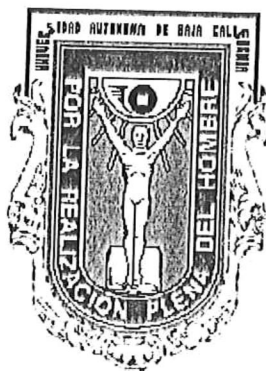


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



**EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA  $\alpha$ -GALACTOSIDASA  
PRODUCIDA POR *BACILLUS SPP.* PARA SU EMPLEO COMO ADITIVO  
ALIMENTICIO**

TESIS

que para obtener el título de

BIÓLOGO

presenta:

**JORGE LUIS ARÁMBURO GUERRERO**

Ensenada, Baja California, México. Junio 2004

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA  $\alpha$ -GALACTOSIDASA  
PRODUCIDA POR *BACILLUS SPP.* PARA SU EMPLEO COMO ADITIVO  
ALIMENTICIO

TESIS


que para obtener el título de

BIÓLOGO

presenta:

**JORGE LUIS ARÁMBURO GUERRERO**

Aprobada por:

  
DR. JORGE OLMOS SOTO  
Presidente del jurado

  
DRA. MA. DEL REFUGIO GONZÁLEZ ESPARZA  
Secretario

  
M.C. MIGUEL HÚMBERTO CARRILLO MENDÍVIL  
Primer vocal

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Olmos por su ayuda y dirección en este trabajo.

A Rosalía Contreras, Leonel Ochoa y Alejandro González, por su guía, asesoría y comentarios en la parte experimental.

A la Dra. María del Refugio González por sus correcciones y comentarios en la parte escrita del examen.

Al M.C. Miguel Carrillo por sus correcciones y comentarios en la parte escrita del examen.

A mi familia de Tecate, Tijuana y Ensenada, por todo su cariño y apoyo.

A Sharon, por su cariño, apoyo y por todo lo que me ha dado.

**ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO POR CONACYT CON EL  
PROYECTO NÚMERO 225080-5-4301PB.**

ESTE PROYECTO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JORGE OLMOS SOTO, EN EL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA MARINA DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA.

Resumen de la Tesis de Jorge Luis Arámburo Guerrero presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México. Junio de 2004.

**EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA  $\alpha$ -GALACTOSIDASA  
PRODUCIDA POR *BACILLUS SPP.* PARA SU EMPLEO COMO ADITIVO  
ALIMENTICIO**

Resumen aprobado por:

  
Dr. Jorge Olmos Soto

RESUMEN

Los altos costos de la alimentación en el cultivo de camarón han generado una búsqueda de fuentes alimenticias alternas, tanto marinas como terrestres, que disminuyan los costos de producción. La harina de soya, debido a su amplia disponibilidad y bajo costo, constituye una fuente de proteína alterna a la harina de pescado, capaz de disminuir los costos de producción. Sin embargo, la presencia de algunos factores antinutricionales limita la cantidad de este recurso en las dietas para camarón. Los  $\alpha$ -galactósidos son uno de los factores que impiden la inclusión de la harina de soya en altas proporciones en las dietas para camarón. Una manera de eliminar estos componentes de la harina de soya es a través del procesamiento enzimático de la harina de soya. Se identificó y caracterizó molecularmente bacterias del género *Bacillus* productoras de  $\alpha$ -galactosidasa (enzima capaz de degradar los  $\alpha$ -galactósidos presentes en la harina de soya), para evaluar su uso potencial en la alimentación del camarón y se caracterizaron algunas de las propiedades físico-químicas de la enzima. De esta manera, se logró la identificación de una cepa bacteriana productora de una  $\alpha$ -galactosidasa neutra, funcional dentro del rango de temperatura empleado en el cultivo de camarón. El análisis de la secuencia parcial del gen 16s rDNA reveló un 97.9% de similitud de la cepa estudiada, con la especie *Bacillus megaterium*. El género *Bacillus* destaca por su capacidad de producir una amplia variedad de enzimas y secretar grandes cantidades de proteínas. Además, la mayoría de las especies de éste género no son patógenas para los animales, incluyendo el ser humano. Basándose en las características atribuidas al género y en métodos moleculares, se logró la identificación de una especie del género *Bacillus* productora de una  $\alpha$ -galactosidasa, con características afines a su inclusión en dietas de camarón.

| ÍNDICE GENERAL:          | PÁGINAS |
|--------------------------|---------|
| AGRADECIMIENTOS.....     | II      |
| RESUMEN.....             | III     |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....   | V       |
| ÍNDICE DE TABLAS.....    | VI      |
| I.- INTRODUCCIÓN.....    | 1       |
| II.- ANTECEDENTES.....   | 3       |
| III.- JUSTIFICACIÓN..... | 11      |
| IV.- OBJETIVOS.....      | 12      |
| V.- METODOLOGÍA.....     | 13      |
| VI.- RESULTADOS.....     | 19      |
| VII.- DISCUSIONES.....   | 30      |
| VIII.- CONCLUSIONES..... | 35      |
| IX.- PERSPECTIVAS.....   | 36      |
| X.- BIBLIOGRAFÍA.....    | 37      |
| XI.- ANEXOS.....         | 45      |

| ÍNDICE DE FIGURAS:  | PÁGINAS |
|---|---------|
| Figura 1.- Oligonucleótidos específicos para amplificar el gen 16S rDNA.....  | 15      |
| Figura 2.- Electroforesis de los productos de PCR del gen 16S rDNA.....   | 22      |
| Figura 3.- Comparación del crecimiento promedio de las cuatro cepas en MMGM...  | 24      |
| Figura 4.- Árbol filogenético producto del alineamiento con especies emparentadas<br>filogenéticamente a <i>Bacillus</i> sp. Cepa 31.....                         | 23      |
| Figura 5.- Curva de crecimiento y cinética de producción promedio de la $\alpha$ -galactosidasa<br>de la cepa 31.....   | 25      |
| Figura 6.- Efecto del pH sobre la actividad de la enzima $\alpha$ -galactosidasa.....   | 26      |
| Figura 7.- Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima $\alpha$ -galactosidasa..   | 26      |
| Figura 8.- Determinación del tiempo óptimo de incubación para la $\alpha$ -galactosidasa<br>producida por <i>Bacillus</i> sp. cepa 31.....                        | 27      |
| Figura 9.- Estabilidad de la $\alpha$ -galactosidasa a través del tiempo.....   | 28      |
| Figura 10.- Cinética de la $\alpha$ -galactosidasa intracelular de <i>Bacillus</i> sp. cepa 31. Velocidad<br>de reacción (V) y concentración de sustrato [S]..... | 29      |

ÍNDICE DE TABLAS:

PÁGINAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla I.- Comportamiento de las cepas en diferentes medios.....                                  | 20 |
| Tabla II. Características y agrupación de las cepas en base a la morfología de la<br>espora..... | 21 |

## I.- INTRODUCCIÓN

La alimentación constituye uno de los costos mayores de producción en el cultivo de camarón. Los carbohidratos son una fuente de energía barata para la dieta; por lo tanto pueden ser efectivos en la reducción de los costos de producción (Shiau y Peng, 1992; en Arellano-Carbajal y Olmos-Soto, 2002). En los últimos años ha surgido el interés en identificar y desarrollar fuentes de proteína alternas para su empleo en los alimentos acuícolas (Tacon *et al.*, 1998; en Divakaran *et al.*, 2000). Entre los ingredientes que están siendo investigados como alternativos a la harina de pescado, la harina de soya es uno de los más prometedores (Lim *et al.*, 1998; Hardy, 1999; en Divakaran *et al.*, 2000), debido a la seguridad de su abastecimiento, precio y composición proteína/aminoácido/carbohidrato (Divakaran *et al.*, 2000). No obstante, la utilización de los carbohidratos por los camarones es limitada, debido a la incapacidad de procesamiento enzimático que presentan (Rosas *et al.*, 2000). Lo anterior sugiere un pretratamiento de los carbohidratos no asimilables hacia formas asimilables, dicho procesamiento puede llevarse a cabo mediante el empleo de enzimas hidrolíticas.

El uso de  $\alpha$ -galactosidasas como una alternativa biotecnológica para el procesamiento de  $\alpha$ -galactósidos presentes en semillas de leguminosas ya ha sido propuesto (Silvestroni *et al.*, 2002; Gote *et al.*, 2003). La enzima  $\alpha$ -galactosidasa ( $\alpha$ -D-galactósido-galactohidrolasa [EC 3.2.1.22]) cataliza la hidrólisis de los residuos de  $\alpha$ -galactosa unidos por enlaces  $\alpha$ -1,6 de los oligosacáridos y galactomananos poliméricos (Fridjonsson y Mattes, 2001).

El género *Bacillus* es uno de los más diversos y abundantes, encontrándose especies en el suelo y/o asociadas a fuentes de agua como ríos, aguas costeras y estuarios. Las especies del género *Bacillus* presentan una gran diversidad metabólica, conteniendo especies que degradan celulosa, almidón, proteínas, agar, hidrocarburos y otros sustratos derivados de fuentes de plantas y animales (Slepecky, 1992; Sonenshein *et al.*, 1993).

El hecho de que especies de *Bacillus* puedan ser mantenidas a altas tasas de crecimiento, a partir de una variedad de fuentes de carbono y nitrógeno de bajo costo (Harwood, 1992; en Arellano, 1999), la ausencia de productos tóxicos y la capacidad de producir y secretar grandes cantidades de proteínas, han favorecido su empleo en la industria biotecnológica (Olmos, 1996).

Debido a la incapacidad de procesamiento enzimático de los  $\alpha$ -galactósidos de la harina de soya, por parte del camarón, en este trabajo se identificaron cepas del género *Bacillus* productoras de  $\alpha$ -galactosidasas, se caracterizó al enzima  $\alpha$ -galactosidasa de interés, se monitoreó su cinética de producción y se identificó molecularmente una de las cepas.

## II.- ANTECEDENTES

La oferta total de harina de pescado es de aproximadamente 6.5 millones de tm. provenientes de la extracción de 30 millones de tm. de pescado entero, esta oferta no crecerá o lo hará muy poco. En cuanto a los requerimientos, la acuicultura utiliza actualmente el 35% de esta oferta, calculándose que dentro de diez años superará el 50% de la demanda (Berger, 2000).

Las harinas de oleaginosas ofertan más de 200 millones de tm., siendo la harina de soya la más abundante y en expansión. Por ello, su importancia creciente en la industria de alimentos balanceados, incluyendo a los de acuicultura. No obstante, el aumentar la dosis de harinas y aceites vegetales puede dificultar la digestibilidad en la alimentación de animales acuáticos y por lo tanto disminuir la eficiencia de los alimentos y aumentar la contaminación (Berger, 2000; Arellano-Carabajal y Olmos-Soto, 2002). Para algunas especies de penaeidos se ha encontrado que algunos carbohidratos afectan el crecimiento, la asimilación de nutrientes y producen alteraciones fisiológicas (Shiau, 1998; Rosas *et al.*, 2000). El contenido de azúcares de la harina de soya puede ser uno de los ingredientes que limite la digestibilidad de la misma. Por ejemplo, el consumo de productos de soya por animales monogástricos, incluyendo al hombre, está limitado por la presencia de  $\alpha$ -1,6-galactósidos (melibiosa, rafinosa, estaquiosa y verbascosa) provenientes del frijol de soya. Los  $\alpha$ -galactósidos permanecen sin digerir hasta llegar al intestino grueso, en donde son degradados por la microbiota intestinal generando cantidades considerables de metano, bióxido de carbono

e hidrógeno, estos gases pueden generar una aflicción gastrointestinal así como flatulencias (King *et al.*, 1998; Ishiguro *et al.*, 2001).

En base a la materia seca, los frijoles de soya contienen de 4.5 a 5.5% de sacarosa, de 2.8 a 4.9% de estaquiosa y de 0.4 a 1.4% de rafinosa, mientras que la harina de soya contiene de 7.4 a 9.9% de sacarosa, de 4.7 a 4.8% de estaquiosa y de 1 a 1.1% de rafinosa. En lo que respecta a polisacáridos, la harina de soya contiene de 8 a 10% de polisacáridos acídicos, 5% de arabinogalactano, de 1 a 2% de material celulósico y 0.5% de almidón (Potter y Potchanakorn, 1985).

El trisacárido rafinosa es el segundo componente más abundante, después de la sacarosa, presente en los tejidos de plantas. Los genes involucrados en la degradación de la rafinosa están organizados dentro de un operón: *rafR* (proteína reguladora), *rafA* ( $\alpha$ -galactosidasa), *rafB* (rafinosa permeasa), y *rafD* (sacarosa hidrolasa) (Moniruzzaman *et al.*, 1997).

La galactosa está presente en distintos oligosacáridos (por ejemplo, rafinosa, estaquiosa y melibiosa) y polisacáridos (galactomananos, pectina y xilanos) de plantas. En la pectina, la galactosa se encuentra principalmente en las cadenas laterales ramificadas, mientras que en el arabinoxilano, los residuos no ramificados de galactosa están unidos a la xilosa y arabinosa (De Vries *et al.*, 1999). Los galactomananos contienen residuos de galactosa unidos al esqueleto de manosa, y su remoción es efectuada por la acción de las  $\alpha$ -galactosidasas ( $\alpha$ -D-galactósido galactohidrolasa [EC 3.2.1.22]) (Duffaud *et al.*, 1997). Recientes avances en la industria petrolera y de gas

establecen el requerimiento de la hidrólisis enzimática *in situ* de los galactomananos empleados en la estimulación de pozos (Duffaud *et al.*, 1997).

Las  $\alpha$ -galactosidasas han encontrado un valor práctico en biotecnología en la industria papelera y de pulpas. También han sido utilizadas para la eliminación de D-rafinosa de la remolacha en la industria azucarera para facilitar la cristalización y consecuentemente mejorar el rendimiento de la producción de azúcar (Fridjonsson *et al.*, 1999). La aplicación potencial de las  $\alpha$ -galactosidasas en el procesamiento de melazas de soya y leche de soya ha sido demostrada (Kamaly, 1997; Fridjonsson *et al.*, 1999; Gote *et al.*, 2003). Las levaduras comúnmente utilizadas en la producción de pan y etanol son incapaces de metabolizar rafinosa. La utilización de melazas de remolacha como sustrato para la producción de levadura para hornear, ha promovido recientemente el desarrollo de cepas recombinantes que secreten  $\alpha$ -galactosidasa (Moniruzzaman *et al.*, 1997). Otra de las aplicaciones de la  $\alpha$ -galactosidasa, es en el mejoramiento de las propiedades gelificantes de la goma guar, disminuyendo la proporción de galactosa presente en los galactomananos (Dey *et al.*, 1993).

Una manera de afrontar los problemas de digestibilidad de la harina de soya es a través del uso de aditivos enzimáticos, o del empleo de microorganismos probióticos (Berger, 2000; Verschuere *et al.*, 2000). El empleo de microorganismos probióticos en la alimentación de camarones ha sido demostrado (Verschuere *et al.*, 2000). Dentro de las ventajas atribuidas a este tipo de aditivos alimenticios se encuentran las siguientes: inmunoestimulación, exclusión competitiva de microorganismos patógenos,

mineralización, nutrición y reducción de compuestos tóxicos (Berger, 2000; Verschuere *et al.*, 2000; Arellano-Carabajal y Olmos-Soto, 2002).

El mercado mundial de enzimas alcanzó en 1995 ganancias de aproximadamente 1000 millones de dólares y dos terceras partes de estas enzimas fueron producidas por miembros del género *Bacillus* (Ferrari *et al.*, 1993). De este mercado, las carbohidrasas ocupan el segundo lugar en producción (Godfrey y West, 1996).

Las  $\alpha$ -galactosidasas ocurren en una gran variedad de microorganismos, plantas y animales, y algunas de ellas han sido caracterizadas (Ishiguro *et al.*, 2001). Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los residuos de galactosa unidos por un enlace  $\alpha$ -1,6 de oligosacáridos como melibiosa (galactosa- $\alpha$ -1,6-glucosa), rafinosa (galactosa- $\alpha$ -1,6-sacarosa) y estaquiosa (galactosa- $\alpha$ 1,6-rafinosa), además de hidrolizar los galactomananos poliméricos (Fridjonsson *et al.*, 1999). Las  $\alpha$ -galactosidasas eucarióticas presentan un grado significativo de homología en su secuencia de aminoácidos y han sido agrupadas dentro de la familia 27 en la clasificación de las glucosil hidrolasas, mientras que las  $\alpha$ -galactosidasas bacterianas son agrupadas en la familia 32. La masa molecular promedio de las subunidades de las  $\alpha$ -galactosidasas de la familia 32 es de alrededor de 80 kDa y la de las enzimas de la familia 27 es de aproximadamente 50 kDa (Fridjonsson *et al.*, 1999). Generalmente, las  $\alpha$ -galactosidasas tienen un pH óptimo en el rango de 6 a 7, mientras que el pH óptimo las de  $\alpha$ -galactosidasas de levaduras y hongos se encuentra entre 3 y 5 (Gote *et al.*, 2003).

Las  $\alpha$ -galactosidasas producidas por microorganismos procarióticas son principalmente intracelulares, habiendo pocos casos reportados de  $\alpha$ -galactosidasas extracelulares (Wong, 1990). En *Bacillus stearothersophilus* SBFT, *B. stearothersophilus* AT7 y *Bacillus* sp. JF<sub>2</sub>, las  $\alpha$ -galactosidasas son intracelulares (Delente *et al.*, 1974; Pederson y Goodman, 1980; Li *et al.*, 1997). Por otra parte, las  $\alpha$ -galactosidasas producidas por *B. stearothersophilus* ATCC 266 y *B. stearothersophilus* NCIM5146 son secretadas al medio (Talbot y Sygusch, 1990; Gote *et al.*, 2003).

En lo referente a la temperatura óptima de las  $\alpha$ -galactosidasas producidas por microorganismos, tanto eucariotas como procariotas, va desde los 30°C hasta los 105°C (Delente *et al.*, 1974; Pederson y Goodman, 1980; Gherardini *et al.*, 1985; Li *et al.*, 1997; Wong, 1990; Talbot y Sygusch, 1990; Overbeeke *et al.*, 1990; Duffaud *et al.*, 1997; Kamaly, 1997; King *et al.*, 1998; Manzanares *et al.*, 1998; Fridjonsson *et al.*, 1999; Ishiguro *et al.*, 2001; Silvestroni *et al.*, 2002; Shabalin *et al.*, 2002; Gote *et al.*, 2003).

Las  $\alpha$ -galactosidasas son inhibidas por los iones  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{+}$  (Fridjonsson *et al.*, 1999; Gote *et al.*, 2003). También se ha demostrado la inhibición competitiva generada por algunos azúcares, como la D-arabinosa, D-galactosa y celobiosa (Pederson y Goodman, 1980). En lo que respecta a la afinidad por los diferentes sustratos de las  $\alpha$ -galactosidasas, existe una tendencia a la disminución de la actividad conforme se incrementa la longitud de la cadena de los  $\alpha$ -galactooligosacáridos (Talbot y Sygusch, 1990; Fridjonsson *et al.*, 1999; Gote *et al.*, 2003).

Li y colaboradores (1997) demostraron que la mayor producción de  $\alpha$ -galactosidasa por *Bacillus* sp. JF<sub>2</sub> se llevó a cabo cuando se empleó melibiosa como fuente de carbono y cuando el pH inicial del medio era 7.5 a 35°C. La mayor producción de  $\alpha$ -galactosidasa se llevó a cabo a las 65 h empleando melibiosa o rafinosa como fuente de carbono.

Talbot y Sygusch (1990) determinaron para la  $\alpha$ -galactosidasa del termófilo *B. stearothermophilus* ATCC 266 una constante de Michaelis-Menten (K<sub>m</sub>) de 0.25 mM, empleando p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosido (PNPG) como sustrato. Por otro lado, Pederson y Goodman (1980) analizando las  $\alpha$ -galactosidasas I y II producidas por *B. stearothermophilus* AT7, encontraron una K<sub>m</sub> de 0.47 mM y 0.53 mM para el PNPG, respectivamente. Similarmente, Fridjonsson y colaboradores (1999) estimaron una K<sub>m</sub> de 0.38 mM para el PNPG, en la  $\alpha$ -galactosidasa producida por *B. stearothermophilus* NUB3621.

El miembro más representativo del género *Bacillus* es *B. subtilis*, el cual es una eubacteria ampliamente distribuida que habita principalmente en suelo, aunque también se le encuentra en el aire, ríos y estuarios (Priest, 1989). *B. subtilis*, después de *Escherichia coli*, es la eubacteria mejor caracterizada, y entre los microorganismos Gram-positivos, es la más fácil de manipular en términos genético-moleculares. Los avances en la tecnología del DNA recombinante y en el entendimiento de la expresión génica, particularmente en *B. subtilis*, han abierto nuevos campos para la utilización de *B. subtilis* y otros *Bacillus* en muchas áreas de investigación básica y aplicada

(Slepecky, 1992; Olmos, 1996; Arellano-Carbajal y Olmos-Soto, 2002; Olmos-Soto y Contreras-Flores, 2003).

*B. subtilis* es una bacteria generalmente reconocida como segura (GRCS, generally recognized as safe (GRAS)), por la Food and Drug Administration (FDA) de los E.U.A.. Tiene la capacidad de secretar directamente al medio grandes cantidades de enzimas degradativas, entre las cuales se encuentra la subtilisina (Olmos *et al.*, 1997). En los últimos años, el desarrollo de sistemas de producción de proteínas heterólogas, usando a *B. subtilis* como microorganismo huésped, se ha convertido en uno de los más importantes (Olmos-Soto y Contreras-Flores, 2003).

La producción típica de un enzima por *Bacillus* en procesos de fermentación se lleva a cabo en un período corto de tiempo, mediante el uso de fuentes de carbono y nitrógeno de muy bajo costo. Estas características han demostrado que especies de *Bacillus* son buenos candidatos para producir niveles altos de enzimas a costos competitivos (Ferrari *et al.*, 1993; Godfrey y West, 1996).

La identificación de bacterias se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante el aislamiento del microorganismo y el estudio de sus características fenotípicas, incluyendo la tinción de Gram, morfología, requerimientos para su cultivo y reacciones bioquímicas. No obstante, estos métodos de identificación presentan notables desventajas. Primero, no pueden ser empleadas en microorganismos no cultivables. Segundo, ocasionalmente se encuentran organismos cuyas características bioquímicas no caen dentro de ningún género o especie conocida. Tercero, la identificación de

organismos de lento crecimiento es difícil y extremadamente laborioso (Woo *et al.*, 2003).

La comparación de secuencias de genes de diferentes especies de bacterias ha demostrado que el gen 16S rDNA se encuentra altamente conservado, tanto dentro de una misma especie como dentro de especies de un mismo género (Woo *et al.*, 2003). Además, se encuentra presente de manera universal en bacterias (Weisburg *et al.*, 1991) y presenta regiones variables específicas para una misma especie (Drancourt *et al.*, 2000). El gen 16S rDNA es el gen más aceptado en la clasificación e identificación de bacterias (Weisburg *et al.*, 1991).

Hagström y colaboradores en el 2002, analizaron el grado de relación DNA-DNA contra la similitud en el gen 16S para una gran cantidad de bacterias aisladas de ambientes marinos y encontraron que una similitud en secuencia, en el gen 16S rDNA  $\geq 97\%$ , es un nivel confiable para agrupar bacterias dentro de una misma especie (Hagström *et al.*, 2002).

### III.- JUSTIFICACIÓN

La expansión rápida del cultivo de camarón y la acuicultura, aunado al agotamiento de los recursos marinos empleados en la alimentación de éste y otros organismos, hacen necesario el desarrollo de fuentes alternas de alimento. Una de las fuentes más abundantes y económicas y con un perfil nutritivo deseable, lo constituye la harina de soya. Sin embargo, la harina de soya contiene algunos factores antinutricionales, entre estos se encuentran los  $\alpha$ -galactooligosacáridos, tales como la rafinosa y estaquiosa. La  $\alpha$ -galactosidasa es la enzima responsable de la degradación de este tipo de azúcares, es por ello que el aislamiento de microorganismos capaces de producir ésta enzima, ofrece oportunidades en el mejoramiento y optimización del empleo de harina de soya en la alimentación de camarón.

El género *Bacillus* destaca por ser empleado en la producción de diversas enzimas. La mayoría de las especies del género *Bacillus* no son patógenas para los animales, dicha cualidad facilita su empleo en la alimentación de otros organismos, por ejemplo el camarón, sin poner en riesgo la salud humana.

El aislamiento de microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* productores de  $\alpha$ -galactosidasas y la caracterización de estas enzimas, pueden ayudar a la resolución del problema de la alimentación en el camarón, además de reducir los costos de producción.

#### IV.- OBJETIVOS

##### OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar molecularmente cepas de *Bacillus* productoras de  $\alpha$ -galactosidasas, y determinar la cinética de producción del enzima y las propiedades fisicoquímicas de la enzima.

##### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar cepas del género *Bacillus* productoras de  $\alpha$ -galactosidasa.

Identificar a nivel de especie a la cepa productora de  $\alpha$ -galactosidasa.

Caracterizar la curva de crecimiento de la cepa productora de la enzima.

Monitorear la cinética de producción de la enzima durante el crecimiento.

Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de la  $\alpha$ -galactosidasa producida.

## V.- METODOLOGÍA

### V.1. Caracterización e identificación de las cepas.

#### Microorganismos

Las cepas se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE (Cepas 2, 5, 6, 9a, 10b, 18, 21a, 23, 30, 31, 33, 35, 37 y 42), *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y *Bacillus subtilis* BB80. Los microorganismos están preservados a  $-70$  °C en tubos eppendorf de 1.5 mL con medio Luria-Bertani (LB) y glicerol.

#### Condiciones de crecimiento

Los experimentos se llevaron a cabo en medio mineral (Martínez *et al.*, 1997) con modificaciones en la composición de carbohidratos, utilizando agar para las cajas petri y sin agar para cultivos en líquido. El medio mineral presenta la siguiente composición por litro: 4 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5.32 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 6.4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.4 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 mg de  $\text{MnCl}_2$ , 40 mg de  $\text{CaCl}_2$ , y 30 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g de glucosa y 2 g de melibiosa; el pH se ajusta a 7.0. Todos los cultivos en líquido se llevaron a cabo por duplicado.

#### V.1.1. Búsqueda de cepas productoras de $\alpha$ -galactosidasa.

La selección se realizó a partir de cepas previamente aisladas por Contreras (1997) y mantenidas en el laboratorio a  $-70$  °C. Las cepas se reactivan en medio LB sólido, posteriormente se transfirieron a medio mineral sólido suplementado con glucosa

y melibiosa (MMGM). Una vez crecidas en este medio, se transfieren a otra placa con las mismas condiciones más la adición de 50  $\mu\text{L}$  del sustrato específico cualitativo  $\alpha\text{-X-Gal}$  (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\alpha\text{-D-galactopiranosido}$ ) de una solución patrón de 10 mg/mL. Las colonias que se seleccionaron degradaron el sustrato específico y presentaron coloración azul (Overbeeke *et al.*, 1990).

#### V.1.2. Caracterización fenotípica

Se llevó a cabo una tinción de Gram con las cepas seleccionadas para determinar si son Gram positivas y una tinción con verde de Malaquita, para conocer la forma de la espora y determinar a que grupo pertenece dentro del género *Bacillus* (Priest, 1993).

#### V.1.3. Identificación Molecular

##### Extracción de DNA Cromosomal

Se aisló DNA cromosomal de las cepas seleccionadas empleando la técnica de extracción por fenol-cloroformo-alcohol isoamílico descrita en el Manual de Prácticas “Técnicas en Genética Molecular”, veáse apéndice 1 (Olmos y Contreras, 1999).

##### Amplificación por PCR del gen 16s rDNA

Se llevó a cabo un PCR a partir del DNA cromosomal con oligos específicos para el gen que codifica para el RNA ribosomal 16S (fig. 1). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 1  $\mu\text{L}$  de DNA cromosomal (100ng/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de *Taq* polimerasa (1U/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de oligo Delantero (200ng/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de oligo Reverso (200ng/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$

de dNTP's (10mM), 5  $\mu$ L de amortiguador, 3  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> y 37  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada estéril.

|                    |    |         |
|--------------------|----|---------|
| Bseq1 (Delantero)  |    |         |
| 5'                 | 3' | 17 pb   |
| gagtttgatcctggctc  |    | Tm=52°C |
| Bacillus (Reverso) |    |         |
| 5'                 | 3' | 17 pb   |
| cccagttccaatgacc   |    | Tm=54°C |

Figura. 1.- Oligonucleótidos específicos para amplificar el gen 16S rDNA (Arellano-Carbajal y Olmos-Soto, 2002).

El programa de PCR empleado fue: un ciclo a 95°C por 6 min; 25 ciclos con tres series de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C y 2 min a 72°C y un ciclo a 72°C por 10 min (Arellano-Carbajal y Olmos-Soto, 2002).

El producto de PCR fue posteriormente purificado por el método de fenol-cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989). Dicho producto fue resuspendido en agua destilada estéril, se verificó en un gel de agarosa al 1.2%, y se envió a secuenciar a San Diego State University, Microchemical Core Facility ([www.sci.sdsu.edu/dnacore/sdsu\\_dnacore.html](http://www.sci.sdsu.edu/dnacore/sdsu_dnacore.html)). El DNA debe estar puro a una concentración mínima de 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L en un volumen de 10  $\mu$ L.

#### V.1.4. Curvas de crecimiento y cinética de producción de las $\alpha$ -galactosidasas.

##### Curva de crecimiento

Se estrió en medio mineral con glucosa y melibiosa (MMGM) una noche antes. A la noche siguiente, se inoculó una colonia en 20 mL de MMGM líquido en un matraz de 250 mL, se incubó toda la noche a 300 rpm a 37°C. En la mañana siguiente, se transfirieron 2 mL a otro matraz con las mismas condiciones y se incubó por 4hr. Después se inocularon 2 mL en otro matraz bajo las mismas condiciones y se siguió la curva de crecimiento cada hora leyendo la densidad óptica a 600 nm y tomando 1mL de muestra. Las muestras se centrifugaron por 1 min a 1600 g con el fin de separar el sobrenadante del paquete celular y se almacenaron a -20°C.

##### Determinación de la actividad intracelular

Se resuspendió el paquete celular en 1 mL de agua destilada. Se tomaron 20  $\mu$ L de muestra y se agregaron 710  $\mu$ L de solución amortiguadora de fosfatos ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.06M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.04M, KCl 0.01M y  $\text{MgSO}_4$  0.001M, a pH 7), se preparó un blanco con 750  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos. Se agregaron 10  $\mu$ L de lisozima (10 mg/mL) y se incubó por 5 min a 37°C. Se adicionaron 10  $\mu$ L de tritón al 10%, se agregaron 100  $\mu$ L de p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosido ( $\alpha$ PNPG)(4.5 mg/mL), se tomó el tiempo de inicio de la reacción, se incubó a 37°C por 15 min y se terminó la reacción agregando 150  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.2 M. El p-nitrofenol liberado se determinó midiendo la absorbancia a 405 nm. Se midió la actividad enzimática de la muestra y se cuantificó proteína por el

método de Lowry utilizando albúmina de suero bovino como control (Lowry *et al.* , 1951).

#### Determinación de la actividad extracelular

Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y se agregó 720  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de fosfatos, se preparó un blanco con 750  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de fosfatos. Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de  $\alpha\text{PNPG}$  (4.5 mg/mL) y se tomó el tiempo de inicio de la reacción. Se incubó por 15 min a  $37^\circ\text{C}$  y se detuvo la reacción adicionando 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.2 M. El p-nitrofenol liberado se determinó midiendo la absorbancia a 405 nm. Se midió la actividad enzimática de la muestra y se cuantificó proteína por el método de Lowry utilizando albúmina de suero bovino como control (Lowry *et al.* , 1951).

El coeficiente de extinción molar ( $\xi$ ) para el p-nitrofenol para estas condiciones fue de  $18500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Arellano, 1999).

Fórmula para determinar actividad específica (AE):

$$\text{AE} = \frac{\text{Unidades de } \alpha\text{-galactosidasa (U)}}{\text{mg}} = \frac{\text{Abs}_{405} \times 0.001 \text{ L} \times \text{factor de dilución}}{\xi \times \text{Alícuota mL} \times 15 \text{ min} \times \text{mg proteína}}$$

#### Determinación del pH óptimo

Con la finalidad de evaluar la aplicabilidad de la enzima a los cultivos de camarón, se determinó efecto del pH sobre ésta, empleando tres tipos de soluciones.

Para el pH 5 se utilizó amortiguador de acetato de sodio 100 mM, para pH 7 se utilizó amortiguador de fosfato de sodio 100 mM y se empleó amortiguador de Tris 100 mM para pH 9. Las condiciones del ensayo fueron las mismas que para el ensayo enzimático descrito en la página 17 (ensayo enzimático estándar).

#### Determinación de la temperatura óptima

Se llevó a cabo un ensayo enzimático estándar (amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7) a 28, 37, 40 y 45 grados centígrados, para determinar en cual de estas temperaturas se registra la mayor actividad específica, y así evaluar su empleo en el cultivo del camarón.

#### Determinación del tiempo óptimo de reacción

Empleando distintos tiempos de incubación (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 minutos) y por medio de un ensayo enzimático estándar se determinó el tiempo óptimo de reacción, es decir el intervalo en el cual la enzima degrada proporcionalmente la mayor cantidad de sustrato con respecto al tiempo.

#### Determinación de la estabilidad de la enzima a través del tiempo

Para determinar la estabilidad del enzima con respecto al tiempo, se incubó la muestra sin sustrato durante cuatro horas a 37°C. Después de cada hora se tomó una muestra, se agregó el sustrato y se midió la actividad enzimática. Las condiciones de reacción fueron las mismas que para la cinética enzimática.

#### Determinación de parámetros cinéticos de la $\alpha$ -galactosidasa

Para determinar la actividad enzimática de la  $\alpha$ -galactosidasa se realizó un ensayo enzimático estándar (pH 7 y 37°C) en el tiempo óptimo de reacción y a distintas

concentraciones de sustrato. A partir de los datos generados se realizó una gráfica de Michaelis-Menten utilizando el programa PRIZM versión 1996 donde se determinó la Velocidad Máxima ( $V_{max}$ ) y la constante Michaelis-Menten ( $K_m$ ) del enzima.

## VI.- RESULTADOS

### VI.1. Caracterización e identificación de las cepas.

#### VI.1.1. Búsqueda de cepas productoras de $\alpha$ -Galactosidasas.

En las cepas reactivadas se llevó a cabo un sondeo con la finalidad de evaluar las cepas con características afines al propósito del trabajo, la siguiente tabla muestra algunas características de las cepas analizadas.

Tabla I.- Comportamiento de las cepas en diferentes medios. Luria-Bertani (LB), medio mineral (MM), glucosa (G), melibiosa (M) y rafinosa (R).

| Cepas           | LB  | MMGM | MMGR | $\alpha$ -X-Gal | Halo en MMGM |
|-----------------|-----|------|------|-----------------|--------------|
| 2               | +++ | +++  | +++  | ++              | -            |
| 5               | +++ | ++   | ++   | -               | -            |
| 6               | +++ | +    | +    | -               | -            |
| 9 <sup>a</sup>  | +++ | ++   | ++   | +               | +            |
| 10b             | +++ | +++  | +++  | +               | -            |
| 18              | +++ | +    | +    | -               | -            |
| 21 <sup>a</sup> | +++ | -    | -    | -               | -            |
| 23              | +++ | +    | +    | -               | -            |
| 31              | +++ | +++  | +++  | +++             | +++          |
| 33              | +++ | +++  | +++  | ++              | ++           |
| 35              | +++ | -    | -    | -               | -            |
| 37              | +++ | +++  | +++  | -               | -            |
| 42              | ++  | +    | +    | +               | +            |
| 50              | +++ | ++   | ++   | -               | -            |

Se seleccionó a las cepas 2, 9<sup>a</sup>, 10b, 31, 33 y 42, debido a que fueron capaces de degradar el sustrato X- $\alpha$ -Gal, además de crecer en medio mineral con glucosa y melibiosa ó rafinosa.

### VI.1.2. Caracterización fenotípica.

Todas las cepas resultaron ser Gram positivas, en base a la forma de la espora las cepas 2, 9a, 10b, 33 y 42 se incluyeron dentro del grupo IV del género *Bacillus* por presentar una espora de forma esférica. La cepa 31 se incluyó dentro del grupo II del género *Bacillus* por presentar una espora de forma elipsoidal.

Tabla II. Características y agrupación de las cepas en base a la morfología de la espora.

| Cepa           | Distensión | Posición | Forma      | Grupo |
|----------------|------------|----------|------------|-------|
| 2              | No         | Central  | Esférica   | IV    |
| 9 <sup>a</sup> | No         | Central  | Esférica   | IV    |
| 10b            | No         | Central  | Esférica   | IV    |
| 31             | No         | Lateral  | Elipsoidal | II    |
| 33             | No         | Central  | Esférica   | IV    |
| 42             | No         | Central  | Esférica   | IV    |

### VI.1.3. Identificación filogenética de las cepas.

Se amplificó un fragmento del gen 16S rDNA de las cepas 2, 9a, 10b, 31, 33 y 42, el cual fue verificado en un gel de agarosa al 1.2% donde mostró un comportamiento migratorio correspondiente al esperado (650 pb) para especies del género *Bacillus* (fig.2).

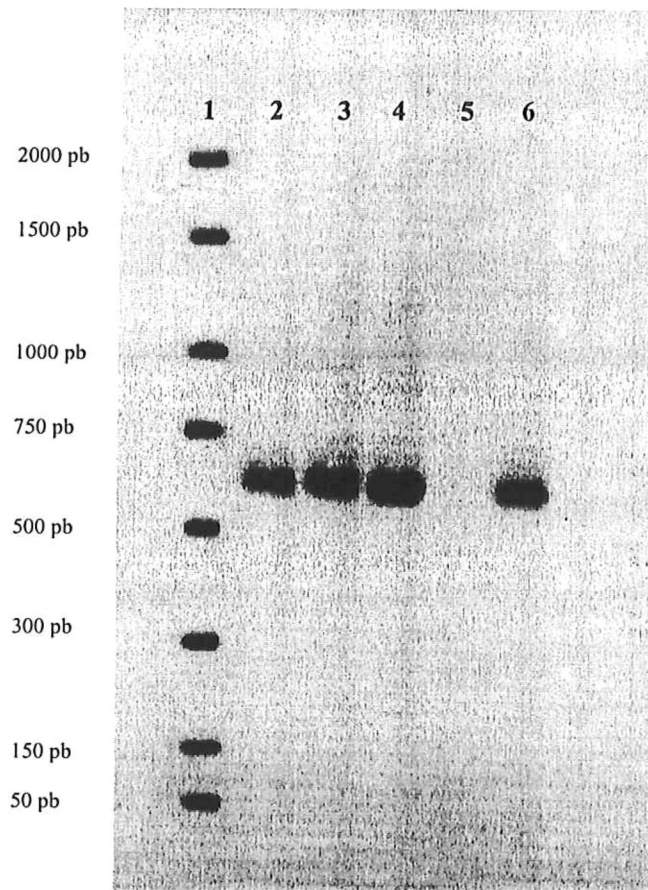


Figura 2.- Electroforesis de los productos de PCR del gen 16S rDNA. Carril 1 marcador de peso molecular; carriles 2, 3 y 4, producto de PCR de las cepas 2, 10b y 31; carril 5 producto de PCR de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , y carril 6 producto de PCR de *Bacillus subtilis* BB80.

Una vez comprobado que las cepas pertenecían al género *Bacillus*, se seleccionó a la cepa 31 para secuenciar debido a sus características. Se llevó a cabo un alineamiento y se generó un árbol filogenético, empleando el programa MegAlign del paquete software DNASTar. Para el análisis filogenético se utilizaron las primeras 650 pb del gen 16S rDNA de 60 especies especies del género *Bacillus* y de especies emparentadas

filogenéticamente al género. Las 60 secuencias fueron obtenidas del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). También se llevó a cabo una matriz de distancia por el método “Neighbor” del programa Phylip versión 3.5c, el cual reveló un mayor grado de parentesco de la cepa 31 con la especie *Bacillus megaterium* con un 97.9% de similitud y un 2.1% de discrepancia (<http://rdp.cmc.msu.edu/html/>) (Fig.3), concluyéndose que la cepa 31 es *Bacillus megaterium*.

## VI.2. Caracterización de la $\alpha$ -galactosidasa.

### VI.2.1. Curva de crecimiento y cinética de producción de la $\alpha$ -galactosidasa.

Se realizaron curvas en medio mineral con glucosa (0.1%) y melibiosa (0.2%) de las cepas 2, 9a, 10b y 31. Se seleccionó a la cepa 31 para monitorear la producción de la  $\alpha$ -galactosidasa, debido a que fue la cepa que presentó mayor crecimiento (fig. 4).

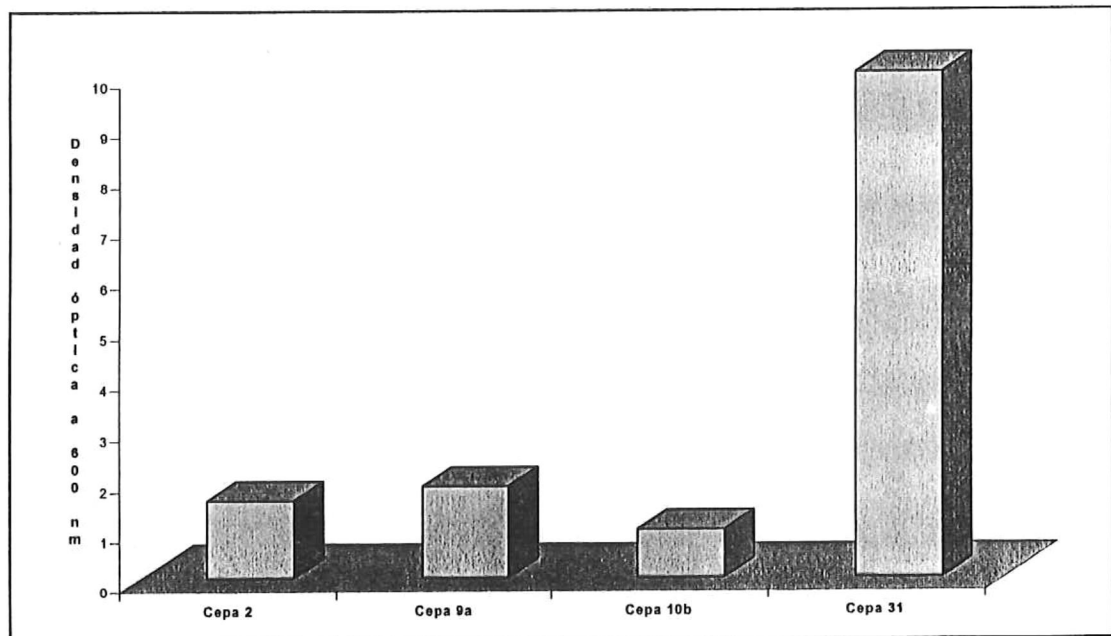


Figura 4.- Comparación del crecimiento promedio de las cuatro cepas en MMGM.

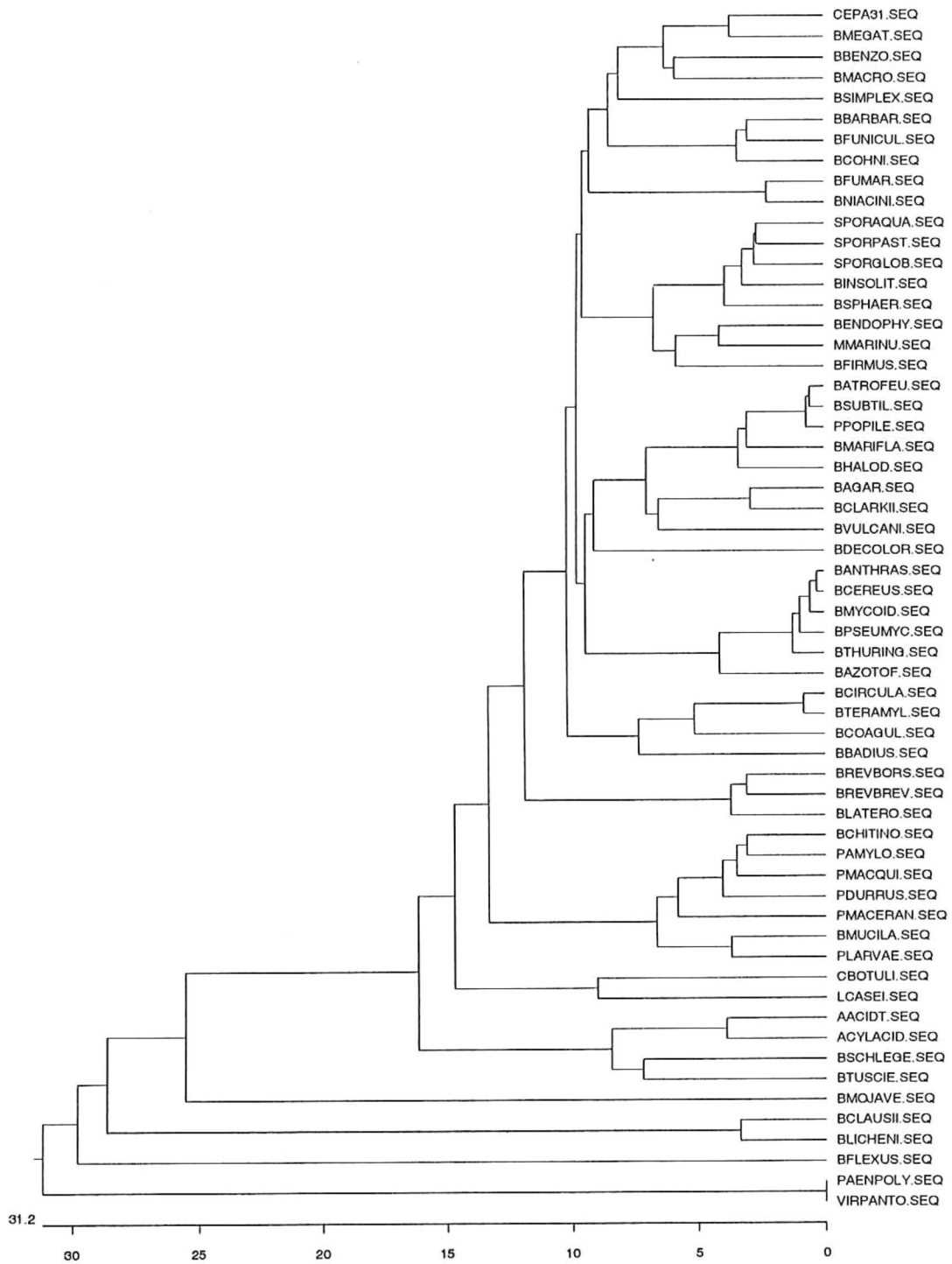


Figura 3.- Árbol filogenético producto del alineamiento con especies emparentadas filogenéticamente a *Bacillus* sp. cepa 31.

La evaluación de las muestras para determinar la naturaleza intra o extracelular de la enzima mostró que la  $\alpha$ -galactosidasa es principalmente intracelular. La mayor producción de la enzima, con una actividad específica de 237 U/mg de proteínas, se registró a las 10 horas lo cual coincidió con la mayor densidad óptica alcanzada por la bacteria (fig. 5).

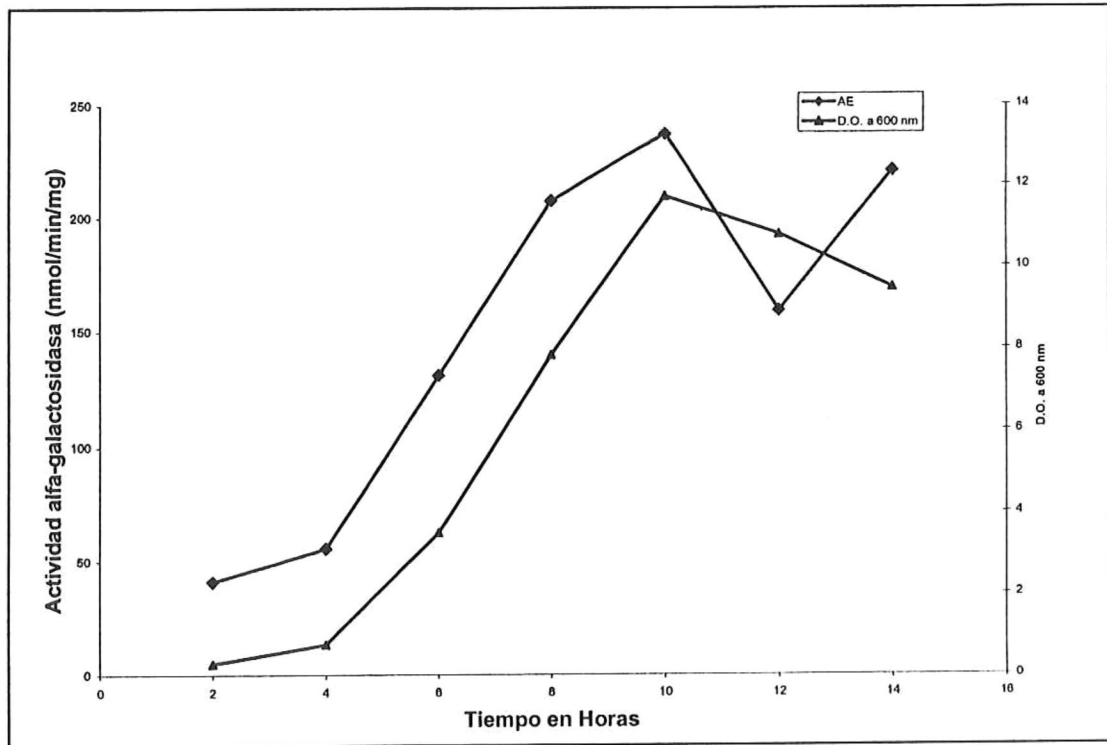


Figura 5.- Curva de crecimiento y cinética de producción promedio de la  $\alpha$ -galactosidasa de la cepa 31.

#### VI.2.2. Determinación del pH óptimo.

La  $\alpha$ -galactosidasa de *Bacillus sp.* cepa 31 registró la mayor actividad a pH 7, a pH 5 se registró un 25% de actividad, mientras que a pH 9 presentó el 43% de actividad (fig. 6).

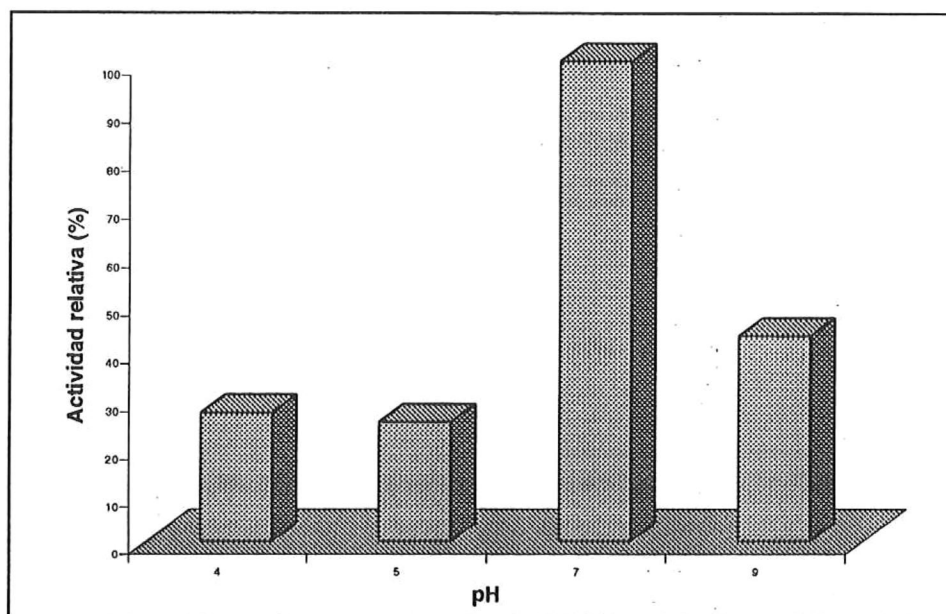


Figura 6.- Efecto del pH sobre la actividad de la enzima  $\alpha$ -galactosidasa.

### VI.2.3. Determinación de la temperatura óptima.

La enzima presentó mayor actividad a 37 °C, mientras que a los 28, 40 y 45, se registró el 68, 84 y 77% de actividad, respectivamente (fig. 7).

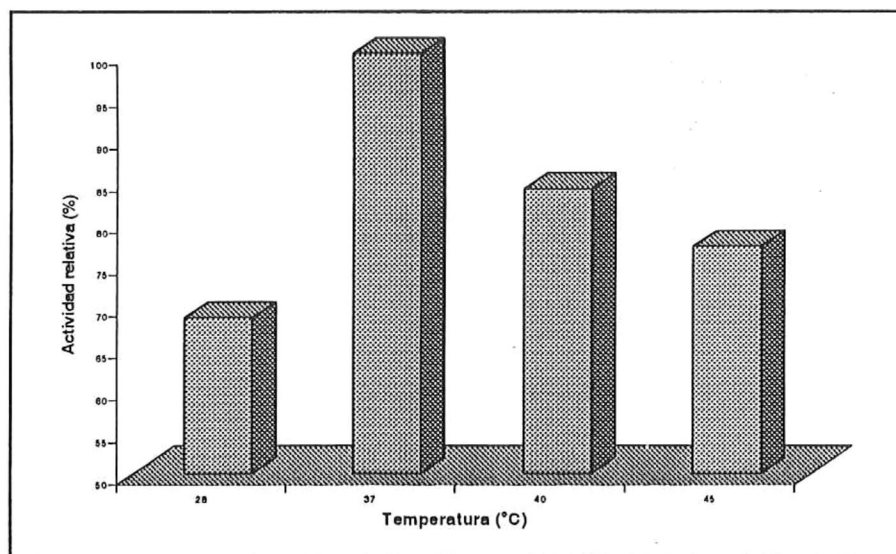


Figura 7.- Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima  $\alpha$ -galactosidasa.

#### VI.2.4. Determinación del tiempo óptimo de reacción.

En los primeros 2.5 minutos de incubación la  $\alpha$ -galactosidasa degradó proporcionalmente la mayor cantidad de sustrato (fig. 8).

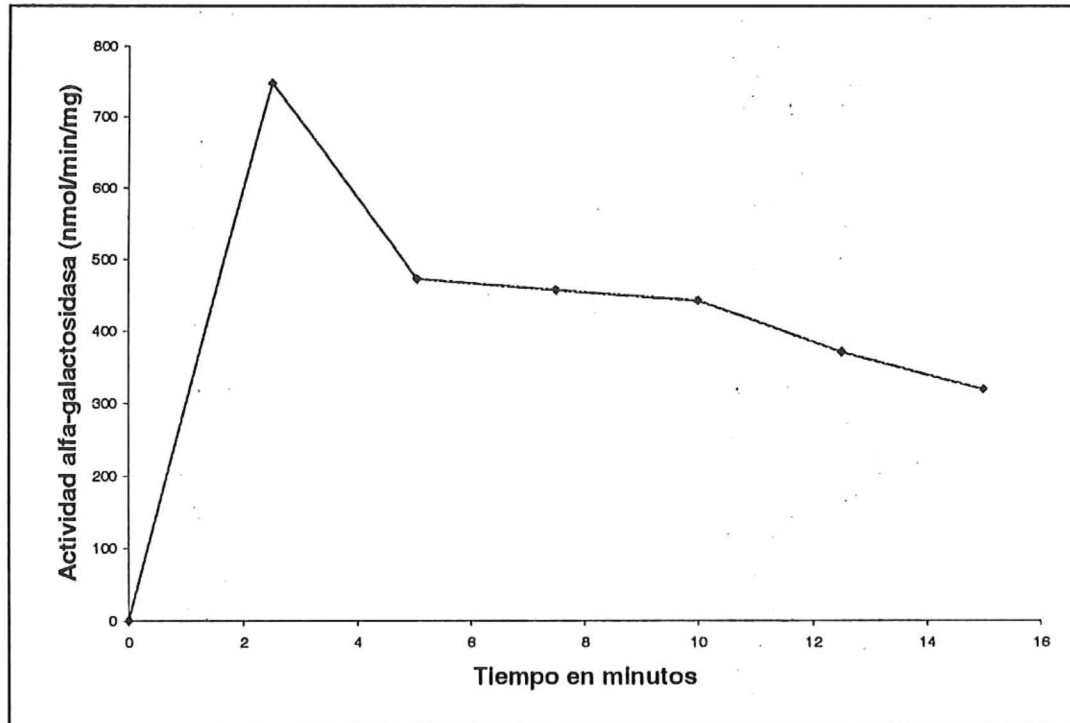


Figura 8.- Determinación del tiempo óptimo de incubación para la  $\alpha$ -galactosidasa producida por *Bacillus* sp. cepa 31.

#### VI.2.5. Determinación de la estabilidad de la enzima a través del tiempo.

La actividad de la enzima disminuyó conforme aumentó el tiempo de incubación, conservando el 98% de la actividad inicial a la primer hora de incubación, mientras que presentó 86% de esta a las cuatro horas de incubación (fig. 9).

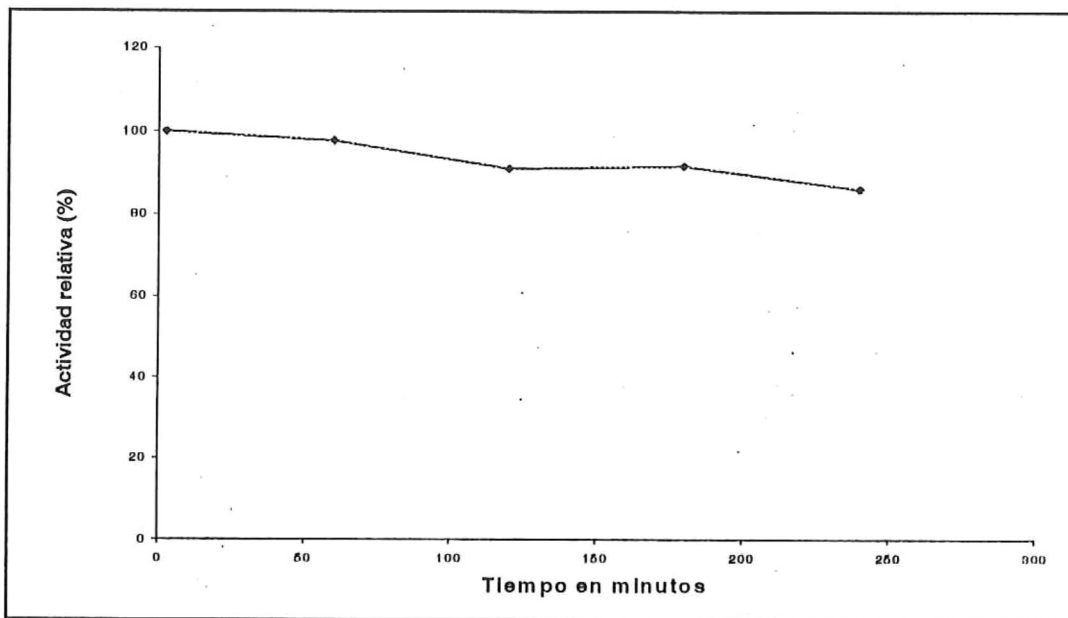


Figura 9.- Estabilidad de la  $\alpha$ -galactosidasa a través del tiempo.

#### VI.2.6. Determinación de los parámetros cinéticos de la $\alpha$ -galactosidasa.

La  $\alpha$ -galactosidasa producida por *Bacillus spp.* cepa 31 obtuvo una  $K_m$  de 0.34 mM y una  $V_{max}$  de 1304 nmol/min/mg (fig. 9).

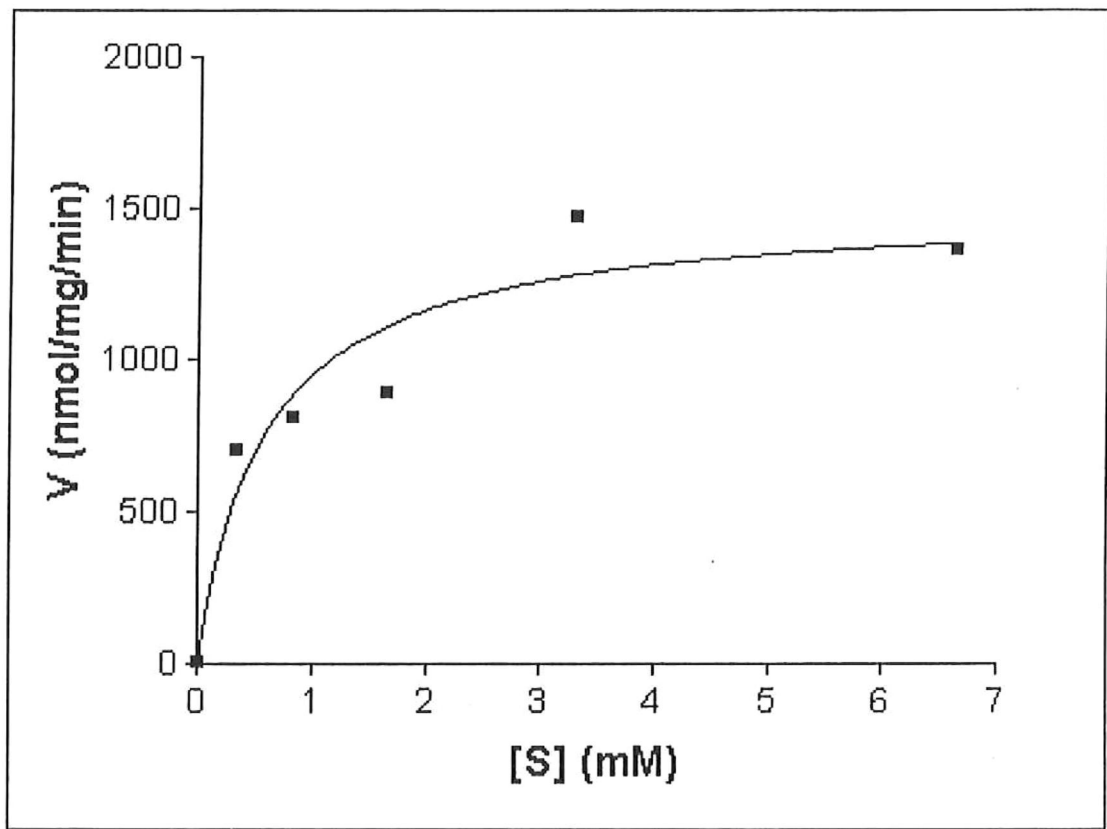


Figura 10.- Cinética de la  $\alpha$ -galactosidasa intracelular de *Bacillus* sp. cepa 31. Velocidad de reacción (V) y concentración de sustrato [S].

## VII.- DISCUSIONES

### VII.1. Caracterización e identificación de las cepas.

#### VII.1.1. Búsqueda de cepas productoras de $\alpha$ -Galactosidasas.

No obstante de que a la fecha existen pocos casos reportados de  $\alpha$ -galactosidasas producidas por especies de *Bacillus*, el presente estudio comprueba que el género es capaz de producir  $\alpha$ -galactosidasas mesófilas, además de las  $\alpha$ -galactosidasas termófilas. Respecto al origen marino de las cepas, tanto *Bacillus subtilis* como *B. megaterium*, han sido aislados a partir de habitats marinos, lo que sugiere un hecho común el aislamiento de cepas de estas especies a partir de habitats marinos (Vary, 1992; Priest, 1993; Vary, 1994). Sin embargo, un origen terrestre no puede ser descartado, ya que se trata de cepas aisladas en zonas costeras, por lo cual éstas están en estrecha relación con el habitat terrestre.

#### VII.1.2. Caracterización fenotípica.

Respecto a las características celulares todas las cepas resultaron ser Gram positivas. De éstas cepas cinco se incluyeron dentro del grupo IV, mientras que la cepa 31 se agrupó en el II, cabe mencionar que esta cepa destacó por ser de mayores dimensiones en relación a las cepas analizadas, este atributo favorece su asignación a este grupo ya que dentro de éste, se encuentra la especie *Bacillus megaterium*, especie que destaca por su gran tamaño.

### VII.1.3. Identificación filogenética de las cepas.

El alineamiento de la secuencia parcial del gene 16S rDNA de *Bacillus* sp. cepa 31 presentó el mayor grado de homología con *B. megaterium*, la cual se asigna dentro del grupo II del género *Bacillus*. Lo anterior sugiere que *Bacillus* sp. cepa 31 es una cepa de *Bacillus megaterium*.

## VII.2. Caracterización de la $\alpha$ -galactosidasa.

### VII.2.1. Curva de crecimiento y cinética de producción de la $\alpha$ -galactosidasa.

*Bacillus* sp. cepa 31, presentó una fase lag de 4 horas, esto posiblemente se debió a un periodo de inducción y síntesis enzimática. En la fase exponencial, se observó que el incremento en la actividad de la enzima aumentó conforme a la densidad óptica. La máxima densidad óptica se registró a las 10 horas, tiempo en el que también se registró la máxima actividad enzimática, la cual está asociada al crecimiento celular. Un comportamiento similar, en lo que respecta a la producción de la  $\alpha$ -galactosidasa producida por *Bacillus* sp. JF<sub>2</sub>, fue reportado por Li y colaboradores en 1997. A diferencia de estas dos especies, la  $\alpha$ -galactosidasa extracelular producida por *Bacillus stearothersophilus* NCIM 5146 encuentra su máxima actividad hasta las 16 horas, lo que sucede 4 horas después de alcanzada la máxima densidad óptica (Gote *et al.*, 2003). Similarmente la  $\alpha$ -galactosidasa extracelular producida por la cepa de *Bacillus stearothersophilus* descrita por Delente y colaboradores (1974), presenta la máxima actividad a las 14 horas de fermentación, mientras que la mayor densidad óptica se registró a las 10 horas. Aunque la producción de  $\alpha$ -galactosidasa aparenta ser

constitutiva, el fenómeno de inducción de la enzima no puede descartarse, ya que la inducción tanto por melibiosa como por rafinosa ha sido demostrada por diversos autores. La síntesis constitutiva ha sido mencionada para las dos  $\alpha$ -galactosidasas intracelulares producidas por *Bacillus stearothermophilus* AT-7 (Pederson y Goodman, 1980). Por otro lado, la actividad en el sobrenadante fue muy baja, en el mismo trabajo Li y colaboradores (1997) encontraron que la  $\alpha$ -galactosidasa estaba asociada principalmente a la célula y reportan que únicamente un 25% de la actividad es extracelular.

La densidad óptica alcanzada por *Bacillus* sp. cepa 31 ( $D.O_{.600} = 11.3$ ), fue marcadamente superior a la densidad óptica alcanzada por las otras cepas estudiadas en este trabajo, como se muestra en la figura 4; también fue mayor a la densidad óptica reportada por Gote y colaboradores (2003) para *Bacillus stearothermophilus* NCIM 5146 y la reportada por Garro y colaboradores (1996) para *Lactobacillus fermentum* (densidad óptica de 2.1 y 0.95, respectivamente).

La actividad específica de la  $\alpha$ -galactosidasa producida por *Bacillus* sp. cepa 31 (237 U/mL), fue considerablemente mayor a la reportada en la literatura para otras  $\alpha$ -galactosidasas [0.14 U/mg en *Bacillus stearothermophilus* AT-7 (Pederson y Goodman, 1980); 2.3 U/mg en *Bacillus stearothermophilus* ATCC 266 (Talbot y Sygusch, 1990); 0.5 U/mL en *Bacillus* sp. JF<sub>2</sub> (Li *et al.*, 1997) y 1.08 U/mL en *Bacillus stearothermophilus* NCIM 5146 (Gote *et al.*, 2003)].

### VII.2.2. Determinación del pH óptimo.

Tanto el pH óptimo, como su efecto en la actividad de la  $\alpha$ -galactosidasa fue similar al encontrado para otras especies de *Bacillus* (Pederson y Goodman, 1980; Talbot y Sygusch, 1990; Li *et al.*, 1997; Fridjonsson *et al.* 1999; Gote *et al.* 2003). Cabe mencionar, que el rango de pH del enzima es adecuado para evaluar los fines de la aplicación de esta al cultivo de camarón.

### VII.2.3. Determinación de la temperatura óptima.

La  $\alpha$ -galactosidasa presentó una temperatura óptima dentro del rango común para las  $\alpha$ -galactosidasas en general (Delente *et al.*, 1974; Pederson y Goodman, 1980; Gherardini *et al.*, 1985; Li *et al.*, 1997; Wong, 1990; Talbot y Sygusch, 1990; Overbeeke *et al.*, 1990; Duffaud *et al.*, 1997; Kamaly, 1997; King *et al.*, 1998; Manzanares *et al.*, 1998; Fridjonsson *et al.*, 1999; Ishiguro *et al.*, 2001; Silvestroni *et al.*, 2002; Shabalin *et al.*, 2002; Gote *et al.*, 2003). No obstante, de que la mayor cantidad de  $\alpha$ -galactosidasas estudiadas para este género son termofílicas (Pederson y Goodman, 1980; Talbot y Sygusch, 1990; Li *et al.*, 1997; Fridjonsson *et al.* 1999; Gote *et al.* 2003), y a diferencia de estas enzimas, la temperatura óptima de la  $\alpha$ -galactosidasa producida por *Bacillus* sp. cepa 31, ofrece la oportunidad de aplicar la enzima o la cepa como tal, directamente en el estanque de cultivo, ya que el enzima es funcional a la temperatura típica de crecimiento del camarón.

#### VII.2.4. Determinación del tiempo óptimo de reacción.

En base al análisis del tiempo óptimo de reacción se observó que la  $\alpha$ -galactosidasa presenta menor actividad conforme el tiempo de incubación aumenta, esto posiblemente se deba a algún tipo de inhibición.

#### VII.2.5. Determinación de la estabilidad de la enzima a través del tiempo.

Ya que la enzima presentó hasta un 86% de su actividad inicial después de cuatro horas, su aplicación a los cultivos de camarón puede ser periódica. La pérdida de actividad posiblemente se deba a la inactivación térmica o por oxidación de la enzima.

#### VII.2.6. Determinación de los parámetros cinéticos de la $\alpha$ -galactosidasa.

La  $\alpha$ -galactosidasa producida por *Bacillus* sp. cepa 31 presentó una  $K_m$  (0.34 mM) comparable a la encontrada para la  $\alpha$ -galactosidasa (0.25 mM) producida por *Bacillus stearothermophilus* ATCC 266. Sin embargo, fue menor a la encontrada para las  $\alpha$ -galactosidasa I (0.47 mM) y la  $\alpha$ -galactosidasa II (0.53 mM) producidas por *Bacillus stearothermophilus* AT7, y para la  $\alpha$ -galactosidasa (0.625 mM) producida por *Bacillus stearothermophilus* NCIM 5146 (Pederson y Goodman, 1980; Talbot y Sygusch, 1990; Gote *et al.*, 2003).

## VIII.- CONCLUSIONES

-En base a la secuencia del gen 16S rDNA, *Bacillus sp.* cepa 31 es probablemente *Bacillus megaterium*.

-La  $\alpha$ -galactosidasa producida por *Bacillus sp.* cepa 31 es primordialmente intracelular, es sintetizada desde el inicio del crecimiento y alcanza su mayor actividad a las 10 horas, tiempo en el que también el cultivo alcanza la mayor densidad óptica.

-*Bacillus sp.* cepa 31 produce por lo menos una  $\alpha$ -galactosidasa neutra cuya máxima actividad se registra a los 37°C.

-La  $\alpha$ -galactosidasa producida por *Bacillus sp.* cepa 31 puede degradar los azúcares melibiosa y rafinosa a 37°C.

## IX.- PERSPECTIVAS

-Purificar la  $\alpha$ -galactosidasa y caracterizar sus especificidades de sustrato e inhibición.

-Determinar la actividad transferasa de la  $\alpha$ -galactosidasa.

-Clonar el gen que codifica para la  $\alpha$ -galactosidasa.

-Llevar a cabo una mutagénesis generalizada y, una vez aislado el gen, realizar mutaciones sitio específicas, con el fin de mejorar las propiedades de la  $\alpha$ -galactosidasa.

-Realizar cultivos a mayor escala de *Bacillus* sp. cepa 31 y emplearlos en la realización de ensayos para la alimentación de camarón a partir de harina de soya.

-Analizar el efecto inmunoestimulador ejercido por *Bacillus* sp. cepa 31 en el camarón.

## X.- BIBLIOGRAFÍA

- Arellano, C. F. 1999. Búsqueda y Caracterización de  $\alpha$ -Glucosidasas de *Bacillus spp.* Aislados de Ambientes Marinos e Identificados Filogenéticamente. [tesis de maestría]: Ensenada, Baja California, Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada. 59 pp.
- Arellano-Carbajal, F. y Olmos-Soto, J. 2002. Thermostable  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6-glucosidase enzymes from *Bacillus sp.* Isolated from a Marine Environment. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18:791-795.
- Berger, C. 2000. Aportes de la Bio-Tecnología a la Alimentación y a la Inmunoestimulación de Camarones Peneidos, en Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo (eds.). Mérida, Yucatán, México, pp. 267-276.
- Contreras, F. R. 1997. Análisis y Caracterización de especies Marinas del Género *Bacillus*. [tesis de licenciatura]: Tijuana, Baja California, Universidad Autónoma de Baja California. 56 pp.
- De Vries, R.P., H.C. Van Den Broeck, E. Dekkers, P. Manzanares, L.H. De Graff y J. Visser. 1999. Differential Expression of Three  $\alpha$ -Galactosidase Genes and a Single  $\beta$ -Galactosidase Gene from *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2453-2460.

- Delente, J., J.H. Johnson, M.J. Kuo, R.J. O'Connor y L.E. Weeks. 1974. Production of a New Thermostable Neutral  $\alpha$ -Galactosidase from a Strain of *Bacillus stearothermophilus*. *Biotechnology and Bioengineering* 16: 1227-1243.
- Dey, P.M., S. Patel y M. D. Brownleader. 1993. Induction of  $\alpha$ -Galactosidase in *Penicillium pchrochloron* by guar (*Cyamopsis tetragonobola*) Gum. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 17: 361-371.
- Divakaran, S., M. Velasco, E. Beyer, I. Foster, A. Tacon. 2000. Soybean Meal Apparent Digestibility for *Litopenaeus vannamei*, Including a Critique of Methodology, en *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo (eds.). Mérida, Yucatán, México, pp. 267-276.
- Drancourt, M., C. Bollet, A. Carlioz, R. Martelin, J. P. Gayral y D. Raoult. 2000. 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3623-3630.
- Duffaud, G.D., C.M. McCutchen, P. Leduck, K.N. Parker y R.M. Kelly. 1997. Purification and Characterization of Extremely Thermostable  $\beta$ -Mannase,  $\beta$ -Mannosidase, and  $\alpha$ -Galactosidase from the Hypertermophilic Eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 169-177.

- Ferrari, E., A.S. Jarnagin, y B.F. Schmidt. 1993. Comercial Production of Extracellular Enzymes, en *Bacillus subtilis* and other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics, Sonenshein A.L., Hoch J.A. y Losick R. (eds.). ASM. Washington, D.C., pp. 917-937.
- Fridjonsson O., H. Watzlawick, A. Gehweiler, T. Rohrhirsch y R. Mattes. 1999. Cloning of the Gene Encoding a Novel Thermostable  $\alpha$ -Galactosidase from *Thermus brockianus* ITI360. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3955-3963.
- Fridjonsson, O. y R. Mattes. 2001. Production of Recombinant  $\alpha$ -Galactosidases in *Thermus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4192-4198.
- Garro, M.S., G.F. de Valdez, G. Oliver y G. S. De Giori. 1996. Influence of Carbohydrates on the  $\alpha$ -Galactosidase Activity of *Lactobacillus fermentum*. *Current Microbiology* 33: 302-305.
- Gherardini, F., M. Babcock y A. A. Salyers. 1985. Purification and Characterization of Two  $\alpha$ -Galactosidases Associated with Catabolism of Guar Gum and Other  $\alpha$ -Galactosides by *Bacteroides ovatus*. *Journal of Bacteriology* 161: 500-506.
- Godfrey, T. y S.I. West. 1996. Introduction to Industrial Enzymology, en *Industrial Enzymology* Godfrey T. & West S. (eds.). The Macmillan Press Ltd., Nueva York, pp. 2-8.
- Gote, M., H. Umalkar, I. Khan y J. Khire. 2003. Thermostable  $\alpha$ -Galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146) and its Application in the Removal of Flatulence Causing Factors from Soymilk. *Process Biochemistry*, en prensa.

- Hagström Å., T. Pommier, F. Rohwer, K. Simu, W. Stolte, D. Svensson y U.L. Zweifel. 2002. Use of 16S ribosomal DNA for Delineation of Marine Bacterioplankton Species. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3628-3633.
- Ishiguro, M., S. Kaneko, A. Kuno, S. Yoshida, G. Park, Y. Sakakibara, I. Kusakabe y H. Kobayashi. 2001. Purification and characterization of the recombinant *Thermus* sp. Strain T2  $\alpha$ -Galactosidase Expressed in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1601-1616.
- Kamaly, K.M. 1997. Bifidobacteria Fermentation of Soybean Milk. *Food Research International* 30: 675-682.
- King, M.R., D.A. Yernool, D.E. Eveleigh y B.M. Chassy. 1998. Thermostable  $\alpha$ -Galactosidase from *Thermus neapolitana*: Cloning, Sequencing and Expression. *FEMS Microbiology Letters* 163: 37-42.
- Li, X., L. Yang, P. Yan, F. Zuo y F. Jin. 1997. Factors Regulating Production of  $\alpha$ -Galactosidase from *Bacillus* sp. JF<sub>2</sub>. *Letters in Applied Microbiology* 25: 1-4.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. Protein Measurement with Folin-Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Manzanares, P., L. H. de Graaff y J. Visser. 1998. Characterization of Galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel  $\alpha$ -galactosidase activity. *Enzyme and Microbial Technology* 22: 383-390 .
- Martínez A., O.T. Ramirez y F. Valle. 1997. Improvement of Culture Conditions to Overproduce  $\alpha$ -Galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47: 40-45.

- Moniruzzaman, M., X. Lai, S.W. York y L.O. Ingram. 1997. Extracellular Melibiose and Fructose are Intermediates in Raffinose Catabolism during fermentation to Ethanol by Engineered Enteric Bacteria. *Journal of Bacteriology* 179: 1880-1886.
- Olmos, S.J. 1996. Estudios sobre la Regulación del Gene *aprE* que codifica para la Subtilisina en *Bacillus subtilis*. [tesis de doctorado]: Cuernavaca, Morelos, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología UACP y P/CCH. 56 pp.
- Olmos, S.J., R. De Anda, E. Ferrari, F. Bolivar y F. Valle. 1997. Effects of the *sinR* and *degU32(Hy)* mutations on the regulation of the *aprE* gene in *Bacillus subtilis*. *Molecular Gene Genetics* 253: 262-567.
- Olmos, S. J. y R. S. Contreras. 1999. "Manual de Prácticas: Técnicas en Genética Molecular". Comunicaciones Académicas, Serie Acuicultura, CICESE. CEACO9901. 49 pp.
- Olmos-Soto J. y R. Contreras-Flores. 2003. Genetic System Constructed to Overproduce and Secrete Proinsulin in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62: 369-373.
- Overbeeke, N., G. H. M. Termorshuizen, M. L. F. Giuseppin, D. R. Underwood y C. T. Verrips. 1990. Secretion of the  $\alpha$ -Galactosidase from *Cyamopsis tetranogloba* (Guar) by *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1249-1434.

- Pederson, D.M. y R.E. Goodman. 1980. Isozymes of  $\alpha$ -Galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Canadian Journal of Microbiology* 26: 978-984.
- Potter, L.M. y M. Potchanakorn. 1985. Digestibility of the Carbohydrates Fraction of Soybean Meal by Poultry. In: World Soybean Research Conference III: Proceedings. Ed. Richard Shibles. Westview Press, Inc. E.U.A. 218-223 pp.
- Priest, F.G. 1989. Products and Applications. In: Harwood, C.R. (ed.) *Bacillus*, biotechnology handbooks, vol. 2. Plenum Press, New York. 293-322 p.
- Priest, F.G. 1993. Systematics and Ecology of *Bacillus*, en *Bacillus subtilis* and other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics, Sonenshein A.L., Hoch J.A. y Losick R. (eds.). ASM. Washington, D.C., pp. 3-16.
- Rosas, C., G. Cuzon, G. Gaxiola, C. Pascual, R. Brito, M. Chimal y A. Van Wormhoudt. 2000. El Metabolismo de los Carbohidratos de *Litopenaeus setiferus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*, en Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo (eds.). Mérida, Yucatán, México, pp. 267-276.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Shabalín, K.A., A. A. Kulminskaya, A.N. Savel'ev, S.M. Shishlyannikov, K.N. Neustroev. 2002. Enzymatic Properties of  $\alpha$ -Galactosidase from *Trichoderma*

- reesei* in the Hydrolysis of Galactooligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 231–239.
- Shiau, S.Y. 1998. Nutrient Requirements of Penaeid Shrimps. *Aquaculture* 164: 77–93.
- Silvestroni, A., C. Connes, S. De Giori y J.C. Piard. 2002. Characterization of the *mela* Locus for  $\alpha$ -Galactosidase in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5464-5471.
- Slepecky, R.A. 1992. What is a Bacillus? en *Biology of Bacilli: Applications to Industry*, Doi, R. H. y M. McGloughlin (eds.). Butterworth-Heinemann. 370 pp.
- Sonenshein, A.L., J.A. Hoch y R. Losick. 1993. *Bacillus subtilis* and other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics. ASM. Washington, D.C. 987 pp.
- Talbot, G. y J. Sygusch. 1990. Purification and Characterization of Thermostable  $\beta$ -Mannanase and  $\alpha$ -Galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 3505-3510.
- Vary, P. 1992. Development of Genetic Engineering in *Bacillus megaterium*, en *Biology of Bacilli: Applications to industry*, Doi R.H. y M. McGloughlin (eds.). Butterworth-Heinemann. E.U.A. 370 pp.
- Vary, P. 1994. Prime Time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology* 140: 1001-1013.
- Verschuere, L., H. Heang, G. Criel, P. Sorgeloos y W. Verstraete. 2000. Selected Bacterial Strains Protect *Artemia* spp. from the Pathogenic Effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1139–1146.

- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier y D.J. Lane. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- Wong, T.Y. 1990. Melibiose is Hidrolyzed Exocellularly by an Inducible Exo- $\alpha$ -Galactosidase in *Azotobacter vinelandii*. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 2271-2273.
- Woo, P. C. Y., H. L. Ng. Kenneth, S.K.P. Lau, K. T. Yip, A. M. Y. Fung, K.W. Leung, D. M. W. Tam, T. L. Que y K. Y. Yuen. 2003. Usefulness of the MicroSeq 500 16S Ribosomal DNA-Based Bacterial Identification System for the Identification of Clinically Significant Bacterial Isolates with ambiguous Biochemical Profiles. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1996-2001.

Direcciones de Internet:

[www.sci.sdsu.edu/dnacore/sdsu\\_dnacore.html](http://www.sci.sdsu.edu/dnacore/sdsu_dnacore.html)

<http://rdp.cme.msu.edu/html/>

## XI.- ANEXOS

### Anexo 1. Purificación de DNA cromosomal de bacterias.

1. Inocular 4 mL de medio Luria (LB) con la cepa de interés. Crecer en condiciones apropiadas para esa cepa (i.e. antibiótico, temperatura, agitación, etc.), hasta que el cultivo llegue a fase estacionaria. Esto puede llevarse desde varias horas, hasta varios días, dependiendo de la velocidad de crecimiento de las células.
2. Centrifugar 1.5 mL del cultivo en una microcentrífuga a 12,000 r.p.m. durante 2 min o hasta que se forme un pellet compacto. Eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet en 567  $\mu$ L de buffer TE. Agregar 5 $\mu$ L de lisozima e incubar a 37 °C, a los 10 min agregar 10  $\mu$ L de RNasa pancreática (10 mg/mL), e incubar por 20 min. Adicionar 30  $\mu$ L de SDS al 10% y 3 $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/mL). Incubar 1 h a 37°C.
4. Adicionar 100  $\mu$ L de NaCl 5 M y mezclar.
5. Agregar 80  $\mu$ L de una solución de CTAB al 10% en NaCl 0.7 M. Mezclar e incubar 10 min a 65 °C (tapar bien los tubos con papel parafilm y tapa de seguridad).
6. Agregar 0.7 mL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), agitar y centrifugar 5 min.
7. Transferir el sobrenadante acuoso viscoso a un tubo nuevo de 1.5 mL para microcentrífuga, dejando atrás la interfase (si es muy gruesa la interfase, repetir el paso 6). Agregar un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, agitar y centrifugar 5 min.

8. Transferir el sobrenadante (600  $\mu$ L) a un tubo nuevo. Agregar 0.6 volúmenes de isopropanol (360  $\mu$ L) para precipitar los ácidos nucleicos. Agitar el tubo y centrifugar 10 min. Decantar el sobrenadante con cuidado, pegando el tubo a la pared de un vaso de precipitado.
9. Lavar con 1 mL de etanol al 70%. Centrifugar 5 min y decantar el sobrenadante suavemente. Secar en el Vacufuge<sup>TM</sup>, 10 min, en fase alcohol, temperatura 30 °C.
10. Disolver el pellet en 10  $\mu$ L de buffer TE. Guardar a -20 °C. Verificar e gel de agarosa al 1.2% utilizando 5  $\mu$ L de DNA resuspendido. Si se presenta un exceso de RNA, adicionarle nuevamente RNasa e incubar a 37 °C por 20 min.

Anexo 2. Datos empleados en la elaboración de los gráficos.

Comparación de la densidad óptica entre las cepas estudiadas.

|                          |            |            |            |            |
|--------------------------|------------|------------|------------|------------|
| Número de cepa           | 2          | 9a         | 10b        | 31         |
| Densidad óptica promedio | 1.54555    | 1.82025    | 0.96405    | 9.9763     |
| Error estándar           | ± 0.034012 | ± 0.036416 | ± 0.096803 | ± 0.105642 |

Curva de crecimiento y cinética de la  $\alpha$ -galactosidasa.

|                               |            |            |            |            |            |            |            |
|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Tiempo (horas)                | 2          | 4          | 6          | 8          | 10         | 12         | 14         |
| Actividad enzimática promedio | 41.0       | 51.4       | 131.8      | 203.1      | 249.0      | 155.4      | 222.0      |
| Error estándar                | ± 14.1     | ± 11.4     | ± 2.9      | ± 7.1      | ± 42.9     | ± 20.5     | ± 13.9     |
| Densidad óptica promedio      | 0.27069    | 0.755653   | 3.370925   | 7.13345    | 11.27548   | 9.62365    | 8.802825   |
| Error estándar                | ± 0.011328 | ± 0.004522 | ± 0.193853 | ± 0.986202 | ± 0.614641 | ± 1.630659 | ± 0.946074 |

Efecto de la temperatura sobre la  $\alpha$ -galactosidasa.

|                               |       |        |        |       |
|-------------------------------|-------|--------|--------|-------|
| Temperatura                   | 28    | 37     | 40     | 45    |
| Actividad enzimática promedio | 826.4 | 1206.9 | 1013.3 | 929.6 |
| Error estándar                | ± 1.5 | ± 4.9  | ± 73.5 | ± 8.6 |

Efecto del pH sobre la  $\alpha$ -galactosidasa.

|                               |        |        |        |        |
|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Ph                            | 4      | 5      | 7      | 9      |
| Actividad enzimática promedio | 319.3  | 296.0  | 1179.2 | 508.2  |
| Error estándar                | ± 28.8 | ± 47.5 | ± 48.0 | ± 28.3 |

Tiempo óptimo de incubación.

| Tiempo (minutos)              | 2.5    | 5      | 7.5    | 10    | 12.5  | 15     |
|-------------------------------|--------|--------|--------|-------|-------|--------|
| Actividad enzimática promedio | 748.1  | 479.4  | 458.8  | 444.0 | 388.1 | 320.3  |
| Error estándar                | ± 58.4 | ± 20.7 | ± 20.5 | ± 3.5 | ± 6.0 | ± 19.5 |

Estabilidad de la enzima a través del tiempo.

| Tiempo (minutos)              | 2.5    | 60    | 120    | 180   | 240   |
|-------------------------------|--------|-------|--------|-------|-------|
| Actividad enzimática promedio | 757.1  | 740.3 | 688.9  | 693.4 | 651.7 |
| Error estándar                | ± 79.5 | ±15.0 | ± 93.2 | ± 8.4 | ± 4.9 |

Cinética enzimática

| Concentración del $\alpha$ PNPG | 0      | 100    | 250   | 500    | 1000   | 2000   |
|---------------------------------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|
| Actividad enzimática promedio   | 290.0  | 711.0  | 906.7 | 983.6  | 1106.2 | 1372.4 |
| Error estándar                  | ± 52.8 | ± 31.9 | ± 9.2 | ± 17.8 | ± 23.1 | ± 32.6 |