docentes:

DRA. SOLEDAD AMPARO BORNÁS ACOSTA	PRESIDENTA
DRA. ANGELA VERÓNICA CHOQUE MIRANDA	SECRETARIA
DR. ROBERTO CASTELLANOS CABRERA	VOCAL

Acto seguido, se dio lectura a la Resolución correspondiente, y del mismo modo se dio lectura al Artículo 22 del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

A continuación, el Presidente del Jurado instó a la Bachiller SENAYDA YULISANDRA QUISPE QUISPE, a exponer la tesis titulada: "**Caracterización de la enzima α -glucosidasa de *Geobacillus kaustophilus* expresado en *Escherichia coli***" para optar el título profesional de Biólogo Microbiólogo.

Siendo las 10:20 horas la tesista concluye su exposición, luego se procedió a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del jurado calificador. Terminado este proceso, se invitó a que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo a reglamento. El promedio de la calificación dio el siguiente resultado: **Aprobado por Unanimidad**, con el calificativo de **sobresaliente, nota dieciocho (18)** de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Siendo las 11:00 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los señores miembros del jurado calificador, en señal de conformidad.



Dra. Soledad Amparo Bornás Acosta

PRESIDENTA



Dra. Angela Verónica Choque Miranda

SECRETARIA



Dr. Roberto Castellanos Cabrera

VOCAL

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Dr. Roberto Castellanos Cabrera, en mi condición de Asesor de tesis, declaro que la Bachiller Senayda Yulisandra Quispe Quispe (2018-118062), de la Escuela Profesional de Biología - Microbiología de la Facultad de Ciencias, quién sustento su trabajo de Tesis profesional: "**Caracterización de la enzima α -glucosidasa de *Geobacillus kaustophilus* expresado en *Escherichia coli***" para obtener el título profesional de BIÓLOGO MICROBIÓLOGO. Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y de similitud de trabajo de tesis profesional, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través de Software de similitud textual TURNITIN, cuenta con el nivel de similitud permitido cuyo porcentaje es 5 %, por lo que, CERTIFICO LA SIMILARIDAD del trabajo final de tesis profesional líneas arriba, la cual está expedita para continuar con los tramites para la obtención del titulo profesional, según corresponda consiguientemente la publicación en el repositorio Institucional.

Sin otro particular, me despido.

Atentamente.



ASESOR

Dr. Roberto Castellanos Cabrera
DNI: 00417795



TESISTA

Bach. Senayda Yulisandra Quispe Quispe
DNI: 77027464

DEDICATORIA

A mis padres, en especial a mi madre Virginia Salome Quispe Huaracallo, por ser una guerrera constante y enseñarme a como serlo también, por sus cuidados, consejos y ser mi mayor ejemplo de perseverancia y trabajo.

A mis hermanas y hermanos por su confianza, por su alegría, paciencia y por estar siempre ahí para escucharme y animarme.

A R.C.M y todos aquellos que han influido en mi vida, y han hecho posible este logro les dedico con profunda gratitud este trabajo, fruto de mi esfuerzo y dedicación.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar a Dios, nuestro creador por regalarme cada amanecer y permitirme culminar este trabajo y darrarmar en mi su bendición y protección cada día.

A mi asesor, Dr. Roberto Castellanos Cabrera, por su invaluable guía, sabiduría y por la confianza depositada en mí. Gracias por motivarme a alcanzar mi máximo potencial y ayudarme a convertirme en una investigadora competente.

A mi co-asesor, Dr. Alonso Poma Ticona, por su apoyo constante, sus valiosas sugerencias y por su enfoque crítico que me permitió mejorar mi trabajo de manera significativa. Gracias por su dedicación y ser un mentor excepcional.

A mis compañeros e investigadores del Laboratorio de Biotecnología Enzimática, Blgo. Heber Ramirez Arua, Blga. Julissa Naquiche Calero, Blga. Mirella Yllanes Huanacuni, Cristian Alave Rosas, Jean Quispe Mamani y Juan Lopez Villafuerte por su compañerismo, colaboración y por crear un ambiente de trabajo estimulante y enriquecedor. Gracias por compartir sus conocimientos y experiencias, por sus valiosas opiniones y su amistad.

Al proyecto de Investigación financiado por Fondos Canon, Sobre canon y Regalías Mineras : Aplicación de tecnología del ADN recombinante en la generación de cocteles enzimáticos para la biodegradación de residuo orgánico vegetal”, aprobado con la R.R. N° 11174-2023-UNJBG, ejecutado en el laboratorio de investigación de Biotecnología Enzimática.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.1 Antecedentes	2
1.2 Formulación del problema	6
1.3 Hipótesis	7
1.4 Justificación.....	7
1.5 Objetivos	9
1.5.1 <i>Objetivo general</i>	9
1.5.2 <i>Objetivos específicos</i>	9
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	10
2.1 Microorganismos termófilos.....	10
2.1.1 <i>Definición y características</i>	10
2.1.2 <i>Enzimas de bacterias termófilas</i>	11
2.1.3 <i>Importancia industrial</i>	12

2.2 <i>Geobacillus kaustophilus</i>	14
2.2.1 Clasificación taxonómica	14
2.2.2 Descripción general	15
2.2.3 Importancia industrial.....	15
2.3 Almidón	16
2.3.1 Estructura del almidón	17
2.3.2 Hidrólisis del almidón.....	19
2.4 Glicosidasas.....	23
2.4.1 La enzima α -glucosidasa	24
2.4.2 Clasificación de la enzima α -glucosidasa.....	25
2.4.3 Estructura de la enzima α -glucosidasa	27
2.4.4 Aplicaciones de la enzima α -glucosidasa.....	29
2.5 Purificación de enzimas.....	31
2.5.1 Cromatografía de afinidad a níquel (IMAC).....	31
2.5.2 Electroforesis de proteínas	32
2.6 Caracterización de enzimas	33
2.6.1 pH.....	34
2.6.2 Temperatura y termoestabilidad	35
2.6.3 Iones metálicos.....	35
2.6.4 Cinética enzimática.....	36
2.7 Expresión heteróloga de enzimas	38

2.7.1	<i>Sistemas de expresión génica</i>	40
2.7.2	<i>Expresión génica en bacterias</i>	40
2.7.3	<i>E. coli como sistema de expresión</i>	41
2.7.4	<i>Capacidad de E. coli para expresar enzimas</i>	41
2.7.5	<i>Sistemas de expresión de E. coli</i>	42
2.7.6	<i>Vectores de expresión</i>	47
2.8	<i>Enzimas recombinantes y su importancia</i>	50
2.8.1	<i>Aplicación de enzimas recombinantes</i>	51
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO		52
3.1	<i>Muestra biológica</i>	52
3.2	<i>Diseño de investigación</i>	52
3.3	<i>Materiales y equipos</i>	55
3.3.1	<i>Material biológico</i>	55
3.3.2	<i>Reactivos</i>	55
3.3.3	<i>Material de laboratorio</i>	56
3.3.4	<i>Equipos</i>	58
3.4	<i>Métodos</i>	59
3.4.1	<i>Producción de la enzima α-glucosidasa recombinante</i>	59
3.4.2	<i>Cuantificación de proteínas</i>	61
3.4.3	<i>Determinación de actividad enzimática</i>	61
3.4.4	<i>Purificación de la enzima α-glucosidasa recombinante</i>	62

3.4.5 Caracterización fisicoquímica de la enzima α -glucosidasa recombinante.....	64
3.4.6 Caracterización cinética.....	66
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	67
4.1 Producción de la enzima α -glucosidasa recombinante	67
4.2 Purificación de la enzima α -glucosidasa recombinante	67
4.2.1 Análisis por electroforesis en gel SDS-PAGE	68
4.3 Caracterización de la enzima α -glucosidasa	72
4.3.1 Efecto de la temperatura en la actividad de la enzima α -glucosidasa recombinante	72
4.3.2 Efecto del pH en la actividad de la enzima α -glucosidasa recombinante.....	76
4.3.3 Efecto de los iones metálicos en la actividad de la enzima α -glucosidasa recombinante	80
4.3.4 Termoestabilidad	86
4.3.5 Caracterización cinética.....	89
V. DISCUSIÓN	92
VI. CONCLUSIONES.....	110
VII. RECOMENDACIONES	111
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
ANEXOS	130

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunas cepas de <i>E. coli</i> empleadas comúnmente para la expresión de proteínas recombinantes	42
Tabla 2. Ejemplos de vectores plasmídicos empleados para la expresión recombinante en <i>E. coli</i>	49
Tabla 3. Valores de entrada en ANOVA para comparación de medias.....	54
Tabla 4. Proporciones para la medición de actividad enzimática de α -glucosidasa recombinada.....	62
Tabla 5. Evaluación de producción de la enzima α -glucosidasa recombinante.....	67
Tabla 6. Purificación por cromatografía de afinidad (IMAC).....	67
Tabla 7. Fases de purificación de la enzima α -glucosidasa recombinante.....	71
Tabla 8. Análisis de estadística descriptiva de los tratamientos de la actividad de α -glucosidasa recombinante frente a diferentes temperaturas	72
Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad enzimática de α -glucosidasa frente a diferentes temperaturas	73
Tabla 10. Prueba Tukey de medias de los tratamientos de actividad enzimática frente a diferentes temperaturas	74
Tabla 11. Análisis de estadística descriptiva de los tratamientos de la actividad de α -glucosidasa recombinante frente a la variación de pH	76

Tabla 12. Análisis de varianza de la actividad enzimática de α -glucosidasa frente a la variación de pH.....	77
Tabla 13. Prueba Tukey de medias de los tratamientos de actividad enzimática frente a diferentes pHs.....	78
Tabla 14. Efecto de iones metálicos a 1mM sobre la actividad relativa de la α -glucosidasa recombinante	80
Tabla 15. Efecto de iones metálicos a 2mM sobre la actividad relativa de la α -glucosidasa recombinante	82
Tabla 16. Efecto de iones metálicos a 5mM sobre la actividad relativa de la α -glucosidasa recombinante	84
Tabla 17. Actividad relativa de la termoestabilidad de la enzima α -glucosidasa recombinante de 30 °C hasta 90 °C.....	87
Tabla 18. Analisis estadístico de las concentraciones de sustrato sobre la actividad de la α -glucosidasa recombinante	89
Tabla 19. Determinación de V_{max} y K_m de la α -glucosidasa recombinante	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del almidón	18
Figura 2. Modelo de acción de las enzimas implicadas en la degradación del almidón	23
Figura 3. Tecnología de ADN recombinante para la producción de amilasas.....	39
Figura 4. Componentes esenciales de un vector plasmídico empleado para la expresión recombinante en <i>E. coli</i>	48
Figura 5. Electroforesis de α -glucosidasa recombinante	68
Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE de las fases de purificación	69
Figura 7. Efecto de temperatura en la actividad de la enzima α -glucosidasa recombinante.....	75
Figura 8. Efecto de pH en la actividad enzimática de la enzima α -glucosidasa recombinante.....	79
Figura 9. Efecto de iones metálicos a 1mM sobre la actividad relativa de la α -glucosidasa recombinante	81
Figura 10. Efecto de iones metálicos a 2mM sobre la actividad relativa de la α -glucosidasa recombinante	83
Figura 11. Efecto de iones metálicos a 5mM sobre la actividad relativa de la α -glucosidasa recombinante	85
Figura 12. Análisis de la estabilidad térmica de la enzima α -glucosidasa.....	88

Figura 13. Modelo cinético de Michaelis - Menten en función de la concentración de sustrato y velocidad de reacción de la α -glucosidasa recombinante 90

RESUMEN

El interés en los microorganismos termófilos ha incrementado gracias a las propiedades únicas de sus enzimas a altas temperaturas, beneficiosas para diversas industrias. Sin embargo, su producción presenta desafíos, debido a la complejidad de cultivar estos microorganismos a gran escala y los altos costos asociados con la fermentación. Para superar estos obstáculos, se están clonando los genes que codifican estas enzimas y expresando en mesófilos como *Escherichia coli*. Posteriormente, se realiza una caracterización exhaustiva de estas enzimas, un paso crucial para comprender sus propiedades y explorar nuevas aplicaciones potenciales.

En la presente tesis, se caracterizó fisicoquímicamente la enzima α -glucosidasa recombinante de *Geobacillus kaustophilus* expresada en *E. coli*, la cual tuvo una actividad de 11,780 U/mL tras 12 h, al cultivarlo en medio Luria bertani utilizando lactosa como inductor. La enzima se purificó mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) y ultrafiltración, obteniendo un factor de purificación de 9,58 y una recuperación del 85 %. La enzima presentó una temperatura óptima de 60 °C y un pH óptimo de 7. En cuanto a la termoestabilidad, la enzima mantuvo una actividad residual de 79 % durante 360 minutos a 60 °C. La actividad enzimática fue inhibida por los iones metálicos Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Hg^{2+} , mientras que concentraciones de 5 mM de Ba^{2+} y Na^{1+} incrementaron la actividad en un 60 % y 65 %, respectivamente. Los valores de K_m y V_{max} , fueron 24,87 mg/mL y 278,22 mg/mL/min, respectivamente. Estas características demuestran el potencial biotecnológico de la enzima α -glucosidasa recombinante para la hidrólisis de almidón en diferentes industrias.

Palabras clave: *Geobacillus kaustophilus*, ADN recombinante, α -glucosidasa, hidrólisis de almidón.

ABSTRACT

Interest in thermophilic microorganisms has increased due to the unique properties of their enzymes at high temperatures, which are beneficial for various industries. However, their production presents challenges due to the complexity of cultivating these microorganisms on a large scale and the high costs associated with fermentation. To overcome these obstacles, genes encoding these enzymes are being cloned and expressed in mesophiles like *Escherichia coli*. Subsequently, an exhaustive characterization of these enzymes is performed, a crucial step to understand their properties and explore new potential applications.

In this thesis, the physicochemical characterization of the recombinant α -glucosidase enzyme from *Geobacillus kaustophilus* expressed in *E. coli* was carried out, showing an activity of 11,780 U/mL after 12 hours when cultivated in Luria-Bertani medium using lactose as an inducer. The enzyme was purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and ultrafiltration, achieving a purification factor of 9,58 and a recovery of 85 %. The enzyme exhibited an optimal temperature of 60 °C and an optimal pH of 7. Regarding thermostability, the enzyme maintained 79 % residual activity for 360 minutes at 60 °C. Enzymatic activity was inhibited by the metal ions Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ and Hg²⁺, while concentrations of 5 mM of Ba²⁺ and Na¹⁺ increased activity by 60 % and 65 %, respectively. The Km and Vmax values were 24,87 mg/mL and 278,22 mg/mL/min, respectively. These characteristics demonstrate the biotechnological potential of the recombinant α -glucosidase enzyme for starch hydrolysis in various industries.

Key words: *Geobacillus kaustophilus*, recombinant DNA, α -glucosidase, starch hydrolysis

INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre enzimas termófilas en Latinoamérica y en nuestro país son todavía limitados, presentando numerosos desafíos por superar. A pesar de contar con una abundante diversidad de recursos naturales, estos no han sido suficientemente estudiados ni explorados a nivel microbiológico, y mucho menos a nivel biotecnológico. Por tal motivo, esta investigación busca contribuir con información relevante sobre la caracterización fisicoquímica y cinética de la enzima α -glucosidasa recombinante de *G. kaustophilus*.

G. kaustophilus, es una bacteria termófila, aislada y reportada por el equipo de investigación del Laboratorio de Biotecnología Enzimática de la UNJBG, fue encontrada por primera vez en las aguas geotermales de Candarave hace cuatro años. Estudios previos demostraron que *G. kaustophilus* sintetiza una enzima α -glucosidasa con gran potencial biotecnológico. Este hallazgo generó un mayor interés en investigar esta enzima y conocer sobre sus propiedades, especialmente al ser expresada su gen en *Escherichia coli*, por su capacidad para producir proteínas heterólogas. Esperando evaluar las propiedades fisicoquímicas y cinéticas de la α -glucosidasa recombinante, con la esperanza de encontrar una enzima óptima y aplicable en diversos procesos industriales.

Una enzima recombinante, es una enzima obtenida mediante tecnología de ADN recombinante (Azura, 2015). Si bien comparten funciones similares con las enzimas nativas su caracterización detallada es crucial para optimizar su uso y

desarrollar nuevos procesos industriales más sostenibles y rentables. Además, la caracterización garantiza la reproducibilidad de los resultados y facilita el escalado de los procesos, lo que es esencial para su aplicación industrial, en donde se podría reducir el impacto ambiental y los costos de producción.

Mas allá del aporte científico, esta tesis aspira a llenar vacíos de información sobre estos temas de gran interés industrial local, pues contamos con recursos naturales que podrían ser fuentes valiosas de microorganismos capaces de ofrecer importantes servicios biotecnológicos importantes para la región.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Antecedentes

Lara et al. (2011) desarrollaron en su investigación titulada "Producción de proteína recombinantes en *Escherichia coli*" estrategias para mejorar la producción de proteínas recombinantes (PR) en bacterias, enfocándose en ingeniería metabólica y optimización de condiciones de cultivo. El cultivo alimentado exponencialmente o en modo pH-stat permitió alcanzar concentraciones significativamente altas de biomasa y PR. Se exploraron respuestas transcripcionales a gradientes ambientales y se generaron cepas modificadas con mayor producción de PR, destacando la capacidad de bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* para secretar proteínas. Además, se analizaron las respuestas de *E. coli*, proporcionando estrategias de mejora del metabolismo celular.

Asimismo, en un estudio sobre expresión de la bacteria *G. kaustophilus*, titulada "A novel method for transforming the thermophilic bacterium *Geobacillus kaustophilus*" realizado por Miyano et al. (2018) caracterizaron a *G. kaustophilus* como una bacteria termofílica del género *Geobacillus*, que crece óptimamente a temperaturas de 50 - 75 °C. Esta característica la hace beneficiosa para aplicaciones biotecnológicas, ya que su capacidad para crecer a altas temperaturas evita el crecimiento de posibles bacterias contaminantes mesófilas y facilita la recuperación de productos volátiles de los medios de cultivo. Además, se ha demostrado que

G. kaustophilus es un organismo difícil de transformar genéticamente debido a la falta de eficiencia en las técnicas de transformación existentes.

La comprensión de las características únicas de *G. kaustophilus*, incluida su termofilia y su resistencia en condiciones extremas, así como, el conocimiento previo sobre la movilización de plásmidos en *G. kaustophilus* proporciona una base sólida para el diseño y la implementación de estrategias de expresión génica heteróloga en este organismo, lo que contribuirá a nuestro entendimiento de la enzima α -glucosidasa y su potencial aplicabilidad en biotecnología.

En el estudio titulado "Purification and characterization of α -glucosidase enzyme from rice groats" elaborado en Indonesia por Papriani et al. (2019) se llevó a cabo la purificación y caracterización de la enzima α -glucosidasa a partir de arroz descascarillado. Se identificó que esta enzima tiene un papel importante en la hidrólisis del almidón y la producción de glucosa utilizada como fuente de energía por las plantas. Además, se demostró que la enzima α -glucosidasa puede ser aislada de diversas fuentes, incluyendo bacterias, levaduras, insectos y plantas. De este modo, se planteó la investigación de la caracterización de la enzima α -glucosidasa de la bacteria *Geobacillus kaustophilus* expresada por la bacteria *E. coli*. Este estudio buscó profundizar en el conocimiento de las propiedades y características de esta enzima, así como su potencial aplicación en diversas industrias, como la alimentaria y farmacéutica. Con esta investigación, se espera contribuir al desarrollo de nuevas

tecnologías y procesos que permitan una producción más eficiente y sostenible de esta enzima de interés industrial.

Por otro lado, en el estudio "Characterization of a thermostable α -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* F84a" llevado a cabo en Turquía por Cihan et al. (2012) se demostró la importancia biotecnológica de las enzimas termofílicas y su capacidad para resistir condiciones extremas. Se concluyó que las α -glucosidasas termoestables tienen un amplio rango de especificidad de sustrato y la capacidad de catalizar reacciones de transglucosilación. Además, se identificó que la cepa F84a de *Geobacillus thermodenitrificans* producía niveles significativos de α -glucosidasa extracelularmente, lo que la convertía en una candidata prometedora para aplicaciones industriales.

Estos hallazgos son relevantes para la investigación actual, dado que la α -glucosidasa de *Geobacillus thermodenitrificans* F84a demostró ser termoestable y biotecnológicamente relevante, lo que significa un gran antecedente a nivel de género bacteriano para comprender las características de la enzima α -glucosidasa de *Geobacillus kaustophilus* expresada en *Escherichia coli*, lo que nos permitirá evaluar su potencial para aplicaciones industriales y biotecnológicas.

Por último, en otro estudio titulado "Expression and characterization of an α -glucosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 with potential for industrial application" realizado por Wang et al. (2009) quienes investigaron la clonación y expresión de un nuevo gen de α -glucosidasa, así como sus condiciones óptimas de

actividad hidrolítica, especificidad de sustrato y actividad de transglucosilación. Los resultados mostraron que la enzima tenía un gran potencial para aplicaciones industriales en la producción de oligosacáridos y otros productos valiosos. Esta investigación buscó ampliar el conocimiento sobre las propiedades y aplicaciones de las α -glucosidasas, así como explorar nuevas fuentes de estas enzimas con potencial industrial.

En general, los trabajos de investigación mencionados demuestran que la enzima recombinante a estudio significa una enzima con propiedades latentes, gracias al desarrollo de métodos para mejorar aún más la estabilidad de la enzima a variables ambientes y parámetros, lo que podría abrir nuevas aplicaciones biotecnológicas y escalar su producción a nivel industrial.

1.2 Formulación del problema

La α -glucosidasa, naturalmente es una enzima clave en procesos biológicos y biotecnológicos, por ello exhibe un interés significativo, pero al ser obtenida mediante técnicas de expresión heteróloga, cual es el caso de la enzima en estudio, podría presentar características distintivas que requieren una atención detallada. Pues la falta de información específica sobre las propiedades particulares de esta enzima recombinante, limita la capacidad de optimizar su utilización en diversos ámbitos, como la investigación científica, la industria farmacéutica y otras aplicaciones industriales.

La investigación propuesta busca, por lo tanto, abordar con precisión la evaluación de las características fisicoquímicas y cinéticas de la enzima α -glucosidasa recombinante. Este enfoque contribuirá no solo a expandir el conocimiento científico sobre este tipo de enzimas, sino también a mejorar su aplicabilidad en diversos campos, impulsando así el desarrollo de nuevas estrategias y tecnologías basadas en estas enzimas modificadas genéticamente.

Por consiguiente, con el fin de profundizar en el estudio de biocatalizadores termoestables recombinantes, como la enzima α -glucosidasa de *G.kaustophilus*, se formula la siguiente interrogante:

¿Cuáles son las características fisicoquímicas y cinéticas que presenta la enzima recombinante α -glucosidasa de *Geobacillus kaustophilus*?

1.3 Hipótesis

Los parámetros fisicoquímicos como: temperatura, pH, termoestabilidad, iones metálicos, y cinéticos como el K_m y V_{max} permiten determinar las características de la enzima α -glucosidasa recombinante, producida por *G. kaustophilus*.

1.4 Justificación

La importancia de una caracterización completa de la α -glucosidasa de *Geobacillus kaustophilus* radica en su potencial para mejorar los procesos biotecnológicos y proporcionar soluciones innovadoras en diversos sectores. Comprender en profundidad su actividad enzimática, estabilidad y propiedades

fisicoquímicas, permitirá optimizar su producción y aplicabilidad en condiciones específicas.

Por otro lado, los diferentes usos de las amilasas, familia a la que pertenece la enzima a estudio, exigen que estén diseñadas para actuar en condiciones particulares y que su producción se encuentre en grandes cantidades, por ser excelentes biocatalizadores, de tal modo que los costes en procesos industriales se abaraten. Por tal motivo, para solventar estas implicancias, resulta favorable para la industria, la evaluación de estas enzimas producidas mediante recombinación génica.

Naturalmente la enzima α -glucosidasa exhibe atributos particulares que, dentro de las más importantes, está el convertir el almidón en azúcares simples, que es aprovechado en la industria alimentaria para endulzar, mejorar sabores y texturas, en la industria papelera para mejorar el brillo y blancura del papel. También se utiliza para sintetizar nuevos fármacos y, mejorar la absorción de estos en el cuerpo (Yadav et al., pp. 225-237). Es así que evaluar las características fisicoquímicas y cinéticas de esta enzima en forma recombinante, puede guiar el diseño de procesos y la selección de cepas para demás aplicaciones industriales, contribuir en el desarrollo de tecnologías más eficientes y sostenibles, como también la producción de bioproductos.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Caracterizar la enzima α -glucosidasa de *Geobacillus kaustophilus* expresada en *Escherichia coli*.

1.5.2 Objetivos específicos

- Producir la enzima α -glucosidasa recombinante.
- Purificar la enzima α -glucosidasa recombinante por métodos cromatográficos y ultrafiltración.
- Determinar el peso molecular de la enzima por electroforesis SDS-PAGE.
- Determinar el efecto del pH, temperatura, termoestabilidad e iones metálicos sobre la actividad de la α -glucosidasa recombinante.
- Caracterizar a la α -glucosidasa recombinante en relación a sus parámetros cinéticos ($V_{m\acute{a}x}$ y K_m).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Microorganismos termófilos

2.1.1 Definición y características

Los microorganismos extremófilos son organismos adaptados a vivir en ambientes extremos, como fuentes termales, océanos profundos o suelos salinos. Estos microorganismos han desarrollado mecanismos moleculares únicos para sobrevivir en condiciones de alta temperatura (termófilos e hipertermófilos), baja temperatura (psicrófilos), alta salinidad (halófilos), alta presión (barófilos) o pH extremos (acidófilos y alcalófilos). Los termófilos prosperan a temperaturas superiores a 45°C, mientras que los hipertermófilos requieren temperaturas aún más altas, superiores a 80°C (Suárez et al., 2004).

Las bacterias termófilas han experimentado un desarrollo muy rápido en el mundo de la biotecnología gracias a sus propiedades resistentes a temperaturas elevadas. Su desarrollo está aumentando con la creciente demanda de producción de enzimas en la biotecnología y la industria. El avance de las bacterias termófilas en el mundo de la biotecnología y la industria ha provocado que estas bacterias llamen la atención de los expertos. De modo que se seguirán explorando e investigando los microorganismos que producen enzimas que desempeñan un papel importante en la industria (Sanka et al., 2023).

La capacidad de estos microorganismos termófilos para sobrevivir a altas

temperaturas está relacionada con la estructura de sus células, que presenta ventajas como: La estructura de la membrana celular, que en todos los seres vivos está compuesta por compuestos de lípidos y proteínas llamados lipoproteínas. Las chaperoninas son un tipo especial de proteínas, localizados en diversos compartimientos celulares. Esta proteína desempeña un papel en el mantenimiento de la estructura tridimensional de las proteínas funcionales celulares, protegiéndolas de la desnaturalización por temperaturas ambientales extremas. La estructura de la ADN girasa es un miembro del grupo de enzimas topoisomerasas, que juega un papel en el control de la topología del ADN de una célula y es fundamental en el proceso de replicación durante la transcripción del ADN (Indriati, 2023).

2.1.2 Enzimas de bacterias termófilas

Existen 4 tipos de enzimas bacterianas termófilas principales: Amilasas, proteasas, lipasas y catalasas (Finore et al., 2023).

Las enzimas de bacterias termófilas, como las amilasas, son un grupo de enzimas que tienen la capacidad de romper enlaces glucosídicos presentes en compuestos de polímeros de carbohidratos. Las enzimas proteasas son enzimas comerciales de alto valor económico y su utilización ha aumentado rápidamente, ocupando una posición importante en el campo de la tecnología y la industria (Solanki et al., 2021). La enzima lipasa es un descomponedor de grasas, hidrolasa de ésteres de glicerol o triacilglicerol acilhidrolasa, y pertenece a la clase de enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis. Las enzimas lipasas tienen actividades que pueden

hidrolizar diversas grasas y aceites en una unidad de tiempo (Najm & Walsh, 2022). La enzima catalasa es una molécula formada por proteínas cuya función principal es actuar como catalizador. El catalizador es un proceso que acelera las reacciones en varios procesos químicos en el cuerpo (Finore et al., 2023).

2.1.3 Importancia industrial

Las bacterias termófilas son muy adecuadas para su uso en biotecnología moderna, así como en la industria alimentaria y no alimentaria (Ardhi et al., 2020). Estos microorganismos producen enzimas termoestables, que son biocatalizadores esenciales en las células. Las enzimas termoestables son altamente efectivas y resistentes a altas temperaturas. A medida que avanza la biotecnología moderna, aumenta el interés en estas enzimas desde el sector industrial (Che Hussian & Leong, 2023). Las enzimas derivadas de microbios tienen varias ventajas sobre las provenientes de animales y plantas. Una de las principales ventajas es que las bacterias se dividen rápidamente, facilitando la producción en grandes cantidades y acortando el tiempo necesario para obtener las enzimas.

Como fuente de enzimas, los microorganismos se emplean en una variedad de productos industriales, agrícolas, químicos y médicos. Esto se debe a que son más eficientes, selectivos, predecibles, generan reacciones sin subproductos y son ambientalmente amigables. Estas propiedades provocan un aumento en el uso de enzimas año tras año, con un incremento estimado del 10-15% anual (Pazoki et al., 2021). Las bacterias termófilas se han convertido en una fuente atractiva para

enzimas industriales termoestables (Ginting et al., 2021). Las enzimas termoestables exhiben un mayor grado de resistencia contra proteínas desnaturalizantes, detergentes, pH extremos y solventes orgánicos en comparación con las enzimas mesofílicas análogas.

Aplicación en diversas industrias

La utilización de enzimas de bacterias termófilas en industrias como la de productos lácteos procesados: La leche contiene una serie de enzimas naturales. Se han aislado 20 enzimas de la leche e identificado como constituyentes naturales. Algunas benefician a los consumidores naturales de leche, otras afectan la estabilidad y vida útil de la leche, y algunas influyen en los productos procesados a partir de la leche. La lipasa específicamente, aumenta la fuerza y estabilidad de la masa. El gluten de la harina de trigo tratada con lipasa es más fuerte y elástico. Por lo tanto, la lipasa puede ser una alternativa a los productos químicos para fortalecer la masa y los emulsionantes (Okpara, 2022).

Industria de procesamiento de carne: La carne almacenada generalmente ha sufrido un proceso de descomposición de proteínas por las enzimas presentes en ella, lo que resulta en albóndigas menos masticables o más suaves. El enlace entre las proteínas en la carne es el factor más dominante en la determinación de la calidad de los productos cárnicos procesados como salchichas y albóndigas (Che Hussian y Leong, 2023).

Otro tipo de enzimas son las nitrilasas, obtenidas de microorganismos que prosperan en altas temperaturas, estas han mostrado un gran potencial en diversas industrias. Desde la fabricación de papel y el tratamiento de aguas residuales hasta la producción de compuestos químicos como la acrilamida y fármacos, estas enzimas ofrecen soluciones innovadoras. Sin embargo, su limitada estabilidad ha restringido su uso a gran escala (Okpara, 2022).

En la industria licorera, la deshidrogenasa alcohólica, por ejemplo, se utiliza para oxidar alcoholes, mientras que las isomerasas de glucosa y xilosa catalizan la conversión de azúcares, un paso fundamental en la producción de jarabes de alta fructosa, ampliamente utilizados en la industria alimentaria industria (Solanki et al., 2021).

Las enzimas desempeñan un papel importante en el mundo industrial, como en la industria textil, detergentes, alimentos y bebidas, químicos, farmacéuticos y cuero.

2.2 *Geobacillus kaustophilus*

2.2.1 Clasificación taxonómica

Dominio	Bacterias
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae

Género	Geobacillus
Especies	<i>Geobacillus kaustophilus</i>
Nombre científico completo	<i>Geobacillus kaustophilus</i> (Priest et al. 1989) Nazina et al. 2001

2.2.2 Descripción general

Originalmente aislada de leche pasteurizada; esta especie fue identificada en un momento como *Bacillus stearothermophilus* debido a similitudes fenotípicas. Sin embargo, estudios taxonómicos exhaustivos llevaron a una propuesta para restablecer el taxón, una idea respaldada por estudios de secuenciación del gen 16S rRNA (Zeigler, 2001) . Las colonias de esta bacteria son convexas y transparentes, es una bacteria grampositiva, y se encuentra en ambientes cálidos, como suelos y aguas termales. Las células no son móviles, 1,5 µM × 3,5 µM, y producen esporas que son de ovaladas a cilíndricas y pueden hinchar los esporangios. El contenido de GC es del 51-55 %. El ácido se produce a partir de adonitol, celobiosa, inositol, maltosa, manosa, salicina, sacarosa, trehalosa y xilosa, pero no a partir de arabinosa, glicerol o ribosa. El crecimiento requiere condiciones de pH de 6,2 a 7,5 y temperatura en un intervalo de 37 a 68 °C con 0 a 2 % de NaCl (Nazina et al., 2001).

2.2.3 Importancia industrial

Geobacillus kaustophilus es capaz de degradar una variedad de compuestos orgánicos, lo que la hace útil en aplicaciones industriales y ambientales. Puede producir enzimas termoestables como lipasas y amilasas, que son útiles en diversas

aplicaciones industriales y de gran interés en procesos biotecnológicos, como la producción de biocombustibles, la bioremediación y la síntesis de productos químicos (Turkan et al., 2011).

La resistencia a condiciones extremas de temperatura y pH permite su utilización en ambientes industriales hostiles. Además, su capacidad para formar esporas aumenta su viabilidad y durabilidad en diversas aplicaciones. Se han realizado estudios genómicos que han permitido identificar genes relacionados con su resistencia a altas temperaturas y su capacidad metabólica, lo que abre nuevas posibilidades para su uso en biotecnología. Además, La especie también ha demostrado potencial en la producción de proteínas recombinantes y en la bioconversión de residuos agrícolas y forestales en productos de valor añadido. La optimización de las condiciones de cultivo, así como la manipulación genética, han mejorado significativamente su rendimiento en aplicaciones prácticas (Zeigler, 2001).

2.3 Almidón

El almidón es un polisacárido de reserva presente en abundancia en la naturaleza y se encuentra en muchos cultivos de gran importancia económica en todo el mundo, como el trigo, arroz, maíz, yuca y patatas, y puede extraerse de raíces, tubérculos y semillas (Gadhawe et al., 2017). Es un constituyente importante de la dieta humana y animal, además de ser una fuente potencial de energía renovable y biodegradable, hecho que ha culminado con el desarrollo de la industria procesadora de manera significativa desde el siglo pasado (Karaki et al, 2016).

Los almidones nativos y modificados se utilizan en los sectores alimentario, farmacéutico, textiles y papel, y puede aplicarse para modificar la textura de los alimentos, como agente gelatinizante y retenedor de agua (Souza & Magalhães, 2016). Ciertas aplicaciones industriales se dirigen a los productos de hidrólisis de este sustrato o a la propia molécula modificada. Por ejemplo: almidones modificados, hidrolizados de almidón, jarabes de glucosa, fructosa, maltodextrina o derivados de ciclodextrina y otros subproductos de alto valor añadido como el bioetanol (mediante el proceso de fermentación), siendo este último el que se produce a mayor escala a partir de de biomasa amilácea (Silva Neto, 2020). La industria del almidón junto con la industria de sus productos derivados generó alrededor de 72,51 mil millones de dólares en 2016 y se estima que este valor alcanzará los 106,64 mil millones para 2022, con una tasa de crecimiento anual del 6,64% durante este período (Läufer, 2017).

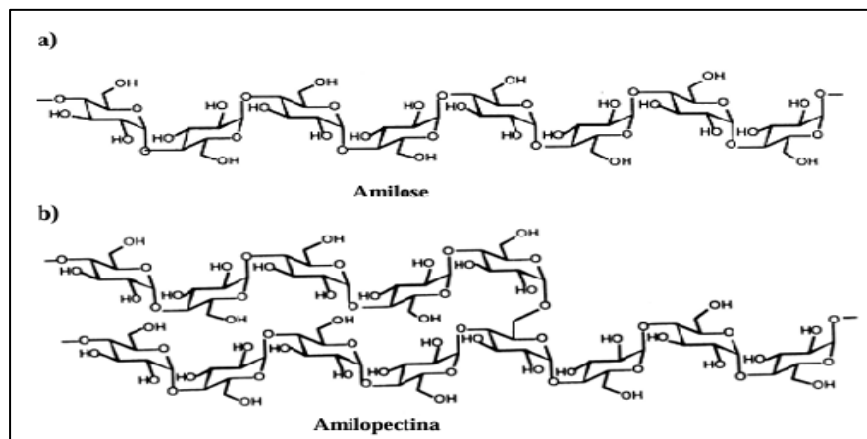
2.3.1 Estructura del almidón

En el almidón están presentes dos tipos de polímeros que se observan en la Figura 1: amilopectina y amilosa, esta última se encuentra formada por una cadena lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -1,4 y puede contener de 350 a 1000 unidades de glucosa en su estructura. La amilopectina presenta una estructura ramificada, compuesta por cadenas lineales de 20 a 25 unidades de α -D-glucosas unidas en α -1,4. Estas cadenas están asociadas entre sí mediante enlaces glucosídicos α -1,6. Al estar constituida por 10 a 500 millones de unidades de glucosa,

es una de las mayores moléculas presentes en la naturaleza y además presenta una estructura esférica (Ribeiro & Seravalli, 2007). El contenido relativo de amilosa y amilopectina varía según la fuente de almidón (Agüero de Olivera, 2013).

Figura 1

Estructura del almidón



Nota: a) Amilosa b) Amilopectina. Extraído de Agüero de Olivera, 2013.

La amilosa es en gran medida responsable de la gelatinización (o retrogradación) del almidón, provocada después de calentarlo a altas temperaturas seguido de enfriarlo. En este proceso, a medida que aumenta la temperatura, las moléculas de amilosa presentes en el grano de almidón se liberan y, una vez en solución, se reasocian entre sí formando un gel (Gadhve et al., 2017). La amilopectina, considerando su estructura total, es decir, tanto las cadenas lineales como las ramas, es una molécula mucho más grande que la amilosa (Silva Neto, 2020). Normalmente ocurre en estructuras agrupadas según el modelo propuesto por

Robin et al. (1974) y Myers et al. (2000), y tiene una influencia directa en la formación regular y morfología del gránulo de almidón (Wang & Copeland, 2015).

En general, la amilosa representa alrededor del 20 al 25 % y la amilopectina del 75 al 80 % de la composición total de este polisacárido. Sin embargo, existen almidones considerados “céreos”, en los que la tasa de amilosa es inferior al 15 %, y aquellos considerados “ricos” en amilosa, en los que la tasa es superior al 40 % (Silva Neto, 2020).

2.3.2 Hidrólisis del almidón

Los almidones pueden ser hidrolizados química o enzimáticamente (Cereda, 2003). Ahora se sabe que hay un gran número de enzimas conocidas para hidrolizar la molécula de almidón en diferentes productos y se requiere una acción combinada de varias de estas para hidrolizar el almidón por completo. Esas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se sintetizan en diversos tejidos animales, plantas superiores, hongos, levaduras y bacterias, sin embargo, las producidas por microorganismos termófilos y termotolerantes son especialmente interesantes porque normalmente son termoestables y pueden ser utilizadas en procesos de sacarificación que ocurren a altas temperaturas (Peixoto et al., 2003).

Para hidrolizar el almidón, los microorganismos producen enzimas amilolíticas extracelulares con diferentes especificidades. Estas enzimas se encuentran entre las más importantes producidas a escala industrial, siendo ampliamente utilizadas en la producción comercial de diversos tipos de jarabes de azúcar y alcohol a partir de

almidón, además de ser utilizadas en la formulación de detergentes, entre otras aplicaciones (Agüero de Olivera, 2013). La acción coordinada de estas enzimas es necesaria para obtener una conversión eficiente del almidón en productos de bajo peso molecular, como la glucosa, la maltosa o la maltotriosa (Bon et al., 2008).

2.3.2.1 Enzimas amilolíticas

Actualmente, cuatro tipos de enzimas de la familia amilasas son capaces de hidrolizar el almidón: endoamilasas, exoamilasas, enzimas desramificadoras y transferasas (Agüero de Olivera, 2013).

Las α -amilasas (E.C. 3.2.1.1) corresponden a las endoamilasas, capaces de escindir los enlaces glucosídicos α -1,4 localizados en la estructura interna de la molécula del almidón, siendo el producto final de la acción de las α -amilasas, oligosacáridos de diferentes tamaños con configuraciones α y límite α -dextrinas, que consisten en oligosacáridos ramificados. Además de los enlaces α -1,4, existen algunas α -amilasas que también pueden hidrolizar enlaces glucosídicos α -1,6 (Agüero de Oliveira, 2013).

Por otro lado, las exoamilasas actúan sobre los residuos externos de glucosa de amilosa y amilopectina para producir glucosa, maltosa y limitar las β -dextrinas; en este tipo están incluidas la β -amilasa, la glucoamilasa y la α -glucosidasa.

- Las α -glucosidasas (EC 3.2.1.20) son exoamilasas que catalizan preferentemente la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -1,4. Se diferencian de las glicoamilasas en su sustrato preferido, actuando

mejor sobre sacáridos cortos, liberando glucosa con α configuración (De moraes, 2004).

- Las β -amilasas (EC 3.2.1.2) hidrolizan exclusivamente los enlaces glucosídicos α -1,4 de los extremos no reductores de la molécula, liberando los límites de maltosa y β -dextrina. Además de la hidrólisis, la enzima también provoca la inversión de la configuración anomérica de la maltosa liberada de α a β (Norouzian et al., 2006).
- Las glicoamilasas (EC 3.2.1.3) son exoenzimas que eliminan los residuos de glucosa del extremo no reductor de la molécula de almidón mediante la hidrólisis de los enlaces α -1,4, liberando glucosa. Esta enzima también convierte la configuración anomérica de carbono de la glucosa de α a β , y también es capaz de hidrolizar los enlaces α -1,6 de las ramas de amilopectina, aunque más lentamente (Norouzian et al., 2006).
- Las enzimas desramificantes hidrolizan enlaces tipo α -1,6 presentes en el almidón, deshaciendo las ramificaciones (por ejemplo: isoamilasa y pululanasa); y las transferasas forman nuevos enlaces α -1,4 y/o α -1,6, incorporando nuevos monómeros en cadena lineal o en forma de ramificaciones en la cadena amilácea (por ejemplo: rama de 1,4- α glicano, también conocida como enzima ramificadora de glucógeno o

enzima ramificadora de glucógeno; amilomaltasa; y ciclodextrina glicosiltransferasa) (Silva Neto,2020).

La conversión enzimática del almidón en la industria incluye los pasos de licuefacción y sacarificación, y el paso de licuefacción implica la disolución del almidón en agua a altas temperaturas, en este paso se reduce el grado de polimerización del almidón. Su hidrólisis se produce por las diferentes enzimas amilolíticas ya mencionadas, tales como: α -amilasa, pululanas e isoamilasa (Agüero de Oliveira, 2013).

Las α -amilasas se utilizan en el primer paso (licuefacción) para convertir del 30 al 40 % del almidón en dextrinas solubles con diferentes grados de polimerización, disminuyendo la viscosidad de la solución de almidón. Durante la segunda etapa (sacarificación), estas dextrinas son hidrolizadas en maltosa y glucosa por la glicoamilasa y la β amilasa (Agüero de Oliveira, 2013). La figura 2 sintetiza la acción conjunta de las enzimas que degradan la molécula de almidón.

Entre las glicosidasas, se encuentran las enzimas llamadas α -glucosidasas las cuales también son conocidas con otros nombres como: isomaltasa, maltasa, maltasa ácida, glicoinvertasa, glucósido sacarasa, α -glucosidasa lisosomal y maltasa-glucosidasa (Hakamata et al., 2009).

2.4.1 La enzima α -glucosidasa

Las enzimas clasificadas como EC 3.2.1, conocidas como glucosidasas, catalizan la hidrólisis de O- o S-glucósidos. También pueden ser clasificadas de acuerdo al resultado estereoquímico de la reacción de hidrólisis (Rincon et al., 2019), este es un subgrupo de las glicosidasas.

La α -glucosidasa (α -D-glucósido glicohidrolasa; EC 3.2.1.20), subgrupo de las glicosidasas, está formado por exoglucósido hidrolasas, que catalizan la exohidrólisis de enlaces glicosídicos del tipo α -1,4 en los extremos no reductores de oligos o polisacáridos para liberar α -D-glucosa. El enlace glicosídico es uno de los enlaces químicos más estables de la naturaleza, con una vida media de hidrólisis espontánea de aproximadamente 5 millones de años (Souza Ferreira, 2015). Esta enzima actúa descomponiendo compuestos como la maltodextrina y la sacarosa para obtener glucosa (α -D-glucosa) en distintos seres vivos. La especificidad del sustrato de las α -glucosidasas difiere mucho dependiendo de la fuente de las enzimas (Jhosi et al., 2015)

Se han determinado las secuencias genéticas de α -glucosidasas y las enzimas correspondientes se han agrupado en familias (de la familia 1 a la familia

106) en función de la similitud de sus secuencias. Las α -glucosidasas se encuentran principalmente en las familias 13 y 31 y, en menor medida, en las familias 4 y 63 de glucósidos hidrolasas (Souza Ferreira, 2015).

2.4.2 Clasificación de la enzima α -glucosidasa

La Nomenclatura de Enzimas de la IUB (1984) se basa en el tipo de reacción que catalizan las enzimas y su especificidad de sustrato. Los primeros tres dígitos (EC 3.2.1) en la clasificación de las glicosidasas indican su función general de hidrolizar enlaces O-glicosídicos. Sin embargo, es el último dígito el que otorga especificidad, revelando el tipo de molécula de azúcar involucrada y, en algunos casos, el mecanismo molecular empleado. Esta clasificación es muy útil, sobre todo para evitar ambigüedades y la proliferación de nombres triviales, y proporciona una clasificación original (Henrissat, 1991).

La clasificación del grupo de las glicosidasas se da según la especificidad de la escisión del enlace glicosídico, en relación con el número, posición o configuración del grupo hidroxilo en la molécula de azúcar (Melo et al., 2006). Por lo tanto, el subgrupo de α -glucosidasas (α -D-glucósido glicohidrolasas; EC 3.2.1.20) está formado por exoglucósido hidrolasas que son capaces de escindir residuos de α -glicosilo de los extremos no reductores de sustratos con enlaces α para liberar α -D-glucosa (Chiba, 1997). En el mismo trabajo, Chiba clasificó las α -glucosidasas en tres grupos (I, II y III) según el tipo de sustrato. El primer grupo está formado por las típicas α -glucosidasas, que son más activas con fenil- α -glucósido o sacarosa como sustrato

que con maltosa. El segundo grupo está formado por las llamadas “maltasas” que fácilmente hidrolizan maltooligosacáridos y las enzimas del tercer grupo presentan actividad maltasa y también pueden hidrolizar α -glucanos.

Henrrisat (1991), clasificó las glicosidasas comparando la secuencia de aminoácidos de 301 glicosilhidrolasas. A partir de entonces se crearon 35 familias que engloban enzimas implicadas en el metabolismo de los carbohidratos. Las α -glucosidasas se encuentran principalmente en las familias 13 y 31 de las glucósidos hidrolasas .

Las α -glucosidasas de la familia 13 son más activas sobre sustratos heterogéneos, como el p-nitrofenil α -glucósido y la sacarosa, que sobre la maltosa, y las enzimas de esta familia están incluidas en el grupo I. Las enzimas de la familia 31 tienen preferencia por sustratos homogéneos. sustratos tales como maltosa, maltotriosa y maltotetraosa en comparación con sustratos heterogéneos, y comprende α -glucosidasas de los grupos II y III. Además, las α -glucosidasas del grupo III hidrolizan polisacáridos, como la amilosa y el almidón (Souza Ferreira, 2015).

Las enzimas de la familia 13 son las producidas por *S. cerevisiae*, *B. cereus*, *Bacillus* sp. e insectos. En la familia 31 se incluyen enzimas de plantas, mamíferos y hongos, como *A. niger*, *M. javanicus* (Souza Ferreira, 2015).

a) Clasificación según CAZY

Desde el trabajo de Henrrisat (1991), se ha observado que la clasificación de familias de glucósidos hidrolasas basada únicamente en la secuencia de aminoácidos

ha agrupado enzimas con diferentes especificidades de sustrato, es decir, enzimas con diferentes números de CE. Actualmente CAZY (Carbohydrate-Active Enzymes), base de datos, proporciona acceso continuo y en línea a la clasificación de familias basada en la secuencia, especificidad y estructura 3D de enzimas que ensamblan, modifican o descomponen oligos y polisacáridos (Souza Ferreira, 2015).

Las glucosidasas se encuentran en cinco familias de glucósidos hidrolasas (GH): GH4, GH13, GH31, GH97 y GH122, según el sistema de clasificación de “enzimas activas en carbohidratos” (CAZY) (Khersonsky & Tawfik, 2010). La familia 13 (familia 31 α -amilasa) incluye α -amilasas, α -glucosidasas, pululanasas, ciclodextrina glucanotransferasas, 1,4- α -D-glucano, entre otros.

Las enzimas de la familia 13 tienen características estructurales comunes específicas, como el dominio catalítico (β/α)₈-barril, que actúa específicamente sobre los enlaces α -1,4- y α -1,6-O-glucosídicos (Souza Ferreira, 2015).

2.4.3 Estructura de la enzima α -glucosidasa

Los miembros de la familia 13 de GH comparten poca similitud de secuencia. Sin embargo, contienen cuatro regiones altamente conservadas (regiones I-IV) y tres residuos ácidos catalíticos ubicados en estas regiones (Yamamoto et al., 2010). Todos los miembros de esta familia de enzimas como la α -glucosidasa están compuestos por tres dominios, A, B y C. El dominio A es un dominio catalítico que contiene un sistema de barriles (β/α)₈, el B se inserta entre la tercera hoja β y la hélice

del sistema ($\beta\alpha$)₈ del dominio A y el dominio C comprende ocho cadenas β antiparalelas en un motivo de doble clave griega (Svensson, 1988).

Los residuos de ácido aspártico (Asp) en la región II y de ácido glutámico (Glu) en la región III, situados al extremo carbono de la cadena β ₄ y la cadena β ₅, respectivamente, desempeñan roles fundamentales en la catálisis enzimática: el Asp actúa como nucleófilo, atacando el enlace a romper, mientras que el Glu funciona como un catalizador ácido-base, facilitando la transferencia de protones. El tercer residuo, Asp (región IV), ubicado entre la hebra 7 y la hélice 7, puede estabilizar el sustrato durante la catálisis para ayudar a acelerar la reacción de hidrólisis ácido-base (Hasegawa,1999). La arquitectura tridimensional que rodea a los tres residuos catalíticos es prácticamente idéntica en todas las enzimas de la familia GH13, lo que sugiere que esta disposición es esencial para su actividad enzimática. Por lo tanto, la diferencia en la especificidad del sustrato entre las enzimas de la familia 13 de GH depende de la estructura del sitio activo (Yamamoto et al., 2010).

El sitio activo de la enzima α -glucosidasa está formado por un conjunto de residuos de aminoácidos que se unen al sustrato y catalizan la reacción de hidrólisis (Andrews et al.,2016).

Los residuos de aminoácidos clave en el sitio activo son:

- Histidina (His-196): participa en la formación del enlace covalente intermedio con el sustrato.
- Serina (Ser-301): cataliza la hidrólisis del enlace glucosídico.

La α -glucosidasa es una enzima eficiente que puede hidrolizar enlaces glucosídicos en una variedad de polisacáridos, incluyendo el almidón, la maltosa, la celulosa y la quitina.

2.4.4 Aplicaciones de la enzima α -glucosidasa

La α -glucosidasa forma parte de las amilasas cuales se encuentran entre las hidrolasas más utilizadas en procesos biotecnológicos. Actualmente representa alrededor del 65 % de las ventas en el mercado mundial de enzimas (Simair et al., 2017). Esta enzima cataliza la modificación estructural del almidón, dando origen a una amplia gama de productos refinados con propiedades funcionales mejoradas, lo que les permite desempeñar un papel fundamental en una gran cantidad de diferentes procesos industriales, tales como: textil, alimentos, detergentes, producción de papel, biorremediación. y productos farmacéuticos (Läufer, 2017).

En la producción textil y de papel se utilizan en la suavización, limpieza y desengomado de fibras y láminas textiles (Singh et al., 2016). En su procesamiento a estos materiales les añaden goma (un producto a base de almidón) para proporcionar mayor resistencia e integridad a sus superficies. Sin embargo, la aplicación de almidón nativo hace que dichas superficies sean muy viscosas y, por esta razón la α -glucosidasa en conjunto con la α -amilasa, actúan hidrolizando los enlaces α -1,4 presentes en el almidón de la goma, mejorando así la calidad del tejido y del papel producidos (Souza & Magalhães, 2010). En estos procesos actualmente se utilizan

los tipos de amilasas ya mencionados, de especies del género *Bacillus* sp. y *Bacillus licheniformis* (Singh et al., 2016).

En la industria de los detergentes, las amilasas representan el segundo tipo de enzima más utilizado en las formulaciones de detergentes enzimáticos, estando presentes en una alta proporción de los detergentes líquidos producidos (Hashim, 2019). La α -glucosidasa vinculado a endoamilasas actúan aportando mayor capacidad de limpieza y eliminación de manchas por la descomposición de ciertos residuos de alimentos que contienen almidón. Uno de los requerimientos para su aplicación en este sector es la actividad enzimática y la estabilidad en ambientes oxidativos y rangos de pH alcalinos. Se utilizan en este proceso amilasas de *Aspergillus* sp. y *Bacillus subtilis* (Zhou et al., 2015). En otros sectores, como la industria de jugos y cervezas, también trabajan en el proceso de prefermentación para generar mono y oligosacáridos que serán fermentados y, en el proceso de clarificación de bebidas. También están presentes en la producción de diversos ingredientes alimentarios a base de almidón (Hoon et al., 2017).

Las α -glucosidasas también son enzimas esenciales para la digestión de los carbohidratos, ya que escinden la maltosa y unidades de oligosacáridos más pequeñas, después de la hidrólisis del almidón por la α -amilasa, lo que lleva a la producción de glucosa que será absorbida por el cuerpo. Las unidades terminales de glucosa de amilosa o amilopectina también son escindidas por la α -glucosidasa,

aunque prefiere maltooligosacáridos más pequeños, liberando glucosa con una configuración α (Souza Ferreira, 2015).

2.5 Purificación de enzimas

2.5.1 Cromatografía de afinidad a níquel (IMAC)

Podemos definir la Cromatografía de Afinidad por Ion Metálico Inmovilizado (IMAC, Immobilized Metal Affinity Chromatography) como un método de separación de alta versatilidad de enzimas, basado en las interacciones entre moléculas en solución (básicamente biomoléculas tales como aminoácidos) e iones metálicos fijados en un soporte sólido, el cual es usualmente un polímero hidrofílico entrecruzado (Porath & Belew,1983).

La cromatografía de afinidad es una cromatografía de adsorción basada en la capacidad de sustancias biológicamente activas, de asociarse específicamente con sustancias complementarias inmovilizadas, llamadas generalmente ligandos, que se disocian reversiblemente del sustrato cuando las condiciones del medio se cambian (Santagapita,2015).

El propósito inicial de aplicar este método fue separar las macromoléculas según la afinidad entre ciertos iones metálicos y las proteínas, con el fin de fraccionarlas de manera efectiva. Aunque este principio fundamental no era nuevo, ya que desde principios de siglo se conocía la afinidad de las proteínas por los iones metálicos, es a partir de los trabajos de Porath cuando realmente se relanza la utilización de este método de separación (Porath & Belew,1983).

2.5.2 Electroforesis de proteínas

Según Copeland (2000), la electroforesis se destaca como una de las técnicas más utilizadas actualmente para la separación de macromoléculas en geles de acrilamida o agarosa. La electroforesis en gel de SDS-PAGE es la técnica más común en ensayos enzimáticos, permitiendo la separación de proteínas y péptidos basada en su peso molecular. Tras tratar las muestras con SDS para homogeneizar su carga, se aplica un campo eléctrico que impulsa las proteínas hacia el electrodo positivo. La migración de las moléculas se ve influenciada por la matriz del gel, que restringe su movimiento en función de su peso molecular, logrando así una separación efectiva.

Las biomoléculas con mayores pesos moleculares serán las que se desplacen más lentamente, presentando una migración mínima en un intervalo de tiempo establecido. Por otro lado, las moléculas de menor peso molecular se moverán con mayor facilidad a través del gel, avanzando una distancia mayor en el mismo período.

La forma más simple de llevar a cabo la electroforesis de proteínas implica el uso de un gel, que actúa como un medio anticonvectivo. Los resultados de la separación se pueden observar al teñir los geles con el colorante azul de comassie, que se ensamblan a las proteínas. La electroforesis de proteínas en geles se ha establecido como una técnica de separación ampliamente utilizada, dado su alto poder de resolución, su rapidez y su facilidad de implementación en equipos de diseño relativamente sencillo, además de que los insumos son económicos (Janson, 2011).

2.6 Caracterización de enzimas

Comprender las características de las enzimas y cómo funciona la enzima ha sido uno de los objetivos más importantes para los investigadores para las actividades académicas y para la comercialización, ya que los intereses en la aplicación de enzimas en la industria han crecido desde la industria alimentaria tradicional y en campos muy variados como la remediación del medio ambiente, la reutilización de recursos, la creación de nuevos procesos industriales para la creación de nuevos alimentos funcionales, la contribución al cribado diagnóstico y la investigación, así como a los tratamientos médicos (Azura, 2015).

La comprensión de las propiedades bioquímicas y los mecanismos de las enzimas a través de un análisis detallado de la actividad permite a los usuarios finales utilizar estas enzimas de manera efectiva, así como a los investigadores diseñar y producir nuevas enzimas con eficiencias catalíticas que pueden rivalizar con las de las enzimas naturales y/o con la capacidad de catalizar reacciones que no se encuentran de forma natural (Ben & Salleh, 2015).

La reacción catalizada por enzimas para la conversión de reactivos en productos ocurre en el sitio reactivo o sitio activo, generalmente descrito como una hendidura o bolsa donde se unen los sustratos, lo que luego desencadena un cambio conformacional de la enzima para luego continuar con la catálisis enzimática prevista, en la enzima que representa solo un segmento parcial de toda la estructura enzimática. Dado que la estructura de la enzima es compleja y delicada, es importante

conocer y comprender los muchos parámetros que afectan la actividad catalítica de la enzima. Entre los componentes centrales de la enzimología moderna o caracterización enzimática estándar se incluyen los factores que afectan la actividad y la estabilidad de las enzimas (pH, temperatura y concentraciones de moléculas pequeñas, incluidos sustratos enzimáticos, activadores e inhibidores), así como una buena comprensión de la catálisis y el mecanismo enzimático (Ben & Salleh, 2015).

2.6.1 pH

Los cambios en la concentración de iones de hidrógeno tienen una influencia significativa en la catálisis enzimática. La exploración de cómo el pH impacta la actividad enzimática proporciona conocimientos valiosos sobre el mecanismo de la catálisis enzimática y la naturaleza de los grupos ácidos y básicos en la enzima que están relacionados con dicho proceso (Fromm, 1975).

Asimismo, según Bisswanger (2002), debido a la naturaleza poliiónica de las enzimas, los grupos cargados que no participan directamente en la catálisis determinan el comportamiento del pH de las enzimas. En el sitio activo, la protonación es un proceso principalmente reversible, mientras que las variaciones en la carga de los residuos que sostienen la estructura pueden ocasionar alteraciones irreversibles en la conformación nativa.

Es sabido que las enzimas experimentan variaciones en su actividad en respuesta a alteraciones en el pH. El pH óptimo, que denota el nivel más propicio, indica el punto en el cual la actividad enzimática alcanza su punto máximo. pHs

enormemente elevados o inferiores suelen resultar en una completa pérdida de actividad de las enzimas. En general, las enzimas son más activas en un rango de pH entre 5 y 9, ya que las proteínas funcionan de manera óptima en un entorno que refleja estos niveles de Ph (Fromm, 1975).

2.6.2 Temperatura y termoestabilidad

La temperatura máxima sirve como un indicador de la estabilidad de una enzima. A elevadas temperaturas, la actividad enzimática experimenta un aumento hasta cierto punto, tras el cual la enzima sufre desnaturalización, resultando en la pérdida irreversible de su actividad (Bisswanger, 2002).

Illanes (2008), destaca que la temperatura constituye una variable de gran relevancia en cualquier sistema biológico, especialmente en lo que respecta a los procesos enzimáticos. Dado que las enzimas son proteínas complejas y sensibles, la biocatálisis implica su utilización en condiciones no naturales, lo que puede provocar alteraciones significativas en sus propiedades nativas. Por lo tanto, es de esperar que la temperatura influya notablemente en la eficacia de las enzimas, así como en su resistencia y durabilidad.

2.6.3 Iones metálicos

Se encuentra una gran variedad de iones metálicos en el medio ambiente y en los sistemas vivos. Cumplen muchas funciones en proteínas y enzimas, incluida la modificación de las estructuras de las proteínas, la mejora de la estabilidad estructural

de las proteínas en la conformación requerida para la función biológica o participan en los procesos catalíticos de las enzimas.

Es parte de una normal caracterización enzimática evaluar los efectos de los iones metálicos en la velocidad de reacción enzimática porque estos mismos pueden afectar a las enzimas de la siguiente manera: a) las metaloenzimas son una clase de enzimas que tienen uno o varios iones metálicos estrechamente unidos que participan directamente en los procesos catalíticos; b) las enzimas dependientes de metales o activadas por metales son otro grupo de enzimas que no poseen iones directamente unidos, sino que exhiben actividad catalítica solo en presencia de los iones metálicos; c) para las enzimas independientes de metales los iones no son participantes obligatorios de la reacción catalítica, pero su presencia influye en la actividad enzimática (Ben & Salleh, 2015).

Los iones metálicos pueden considerarse efectores, ya que tienen la capacidad de actuar como activadores o inhibidores de la actividad enzimática. La interacción de los metales a las enzimas desempeña un rol significativo en su activación y estabilidad (Bearne, 2014).

2.6.4 Cinética enzimática

Constante de Michaelis-Menten (Km) y velocidad máxima (V_{máx})

La relación entre la tasa inicial y la concentración del sustrato está representada por la ecuación matemática conocida como la ecuación de Michaelis-Menten, la cual se presenta a continuación:

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]}$$

Donde:

V_{máx}: Velocidad máxima (valor límite de la velocidad inicial cuando todos los sitios activos están ocupados).

K_m : Constante de Michaelis-Menten

[S] : Concentración de sustrato

Cuando hay poco sustrato, las enzimas no trabajan a toda capacidad, y la velocidad de la reacción depende de cuántas enzimas logren unirse al sustrato. Esta situación es análoga a una cinética de primer orden, donde la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración de sustrato. A altas concentraciones de sustrato, todos los sitios activos enzimáticos están saturados, y la velocidad de reacción alcanza un valor máximo independiente de la concentración de sustrato. En este escenario, se observa una cinética de saturación o de orden cero, donde la velocidad de reacción solo depende de la conversión del complejo enzima-sustrato (ES) en productos y de la difusión de los productos desde la enzima (Wilson et al., 2010). K_m es la cantidad de sustrato que necesitamos para que la reacción vaya a la mitad de su velocidad máxima, se expresa en unidades de molaridad. Por lo general, los valores de K_m se encuentran en el rango de 2×10^{-6} M y son relevantes ya que

permiten calcular la concentración de sustrato necesaria para saturar todos los sitios activos en la reacción enzimática (Illanes, 2008).

Según Illanes, la velocidad máxima de una reacción enzimática, $V_{m\acute{a}x}$, no es una constante absoluta, sino que varía proporcionalmente a la concentración de enzima. Esta dependencia debe considerarse al determinar los parámetros cinéticos y al comparar la actividad de diferentes enzimas.

2.7 Expresión heteróloga de enzimas

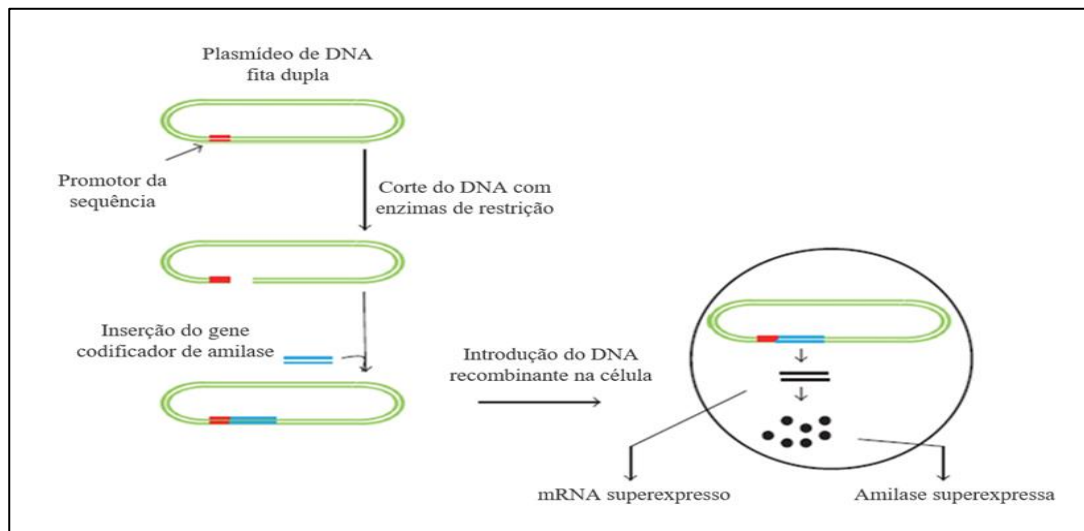
Uno de los mecanismos que permite obtener enzimas de interés de microorganismos para su uso en campos biotecnológicos es la expresión heteróloga, donde se utilizan organismos modelo para expresar dicha proteína de interés (Silva Neto, 2020), y se puede observar en la Figura 3. Esto se debe a que dicho proceso, junto con la ingeniería genética, puede determinar la estabilidad, actividad y especificidad de una enzima determinada, haciendo uso de múltiples copias de genes, promotores fuertes y péptidos señal eficientes. Cuando se realiza en organismos de fácil cultivo, aumenta la productividad en un período de tiempo más corto y reduce los costos de producción (Piscitelli et al., 2010).

La expresión heteróloga juega un papel fundamental en el descubrimiento y caracterización de nuevas enzimas, como se demuestra, por ejemplo, en la amilasa obtenida de *Bacillus alkalofillus* expresado en *Bacillus subtilis* (yang et al., 2011). Actualmente, se utilizan diferentes sistemas para la expresión heteróloga de proteínas, tanto eucariotas (levaduras, hongos, células de insectos o plantas) como

procarióticas . Las bacterias *Escherichia coli*, desde hace más de veinte años, ha sido el sistema más popular utilizado para la producción de proteínas recombinantes, entre todos los demás descritos. Factores como: la capacidad de ser cultivado en medios baratos y condiciones de laboratorio bien definidas; tiempo de crecimiento rápido; facilidad para seleccionar mutantes y manipulación genética; y la eficiencia en la incorporación de ADN exógeno lo convierten en uno de los sistemas más atractivos para este proceso (Silva Neto, 2020).

Figura 3

Tecnología de ADN recombinante para la producción de amilasas



Nota: Los pasos implican seleccionar un gen de amilasa eficiente, insertar el gen en el vector apropiado y transformarlo en un sistema de expresión eficiente para producir grandes cantidades de ARNm y proteína recombinantes. Extraído de Gopinath et al. (2017).

2.7.1 Sistemas de expresión génica

El primer paso crucial para producir una proteína mediante técnicas de recombinación es elegir el sistema de expresión adecuado, el cual consta de un organismo anfitrión y un vector de expresión diseñado para contener los elementos genéticos necesarios que permiten la transcripción y traducción del gen deseado dentro del organismo anfitrión. La selección del sistema de expresión más adecuado dependerá de diversos factores, entre los que se incluyen el origen biológico y las propiedades de la proteína de interés, las características de crecimiento del organismo huésped, los niveles de expresión y la localización celular de la proteína, la presencia de modificaciones postraduccionales y su impacto en la actividad biológica de la proteína, los aspectos regulatorios vinculados a su eventual aplicación, así como el coste económico asociado a todo el proceso (Gonzales et al., 2018).

En la actualidad existe una amplia variedad de sistemas de expresión disponibles para la producción a gran escala de proteínas recombinantes (Jia & Jeon, 2016), los cuales se dividen en dos categorías generales: sistemas procarióticos y sistemas eucarióticos.

2.7.2 Expresión génica en bacterias

En la mayoría de los casos, se prefieren los sistemas procarióticos debido a su fácil manipulación y costos relativamente bajos, siempre y cuando demuestren ser efectivos para los propósitos deseados(Fedulova et al., 2007).

Aparte de *E. coli*, se han utilizado con eficacia diferentes organismos huéspedes bacterianos para la síntesis de proteínas recombinantes, como *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus carnosus*, *Streptomyces sp*, entre otros (Chen, 2012).

2.7.3 *E. coli* como sistema de expresión

Aunque se han desarrollado y utilizado con éxito numerosos hospederos y sistemas de expresión *E. coli* es la herramienta primaria en los laboratorios de genómica y genética microbiana. Esto es válido tanto en el ámbito educativo de nuestras universidades como en la investigación llevada a cabo en instituciones científicas, consolidándose como el sistema de expresión más empleado para la producción de proteínas heterólogas (Rosano & Ceccarelli, 2014). Aproximadamente el 80 % de las proteínas cuya estructura tridimensional ha sido determinada y registrada en el PDB (Banco de Datos de Proteínas) fueron producidas mediante el método de expresión recombinante utilizando *E. coli* como organismo huésped (Sorensen & Mortensen, 2005).

2.7.4 Capacidad de *E. coli* para expresar enzimas

Indudablemente, *E. coli* es el organismo huésped más frecuentemente empleado en entornos de laboratorio y figura como uno de los más significativos a nivel industrial. Esto se debe al extenso conocimiento existente sobre su fisiología y genética, lo cual simplifica considerablemente las tareas de clonación y cultivo (Peti & Page, 2007). Gracias a su rápido crecimiento, bajo costo de cultivo y alta capacidad

para producir proteínas, *E. coli* se ha convertido en una herramienta esencial en la biotecnología, funcionando como una 'fábrica' celular. Las cepas de *E. coli* utilizadas en la producción recombinante han sido sometidas a manipulación genética mediante la eliminación de los genes asociados con los mecanismos de patogenicidad, lo que las convierte en hospederos considerados seguros para procesos de fermentación a gran escala (Jia & Jeon, 2016).

2.7.5 Sistemas de expresión de *E. coli*

En la actualidad, existen diversas cepas comerciales de *E. coli* que han sido modificadas genéticamente para adaptarse a aplicaciones específicas, y se pueden visualizar en la Tabla 1 (Saida et al., 2005).

Tabla 1

Cepas de E. coli empleadas regularmente para la expresión de proteínas recombinantes

Cepa	Características	Uso recomendado
BL21	<ul style="list-style-type: none"> • Carente en las proteasas lon y OmpT. • No posee T7 RNA pol. 	Expresión de genes recombinantes controlada por promotores reconocidos por la polimerasa de RNA de <i>E. coli</i> , como lac, tac, trc y T5.
BL21(DE3)	<ul style="list-style-type: none"> • Proviene de BL21. • Incluye el profago λDE3 que lleva el gen de la 	Expresión de genes recombinantes bajo el control de promotores T7,

Cepa	Características	Uso recomendado
	<p>RNA polimerasa T7, controlado por el promotor lacUV5, el cual puede ser inducido mediante IPTG.</p>	<p>T7-lac, y otros promotores reconocidos por la RNA polimerasa de <i>E. coli</i>.</p>
BL21(DE3)con pLysS	<ul style="list-style-type: none"> • Proviene de BL21. • Incorpora el profago λDE3, que lleva el gen de la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor lacUV5. • Incluye el plásmido pLysS, que contiene el gen de la lisozima T7 (LysS), un inhibidor de la T7 RNA polimerasa, lo que ayuda a evitar la expresión basal en cultivos que no han sido inducidos con IPTG. 	<p>Producción recombinante utilizando vectores con promotores T7, ideal cuando se necesita un control más estricto de la expresión basal.</p>
BL21(DE3)pLysE	<ul style="list-style-type: none"> • Proveniente de BL21. • Incluye el profago λDE3, que alberga el gen de la T7 RNA polimerasa, 	<p>Producción recombinante utilizando vectores que se basan en promotores T7, en situaciones donde se necesita un estricto control sobre la expresión basal.</p>

Cepa	Características	Uso recomendado
	<p>regulado por el promotor lacUV5.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Posee el plásmido pLysE, que produce mayores niveles de T7 lisozima que pLysS. 	<p>Es particularmente adecuada para la producción de proteínas que resultan tóxicas para <i>E. coli</i>.</p>
BL21-SI y BL21-AI	<ul style="list-style-type: none"> • BL21-SI proviene de la cepa “salt-inducible” GJ1158. Esta cepa posee el gen de la T7 RNA polimerasa regulado por el promotor proU, cuya activación se da en respuesta a la concentración de sal en el medio. • Por otro lado, BL21-AI incluye el gen de la T7 RNA polimerasa regulado por el promotor araBAD, que se activa en presencia de arabinosa. 	<p>Ambas cepas permiten un control riguroso de la expresión basal de proteínas recombinantes, siendo particularmente adecuadas para la producción de proteínas que resultan tóxicas para <i>E. coli</i>.</p>
CD41(DE3) y CD43(DE3)	<ul style="list-style-type: none"> • Proviene de la cepa BL21(DE3). Incluyen el profago λDE3, que lleva 	<p>Expresión de proteínas tóxicas y proteínas de membrana de diversos</p>

Cepa	Características	Uso recomendado
	<p>el gen para la T7 RNA polimerasa regulado por el promotor lacUV5.</p> <ul style="list-style-type: none"> Presentan mutaciones no detalladas que evitan la muerte celular asociada con la expresión de proteínas. 	<p>organismos, tanto procariontes como eucariotas, incluyendo insectos, plantas y mamíferos.</p>
<p>Rosetta (DE3) y Rosetta 2 (DE3)</p>	<ul style="list-style-type: none"> Provenientes de la cepa BL21. Estas variantes incluyen el profago λDE3, que lleva el gen para la T7 RNA polimerasa regulado por el promotor lacUV5. Además, poseen el plásmido pRARE o pRARE2, los cuales contienen genes que codifican para tRNA específicos para los codones AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA (pRARE) y AGA, AGG, 	<p>Se utilizan para la expresión de genes eucarióticos que incluyen codones poco frecuentes en <i>E. coli</i>. También son adecuados para la expresión de genes provenientes de procariontes que están filogenéticamente distantes de <i>E. coli</i> y que contienen codones infrecuentes.</p>

Cepa	Características	Uso recomendado
	AUA, CUA, GGA, CCC, CGG (pRARE2).	
BL21 CodonPlus y BL21 CodonPlus (DE3)	<ul style="list-style-type: none"> • Procedentes de BL21-Gold • Incluyen los genes para los tRNA que codifican los codones AGG, AGA, AUA, CUA, y CCC. 	Expresión de genes recombinantes que presentan codones poco comunes para <i>E. coli</i> , abarcando tanto genes procariotas como eucariotas.
Origami (DE3)	<ul style="list-style-type: none"> • Procede de K12. • Incorpora el profago λDE3, que alberga el gen de la T7 RNA polimerasa regulado por el promotor lacUV5. • Presenta mutaciones en los genes <i>trxB</i> (tiorredoxina reductasa) y <i>gor</i> (glutación reductasa), lo que favorece la formación de puentes disulfuro en el citoplasma. 	Expresión de proteínas recombinantes que necesitan la formación de puentes disulfuro para lograr su estructura nativa.

Cepa	Características	Uso recomendado
ArcticExpress (DE3)	<ul style="list-style-type: none"> • Proveniente de BL21-Gold. • Incluye el profago λDE3 que lleva el gen para la T7 RNA polimerasa, regulado por el promotor lacUV5. • Posee los genes para las chaperoninas Cpn10 y Cpn60 de <i>Oleispira antarctica</i>, que tienen una alta homología con las chaperoninas GroEL y GroES de <i>E. coli</i>, pero son particularmente eficaces a temperaturas de cultivo bajas. 	<p>Expresión de proteínas recombinantes que tienen tendencia a formar cuerpos de inclusión. La coexpresión de las chaperoninas Cpn10 y Cpn60, combinada con el cultivo a temperaturas bajas (entre 15 y 25 °C), puede mejorar considerablemente la cantidad de proteína soluble y funcional.</p>

Nota: Extraído de Gonzales et al. (2018)

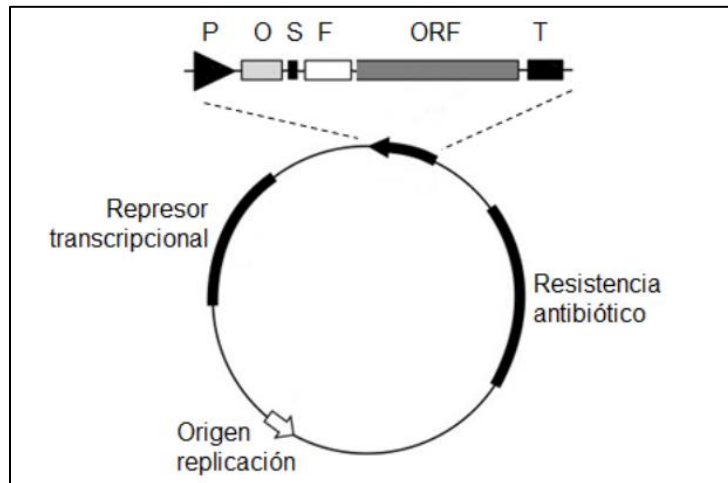
2.7.6. Vectores de expresión

Los vectores de expresión utilizados en sistemas procarióticos suelen ser plásmidos generados mediante manipulación genética y diseñados de manera precisa para asegurar niveles objetivos de producción de la proteína deseada. La arquitectura de los vectores de expresión está diseñada para asegurar su mantenimiento en la célula huésped y la expresión controlada del gen clonado. Estos

vectores contienen elementos como el origen de replicación, promotores regulables, sitios de unión a ribosomas y señales de terminación de la transcripción, además de marcadores de selección que permiten identificar las células que han incorporado el plásmido. Además, como parte de la estructura del vector, puede incluirse un gen regulador que actúe directamente (mediante la unión al operador) o indirectamente sobre el promotor, modulando su actividad y permitiendo ajustar los niveles de expresión de acuerdo con los objetivos de síntesis de la proteína específica (Terpe, 2006).

Figura 4

Componentes esenciales de un vector plasmídico utilizado en la expresión heteróloga en E. coli



Nota: F: sitio de fusión, ORF: sitio codificadora del gen de interés, S: secuencia de unión al ribosoma, O: operador, P: promotor, T: terminador. Extraído de Gonzales et al. (2018).

Tabla 2

Ejemplos de vectores plasmídicos empleados para la expresión recombinante en E. coli

Vector	Promotor/ repressor	Resistencia	Fusión	Cepa hospedera	Aplicación
pET-28a(+)	T7/Lacl	Kanamicina	N-His C-His	BL21(DE3)	Sobreexpresión inducido por IPTG, purificación por IMAC.
pET-20b(+)	T7	Ampicilina	C-His Péptido señal	BL21(DE3)	Sobreexpresión inducido por IPTG en periplasma, purificación por IMAC.
pET-32a(+)	T7/Lacl	Ampicilina	N-Trx N-His C-His	Origami(DE3)	Sobreexpresión de proteínas con puentes disulfuro, purificación por IMAC.
pGEX-4T-3	tac	Ampicilina	N-GST	BL21	Purificación por afinidad a glutatión.
pETDuet-1	2x(T7/Lacl)	Ampicilina	N-His C-S	BL21(DE3)	Co-expresión de dos proteínas, purificación independiente por IMAC y afinidad a proteína S.

Nota: Extraído de Gonzales et al.(2018)

2.8 Enzimas recombinantes y su importancia

La producción de enzimas recombinantes implica la utilización de la tecnología de ADN recombinante, que incluye el aislamiento del gen específico de la enzima deseada de una fuente natural, su inserción en un vector de expresión y su transferencia a un organismo huésped adecuado, permitiendo su producción controlada. Se recomienda elegir de antemano un huésped que sea más fácil de manipular, como *E. coli*. La enzima recombinante se produce como una proteína intercelular o extracelular y debe someterse a un proceso de purificación y formulación antes de poder usarse en aplicaciones adicionales (Azura,2015).

Las enzimas se pueden obtener de una variedad de fuentes incluidas plantas, animales, humanos y microorganismos. Hoy en día, muchas enzimas disponibles comercialmente se adquieren a través de medios biotecnológicos empleando técnicas en la tecnología del ADN recombinante. La tecnología del ADN recombinante ha permitido preparar grandes cantidades de enzimas en un corto período de tiempo y reducir costos en diversos ámbitos industriales y biotecnológicos. Además, muchas enzimas para la investigación y el desarrollo producidas mediante tecnologías de ADN recombinante son nuevas y no se han caracterizado anteriormente (Farah Fadwa 2020).

En la vida, muchas reacciones dependen de enzimas que son activas en condiciones suaves, como a temperatura ambiente y el pH neutro. Sin embargo, no todos los microorganismos producen naturalmente enzimas en esas condiciones. Por

lo tanto, la ingeniería genética ha traído consigo la solución para obtener enzimas recombinantes que han mostrado trabajar de manera óptima y mejorada en diferentes entornos específicos (Ben & Salleh, 2015).

2.8.1 Aplicación de enzimas recombinantes

Las enzimas recombinantes pueden ser utilizados de las siguientes maneras:

- Para desarrollar nuevos productos y servicios, lo que puede ayudar a las industrias a mantenerse competitivas. Por otro lado, al mejorar la sostenibilidad de sus operaciones, son biodegradables y no producen residuos tóxicos, lo que ayuda a las industrias a reducir su impacto ambiental (OTRI,2024).
- La industria alimentaria utiliza enzimas recombinantes para mejorar la textura, el sabor y la vida útil de los alimentos. Así mismo, para convertir el almidón en azúcares simples, lo que ayuda a endulzar los alimentos (OTRI,2024). Por ejemplo, la quimosina recombinante se utiliza para fabricar queso y la somatotropina bovina recombinante se utiliza para aumentar la producción de leche de alta calidad en vacas (Azura,2015).
- Las enzimas recombinantes también se usan en la industria de los detergentes, para eliminar la suciedad rebelde, descomponer las grasas y las proteínas, lo que ayuda a limpiar las superficies, utilizando proteasas recombinantes (Azura,2015).

- En la industria cosmética también se manipula ampliamente la enzima proteasa recombinante, porque mejora la penetración de ingredientes activos en la piel (Azura,2015).
- Otra enzima recombinante importante es la pectinasa, la cual se utiliza en la fabricación de papel y procesamiento de textiles, así como en alimentos para animales y equipos de laboratorio (Azura,2015).

La clonación de enzimas es una tecnología prometedora que tiene el potencial de revolucionar una amplia gama de industrias.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Muestra biológica

Para cumplir los objetivos de la presente tesis, se utilizó la cepa recombinante de *Escherichia coli ArcticExpress* (DE3), la cual fue sometida previamente a un proceso de transformación para expresar el gen (*Gluc A*), que codifica a la enzima α -glucosidasa en el vector PET28a⁺. El vector construido fue proporcionado previa coordinación, con el proyecto de investigación: “Aplicación de tecnología del ADN recombinante en la generación de cocteles enzimáticos para la biodegradación de residuo orgánico vegetal” que viene ejecutando el Laboratorio de Investigación de Biotecnología Enzimática de la UNJBG.

3.2 Diseño de investigación

Este estudio es de naturaleza experimental básica. Para la medición y el análisis estadístico de los datos, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) con el software STATGRAPHICS 19, de acuerdo con los objetivos del estudio, con una significancia igual a $p < 0,05$ (95 % de confianza) para la determinación de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Para el contraste de las hipótesis H_0 y H_1 fueron:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$ (Las medias de las poblaciones, tratamientos, grupos iguales)

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \dots$ (No todas las μ_k son iguales)

Para la evaluación del efecto del cambio de temperatura y pH sobre la actividad de la α -glucosidasa recombinante (variable respuesta). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) junto con la prueba de Tukey para realizar comparaciones múltiples entre las medias de los distintos tratamientos. Se consideraron 7 niveles para el factor pH y temperatura.

Tabla 3

Valores de entrada en ANOVA para comparación de medias

Parametros	Valor mínimo						Valor máximo	Unidad
Temperatura	30	40	50	60	70	80	90	°C
pH	3	4	5	6	7	8	9	pH

Todos los ensayos experimentales se realizaron por triplicado para el desarrollo del análisis estadístico descriptivo. En donde se empleó estadísticos como la media, coeficiente de variación (CV) y desviación estándar (DE) para la evaluación de efectos de iones metálicos y estabilidad térmica. El software estadístico Origin Pro 2024 se usó para generar representaciones gráficas basadas en el análisis descriptivo obtenido.

Para los parámetros cinéticos de la α -glucosidasa, como la constante de Michaelis (Km) y la velocidad máxima (V_{máx}), se determinó la relación entre la cantidad de sustrato y la actividad enzimática utilizando el software OriginPro 2024,

en donde se introdujeron los datos de concentración del sustrato (mg/mL) y velocidad de reacción ($\mu\text{mol/ min/ mL}$). A continuación, se utilizó la función de ajuste no lineal para estimar los parámetros cinéticos de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten y, se validó el ajuste mediante el coeficiente de determinación (R^2), y los resultados se mostraron en un gráfico de curva ajustada junto a los datos experimentales resultantes en una pequeña tabla.

3.3 Materiales y equipos

3.3.1 Material biológico

- Cepa de *Escherichia coli ArcticExpress* (DE3)

3.3.2 Reactivos

- Ácido dinitrosalicílico (DNS)
- Colorante de Coomassie Blue G-250
- Dodecil sulfato sódico (SDS)
- Sulfato de cobre (CuSO_4)
- Reactivo de Bradford
- Seroalbúmina bovina (BSA)
- Cloruro de Manganeso (MnCl_2)
- Cloruro de Magnesio (Mg Cl_2)
- Cloruro de Calcio (Ca Cl_2)
- Cloruro de Potasio (KCl_2)
- Sulfato de Zinc (ZnSO_4)

- Sulfato de Hierro (FeSO_4)
- Cloruro de Sodio (NaCl_2)
- Cloruro de Bario (BaCl_2)
- Cloruro de Cobalto (CoCl_2)
- Cloruro de Mercurio (HgCl_2)
- Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)
- Poliacrilamida ($(\text{C}_3\text{H}_5\text{NO})_n$)
- Almidón soluble ($(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$)
- Agua ultra pura (H_2O)

3.3.3 Material de laboratorio

- Caja de plástico para puntas 10 y 100 μL
- Caja de plástico para puntas 1000 μL
- Algodón
- Espátula doble de acero inoxidable
- Frascos de vidrio transparente con tapa rosca 200 mL
- Gradillas para microtubos
- Guantes de nitrilo de Talla S
- Guantes de látex de Talla S
- Matraz Erlenmeyer 250 mL y 500 mL
- Micropipeta de 10 -200 μL

- Micropipeta de 100-1000 μL
- Puntas de plástico para micropipetas 1000 μL
- Puntas de plástico para micropipetas 10 y 100 μL
- Microtubos para centrifuga de 1,5 mL
- Microtubos para centrifuga de 2 mL
- Microplacas 250 μL
- Probeta de 50 y 250 mL
- Vasos precipitados de 100, 250, 500 mL
- Plástico film
- Tijeras
- Pinzas metálicas
- Papel aluminio
- Papel Kraft
- Alcohol
- Tubos de ensayo
- Tubos de plástico (Falcon) de 15 y 50 mL

3.3.4 Equipos

- Balanza analítica
- Autoclave
- Ultrafreezer
- Termociclador
- Centrífuga con sistema de refrigeración
- Cámara de electroforesis vertical (BIO-RAD)
- Potenciómetro
- Cocina eléctrica
- Incubadoras
- Cabina de flujo laminar
- Refrigerador
- Vórtex
- Lector de microplacas (Epoch)
- Sistema de ultrafiltración (AMICON)
- Agitador (Shaker)
- Baño maría digital
- Refrigerador

3.4 Métodos

3.4.1 Producción de la enzima α -glucosidasa recombinante

3.4.1.1 Condiciones de cultivo de la cepa recombinante *E. coli*

ArcticExpress(DE3)

La preservación del stock de la cepa de *E. coli* ArcticExpress(DE3) [pET28 AG] se realizó en microtubos bajo congelamiento en un untrafreezer (-70 °C) y se puede observar en el Anexo 1

Para reactivar la cepa recombinante *E. coli* ArcticExpress(DE3) se empleó el caldo Luria Bertani (LB), este medio contenía peptona de caseína (10 g/L) y extracto de levadura (5 g/L) componentes que proveen los nutrientes esenciales para el desarrollo óptimo de la mayoría de los microorganismos. Asimismo, contiene NaCl (10 g/L) que contribuye a mantener el equilibrio osmótico en el medio (Miller, 1972). Las condiciones de uso del medio para la reactivación de la cepa fueron de 37 °C con agitación de 180 rpm (Buiza Urdanivia, 2021).

3.4.1.2 Preparación de Inóculo y masificación de *E. coli*

ArcticExpress(DE3)

Para este procedimiento se tomó 10 μ L del cultivo criopreservado de la cepa *E. coli* ArcticExpress(DE3) y se cultivó en 5 mL de caldo Luria Bertani (LB) en donde se adicionó el antibiótico kanamicina en proporción de 1 μ L/mL, y se dejó durante 5 - 6 horas bajo condiciones de incubación de 37 °C a 180 rpm.

Posteriormente, para el proceso de masificación, se agregó la totalidad del pre inóculo preparado (5mL) en 250mL de medio LB, con el antibiótico kanamicina en las mismas proporciones, y se dejó en incubación a 37 °C por 12 horas con agitación de 180 rpm, hasta alcanzar un $DO_{600} = 0,5 - 0,6$ (Rodríguez et al., 2016).

3.4.1.3 Inducción de *E. coli* para la expresión de la α -glucosidasa

Al cabo de las 12 horas de incubación con una $DO_{600} = 0,5 - 0,6$ se procedió a la inducción para la expresión de la enzima recombinante α -glucosidasa adicionando 19 mL de Lactosa para 250 mL (14 g/L) a 30 °C. Posterior a ello, se dejó en incubación por 6 horas adicionales bajo condiciones de 30 °C a 180 rpm (Buiza Urdanivia, 2021).

3.4.1.4 Obtención de la enzima recombinante

- **Primera centrifugación**

El cultivo inducido, se centrifugó a 6000 rpm por 15 min a 8 °C. Seguido a ello, se eliminó el sobrenadante y se reservó el pellet celular para la siguiente etapa.

- **Sonicación**

El pellet celular reservado, se resuspendió en 10 mL de solución lisis (Tris HCl 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, con pH de 7) para obtener las proteínas intracelulares en disolución, previa a una disrupción celular. Las muestras se sonicaron bajo 3 ciclos

compuestos por 1 pulso intermitente durante 3 min (ON) a 50 % de amplitud, y 1 min OFF (Balcucho Escalante, 2017).

- **Segunda Centrifugación**

Posterior al proceso de sonicado, las muestras se sometieron a una segunda centrifugación bajo las siguientes condiciones: 8 °C, 10 min a 10000 rpm. Al término de ello, se desechó el pellet y se guardó el sobrenadante, el cual corresponde a las proteínas intracelulares solubles, para los posteriores pasos de purificación (Pérez Márquez, 2016).

3.4.2 Cuantificación de proteínas

Se cuantificó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford empleando una curva de calibración con seroalbúmina bovina (BSA) como solución patrón (1mg /mL). Para generar las diferentes concentraciones se tomaron varios volúmenes del patrón (0,2,4,6,8,10 y 12 μ L) y se completó con H₂O a un volumen final de 20 μ L. Luego, se agregó 200 μ L de reactivo Bradford, se mantuvo por 5 min a temperatura ambiente y, se llevó a leer en un lector de microplacas (Epoch) a una longitud de onda de 595 nm. En base a la curva que se obtuvo previamente, se determinó la concentración de proteínas (Bradford, 1976).

3.4.3 Determinación de actividad enzimática

La medición de actividad de la enzima α -glucosidasa se realizó de acuerdo a la Tabla 4.

Tabla 4

Proporciones para la medición de actividad enzimática de α -glucosidasa recombinada

Reactivos	Blanco de reactivo (BR)	Blanco de sustrato (BS)	Blanco de la enzima (BE)	Reacción Enzima Sustrato (ES)
H ₂ O	50	20	10	10
Almidón (1 %) diluido en tampón (μ L)	-	30	-	30
Enzima (μ L)	-		10	10
Tampon (Fosfato de Sodio pH 7 a 0,1 M) (μ L)	-	-	30	-
Incubar por 20 minutos a 60 °C.				
Reactivo DNS (μ L)	100	100	100	100
Hervir durante 5 minutos e inmediatamente enfriar en baño de agua corriente				
100 μ L leer en equipo Epoch				

3.4.4 Purificación de la enzima α -glucosidasa recombinante

3.4.4.1 Purificación por cromatografía de afinidad IMAC

Habiendo realizado el paso anterior, la enzima α -glucosidasa, se empaquetó en una columna (12mm x 100 mm) con resina de Sefarosa-Níquel, con el fin de lograr un lecho de 2,5 mL, para ejecutar la cromatografía de afinidad por ion metálico

inmovilizado (IMAC). Gracias a la afinidad entre el níquel de la resina y el His-Tag de la proteína, esta última queda retenida en la columna cromatográfica. La columna se equilibró con un lavado de NaCl (1,5 M) a 3 volúmenes y agua a 10 volúmenes, finalmente con tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM a pH 7 con NaCl 300 mM e imidazol a 10 mM. El sobrenadante que se obtuvo después de la segunda centrifugación (≈ 24 mL) se cargó y dejó interaccionando con la resina en la columna por 12 h. Luego, se realizó lavados usando el tampón ya mencionado para recolectar las proteínas que no interaccionaron con la resina. Finalmente se eluyó las proteínas fijadas en la resina con 5 mL de buffer de elución, la cual contenía Imidazol a 500 mM. El eluido obtenido se recolectó para su análisis en electroforesis de proteínas por SDS-PAGE y medición de actividad enzimática (Olivos Hernández, 2020).

Una vez obtenido el eluido enzimático tras la purificación por IMAC, se realizó una ultrafiltración con el dispositivo Amicon® Ultra-4 10 K (Millipore, EE. UU) para eliminar sales y componentes no deseados. El eluido se resuspendió con tampón fosfato de sodio a 0,1 M y pH 7, y se centrifugó a 7000 rpm durante 7 minutos, repitiendo 5 veces o hasta que el eluato no presentara actividad enzimática. La α -glucosidasa concentrada se guardó a 4 °C en un tubo Eppendorf de 2 mL para su uso posterior (Magwaza et al., 2024).

3.4.4.2 Electroforesis de proteínas SDS-PAGE

Se utilizó electroforesis vertical en condiciones desnaturizantes para separar las proteínas. Las muestras se acondicionaron en una proporción de 4:1 con buffer

de muestra 4X, se sometieron a ebullición durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas, y luego se cargaron en geles de bis-acrilamida al 12 % (p/v) a pH 8,8 como gel separador, y gel de apilamiento al 4 % (p/v) a pH 6,8 preparados con SDS al 0,1 % (p/v). Un volumen total de 10 μ L de muestra se cargó en cada carril del gel de apilamiento junto al marcador de peso molecular.

La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V a 4 °C, utilizando buffer de corrida 10X durante dos horas. Para visualizar las proteínas en el gel de poliacrilamida, se tiñó durante 1 hora con azul brillante de Coomassie a 50 °C con agitación (80 rpm). Luego, se realizó el desteñido con una solución de metanol al 50 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v) por 1 hora a 50 °C.

Para la determinación del peso molecular, se utilizó un patrón comercial de proteínas conocidas de 10 a 225 kDa, visualizado junto a las bandas de la proteína en estudio al final del desteñido del gel (Buiza Urdanivia, 2021). El peso molecular se estimó observando las bandas presentes en el gel y comparando sus posiciones con las del marcador molecular, utilizando el programa Vision Capt versión 16,08 (Magwaza et al., 2024).

3.4.5 Caracterización fisicoquímica de la enzima α -glucosidasa recombinante

3.4.5.1 Efecto del pH y determinación de su valor óptimo

Para evaluar el efecto del pH en la actividad enzimática de la α -glucosidasa recombinada y determinar su valor óptimo, se realizaron ensayos según el ensayo estándar descrito en la Tabla 4. Se usaron buffers como citrato fosfato de sodio a 0,1

M para pHs de 3, 4, 5, 6, 7 y 8, y glicina/NaOH 0,1 M para pH 9. Los resultados se procesaron utilizando los programas STATGRAPHICS y Origin Pro 2024 para generar las gráficas (Hinojosa Calderón, 2020).

3.4.5.2 Efecto de la temperatura y determinación de su valor óptimo

Para determinar la temperatura óptima para la actividad de la enzima en estudio, se siguió el procedimiento estándar descrito en la Tabla 4, evaluando temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 °C con un incremento de 10 °C entre cada ensayo. Cada prueba se realizó por triplicado, y se analizó la actividad enzimática resultante para cada temperatura.

3.4.5.3 Efecto de iones metálicos

Para evaluar el efecto de iones metálicos en la actividad de la enzima α -glucosidasa, se prepararon soluciones de CuSO_4 , MgCl_2 , MnCl_2 , ZnSO_4 , CaCl_2 , KCl , BaCl_2 , FeSO_4 , NaCl y HgCl_2 en concentraciones de 1 mM, 2 mM y 5 mM. La actividad enzimática se midió siguiendo el ensayo estándar mostrado en la Tabla 14, reemplazando el volumen de H_2O (10 μL) por el volumen de cada ion metálico. Cada ensayo se realizó por triplicado y se dejó en preincubación con la muestra de enzima purificada (10 μL) durante 45-60 minutos. Además, se realizaron ensayos control para cada concentración de ion trabajada, sin la adición de ningún ion, tomándose este como referencia del 100 % para determinar la actividad relativa (Hinojosa Calderón, 2020).

3.4.5.4 Termoestabilidad

Para evaluar la termoestabilidad, se sometió la enzima a diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 °C) y se midió la actividad enzimática en intervalos de 30, 60, 120, 240 y 360 minutos (6 horas) de incubación a esas temperaturas, tomando muestras de 10 µL por triplicado en cada intervalo de tiempo (Hinojosa Calderón, 2020). Además, se realizaron ensayos enzimáticos con la muestra de enzima pura, evaluada a temperatura y pH óptimos, sin la incubación de 6 horas. Estos ensayos se tomaron como representativos del 100 % de la actividad enzimática (Bonfá et al., 2018). Las curvas de termoestabilidad se generaron utilizando el programa OriginPro 2024.

3.4.6 Caracterización cinética

3.4.6.1 Determinación del K_m y $V_{m\acute{a}x}$

Para analizar la cinética enzimática, se determinó la velocidad de reacción a diferentes concentraciones de sustrato en mg/mL (1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30), utilizando almidón al 3% (p/v) a fin de poder determinar la velocidad para cada una de estas. Mediante la ecuación de Michaelis - Menten se calcularon los valores del K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la α -glucosidasa recombinante a través del ajuste no lineal de la curva de velocidad enzimática frente a la concentración de sustrato, en el programa OriginPro2024 (Hinojosa Calderón, 2020)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Producción de la enzima α -glucosidasa recombinante

Tabla 5

Evaluación de producción de la enzima α -glucosidasa recombinante

	Proteínas totales (mg/mL)	Actividad enzimática (U/mL)
Extracto crudo	13, 090	11,780

La tabla 5 muestra , que el extracto crudo contiene una cantidad significativa de proteínas totales y actividad enzimática de la enzima α -glucosidasa recombinante producida por *E. coli* . La concentración de proteínas totales fue de 13,090 mg/mL, lo que indica que el extracto crudo está enriquecido con la enzima en estudio. Además, se observa una actividad enzimática de 11,78 U/mL lo que indica que la enzima es funcional catalíticamente. Se empleó fermentación sumergida para la producción.

4.2 Purificación de la enzima α -glucosidasa recombinante

Tabla 6

Purificación por cromatografía de afinidad (IMAC)

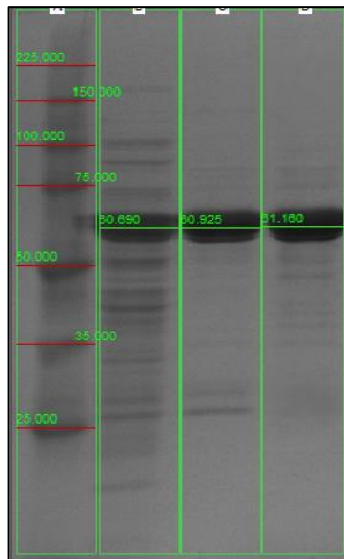
	Proteínas totales (mg/mL)	Actividad enzimática (U/mL)
Eluido (IMAC)	10,960	48,600

En la Tabla 6 se muestran los valores de proteínas totales y actividad enzimática del eluido obtenido tras el proceso de purificación por el método de cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) que fue de 10,960 mg/mL y 48,600 U/mL respectivamente, se puede apreciar que a diferencia de la actividad del extracto crudo el eluido aumentó hasta 3 veces respecto a la actividad enzimática de la enzima α -glucosidasa recombinante.

4.2.1 Análisis por electroforesis en gel SDS-PAGE

Figura 5

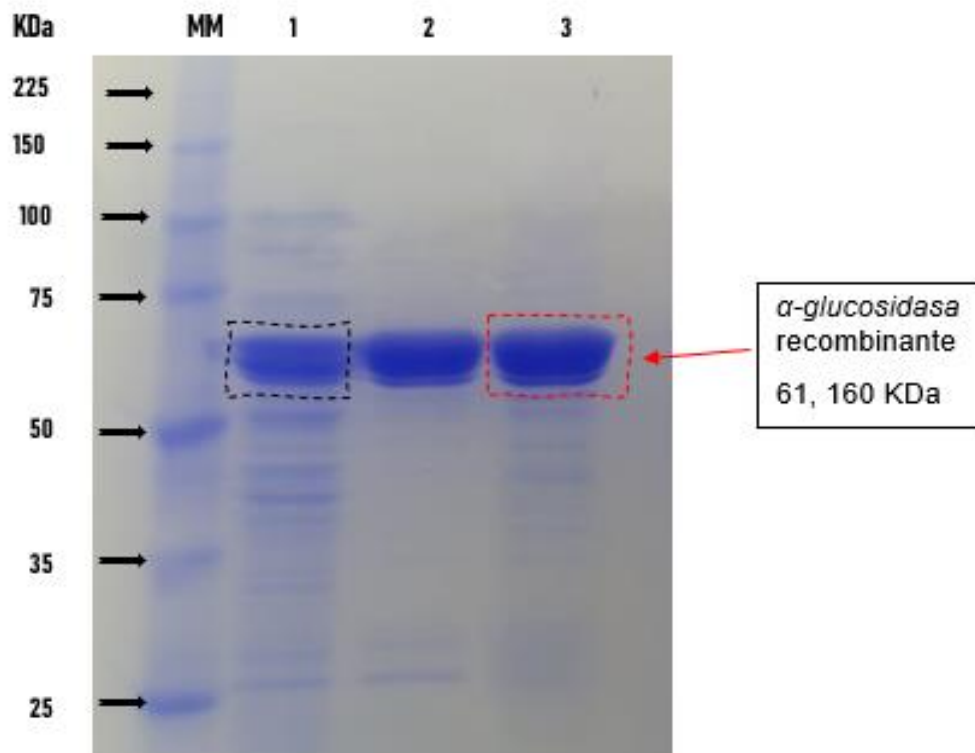
Electroforesis de α -glucosidasa recombinante



Nota: Estimación del peso molecular de las bandas resultantes en el gel de poliacrilamida SDS-PAGE de la α -glucosidasa recombinante, en el programa de Vision Capt 16.08.

Figura 6

Electroforesis SDS-PAGE de las fases de purificación



Nota: Carril 1= extracto crudo; carril 2=eluido obtenido por IMAC; carril 3= concentrado ; MM= Marcador molecular de proteína

En la Figura 6, el carril 3 muestra una banda predominante con un peso molecular aproximado de 61,160 kDa, correspondiente a la α -glucosidasa ultrafiltrada. Esta banda es más definida y presenta menos interferencias de otras, en comparación con el carril 1, que representa al perfil de proteínas del extracto crudo. En este carril, se puede distinguir la banda de la proteína de interés, sin embargo también aparecen

otras adicionales con pesos moleculares entre 25 y 100 kDa, indicando la presencia de proteínas no deseadas o impurezas. El carril 2 muestra las fracciones proteicas del eluido obtenido mediante el método IMAC. La banda de interés también se visualiza significativamente mejor en comparación con el carril 1, con un peso molecular aproximado de 60 kDa, lo que sugiere que el proceso de purificación ha sido exitoso y ha reducido de manera óptima las bandas no deseadas, logrando el grado de pureza deseado de la enzima en estudio.

Tabla 7*Fases de purificación de la enzima α -glucosidasa recombinante*

ETAPAS	VOLUMEN (mL)	Actividad enzimática (U/mL)	Proteínas totales (mg/mL)	Actividad Total (U)	Proteínas totales (mg)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extraído crudo	23,9	11,780	13,090	281,54	312,851	0,900	1,000	100 %
Eluido (IMAC)	5,4	48,600	10,960	262,44	59,18	4,434	4,927	93 %
Ultrafiltrado	1	240,560	27,900	240,56	27,9	8,622	9,581	85 %

La Tabla 7 presenta las etapas de purificación de la enzima α -glucosidasa recombinante, dividida en tres fases: obtención del extracto crudo, obtención del eluido por IMAC y el concentrado. La actividad enzimática final (ultrafiltrado) alcanzó 240,560 U/mL, y la actividad específica se incrementó de 0,900 a 8,622 U/mg. Además, la tabla evidencia que se logró purificar la enzima casi 10 veces, con un factor de purificación de 9,581, lo que indica una reducción significativa de impurezas, alcanzando un rendimiento del 85 %.

4.3 Caracterización de la enzima α -glucosidasa

4.3.1 Efecto de la temperatura en la actividad de la enzima α -glucosidasa recombinante

Tabla 8

Análisis de estadística descriptiva de los tratamientos de la actividad de α -glucosidasa recombinante frente a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Recuento	Media (U/mL)	Desviación estándar	CV
30	3	11,529	1,1589	0,1005
40	3	19,882	1,1342	0,0571
50	3	38,667	1,4186	0,0367
60	3	87,882	1,2722	0,0145
70	3	24,667	0,7831	0,0380
80	3	4,235	0,5129	0,1211
90	3	-0,392	0,3783	-0,9644

Nota: CV=Coeficiente de variación

La Tabla 8 presenta un análisis comparativo de la actividad de la enzima α -glucosidasa en siete tratamientos con temperaturas que varían entre 30 y 90 °C, evaluando su efecto en unidades enzimáticas (U/mL). Los resultados muestran una diferencia notable en los valores medios de la actividad enzimática, con un máximo alcanzado a 60 °C y valores mínimos a 30 °C, 80 °C y 90 °C. Estos datos sugieren que la temperatura óptima para la actividad de la α -glucosidasa es de 60 °C.

Por otro lado, en la Tabla 9 se presenta un análisis de varianza ordinario (ANOVA) para evaluar la influencia de la temperatura en la actividad de la α -glucosidasa . Se puede observar el valor-F de 2599,08 que indica una marcada diferencia de variabilidad entre grupos (diferencias entre las medias de los tratamientos) en comparación con la variabilidad dentro de los grupos (variabilidad dentro de cada tratamiento). Además, el valor-P asociado a la prueba-F es inferior a 0,05, lo que evidencia una diferencia estadísticamente significativa en las medias de la actividad enzimática en los diferentes niveles de temperatura, con un nivel de confianza del 95 %. Estos resultados respaldan los resultados presentados en la Tabla 8.

Tabla 9

Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad enzimática de α -glucosidasa frente a diferentes temperaturas

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
Entre grupos	16217,6	6	2702,94	2599,08	0,0000
Intra grupos	14,5594	14	1,03996		
Total	16232,2	20			

La Tabla 10 muestra los resultados de las comparaciones múltiples entre los tratamientos, realizadas con la prueba de Tukey, con el objetivo de identificar qué medias difieren significativamente entre sí. Se identificaron siete grupos distintos, mostrando diferencias significativas en las medias de actividad enzimática entre los tratamientos. Es relevante señalar que la mayor actividad enzimática se observó a una temperatura de 60 °C.

Tabla 10

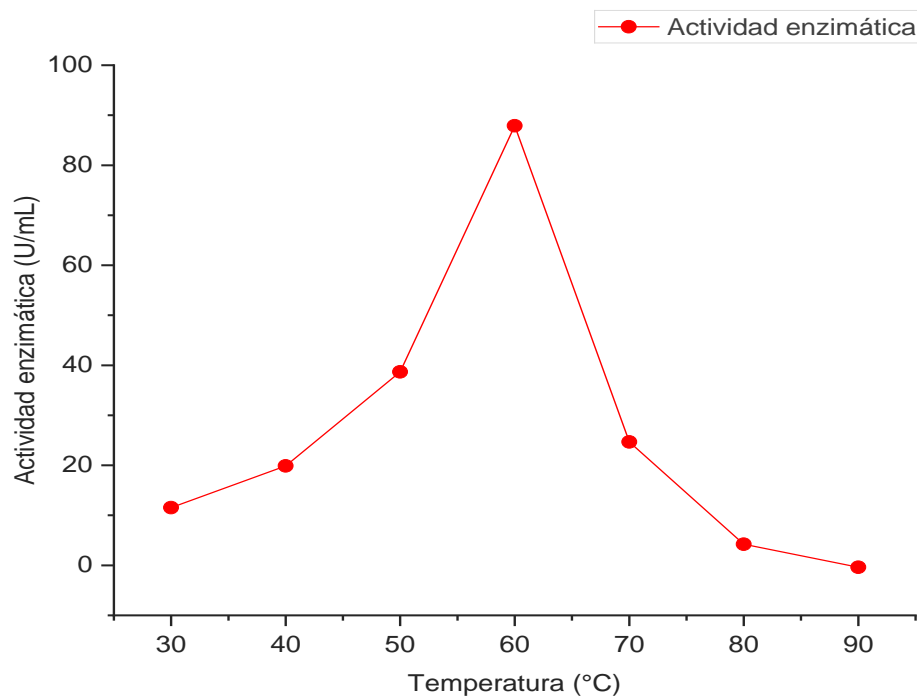
Prueba Tukey de medias de los tratamientos de actividad enzimática frente a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	N	Media (U/mL)	Grupos homogéneos
90	3	-0,392	A
80	3	4,235	B
30	3	11,529	C
40	3	19,882	D
70	3	24,667	E
50	3	38,667	F
60	3	87,882	G

Nota: No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una letra común ($p > 0,05$)

Figura 7

Efecto de temperatura en la actividad de la enzima α -glucosidasa recombinante



Nota: Máxima actividad enzimática a 60 °C (87,882 U/ mL)

La Figura 7 ilustra el efecto de diversas temperaturas sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa recombinante. Se observa que la enzima alcanza una actividad enzimática máxima de 87,882 U/mL a 60 °C, la cual se identifica como la temperatura óptima. En contraste, a 80 °C y 90 °C, la actividad enzimática disminuye drásticamente, con valores de 4,235 U/mL y -0,392 U/mL, respectivamente. A 30 °C, la actividad también es baja (11,529 U/mL), pero aumenta progresivamente hasta alcanzar su máximo a 60 °C

4.3.2 Efecto del pH en la actividad de la enzima α -glucosidasa recombinante

Tabla 11

Análisis de estadística descriptiva de los tratamientos de la actividad de α -glucosidasa recombinante frente a la variación de pH

pH	Recuento	Media (U/mL)	Desviación estándar	CV
3	3	0,041	0,0071	0,1800
4	3	0,195	0,0165	0,0800
5	3	1,092	0,0940	0,0900
6	3	66,784	0,9436	0,0141
7	3	86,432	0,5803	0,0067
8	3	13,882	0,4242	0,0300
9	3	4,157	0,1797	0,0400

Nota: CV=Coeficiente de variación

La Tabla 11 presenta un análisis comparativo de las medias de siete tratamientos para evaluar la influencia del pH en la actividad de la enzima α -glucosidasa, expresada en U/mL. Se realizaron pruebas enzimáticas en un rango de pH de 3 a 9. Los valores medios de los tratamientos son numéricamente distintos, excepto por la media de 66,784 U/mL a pH 6, que es cercana a la media de 86,4317 U/mL a pH 7. Este último pH muestra la mayor actividad enzimática.

Para el análisis estadístico del efecto del pH, se efectuó el ANOVA de un solo factor de las medias de actividad enzimática, en los siete niveles de pH, como se detalla en la Tabla 11.

Tabla 12

Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad enzimática de α -glucosidasa frente a la variación de pH

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
Entre grupos	23660,6	6	3943,43	19049,79	0,0000
Intra grupos	2,89809	14	0,207006		
Total	23663,5	20			

Nota: GL= Grados de libertad

Los resultados de la Tabla 12 muestran una diferencia estadísticamente significativa en la actividad enzimática de la α -glucosidasa recombinante entre los distintos tratamientos de pH. El valor-F de 19049,79, que representa la razón entre la variabilidad entre grupos y la variabilidad intra-grupos, junto con un valor-P de la prueba-F inferior a 0,05 (nivel de confianza del 95 %), permite rechazar la hipótesis nula de que no existen diferencias entre las medias de la actividad enzimática.

Tabla 13

Prueba Tukey de medias de los tratamientos de actividad enzimática frente a diferentes pHs

pH	N	Media (U/mL)	Grupos Homogéneos
3	3	0,041	A
4	3	0,195	A
5	3	1,092	B
9	3	4,157	C
8	3	13,882	D
6	3	66,784	E
7	3	86,432	F

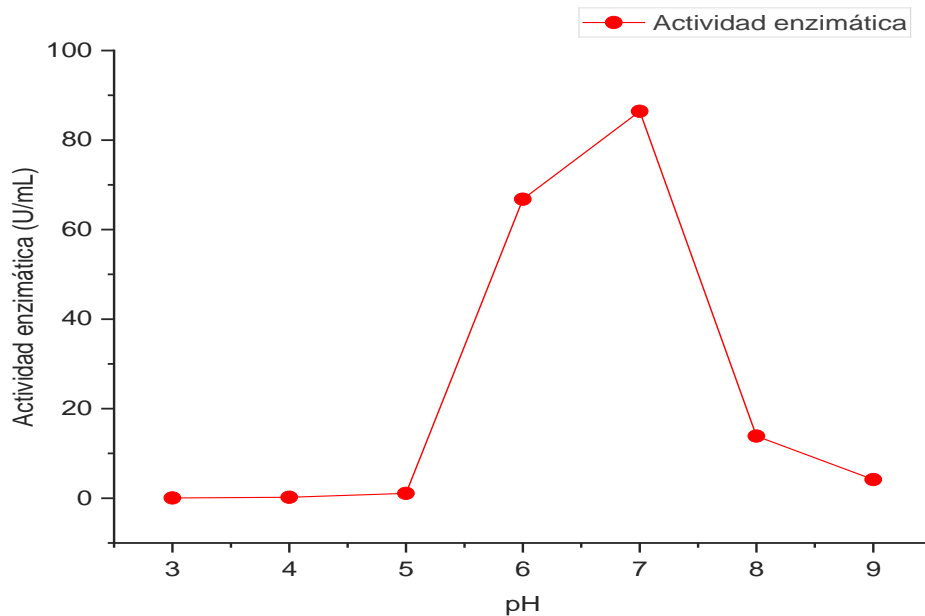
Nota: No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una letra común ($p > 0,05$)

La Tabla 13 muestra los resultados del análisis de la actividad enzimática de la α -glucosidasa utilizando la prueba de Tukey para comparar las medias de cada tratamiento. Se identificaron siete grupos, de los cuales dos, correspondientes a pH 3 y 4 (designados con la letra "A"), presentan la menor actividad enzimática y no muestran diferencias significativas entre sí. En contraste, los tratamientos con pH entre 5 y 9 exhiben diferencias significativas entre ellos. Entre estos, el tratamiento

con pH 7 destaca por mostrar la mayor actividad enzimática de la α -glucosidasa recombinante.

Figura 8

Efecto de pH en la actividad enzimática de la enzima α -glucosidasa recombinante



La Figura 8 ilustra la actividad de la enzima α -glucosidasa en función de la variación de pH. Se observa que la actividad enzimática es alta en un rango de pH, específicamente entre 6 y 7, con una actividad máxima de 86,431 U/mL a pH 7. La actividad disminuye a pH 8 y 9, y es muy baja a pH 3 y 4, con valores de 0,041 U/mL y 0,195 U/mL, respectivamente.

4.3.3 Efecto de los iones metálicos en la actividad de la enzima α -glucosidasa recombinante

Las Tablas 14, 15 y 16 presentan los resultados del efecto de diversos iones a concentraciones de 1 mM, 2 mM y 5 mM sobre la actividad enzimática de la α -glucosidasa recombinante. Se evaluó el comportamiento de cada ion como inhibidor o activador de la actividad enzimática.

Tabla 14

Efecto de iones metálicos a 1mM sobre la actividad relativa de la α -glucosidasa recombinante

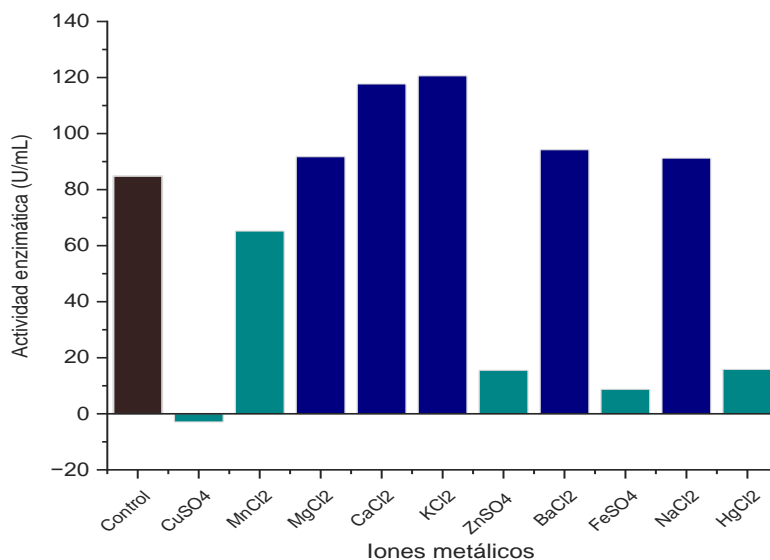
IONES	ACTIVIDAD RELATIVA (%)			
	1 mM			
	U/mL	%	DE	CV
Control	84,863	100	$\pm 0,8830$	0,0104
CuSO ₄	-2,902	-3	$\pm 0,9509$	-0,3277
MnCl ₂	65,216	77	$\pm 1,9908$	0,0305
MgCl ₂	91,725	108	$\pm 1,9838$	0,0216
CaCl ₂	117.686	139	$\pm 0,0006$	0,0151
KCl	120.588	142	$\pm 0,0074$	0,0165
ZnSO ₄	15,529	18	$\pm 0,8882$	0,0572
BaCl ₂	94,196	111	$\pm 0,2449$	0,0026
FeSO ₄	8,746	10	$\pm 1,7143$	0,1960
NaCl	91,215	107	$\pm 0,6893$	0,0076
HgCl ₂	15,843	19	$\pm 0,3782$	0,0239

Nota: DE= Desviación estándar, CV= Coeficiente de Variación

La Tabla 14 muestra que, a una concentración de 1 mM, los iones metálicos que más activan la actividad enzimática de la α -glucosidasa son: KCl, CaCl₂, MgCl₂, BaCl₂ y NaCl, con incrementos de actividad del 42 %, 39 %, 11 %, 8 % y 7 %, respectivamente. En contraste, los iones ZnSO₄, FeSO₄ y HgCl₂ resultaron en actividades relativas bajas, mientras que el ion CuSO₄ inhibió completamente la actividad enzimática.

Figura 9

Efecto de iones metálicos a 1mM sobre la actividad relativa de la α -glucosidasa recombinante



La Figura 9 muestra cinco barras que superan al control, indicando los iones que aumentan la actividad enzimática. Por otro lado, cuatro barras representan los

iones que no favorecen la actividad de la enzima estudiada, siendo casi invisible la barra correspondiente al ion CuSO_4 .

Tabla 15

Efecto de iones metálicos a 2mM sobre la actividad relativa de la α -glucosidasa recombinante

IONES	ACTIVIDAD RELATIVA (%)			
	2 mM			
	U/mL	%	DE	CV
Control	88,627	100	$\pm 0,9582$	0,0108
CuSO_4	-0,196	0	$\pm 0,2961$	-1,5100
MnCl_2	45,176	51	$\pm 1,2226$	0,0271
MgCl_2	119,373	135	$\pm 0,8008$	0,0067
CaCl_2	97,294	110	$\pm 0,8484$	0,0087
KCl	95,137	107	$\pm 0,8908$	0,0094
ZnSO_4	8,059	9	$\pm 0,5882$	0,0730
BaCl_2	155,137	175	$\pm 0,2449$	0,0016
FeSO_4	7,137	8	$\pm 0,8511$	0,1192
NaCl	125,255	141	$\pm 0,7564$	0,0060
HgCl_2	0,275	0	$\pm 0,0679$	0,2474

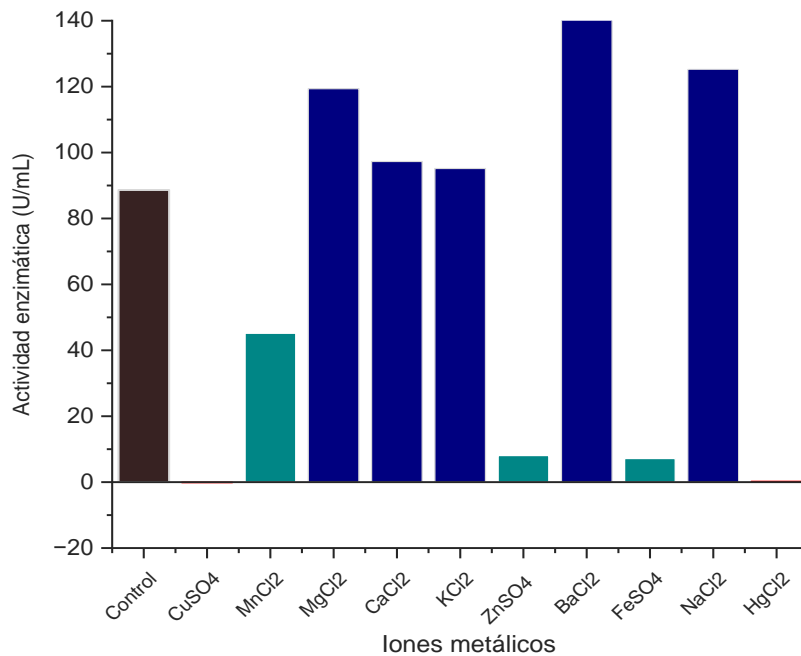
Nota: DE=Desviación estándar; CV=Coeficiente de variación

La Tabla 15 evidencia que a una concentración de 2 mM, los iones de efecto activador (aumentan la actividad enzimática) fueron: BaCl_2 , NaCl MgCl_2 , CaCl_2 y KCl con un incremento de actividad relativa de 75, 41,35,10 y 7 % respectivamente. Por

lo contrario, en la misma tabla se puede observar que frente a los iones metálicos $ZnSO_4$ y $FeSO_4$ resultaron bajas las actividades relativas, sin embargo frente al ion $CuSO_4$ y $HgCl_2$ la actividad enzimática es nula a un 0%, en otras palabras la tasa de inhibición es de 100 %.

Figura 10

Efecto de iones metálicos a 2mM sobre la actividad relativa de la α -glucosidasa recombinante



En la Figura 10, se observan cinco barras que sobrepasan el control, indicando tratamientos donde la actividad enzimática aumentó. Estos son los mismos iones que, a una concentración de 1 mM, mostraron incremento de actividad. Sin embargo, frente a $BaCl_2$ y $NaCl$, la actividad que era menor aumentó a 2 mM, mientras que frente a

CaCl₂ y KCl disminuyó. Por otro lado, ahora hay dos barras casi invisibles, lo que indica que la actividad frente a los iones HgCl₂ y CuSO₄ es nula (0 %).

En la Tabla 16 se visualiza que, a una concentración de 5 mM, los iones metálicos han generado más inhibidores que activadores. Se observa que solo dos iones aumentaron la actividad: NaCl con un incremento del 65 % y BaCl₂ con un 60 % en comparación con el control. En contraste, los tratamientos con otros iones metálicos que habían mejorado la actividad a concentraciones de 1 mM y 2 mM mostraron una disminución en esta concentración. Por ejemplo, MgCl₂ resultó en una actividad inhibida del 46 %, CaCl₂ del 35 % y KCl del 39 %.

Tabla 16

Efecto de iones metálicos a 5mM sobre la actividad relativa de la α -glucosidasa recombinante

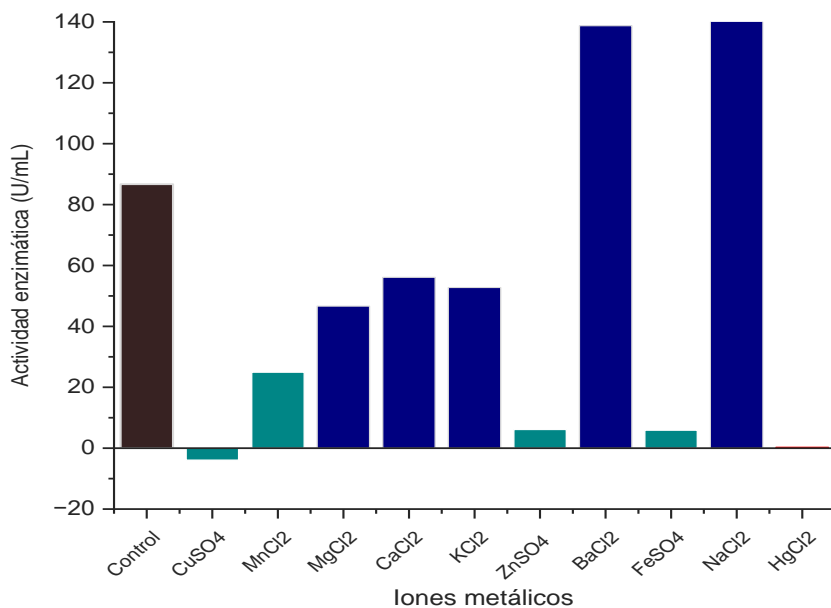
IONES	ACTIVIDAD RELATIVA (%)			
	5 mM			
	U/mL	%	DE	CV
Control	86,686	100	±0,9897	0,0113
CuSO₄	-3,882	-4	±1,1345	-0,2922
MnCl₂	24,941	29	±0,8484	0,0340
MgCl₂	46,667	54	±0,6037	0,0129
CaCl₂	56,118	65	±0,8235	0,0147
KCl	52,745	61	±1,0006	0,0190
ZnSO₄	6,118	7	±0,6225	0,1018
BaCl₂	138,745	160	±0,8830	0,0064

IONES	ACTIVIDAD RELATIVA (%) 5 mM			
	U/mL	%	DE	CV
FeSO₄	5,882	7	±0,7715	0,1311
NaCl	142,627	165	±0,8830	0,0062
HgCl₂	0,314	0	±0,0679	0,2165

Nota: DE= Desviación estándar

Figura 11

Efecto de iones metálicos a 5mM sobre la actividad relativa de la α -glucosidasa recombinante



La Figura 11 muestra que 8 de los 10 iones metálicos a 5 mM de concentración inhiben la actividad de la α -glucosidasa recombinante, evidenciado por barras más cortas en comparación con la barra de control, lo que indica una disminución de la actividad. Sin embargo, los iones BaCl_2 y NaCl_2 incrementaron la actividad en un 60 % y 65%, respectivamente, mostrando un efecto activador significativo.

4.3.4 Termoestabilidad

La Tabla 17 resume el análisis de la estabilidad térmica de la α -glucosidasa recombinante, expresada como porcentaje de actividad residual. Se evaluó la enzima a siete temperaturas diferentes (30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C y 90 °C) mediante ensayos enzimáticos realizados durante 360 minutos para cada temperatura.

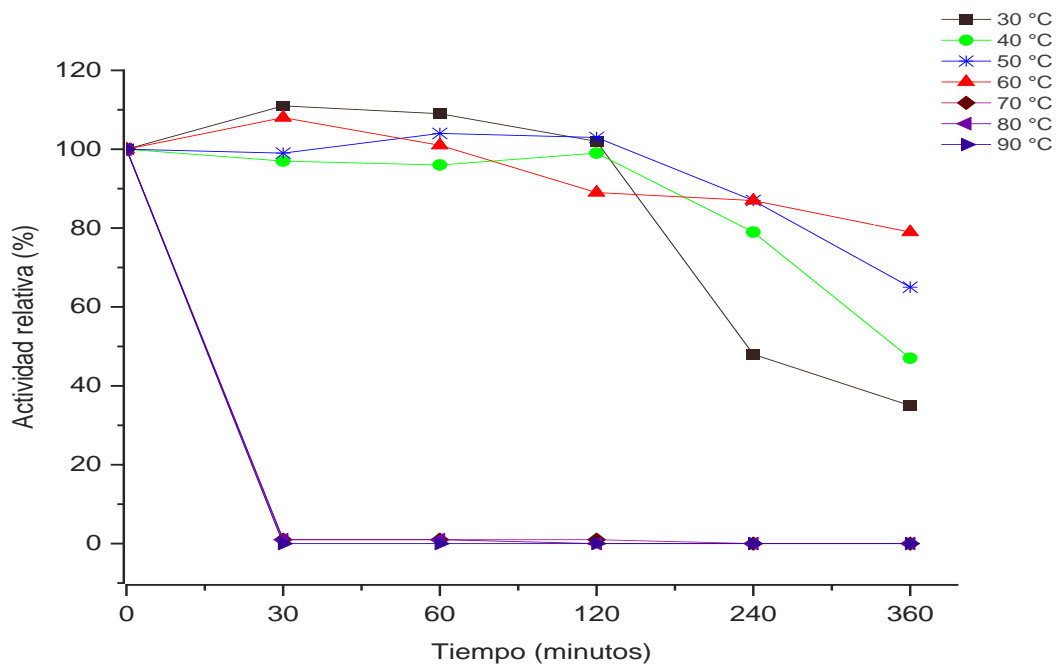
Tabla 17*Actividad relativa de la termoestabilidad de la enzima α -glucosidasa recombinante*

Tiempo (Min)	ACTIVIDAD RELATIVA (%)													
	30 °C	DE	40 °C	DE	50 °C	DE	60 °C	DE	70 °C	DE	80 °C	DE	90 °C	DE
0	100	±0,93	100	±0,93	100	±0,93	100	±0,93	100	±0,93	100	±0,93	100	±0,93
30	111	±0,32	97	±1,79	99	±0,71	108	±0,81	1	±0,12	1	±0,27	0	±0,13
60	109	±0,62	96	±0,69	104	±1,11	101	±0,47	1	±0,27	1	±0,45	0	±0,44
120	102	±0,52	99	±0,99	103	±0,33	89	±1,29	1	±0,18	0	±0,06	0	±0,12
240	48	±0,30	79	±0,17	87	±0,73	87	±0,47	0	±0,07	0	±0,25	0	±1,11
360	35	±0,08	47	±0,66	65	±1,12	79	±1,08	0	±0,73	0	±0,86	0	±0,39

Nota: DE= Desviación estándar

Figura 12

Análisis de la estabilidad térmica de la enzima α -glucosidasa de 30 °C a 90 °C



La Figura 12 indica el efecto del tiempo de incubación en la estabilidad térmica de la enzima α -glucosidasa recombinante en un intervalo de 30 °C a 90 °C. Después de 360 minutos de incubación, la enzima conservó la mayor parte de su actividad relativa, un 79 %, a 60 °C. En contraste, a 40 °C y 50 °C, aunque la actividad permaneció relativamente estable durante los primeros 240 minutos, se observó una disminución más rápida a 40 °C, con solo un 55 % de actividad restante al final. A temperaturas superiores, como 70 °C, 80 °C y 90 °C, la actividad de la enzima cayó

drásticamente, reduciéndose al 1% en los primeros 30 minutos y desapareciendo completamente después de 6 horas de incubación.

4.3.5 Caracterización cinética

Tabla 18

Análisis estadístico de las concentraciones de sustrato sobre la actividad de la α -glucosidasa recombinante

Sustrato (mg/mL)	Velocidad ($\mu\text{mol/ mL/min}$)	DE	CV
1	0,784	$\pm 0,0679$	0,0866
3	27,961	$\pm 0,2717$	0,0097
6	47,176	$\pm 0,6550$	0,0139
9	71,765	$\pm 0,3113$	0,0043
12	93,725	$\pm 0,5305$	0,0057
15	107,039	$\pm 0,6506$	0,0061
18	123,706	$\pm 0,2941$	0,0024
21	124,922	$\pm 0,8326$	0,0067
24	139,020	$\pm 0,5560$	0,0040
27	146,784	$\pm 0,9509$	0,0065
30	145,373	$\pm 0,1797$	0,0012

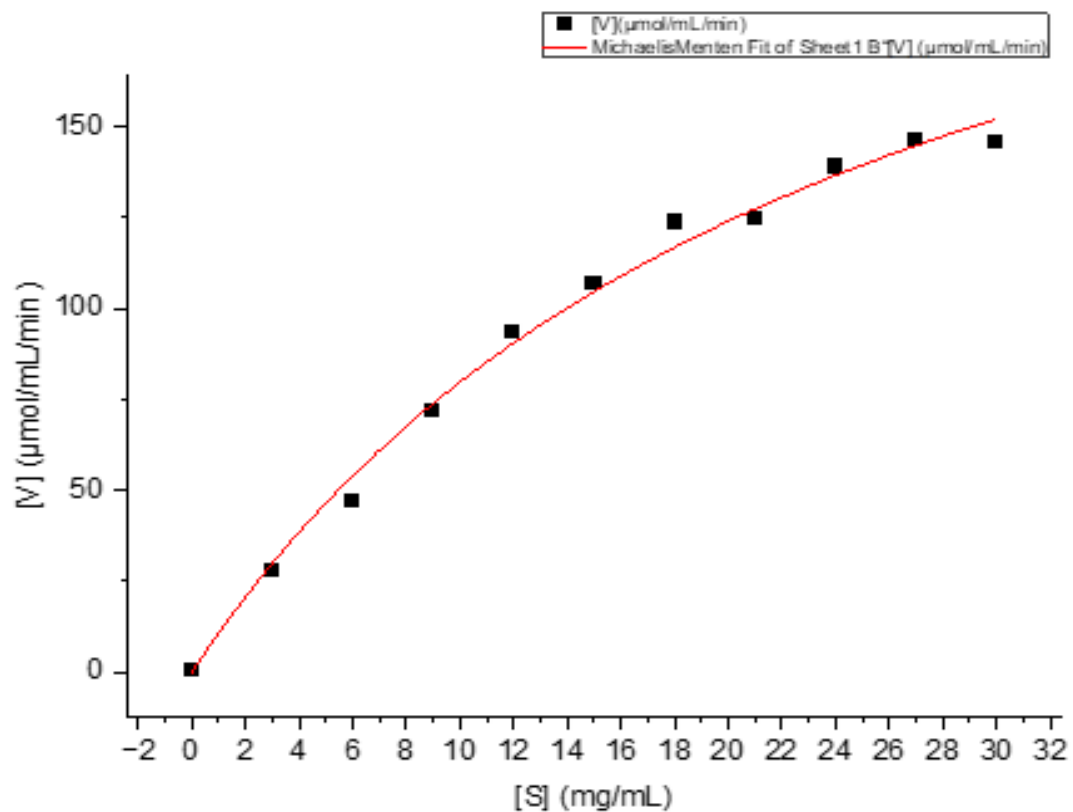
Nota: DE= Desviación estándar; CV= Coeficiente de variación

La Tabla 18 presenta los datos de la velocidad de reacción enzimática de la α -glucosidasa recombinante frente a varias concentraciones de almidón (3%), empleado como sustrato. Se aprecia un incremento constante en la velocidad a

medida que la concentración de sustrato aumenta, desde 3 mg/mL hasta alcanzar un máximo de 146,78 $\mu\text{mol/mL/min}$ a 27 mg/mL de almidón. Este comportamiento sugiere que el punto de saturación por el sustrato estaría próximo a la concentración mencionada, para alcanzar la velocidad máxima o haber ya cubierto esta misma.

Figura 13

Modelo cinético de Michaelis - Menten en función de la concentración de sustrato y velocidad de reacción de la α -glucosidasa recombinante



Nota: V= Velocidad; S= Sustrato

La Figura 13 ilustra cómo el modelo de Michaelis-Menten se ajusta a los datos experimentales, obteniendo una V_{max} de 278,21713 $\mu\text{mol/mL/min}$ y un K_m de 24,866, datos visibles en la Tabla 19. En esa misma tabla también se muestra que el coeficiente de determinación ajustado (R^2) es de 0,992 lo que refleja un alto grado de precisión en el ajuste del modelo, muy cercano a 1. Evaluando los resultados, se puede mencionar que la enzima α -glucosidasa recombinante es eficiente a una concentración de sustrato, próximo a 27 mg/mL, ya que después la velocidad de reacción es menor, lo que significa que la enzima ya llega a saturarse en tal concentración.

Tabla 19

Determinación de V_{max} y K_m de la α -glucosidasa recombinante

MODELO	Michaelis Menten
Ecuación	$y = V_{max} * x / (K_m + x)$
V_{Max}	278,21713
K_m	24,86658
R-Square (Cod)	0,99315
ADJ, R-Square	0,99239

Nota: x = Concentración de sustrato

V. DISCUSIÓN

Producción y purificación de la enzima α -glucosidasa recombinante

Los avances en la tecnología del ADN recombinante han hecho posible la producción de proteínas en diversos sistemas heterólogos de expresión, tales como la bacteria *Escherichia coli* (Sorensen & Mortensen, 2005).

La producción de la enzima α -glucosidasa de *Geobacillus kaustophilus* se logró exitosamente tras la reactivación de la cepa *E. coli* ArcticExpress(DE3) [PET28a⁺] utilizando el caldo Luria Bertani, procedimiento también replicado por Zhang et al.(2019) para producir y evaluar la expresión de la misma enzima pero de *Geobacillus* sp. en *E. coli* BL21 (DE3), en condiciones de 37 °C y agitación de 180 rpm). Este procedimiento es recurrente, como detalla Olivos Hernández (2020) en su metodología. La proteína de interés se produjo a partir del cultivo criopreservado de la cepa *E. coli* ArcticExpress(DE3) transformadas previamente con el plásmido que contiene el gen codificante para α -glucosidasa.

La elección de las condiciones de cultivo, la cual se detalla en la metodología, la concentración del antibiótico kanamicina, y el inductor (Lactosa) fueron críticas para asegurar un crecimiento óptimo de *E. coli* ArcticExpress (DE3) y la expresión eficiente de la α -glucosidasa recombinante. La temperatura de incubación a 37 °C y la agitación a 180 rpm proporcionaron un ambiente adecuado para la proliferación bacteriana y la producción de la enzima. El uso de un medio rico como LB favoreció el crecimiento robusto de las bacterias.

Estos resultados destacan la importancia cumplir con las condiciones de cultivo para maximizar la producción de proteínas recombinantes, permitiendo alcanzar una densidad celular adecuada antes de proceder con la purificación y caracterización de la enzima (Rodríguez et al., 2016).

La producción de α -glucosidasa de *Geobacillus kaustophilus* sigue un patrón similar al de las α -amilasas en general, ocurriendo paralelamente al crecimiento bacteriano (*E. coli*). En la fase de crecimiento activo, la producción de la enzima aumenta, sugiriendo una estrecha relación entre la síntesis de esta misma y la proliferación bacteriana. Es por ello que se espera que el DO₆₀₀ este entre 0,5 – 0,6. Este comportamiento es consistente con estudios previos, como el de Santos y Martins (2003), que observaron una relación similar entre la producción de α -amilasa y el crecimiento de *Bacillus* sp.

Purificación de la enzima α -glucosidasa recombinante

Para la ruptura de células de *E. coli* y recuperación de la enzima, estas fueron lisadas en hielo al 50 % de amplitud. En base a lo anterior, la purificación se centró en el extracto crudo resultante por centrifugación de las células sonicadas, la cual se llevó a purificar por el método de cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC) utilizando columnas His-Trap™. Estas columnas contienen una matriz de sefarosa unida a iones de Níquel (Ni²⁺), al que se une el epítipo de histidinas (Olivos Hernández, 2020). La enzima en estudio tenía etiquetas de histidina (His-Tag), por lo que este método de purificación fue la elección más adecuada debido

a que esta columna preempacada es ideal para la purificación de proteínas recombinantes marcadas con histidina (EasyScan, 2024). Esta primera etapa de purificación fue complementada por ultrafiltración con el uso del dispositivo Amicon Ultra-4 10 K , lo que permitió concentrar más la proteína antes de la caracterización.

Se midió la actividad enzimática de las fracciones obtenidas en el proceso de purificación, mostradas en la Tabla 7. La α -glucosidasa recombinante se purificó casi 10 veces (9,58) con una actividad específica de 8,622 U/mg y una recuperación del 85 % de la actividad inicial. Zhang (2019) reportó una purificación de 6,6 veces y una recuperación de 73,7 %. Caso similar describieron Coleri et al.(2016) en donde la α -glucosidasa nativa de *Geobacillus toebii* se purificó 10 veces, lo cual guarda mucha cercanía al reportado para la enzima en estudio, con una actividad específica de 4,9 U/mL y una recuperación de 71,2 %. En consecuencia, se puede afirmar que la purificación y recuperación de la α -glucosidasa recombinante en este estudio fue considerablemente más eficiente. Por otro lado, si se contrasta con la α -glucosidasa nativa de *G. thermodenitrificans* HR010, que se purificó 5,22 veces con una actividad específica de 0,99 U/mL y una recuperación del 37 %, reportado por Amri et al.(2022), la purificación de la α -glucosidasa recombinante sigue siendo superior .

Dicho todo ello, se menciona que la enzima α -glucosidasa recombinante mostró una purificación y recuperación más alta, con mayor actividad específica en contraste al nativo y otras investigaciones. Las etiquetas de histidinas son cruciales

para la purificación de proteínas recombinantes, ya que se unen al níquel, permitiendo recuperar proteínas de interés y desechar impurezas. La Tabla 7 muestra que en la primera purificación por el método IMAC se recupera el 93 % de la actividad y tras la ultrafiltración por AMICON se recupera un 85 % con una actividad enzimática de 240,560 U/mL. En general se ha evidenciado una buena eficiencia del proceso de purificación, consistente con investigaciones previas que han demostrado la viabilidad de este proceso crucial de α -glucosidasa recombinante en *E. coli*, ya que depende del purificado una correcta caracterización de cualquier proteína.

Análisis por electroforesis en gel SDS-PAGE

Con referencia a las fases de purificación se evaluaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), como se muestra en la Figura 6. En el carril 2 se visualiza una banda de aproximadamente, 60,925 kDa, correspondiente a la α -glucosidasa recombinante, con una notable disminución de número de bandas respecto a la muestra de extracto crudo (carril 1), lo que significa que en este paso, se eliminaron la mayoría de las proteínas no deseadas. No obstante, el carril 3 muestra la proteína recombinada mucho más concentrada y purificada como una única banda de 61,160 kDa, El peso molecular de la α -glucosidasa recombinante es similar al reportado por Zhang et al. (2019) donde la α -glucosidasa recombinante de *Geobacillus* sp. tuvo aproximadamente 70 kDa, determinada más exactamente por espectrometría de masas MALDI-TOF como 68,9 kDa, y también mostró en su

análisis electroforético únicas bandas desde su primera fase de purificación (extracto crudo) lo que representa gran similitud con la proteína en estudio.

Cihan et al.(2016) reportaron un peso molecular de α -glucosidasa de *Geobacillus toebii* E134 de aproximadamente 65 kDa por SDS-PAGE, peso notablemente cercano al de la α -glucosidasa recombinante. Del mismo modo se reportó α -glucosidasas producidas por *G. stearothermophilus* ATCC12016 y *B. thermoamyloliquefaciens* KP1071-I con un peso molar de 62 kDa en ambos casos (Suzuki et al.,1992). En contraste con el peso molar de una α -glucosidasa fúngica el valor de este resultó también similar, con 56 kDa de *Aspergillus niveus*, sin embargo no se mostraron únicas bandas, como el reportado por Zhang et al., (2019).

A diario, científicos buscan constantemente nuevas formas de producir proteínas para poder analizarlas y comprender mejor sus funciones. Los días en los que se necesitaba coleccionar kilogramos de tejido animal o vegetal para la purificación de pequeñas cantidades de la proteína de interés han quedado atrás con la aplicación de la tecnología del ADN recombinante (Muñoz, 2018), como el que fue sometido la enzima α - glucosidasa de *Geobacillus Kautophilus* en *E. coli*, logrando resultados de purificación mayor o iguales con solo dos etapas de purificación en comparación de otras investigaciones como el de Papriani et al. (2019) donde se lleva a purificación por tratamiento térmico, fraccionamiento de amonio y diálisis, métodos mas complejos y costosos.

Efecto del pH

Las enzimas, como la α -glucosidasa, son cruciales para desintegrar biopelículas. Saptadip (2022), describe que el pH es fundamental para inducir la secreción de la enzima, siendo el rango óptimo para glucosidasas entre 4-7. Para este ensayo el sustrato fue preparado a pHs 3, 4,5 ,6 ,7 ,8 y 9 y la razón por la que no se hicieron a pHs mayores es porque el sustrato ya llegaría a sufrir auto hidrólisis (Cedrés, 2021).

Ben & Salleh (2015) indicaron que muchas enzimas muestran una actividad óptima de pH con un perfil en forma de campana. Lo que se ha podido percibir también en la presente tesis, en donde los resultados del ensayo se muestra en la Figura 8, y se observa que a pH 7 se alcanza la máxima actividad (86,4317 U/mL). Similar a lo reportado por Zhang et al. (2019), quienes mencionaron que la α -glucosidasa recombinante de *Geobacillus* sp. es más activa a pH 7. Por su parte Rauda et al. (2012) reportaron también un pH óptimo cercano a 7 para la α -glucosidasa recombinante en *E. coli* de *Geobacillus stearothermophilus*. Sin embargo, en la caracterización de una α glucosidasa termoestable de *Geobacillus thermodenitrificans* F84a, que no fue recombinada presentó una mayor actividad también a pH 7 (Coleri et al.,2016), lo que nos indica que a pesar de la recombinación esta propiedad podría

mantenerse y no variar en demasía, ya que esta dentro del intervalo de pHs óptimos para glucosidasas, y la hace muy atractiva para industrias que trabajan a pH neutro.

La Tabla 11 muestra que la actividad enzimática de la α -glucosidasa recombinante disminuye significativamente a pHs inferiores a 5. Irazoqui (2021) indica que ese comportamiento es debido a que por debajo de pH 4,5, la actividad de las glucosidasas es muy reducida o casi nula. En el procesamiento industrial del almidón, se buscan amilasas que mantengan alta actividad cerca de pH 4. Sin embargo, las amilasas más termoestables no suelen ser efectivas a este pH, lo que ha llevado a estudios de ingeniería de proteínas para mejorar esta propiedad. A pesar de la recombinación celular, es crucial modificar el gen específico para lograr estabilidad y actividad óptima a pH 4 o menor (Irazoqui,2021). En contraste, las amilasas termolábiles son utilizadas en procesos como la sacarificación del almidón a temperaturas moderadas, en la industria cervecera, la fermentación de alcohol, el acondicionamiento de masas, o como aditivos detergentes (Polaina & MacCabe, 2007). La α -glucosidasa recombinante de *Geobacillus* sp. mostró actividad nula a pH 4 y 3,4 U/mL a pH 5, y mejoró a partir recién desde el pH 6, similar al comportamiento de la enzima en estudio (Zhang et al., 2019).

La α -glucosidasa intracelular de *Geobacillus toebii* muestra actividad en un amplio rango de pH de 4,5 a 9,5, siendo óptima a pH 7 (Coleri et al., 2016). A pesar de pertenecer al mismo género que *Geobacillus kaustophilus*, productor nativo de la

α -glucosidasa recombinada, variaciones en la fuente de origen y composición estructural pueden conferir propiedades que difieran entre sus enzimas (Coleri et al., 2016).

Ben & Salleh (2015) indican que cambios sutiles en el pH pueden afectar la protonación de grupos en las cadenas laterales de aminoácidos, alterando así la afinidad de la enzima por el sustrato. Cambios drásticos en el pH pueden desnaturalizar la proteína, resultando en inactivación completa de la enzima.

Efecto de la temperatura

Saptadip (2022) informó que las glucosidasas mostraron su máxima actividad en temperaturas comprendidas entre 50 y 65 °C. Este comportamiento es consistente con la enzima α -glucosidasa recombinante estudiada, ya que alcanzó su mayor actividad enzimática a 60 °C, identificándose esta como su temperatura óptima. Coleri Cihan et al. (2016) reportaron resultados similares en su estudio sobre la α -glucosidasa de *Geobacillus thermodenitrificans* F84a, que fue activa en un amplio rango de temperaturas entre 40 y 70 °C. No obstante, la enzima alcanzó su máxima actividad y estabilidad a 60 °C. Aunque esta enzima no era recombinante, su preferencia de temperatura no varió en comparación con la α -glucosidasa recombinante.

En contraste, Zhang et al. (2019) estudiaron una α -glucosidasa recombinante de *Geobacillus* sp. y observaron que, aunque la temperatura óptima de la enzima salvaje (nativa) era 60 °C, la recombinante mostró una temperatura óptima

ligeramente más alta, de 65 °C. A pesar de esta diferencia, la estabilidad a 60 °C para la α -glucosidasa recombinante de *Geobacillus kaustophilus* fue superior, un aspecto que se explorará en la sección de termoestabilidad. Un hallazgo similar se reportó para la α -glucosidasa de *Geobacillus toebii*, que tuvo una actividad óptima a 65 °C pero mejor estabilidad a 60 °C. Uno de los factores clave mencionados para que estas enzimas conserven su actividad a temperaturas elevadas, es la interacción entre proteínas. Se ha demostrado una fuerte correlación entre los enlaces disulfuro entre las proteínas y el mantenimiento de su estabilidad térmica (Rigoldi et al., 2018).

Después de alcanzar la temperatura óptima de 60 °C para la proteína en estudio, la Tabla 8 muestra que a partir de 70 °C la actividad enzimática disminuye significativamente hasta 24,6667 U/mL, llegando a ser nula a 90 °C. La desnaturalización proteica es una de las razones principales que explican este comportamiento, generando altas tasas de inactivación. Para mejorar la estabilidad de la enzima a altas temperaturas como 80 y 90 °C, es necesario optimizar genéticamente este parámetro (Illanes, 2008).

Efecto de los iones metálicos

Referente a los iones metálicos, varios de estos pueden alterar la actividad enzimática, actuando como activadores o inhibidores. La interacción entre estos iones y las enzimas es crucial para su activación y estabilización (Bearne, 2014). Para evaluar el efecto de diferentes iones metálicos en la actividad de la α -glucosidasa, se

probaron 10 iones (CuSO_4 , MgCl_2 , MnCl_2 , ZnSO_4 , CaCl_2 , KCl , BaCl_2 , FeSO_4 , NaCl y HgCl_2) en concentraciones de 1 mM, 2 mM y 5 mM.

Zhang et al. (2020) reportaron una fuerte inhibición de la α -glucosidasa recombinante de *Geobacillus* sp. por Fe^{3+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} a 1 mM. Sin embargo el ion Mg^{2+} y K^+ no afectaron la actividad, mientras que Ca^{2+} y Mn^{2+} la mejoraron significativamente (113,8 % y 132,1 %, respectivamente). Este comportamiento guarda similitud a los resultados obtenidos para la enzima α -glucosidasa recombinanda de *Geobacillus kaustophilus* ya que a 1 mM frente a los iones CaCl_2 , KCl y MgCl_2 la actividad fue mucho mayor llegando a 139, 142 y 108 % respectivamente, en relación al control de 100 %, junto a los iones BaCl_2 con aumento de 111% y NaCl de 107 % las cuales a diferencia del estudio realizado por Zhang et al. (2020), si se trabajo para ver el efecto en la actividad.

En otro estudio, la α -glucosidasa de *Geobacillus thermodenitrificans* F84a mostró que el ion Hg^{2+} a 2 mM es uno de los inhibidores más potentes, con una tasa de inhibición del 99 %. Esto indica que la enzima no requiere este ion para su actividad, ya que su presencia es desfavorable (Amri et al., 2022). En el caso de la enzima recombinante estudiada, tanto el ion Hg^{2+} como el Cu^{2+} muestran una inhibición del 100 %.

La inhibición de la α -glucosidasa recombinante por los iones Cu^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} y Zn^{2+} en concentraciones de 1, 2 y 5 mM se debe a la interacción de estos metales con grupos sulfhidrilo y residuos nitrogenados cercanos al centro activo de la enzima.

Esta interacción altera la estructura tridimensional de la enzima, impidiendo su funcionamiento (Nieboer & Richardson, 1980). En otras palabras, estos iones metálicos perturban la estructura y función de la α -glucosidasa recombinante, reduciendo su actividad enzimática a medida que aumenta su concentración.

Cihan et al. (2016) reportaron que el ion Hg^{2+} era el inhibidor más fuerte para la α -glucosidasa de *G. toebii* y *G. stearothermophilus* ATCC, con tasas de inhibición del 64 % y 100 %, respectivamente, similares a las observadas en la α -glucosidasa recombinante a esa concentración. También describieron que el ion Cu^{2+} y Zn^{2+} inhibía completamente la actividad de la enzima α -glucosidasa de *G. stearothermophilus* ATCC. Corroborando con ello, que esos iones metálicos no son favorable para la actividad enzimática de la proteína en estudio. Sin embargo, el ion Ba^{2+} , aunque no mostró efectos significativos en *G. toebii* (Cihan et al., 2016), fue un activador visible para la α -glucosidasa recombinante, aumentando la actividad a medida que su concentración se incrementaba.

Las amilasas (grupo de enzimas a la que pertenece la α - glucosidasa) como muchas otras enzimas, dependen de iones metálicos como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} para su actividad (Pandey et al., 2000). Se ha informado que el Ca^{2+} aumenta la actividad de amilasas en *Bacillus* sp. (Burhan et al., 2003), y la adición de cloruro de calcio a medios de fermentación también incrementa la producción enzimática. Este comportamiento se observa igualmente en la α -glucosidasa recombinante, como se muestra en la Tabla 14. A 1 mM, el Ca^{2+} fue uno de los principales activadores de la

reacción, mejorando la actividad en un 39 % respecto al control. Sin embargo, a concentraciones más altas, la actividad disminuyó, mostrando una inhibición ligera del 35 %. Con respecto a este comportamiento Polaina & MacCabe (2007) indican que los iones de calcio desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural de los sitios de unión catalíticos y/o de sustrato en las amilasas, amilopululanasa y varias otras glicosilhidrolasas. Por lo tanto, la adición de sales de calcio a la mezcla de reacción mejora esencialmente la actividad y la estabilidad de las enzimas. Sin embargo, cantidades excesivas de Ca^{2+} inducen efectos inhibidores y disminuyen el rendimiento de la reacción.

Por otro lado, John (2017) reportó que algunos iones metálicos como LiSO_4 (25 mM) y MgSO_4 (1 mM) favorecen la producción de α -amilasa en *Bacillus* sp., mientras que FeCl_3 y MgSO_4 tienen un efecto negativo en la producción de amilasas. Los iones metálicos pueden alterar la actividad enzimática modificando enlaces electrostáticos que afectan la estructura terciaria de las enzimas (Reeta et al., 2009).

Las α -amilasas teóricamente son inhibidas por iones de metales pesados como Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+} . Estos iones pueden interactuar con residuos específicos de aminoácidos en el sitio activo de la enzima, como los grupos tiol (-SH) en cisteína, que pueden formar enlaces disulfuro anormales con Hg^{2+} , inhibiendo así la enzima. Además el ion Fe^{2+} puede formar complejos con residuos de lisina y metionina, mientras que Cu^{2+} interfiere con histidina (Sindhu et al., 2016).

Predecir cómo los iones afectarán a una enzima es desafiante, ya que depende de la naturaleza del metal, el tamaño atómico, la concentración del metal, el pH de la solución y la presencia o ausencia del sustrato (Ben & Salleh, 2020).

Termoestabilidad

La termoestabilidad es crucial para evaluar enzimas destinadas a aplicaciones biotecnológicas, ya que permite su funcionamiento eficiente a altas temperaturas. En esta tesis se evaluó la estabilidad térmica de la α -glucosidasa recombinante producida por *Geobacillus kaustophilus* expresada en *Escherichia coli* a temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 °C durante 6 horas. Las amilasas microbianas suelen tener temperaturas óptimas de actividad entre 25 °C y 95 °C (Polaina & MacCabe, 2007).

La Figura 13 ilustra el efecto del tiempo de incubación en la estabilidad térmica de la α -glucosidasa recombinante a diferentes temperaturas. La enzima presenta una temperatura óptima de actividad de 60 °C, donde conserva el 79 % de su actividad relativa incluso después de 6 horas de incubación. A temperaturas más bajas (30 °C y 40 °C), la enzima mantiene aproximadamente el 70 % de su actividad durante los primeros 240 minutos, aunque esta disminuye gradualmente.

En contraste, a temperaturas más altas (70 °C, 80 °C y 90 °C), la enzima se desnaturaliza rápidamente, perdiendo toda su actividad después de 6 horas. Las proteínas pueden ser desnaturalizadas por el calor afectando las interacciones débiles; disolventes orgánicos, urea y detergentes que actúan principalmente sobre

la interrupción de las interacciones hidrofóbicas; por pH extremos que alteran la carga neta de la proteína, provocando repulsión electrostática y ruptura de algunos enlaces de hidrógeno (Nelson & Cox, 2002). Sin embargo, los termófilos poseen chaperoninas, proteínas especializadas que ayudan en el plegamiento y la restauración de funciones tras la desnaturalización (Haki & Rakshit, 2003).

Como ya se mencionó, la enzima α -glucosidasa recombinante mostró una notable termoestabilidad, manteniendo hasta un 79 % de su actividad relativa después de 6 horas a 60 °C, como se muestra en la Tabla 17. Esta estabilidad supera la de otras α -glucosidasas recombinantes, como la de *Bacillus subtilis*, que pierde rápidamente actividad a altas temperaturas. La α -glucosidasa de *Bacillus subtilis* conserva solo el 50 % de su actividad a 60 °C después de 3 horas (Wang et al., 2014), mientras que la enzima estudiada mantiene el 79 % en las mismas condiciones. Esta característica la hace prometedora para aplicaciones biotecnológicas que requieren altas temperaturas.

De igual manera, la estabilidad térmica de la α -glucosidasa recombinante de *G. kaustophilus* es comparable a la de la α -glucosidasa de *G. toebii*. La α -glucosidasa de esa bacteria muestra una actividad óptima a 65 °C y mantiene una estabilidad del 100 % en temperaturas entre 35 y 70 °C (Coleri et al., 2016), resultado que es comparable en cierto grado con la enzima en estudio, ya que esta última mantiene una actividad relativa del 102 % a 30 °C, con una disminución notable solo después de 5 horas; a 40 °C la estabilidad es del 55 % y a 50 °C del 65 % .

Se puede observar en la Figura 12 que cuanto más se acerca la temperatura a 60 °C la estabilidad térmica es mucho mejor, y es lo mismo que describió Coleri et al. (2016) con referente a la α -glucosidasa de *G. toebii*, a la cual incubó a 60 °C durante 10 min, 20 min y 5 h, y su actividad residual se midió como 91, 88 y 82% respectivamente, mientras que la α -glucosidasa recombinante (GSJ) de *G. kautophilus* a la quinta hora resultó con una actividad residual incluso mayor, con 87 % lo que muestra una estabilidad térmica superior. Con ello Coleri, comprobó que la α -glucosidasa con la cual trabajó, a su temperatura óptima (65 °C) tenía una actividad residual de 89 % solo por 10 reducidos minutos, lo que no muestra un futuro muy viable como enzima favorable industrialmente a esa temperatura, por lo que concluye que 60 °C es la temperatura más óptima para una correcta termoestabilidad de la enzima. La actividad como la estabilidad de esa proteína intracelular disminuyeron rápidamente cuando se incubaron a 75 °C a más, lo que coincide con los valores que también se observó en la enzima a estudio.

En el estudio de Zhang (2019), la α -glucosidasa recombinante (GSJ) mostró su mayor actividad a 65 °C y una termoestabilidad significativamente superior a 60 °C, siendo 6,3 veces mayor que la del tipo salvaje (nativo). Esta diferencia en la termoestabilidad puede deberse a la adaptación de la enzima a distintos pH.

La razón por la que la temperatura óptima y buena termoestabilidad de glucosidasas están dentro del rango de 60-70 °C, fue explicada por estudios con la α -glucosidasa de *Bacillus* sp SAM1606 en donde identificaron residuos de Thr272,

ubicado junto a Glu272 (residuo catalítico) y Gly273 (residuo determinante de especificidad), como determinantes de la temperatura óptima. La sustitución de este residuo por aminoácidos hidrófobos como valina, metionina y fenilalanina provoca una caída de la temperatura óptima de hasta 30 °C en con el aumento de la actividad catalítica a bajas temperaturas (Noguchi et al., 2008). Comparaciones entre proteínas de mesófilos y termófilos muestran que los termófilos tienen más enlaces salinos e hidrógeno y una mayor frecuencia de residuos hidrofóbicos en comparación con los residuos polares. El aumento en los niveles de ácido glutámico (Glu) y prolina (Pro) también puede contribuir a la termoestabilidad de las proteínas termófilas al aumentar su rigidez (Sadeghi et al., 2006).

La importancia de utilizar enzimas a altas temperaturas, guarda mucho interés para aplicaciones industriales ya que reduce el riesgo de contaminación por microorganismos mesófilos, que son mayoría entre la población a temperatura ambiente, además de aumentar la velocidad de difusión, la solubilidad, la reducción de la viscosidad y la tensión superficial de los componentes que intervienen en un determinado proceso (Azevedo, 2010).

La termoestabilidad de las proteínas depende de factores que estabilizan su plegamiento natural. La secuencia primaria de una proteína influye en la formación de sus estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias, siendo crucial para su termoestabilización. (Nelson & Cox, 2002). Aminoácidos como alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu) e isoleucina (Ile) estabilizan las estructuras proteicas al promover

interacciones hidrofóbicas. Los enlaces disulfuro entre los grupos sulfhidrilo de la cisteína (Cys) también son importantes para la estabilización, así como los enlaces débiles (no covalentes) como los de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals y las interacciones iónicas (Nelson & Cox, 2002).

El interés en microorganismos termófilos ha crecido debido a la estabilidad de sus enzimas a altas temperaturas, lo que es útil en la industria alimentaria. Sin embargo, el cultivo a gran escala de termófilos es difícil y costoso. Para abordar estos problemas, los investigadores estudian los genes de enzimas termófilas para expresarlos en microorganismos mesófilos como *E. coli* (Hong et al., 2007).

Determinación del Km y V_{máx}

Los valores de Km y V_{máx} para la α-glucosidasa recombinante, utilizando almidón como sustrato a 60 °C y pH 7, fueron 24,866 mg/mL y 278,217 μmol/mL/min, respectivamente. Comparar estos valores con otros estudios puede ser complicado debido a las diferentes condiciones experimentales y sustratos utilizados. Por ejemplo, Zhang et al. (2019) reportaron un V_{máx} de 306,3 μmol/min/mL para una α-glucosidasa recombinante con pNP-α-D-glucopiranosido como sustrato, lo que es más alto que el V_{máx} encontrado en este estudio. Además, el Km reportado en su trabajo fue de 2,321, indicando una mayor afinidad por el sustrato en comparación con el Km obtenido en este estudio. Como se indicó, esto podría deberse por el uso diferente de sustrato y condiciones diferentes en la cual se evaluó la cinética enzimática.

Sin embargo en otro estudio, Saptadip (2021) describió para *Geobacillus* sp. un K_m de hasta 36 mg/mL y un V_{max} de 222 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$, utilizando almidón como sustrato, lo que sugiere que los parámetros cinéticos dependen en alto grado del tipo de sustrato que se utiliza, ya que la α -glucosidasa recombinante en estudio, inclusive tiene una mejor afinidad por su sustrato en comparación con lo mencionado anterior.

Cada enzima tiene un valor de K_m específico que la define y que no debería variar significativamente. Además la K_m mide la afinidad de la enzima por el sustrato: valores bajos indican una alta afinidad, lo que significa que la enzima se satura rápidamente con pequeñas cantidades de sustrato. Por el contrario, un K_m alto sugiere una menor afinidad, haciendo que la enzima sea menos susceptible a inhibidores presentes en el medio de reacción. Esto es crucial en procesos industriales, donde contaminantes o subproductos podrían inhibir la actividad enzimática (Goldbeter, 2013).

Una K_m elevado también implica que la enzima mantiene una velocidad de reacción relativamente constante a lo largo de un amplio rango de concentraciones de sustrato. Esto facilita el control del proceso industrial, ya que no se requiere ajustar constantemente la cantidad de sustrato para mantener la actividad enzimática óptima (Acevedo et al., 2014). En procesos con sustratos de baja pureza, una enzima con un K_m alto puede operar eficazmente a pesar de las impurezas y las fluctuaciones en la concentración del sustrato (Castañeda, 2019).

VI. CONCLUSIONES

- Se logró producir la enzima α -glucosidasa recombinante de *Geobacillus kaustophilus* con una actividad de 11,780 U/mL a partir de la cepa de *E.coli* ArcticExpress(DE3) [pET28 AG], permitiendo su purificación mediante el método IMAC, recuperándose en esta fase 93 % y tras la ultrafiltración se obtuvo un factor de purificación cerca a 10 veces con una recuperación de 85 %.
- La evaluación de la purificación por SDS-PAGE reveló una única banda de α -glucosidasa recombinante desde el extracto crudo. Tras la ultrafiltración, la banda se mostró más definida y de aproximadamente 61,160 kDa.
- Tras la caracterización fisicoquímica de la α -glucosidasa recombinante se determinó que su actividad fue mayor entre 50 – 60 °C , con un óptimo a 60 °C y en un pH de 7. La enzima mostró una excelente termoestabilidad a 60°C durante 6 horas, manteniendo un 79% de actividad residual. Los valores de Km y velocidad máxima, calculados fueron 24,866 mg/mL y 278,217 μ mol/mL/min respectivamente.
- A concentraciones de 1, 2 y 5 mM, la actividad de la enzima es fuertemente inhibida por los iones metálicos Hg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} siendo más pronunciada la inhibición a 5 mM. Sin embargo a esa concentración el Ba^{2+} y el Na^{+} mostraron una activación significativa de la actividad de la enzima, comportamiento que a 1 mM, el Ca^{2+} y el K^{+} mostraban pero a medida que la concentración del ion aumentó la actividad de la proteína disminuyó.

VII. RECOMENDACIONES

Para futuros tesistas e investigadores interesados en la caracterización enzimática de la α -glucosidasa estudiada se proponen las siguientes recomendaciones:

- Si se quiere hacer una purificación mucho más estricta de la enzima, para otros fines, se recomienda incluir una etapa de cromatografía en Sephadex G75.
- Se sugiere realizar ensayos de hidrólisis en diferentes compuestos amilolíticos utilizando la enzima α -glucosidasa recombinante, para evaluar la tasa de producción de estos mismos. Consecuentemente se recomienda también analizar los productos de la hidrólisis enzimática mediante HPLC.
- Para complementar la caracterización se recomienda realizar ensayos para evaluar el efecto de agentes quelantes y surfactantes como: SDS, EDTA entre otros, sobre la actividad de la α -glucosidasa recombinante.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguero de Olivera, A. P. (2013). Bioprospecção de microorganismos com potencial para produção de enzimas amilolíticas. Universidade federal da grande dourados faculdade de Ciências Biológicas e ambientais mestrado em biologia geral/bioprospecção, Brasil.
- Amri, A., Ghamdi, M. A., Khan, J. A., Altayeb, H. N., Alsulami, H., Sajjad, M., Baothman, O. A., & Nadeem, M. S. (2022). *Escherichia coli* expression and characterization of α -amylase from *Geobacillus thermodenitrificans* DSM-465. Brazilian Journal of Biology, 82, e239449. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.23944>
- Andrews, A. T., & Coghill, R. M. J. (2016). α -Glucosidases: *Structure, function, and applications*. Current Enzyme Inhibition, 12(1), 1-16.
- Ardhi, A., Nadenggan Sidauruk, A., Suraya, N., Wahyu Pratiwi, N., Pato, U., & Saryono. (2020). *Molecular identification of amylase-producing thermophilic bacteria isolated from Bukit Gadang Hot Spring, West Sumatra, Indonesia*. Biodiversitas Journal of Biological Diversity, 21(3). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210319>

- Azevedo Carvalho, A. F. (2010). *“Purificação e caracterização bioquímica da α glicosidase termoestável produzida por *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756.”* Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” Instituto De Biociências – Rio Claro.
- Balcucho Escalante, J.(2017). *Producción de la proteína humana recombinante Galns como proteína fusión unida a un péptido de internalización celular para su potencial uso en terapia de reemplazo enzimático de la mucopolisacaridosis IVA.*
- Bearne, S. (2014). *Illustrating the effect of pH on enzyme activity using Gibbs energy profiles. ACS Publications, 91(1), 84-90.*
- Ben Belgacem, F. F., & Salleh, H. M. (2015). *Characterization of recombinant enzymes*
1. En Bioprocess & Molecular Engineering Research Unit, Department of Biotechnology Engineering, International Islamic University Malaysia.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-12397-4_4
- Bisswanger, H. (2002). *Enzyme kinetics Principles and Methods. Weinheim, Germany: WILEY-VCH.*
- Bon,S.,Gírio, F., Pereira, N. (2019). *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. Interciência, Rio de Janeiro, 10, pp. 241-272.*

- Bonfá, E. C., de Souza Moretti, M. M., Gomes, E., & Bonilla-Rodriguez, G. O. (2018). *Biochemical characterization of an isolated 50 kDa beta-glucosidase from the thermophilic fungus Myceliophthora thermophila M.7.7. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 311-318. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.008>
- Bradford, M. M. (1976). *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Buiza Urdanivia, Y. (2021). *Expresión, purificación y actividad enzimática de la proteína recombinante Catepsina L5 de Fasciola hepática (rCatL5Fh) obtenida en un sistema de expresión procariota (E. coli BL21)*. Universidad Cayetano Heredia.
- Bukhari, D. y Rehman, A. (2015). *Purification and Characterization of α -Amylase from Bacillus subtilis Isolated from Local Environment*. *Pakistan J. Zoo*, 47(4), 905-911.
- Castañeda, M. T. (2019). *Enzimas de interés biotecnológico*. Universidad Tecnológica Nacional- Facultad región la Plata.
- Cedrés, M. E. (2021). *Purificación y caracterización de amilasas de Geobacillus thermocatenulatus y pseudomonas fluorescens para su aplicación en reacciones de aminólisis*. Universidad de la Republica de Uruguay .

- Cereda, M. (2003). *Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas*. Fundação Cargill, São Paulo.
- Che Hussian, C. H. A., & Leong, W. Y. (2023). *Thermostable enzyme research advances: A bibliometric analysis*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00494-w>
- Chen, R. (2012). *Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond*. *Biotechnol Adv* 30: 1102-1107.
- Chiba, S. (1997). *Molecular mechanism of α -glucosidase and glucoamylase*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(8), 1233-1239.
- Cihan, A. C., Ozcan, B., Tekin, N., & Cokmus, C. (2012). *Characterization of a thermostable α -glucosidase from Geobacillus thermodenitrificans F84a*. In *Characterization of a thermostable α -glucosidase from Geobacillus thermodenitrificans F84a* (p. 1).
- Coleri Cihan, A., Benli, M., & Cumhuri, C. (2016). *Purification and characterization of intracellular and extracellular α -glucosidases from Geobacillus toebii strain E134*. *Cell Biochemistry and Function*, 69–81.
- Copeland, R. A. (2000). *ENZYMES: A Practical Introduction to Structure , Mechanism , and Data Analysis (Second)*. New York: Wiley-VCH.
- De Moraes, L. M. P. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Editora: Legis Summa, Ribeirão Preto, cap.13, p. 223-241, 2004.

- De Moraes, M. P.(2004). *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Legis Summa ed.,
Ribeirão Preto, 13, pp. 223-241.
- De Pablos Torró, L. M. (2021). *Diseño biotecnológico de protozoos de abejas para la expresión heteróloga de antígenos vacunales*. Universidad de Granada.
- Diofanor, A., Granados, C., & Guerrero, E. (2014). *Cinética Enzimática del Bagazo de Caña para la Producción de Glucosa Utilizando la Enzima Trichoderma longibrachiatum*. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v25n5/art10.pdf>
- Easyscan, A. (2024). *Columnas HisTrap™ HP*.
- Fedulova, N., Hanrieder, J., Bergquist, J., & Emren, L. (2007) *Expression and purification of catalytically active human PHD3 in Escherichia coli*. Protein Expr Purif 54: 1-10.
- Finore, I., Feola, A., Russo, L., Cattaneo, A., Di Donato, P., Nicolaus, B., Poli, A., & Romano, I. (2023). *Thermophilic bacteria and their thermozymes in composting processes: A review*. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 10(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00381-z>
- Fromm, H. J. (1975). *The Effect of Temperature and pH on Enzyme Activity*. Initial Rate Enzyme Kinetics. https://doi.org/10.1007/978-3-642-80966-8_8
- G. kaustophilus*, and *G. thermodenitrificans*. Int. J. Syst. Evol.
- Gadhawe, R., Mahanwar, Pensilvania, Gadekar, P. (2017). *Adhesivos a base de almidón para unir madera/compuestos de madera: Revisión*. Revista abierta de

química de polímeros, v. 7, núm. 2, pp. 19 -32. *gen. nov., sp. nov., Bacillus kaustophilus, G. thermocatenulatus*

Ginting, E. L., Wantania, L., Moko, E. M., Tumbol, R., Siby, M., & Wullur, S. (2021). *Isolation and identification of thermophilic amyolytic bacteria from Likupang Marine Hydrothermal, North Sulawesi, Indonesia*. Biodiversitas Journal of Biological Diversity, 22(6). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220638>

Goldbeter, A. (2013). *Oscillatory enzyme reactions and Michaelis–Menten kinetics*, Febs Letters: 587(17),pp. 2778– 2784.

Gonzales, A., & María, F. (2018). *Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en Escherichia coli*. Revista de Educación Bioquímica (REB), 14–27.

Gopinath, B., Anbu, P., Arshad, M., Lakshmi Priya, T., Voon, C., Hashim, U., & Chinni, S. (2017). *Procesos biotecnológicos en la producción de amilasa microbiana*.

Hakamata, W., Kurihara, M., Okuda, H., Nishio, T., Oku, T. (2009). *Diseño y Proyección Estrategias para inhibidores de α -glucosidasa basadas en Información Enzimológica*. Temas actuales en química medicinal, 9, pp.3-12.

Haki, G., Rakshit, S.K. *Developments in industrially important thermostable enzymes: a review*. *Bioresource Technology*, v. 89, p. 17-34, 2003. Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” Instituto De Biociências – Rio Claro

- Hasegawa, K., Kubota, M., & Matsuura, Y. (1999). *Roles of catalytic residues in alpha-amylases as evidenced by the structures of the product-complexed mutants of a maltotetraose-forming amylase*. *Protein Engineering*, 12(10), 819-824.
- Hashim, S. (2019). Starch-modifying enzymes. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 123, pp. 127-141.
- Henrissat, B. (1991). *A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities*. *Biochemical Journal*, 280(2), 309-316.
- Hinojosa Calderón, T. (2020). *Purificación y caracterización de la enzima pectinasa producida por Geobacillus sp p4*. Universidad Jorge Basadre Grohmann.
- Hong, J., Tamaki, H., Kumagai, H. (2007). *Cloning and functional expression of thermostable -glucosidase gene from Thermoascus aurantiacus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 73, pp.1331–1339.
- Hoon, S., Yerim, P., Jungwoo, N., Shin, K., & Kang, D. (2017). *Properties and applications of starch-modifying enzymes for use in the baking industry*. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 36(6), pp.154-167.
- Illanes, A. (2008). *Enzyme biocatalysis: Principles and applications*. In *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7>

- Indriati, G., & Megahati S.(2023). *Exploration of Thermophilic Bacteria: Systematic Literature Review*. Jurnal Penelitian Pendidikan IPA, 9(8), 411–416.
<https://doi.org/10.29303/jppipa.v9i8.4643>
- Janson, J. (2011). *Protein purification. Principles, High Resolution, Methods and Applications*. In Journal of Chemical Information and Modeling (third, Vol. 64 54).
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Jia, B., & Jeon, C. (2016). *High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives*. Open Biol 6: 160196.
- John, J. (2017). *Amylases-Bioprocess and Potential Applications: A Review*12. International Journal of Bioinformatics and Biological Science, 5(2), 41-503.
 DOI: 10.5958/2321-7111.2017.00006.34.
- Joshi, S.,R., Standl, E., Tong, N., Shah, P., Kalra, S., Rathod, R. (2015). *Therapeutic potential of α glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: an evidence-based review*. Expert Opin Pharmacother.16(13),1959-81.
- Karaki, N., Aljawish, A., Humeau, C., Muniglia, L., & Jasniewski, J.(2016). *Modificación enzimática de polisacáridos: mecanismos, propiedades y aplicaciones potenciales: una revisión*. Tecnología enzimática y microbiana, v. 90, pp. 1-18.
- Khersonsky, O., & Tawfik, D. S. (2010). Enzyme promiscuity: A mechanism and evolutionary perspective. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 471-505.

- Lara, A. R., Galindo, E., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2011). *Producción de proteína recombinante en bacterias: Estado del arte*. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 10(2),pp.209-223.
<https://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v10n2/v10n2a6.pdf>
- Läufer, A. (2017). *Enzimas de biorrefinería de almidón*. *Avances En Bioquímica*, 123, 137–152. Universidade federal da grande dourados facultade de Ciências Biológicas e ambientais mestrado em biologia geral/bioprospecção
- Melo, E., & Carvalho, I. (2006). *α - and β -glucosidases as molecular targets for drug development*. *New Chemistry*, 29(6), 840-843.
Microbiol. 51,pp. 433-446.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Miyano, M., Tanaka, K., Ishikawa, S., Mori, K., Miguel-Arribas, A., Meijer, W. J. J., & Yoshida, K. (2018). *A novel method for transforming the thermophilic bacterium Geobacillus kaustophilus*. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 127.
<https://doi.org/10.1186/s12934-018-0969-9>
- Muñoz Pérez, G., A. (2018). *Expresión heteróloga de la proteína PfAvra de Pseudoscopora fijiensis y análisis de su efecto*. *Biología molecular*, Yucatán, Mexico.

- Najm, T. A., & Walsh, M. K. (2022). *Characterization of Lipases from Geobacillus stearothermophilus and Anoxybacillus flavithermuscell Lysates*. Food and Nutrition Sciences, 13(03), 238–251. <https://doi.org/10.4236/fns.2022.133020>
- Nazina, T., Tourova, A., Novikova, A., Belyaev, & Ivanov. (2001). *Taxonomic*
- Nelson, D., & Cox, M. (2002). *Princípios de Bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier,
- Nieboer, E. y Richardson, D. (1980). *The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions*. Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical, 1(1), 3-26.
- Noguchi, A., Nishino, T., Nakayama, T. (2008). *Kinetic and thermodynamic characterization of the cold activity acquired upon single amino-acid substitution near the active site of a thermostable -glucosidase*. *Journal of Molecular Catalysis : Enzymatic*.
- Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Sharer, J., Moo, M. (2006). *Fungal glucoamylases*. *Biotechnology Advances*, 24, pp. 80-85.
- Okpara, M. O. (2022). *Microbial Enzymes and Their Applications in Food Industry: A Mini-Review*. *Advances in Enzyme Research*, 10(01), 23–47. <https://doi.org/10.4236/aer.2022.101002>

Olivos Hernández, K. V. (2020). *Caracterización bioquímica de las enzimas recombinantes aldosa-6-fosfato reductasas (NADPH) AtA6PR1 y 2, de Arabidopsis thaliana*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias.

OTRI. (2024). *Sistemas de expresión heteróloga para análisis funcional de genotecas metagenómicas (Patente)*. Universidad Pablo de Olavide.

Pandey, A., Benjamin, C., Soccol, P., Nigam, N., Krieger & Soccol. (1999). *The realm of microbial lipases in biotechnology*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29, 119–131.

Papriani, N. P., Ahmad, A., Pamenta, A. F. A., Natsir, H., & Karim, A. (2019). *Purification and characterization of α -glucosidase enzyme from rice groats*. *Journal of Physics: Conference Series*, 1341, 032017.
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1341/3/032017>

Pazoki, R., Vujkovic, M., Elliott, J., Evangelou, E., Gill, D., Ghanbari, M., Van Der Most, P. J., Pinto, R. C., Wielscher, M., Farlik, M., Zuber, V., De Knecht, R. J., Snieder, H., Uitterlinden, A. G., Lifelines Cohort Study, Boezen, H. M., Franke, L., Van Der Harst, P., Navis, G., ... Ramoni, R. B. (2021). *Genetic analysis in European ancestry individuals identifies 517 loci associated with liver enzymes*. *Nature Communications*, 12(1), 2579.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22338-2>

- Peixoto, S., Jorge, J., Terenzi, H., & Polizeli, M. (2003). *Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases*. In *International Microbiology*.
- Perez Márquez, A. (2016). *Análisis estructural y funcional de la proteína Clp de xanthomonas axonopodis pv.citri*. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.
- Peti, W., Page, R. (2007). *Strategies to maximize heterologous protein expression in Escherichia coli with minimal cost*. *Protein Expr Purif* 51: 1-10.
- Piscitelli, A., Pezzella, C., Giardina, P., Faraco, V., & Sannia, G. (2010). *Producción de lacasas heterólogas y su papel en aplicaciones industriales*. *Errores de Bioingeniería*, 1(4), 252–262.
- Polaina, J., & MacCabe, A. (2007). *Industrial Enzymes Structure, Function and Applications*. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Valencia, Spain.
- Porath, J., & Olin, B.(1983). *Biochemistry*. Academic Press.
- Rauda, A., Mohamed, Abu Bakar, S., Raja Noor, Z., Raja Abd, R. M., & Basri Thean, C. L. (2012). *Isolation of the encoding gene for a thermostable α glucosidase from Geobacillus stearothermophilus strain RM and its expression in Escherichia coli*. *African Journal of Microbiology Research*, pp. 2909–2917.

- Reeta J, Ackerman RJ, 2009. *Isolation, purification and characterization of a maltotetraose producing amylase from Pseudomonas stutzeri*. Arch. Biochem. Biophys. 145: pp. 105-14.
- Ribeiro, P., & Seravalli, A. (2007). *Química de alimentos*. Editora: Blucher, São Paulo, 2, pp. 58-60.
- Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E. y Gautieri, A. (2018). *Engineering of thermostable enzymes for industrial applications*. APL Bioengineering, 2(1),pp. 1-18.
- Rincon Silva, N. G., Rincon Silva, J. D., & Acosta Vargas, J. S. (2019). *Inhibition of α -glucosidase by naturally flavonoids as a control way in the development of diabetes mellitus*. Biociencias, Universidad Libre Barranquilla, 129–148.
- Rodríguez López, A., et al. (2016). *Recombinant human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) produced in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. Scientific Reports, 6, 36772.
- Rosano, G.L., & Ceccarelli, E.A. (2014). *Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges*. Front Microbiol 5: 172.
- Sadeghi, M., Naderi, H., Zarrabi, M., Ranjbar, B. (2006). *Effective factors in thermostability of thermophilic proteins*. Biophysical Chemistry, v. 119, pp. 256 – 270,

- Sahdev, S., Khattar, S.K., & Saini, K.S. (2008). *Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies*. Mol Cell Biochem 307: 249-264.
- Saida, F., Uzan, M., Odaert, B., Bontems, F. (2006). *Expression of highly toxic genes in E. coli: special strategies and genetic tools*. Curr Protein Pept Sci 7: 47-56.
- Sanka, I., Kusuma, A. B., Martha, F., Hendrawan, A., Pramanda, I. T., Wicaksono, A., Jati, A. P., Mazaya, M., Dwijayanti, A., Izzati, N., Maulana, M. F., & Widyaningrum, A. R. (2023). *Synthetic biology in Indonesia: Potential and projection in a country with mega biodiversity*. Biotechnology Notes, 4, 41–48.
<https://doi.org/10.1016/j.biotno.2023.02.002>
- Santagapita, P. (2015). *Materia de especialización CEBI_E1b técnicas de análisis en biotecnología Macromoléculas*. BIORAD.
- Santos, E. d. y Martins, M. L. (2003). *Effect of the medium composition on formation of amylase by Bacillus sp*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 46(1), 129-134.
- Saptadip, S. (2022). *Structural and Catalytical Features of Different Amylases and their Potential Applications*¹. Jordan Journal of Biological Sciences, 15(2), 311-337. <https://doi.org/10.54319/jjbs/1502202>
- Shuler, M. M., & Kargi, F. J. (2020). *Biotechnology: Principles and Applications*. Pearson Education.

- Silva Neto, M. P. (2020). *Expressão heteróloga e caracterização bioquímica de amilases putativas de bactérias termófilas*. Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Departamento de Biologia Celular Pós-graduação em Biologia Molecular.
- Simair, A. A., Qureshi, A. S., Khushk, I., Ali, C. H., Lashari, S., Bhutto, M. A., Mangrio, G. S., & Lu, C. (2017). Production and partial characterization of α -amylase from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and its potential applications. *BioMed Research International*, 2017, pp. 1-10.
- Sindhu, R., Binod, P. y Pandey, A. (2016). α -Amylases. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*, Amsterdam, Netherlands: Elsevier. pp. 3-24.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). *Microbial enzymes: Industrial progress in the 21st century*. *3 Biotech*, 6(2), 1-15.
- Solanki, P., Putatunda, C., Kumar, A., Bhatia, R., & Walia, A. (2021). *Microbial proteases: Ubiquitous enzymes with innumerable uses*. *3 Biotech*, 11(10), 428.
<https://doi.org/10.1007/s13205-021-02928-z>
- Sorensen, H.P., Mortensen, K.K. (2005). *Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in E. coli*. *J Biotechnol* 115:pp. 113-128.
- Souza Ferreira, L. (2015). *Alfa-glucosidases e sua atividade de formação de hemozoína em rhodnius prolixus e outros modelos*. Universidade estadual do norte fluminense darcy ribeiro – UENF.

- Souza, P. M. de, & Magalhães, P. O. (2010). *Application of microbial α -amylase in industry - A review. Brazilian Journal of Microbiology, 41(4), pp. 850-861.*
- study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of Geobacillus subterraneus*
- Suárez Núñez, C., Ramírez Vives, F., Monroy Hermosillo, Ó., Alazard, D., & Fernández Linares, L. (2004). *La vida a altas temperaturas: adaptación de los microorganismos y aplicación industrial de sus enzimas.*
- Suzuki, E., & Suzuki, R. (2016). *Distribution of branching glucanases among prokaryotes. Cellular and Molecular Life Sciences, 73(2), pp. 1-12.*
- Suzuki, Y., & Ozawa, J. (1992). *Certain properties of-glucosidase from Mucor racemosus. Agric. Biol. Chem, 41, pp. 1559–1565.*
- Svensson, B. (1988). *Regional distant sequence homology between amylases, alpha-glucosidases, and transglucanosylases. FEBS Letters, 230(1-2), pp. 72-76.*
- Terpe, K. (2006). *Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol 72: pp. 211-222.*
- Turkan, A., Özdemir, I., Erdogan, D., Kalay, S., Fincan, S. A., Enez, B., & Rezzukoglu, I. (2011). *Aislamiento y caracterización de α -amilasa de termofílica Geobacillus stearothermophilus. Opinión actual en biotecnología, 22S, S15–S152. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.05.248>*

- Vargas Pabón, L. C., Montoya, D., & Aristizábal, F. (s.f.). *Clonación y expresión en Escherichia coli de genes de celulasas de Clostridium IBUN 22A*. Revista Colombiana de Biotecnología, 4(1).
https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjGq7W5lvuDaxUyrpUCHZC0DVMQFnoECA0QAQ&url=https%3A%2F%2Fdialnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F4808979.pdf&usq=AOvVaw3O3S55wkoop3N0K_sq5M_3&opi=89978449
- Wang , S., Copeland, L.(2015). *Efecto de la hidrólisis ácida sobre la estructura y funcionalidad del almidón*. Revisión crítica en ciencia de los alimentos y nutrición, 55, pp. 1081–1097.
- Wang, Y.-H., Jiang, Y., Duan, Z.-Y., Shao, W.-L., & Li, H.-Z. (2009). *Expression and characterization of an α -glucosidase from Thermoanaerobacter ethanolicus JW200 with potential for industrial application*. Biología, 64(6),pp.1053–1057.
<https://doi.org/10.2478/s11756-009-0197-1>
- Wang, Z., Wang, L., Sun, W., & Li, H. (2014). *Characterisation of the thermostable alpha-glucosidase from Bacillus subtilis A101 and its potential application in starch hydrolysis*. International Journal of Biological Macromolecules, 66, 272-278. <https://link.springer.com/journal/11274>
- Wilson, Keith; Walker, J. (2010). *Principles and Techniques of Biochemistry and molecular Biology, 7th edition*. In Crystallography Reviews (seven edit, Vol. 25).
<https://doi.org/10.1080/0889311x.2019.1587415>

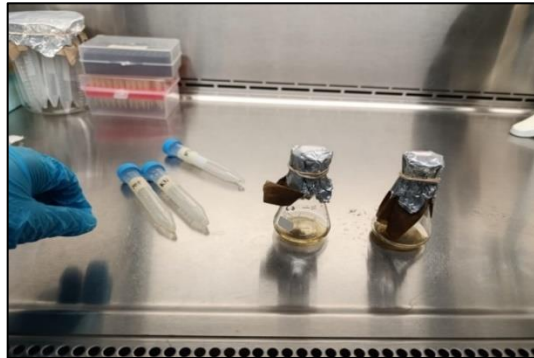
- Yadav, S. S., Singh, R. K., & Singh, A. K. (2014). *α-Glucosidases: Production, properties, and applications in food processing*. Food and Bioproducts Processing, 92(2), 225-237. DOI:10.1016/j.fbp.2013.11.004
- Yamamoto, K., Miyake, H., Kusunoki, M., & Osaki, S. (2010). *Crystal structures of isomaltase from Saccharomyces cerevisiae and in complex with its competitive inhibitor maltose*. FEBS Journal, 277(20), pp. 4205-4214.
- Yang, H., Liu, L., Li, J., & Chen, J. (2011). *Heterologous expression, biochemical characterization, and overexpression of α-amylase alkaline from Bacillus alcalophilus in Bacillus subtilis*. Microbial Cell Factories, pp.10, 77.
- Zeigler, D. (2001). *The Bacillus Genetic Stock Center*. The Ohio State University .
- Zhang Fan, W. W., Binta Maci, F., Song, C., Zhou, Y., Ji, L., & Yuan, Y. (2019). *Heterologous Expression of a Thermostable-Glucosidase from Geobacillus sp. Strain HTA-462 by Escherichia coli and Its Potential Application for Isomaltose–Oligosaccharide Synthesis*. Molecules, pp.2–12.
- Zhou, G., Jin, M., Cai, Y., & Zeng, R. (2015). *Characterization of a thermostable and alkaline-stable alpha-amylase from the deep-sea bacterium Flammeovirga pacifica*. International Journal of Biological Macromolecules, 80, pp. 676-682.

ANEXOS

Anexo 1. Criopreservado de cepa de *E.coli* ArcticExpress(DE3) [pET28 AG]



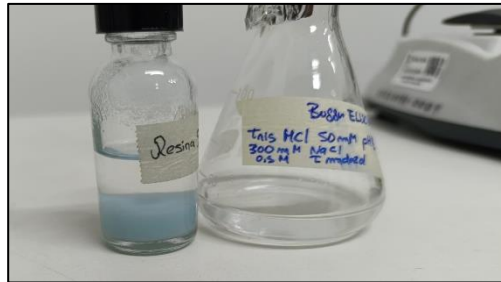
Anexo 2. Preparación para reactivación de la cepa recombinante *E. coli* ArcticExpress(DE3)



Anexo 3. Sonicación de muestras para lisis celular



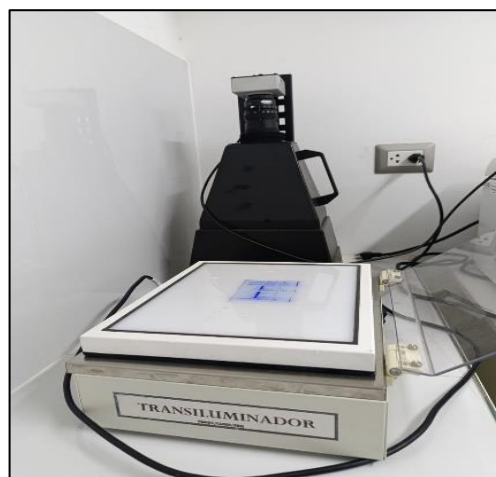
Anexo 4. Resina y buffer de elución para la purificación por IMAC



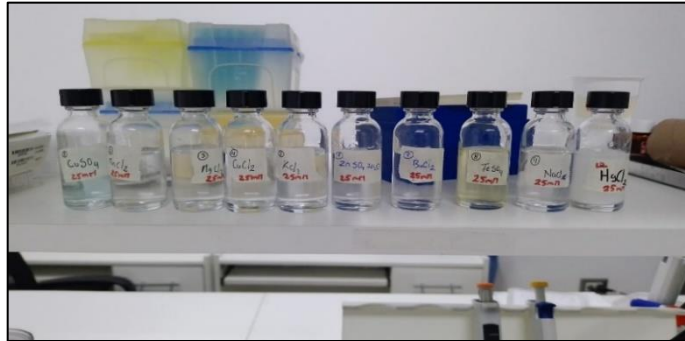
Anexo 5. Muestras de extracto crudo, eluido y concentrado enzimático



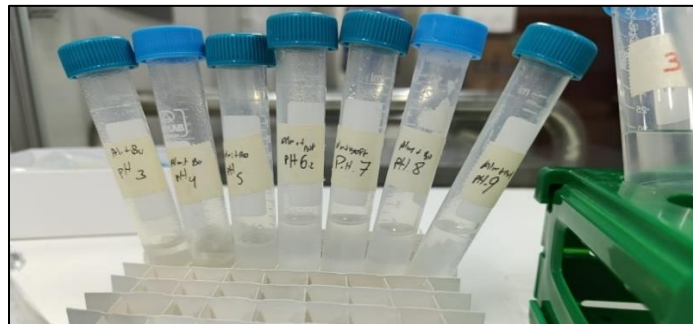
Anexo 6. Toma de fotografías del gel de poliacrilamida con el transiluminador



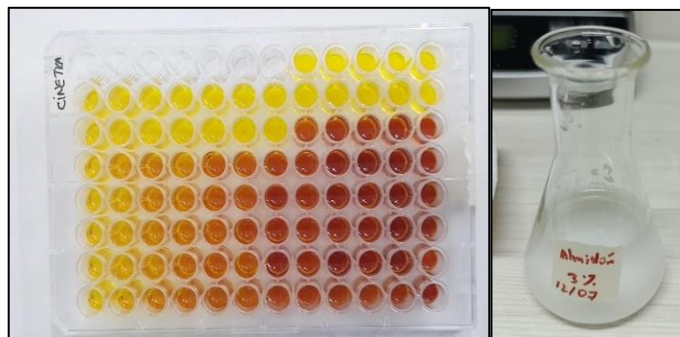
Anexo 7 . Preparación de iones metálicos



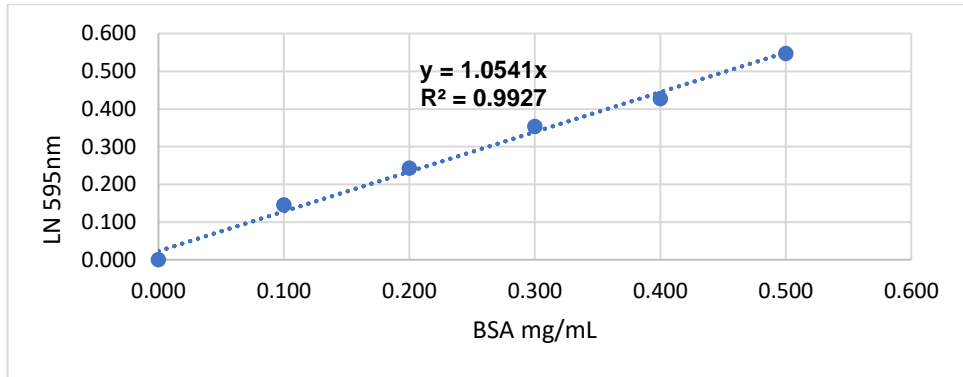
Anexo 8. Preparación de tampón más sustrato para la evaluación del efecto de pH



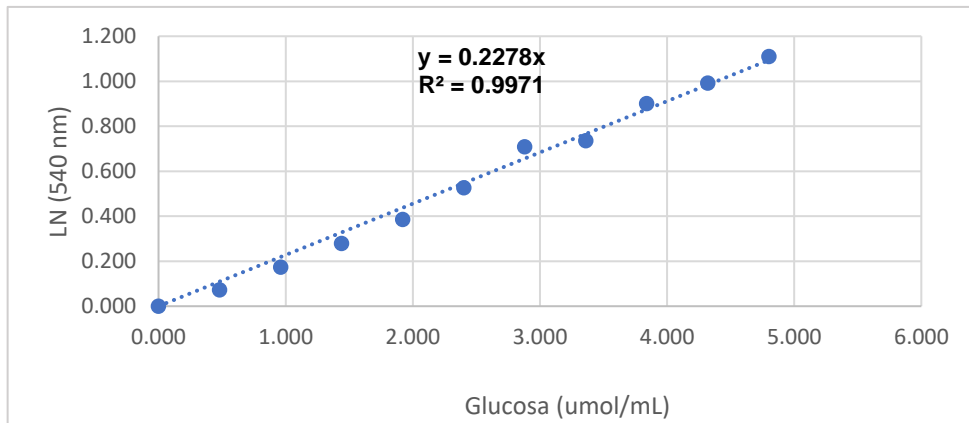
Anexo9. Lectura en microplaca de ensayo de cinetica enzimática con almidon al 3% a diferentes concentraciones



Anexo 9. Curva de calibración de Bradford



Anexo 10. Curva de calibración de DNS



Anexo 11. Ultrafiltración con el dispositivo de filtrado Amicon ultra-4 10 K





ASESOR

Dr. Roberto Castellanos Cabrera



CO-ASESOR

Dr. Alonso Roberto Poma Ticona



TESISTA

Bach. Senayda Yulisandra Quispe Quispe