

Producción y evaluación catalítica de una Taq ADN polimerasa recombinante como alternativa para aplicaciones biotecnológicas

Luna Torres-Hichster¹

Carlos Nieto-Clavijo²

Liliana Morales de la Pava³

Jacqueline Chaparro-Olaya⁴

Cómo citar este artículo / To reference this article /

Para citar este artículo: Torres-Hichster, L., Nieto-Clavijo, C., Morales, L. y Chaparro-Olaya, J. (2026). Producción y evaluación catalítica de una Taq ADN polimerasa recombinante como alternativa para aplicaciones biotecnológicas. *Revista Criterios*, 33(1), e4899. <https://doi.org/10.31948/rc.v33i1.4899>



Fecha de recepción: 16 de junio de 2025

Fecha de revisión: 8 de septiembre de 2025

Fecha de aprobación: 9 de noviembre de 2025

Resumen

La Taq ADN polimerasa recombinante es una enzima esencial en biología molecular. La pandemia por COVID-19 evidenció la vulnerabilidad de los sistemas científicos frente a la dependencia de proveedores externos para la obtención de insumos críticos, como esta enzima. El presente estudio tuvo como objetivo desarrollar un protocolo optimizado para la producción, purificación y validación funcional de una Taq polimerasa recombinante, con el fin de fortalecer la autosuficiencia de un laboratorio nacional. Para ello, se transformaron células *Escherichia coli* BL21(DE3) con el plásmido pOpenTaq y se evaluaron distintas condiciones de inducción para maximizar la expresión de la enzima. La purificación de la Taq polimerasa se hizo mediante una estrategia combinada de precipitación térmica y salina, seguida de cromatografía de exclusión molecular. Finalmente, la actividad enzimática se evaluó por PCR, en comparación con una Taq comercial. Los resultados mostraron que la expresión



Artículo resultado de investigación.

¹ Laboratorio de Parasitología Molecular, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque. Correo electrónico: litorresh@unbosque.edu.co

² Laboratorio de Parasitología Molecular, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque. Correo electrónico: canieto@unbosque.edu.co

³ Laboratorio de Parasitología Molecular, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque. Correo electrónico: limoralesp@unbosque.edu.co

⁴ Laboratorio de Parasitología Molecular, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque. Correo electrónico: chaparrojacqueline@unbosque.edu.co



y rendimiento óptimos se alcanzaron a 37 °C con 1 mM de IPTG, a las 4 horas posinducción. La Taq recombinante presentó una pureza superior al 90 % y exhibió una actividad catalítica comparable a la de la enzima comercial, lo que permitió la amplificación eficiente de fragmentos de ADN, incluso desde muestras clínicas complejas. En conclusión, el protocolo desarrollado demostró ser eficiente, reproducible y escalable; esto representa un avance concreto hacia la producción local de reactivos estratégicos. Su implementación en diferentes sistemas de investigación puede fortalecer las capacidades en I+D+i y contribuir a una mayor autonomía científica y biotecnológica nacional.

Palabras clave: polimerasa Taq; proteínas recombinantes; expresión génica; biotecnología; reacción en cadena de la polimerasa; autonomía científica y técnica

Production and catalytic evaluation of a recombinant Taq DNA polymerase as an alternative for biotechnological applications

Abstract

Recombinant Taq DNA polymerase is an essential enzyme in molecular biology. The COVID-19 pandemic highlighted the vulnerability of scientific systems in contrast to their dependence on external suppliers for critical supplies, such as this enzyme. The objective of this study was to develop an optimized protocol for the production, purification, and functional validation of a recombinant Taq polymerase, to strengthen the self-sufficiency of a national laboratory. To this end, *Escherichia coli* BL21(DE3) cells were transformed with the pOpenTaq plasmid, and different induction conditions were evaluated to maximize enzyme expression. Taq polymerase purification was performed using a combined thermal and salt precipitation strategy, followed by size-exclusion chromatography. Finally, enzymatic activity was evaluated by PCR, in comparison with a commercial Taq. The results showed that optimal expression and yield were achieved at 37 °C with 1 mM IPTG, 4 hours post-induction. The recombinant Taq had a purity greater than 90% and exhibited catalytic activity comparable to that of the commercial enzyme, enabling the efficient amplification of DNA fragments, including those from complex clinical samples. In conclusion, the developed protocol proved to be efficient, reproducible, and scalable. This represents a concrete step toward the local production of strategic reagents. Its implementation in different research systems can strengthen R&D&I capabilities and contribute to greater national scientific and biotechnological autonomy.

Keywords: Taq polymerase; recombinant proteins; gene expression; biotechnology; polymerase chain reaction; scientific and technical autonomy



Produção e avaliação catalítica de uma ADN polimerase Taq recombinante como alternativa para aplicações biotecnológicas

Resumo

A Taq ADN polimerase recombinante é uma enzima essencial na biologia molecular. A pandemia da COVID-19 evidenciou a vulnerabilidade dos sistemas científicos face à dependência de fornecedores externos para a obtenção de insumos críticos, como esta enzima. O presente estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo otimizado para a produção, purificação e validação funcional de uma Taq polimerase recombinante, com o intuito de fortalecer a autossuficiência de um laboratório nacional. Para tal, transformaram-se células de *Escherichia coli* BL21(DE3) com o plasmídeo pOpenTaq e avaliaram-se diferentes condições de indução para maximizar a expressão da enzima. A purificação da Taq polimerase foi realizada através de uma estratégia combinada de precipitação térmica e salina, seguida de cromatografia de exclusão molecular. Por fim, a atividade enzimática foi avaliada por PCR, em comparação com uma Taq comercial. Os resultados mostraram que a expressão e o rendimento ótimos foram alcançados a 37 °C com 1 mM de IPTG, 4 horas após a indução. A Taq recombinante apresentou uma pureza superior a 90 % e exibiu uma atividade catalítica comparável à da enzima comercial, o que permitiu a amplificação eficiente de fragmentos de ADN, inclusive a partir de amostras clínicas complexas. Em conclusão, o protocolo desenvolvido revelou-se eficiente, reprodutível e escalável; isto representa um avanço concreto no sentido da produção local de reagentes estratégicos. A sua implementação em diferentes sistemas de investigação pode reforçar as capacidades em I&D&I e contribuir para uma maior autonomia científica e biotecnológica nacional.

Palavras-chave: Taq polimerase; proteínas recombinantes; expressão génica; biotecnologia; reação em cadeia da polimerase; autonomia científica e técnica

Introducción

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) es una técnica fundamental en biología molecular, ampliamente utilizada en investigación biomédica, diagnóstico clínico, ingeniería genética y tecnologías de secuenciación. Su capacidad para amplificar de forma rápida y precisa secuencias específicas de ADN o de ADN complementario (cADN) obtenido a partir de ARN mediante transcripción reversa ha revolucionado múltiples disciplinas científicas desde su desarrollo en 1983 por Kary Mullis ([Mullis y Faloona, 1987](#); [Innis et al., 1990](#)).

En Colombia, como en muchos países en desarrollo, los laboratorios de investigación han dependido históricamente de la importación de insumos biotecnológicos para llevar a cabo actividades fundamentales en diagnóstico molecular, investigación básica y desarrollo tecnológico. Esta dependencia conlleva altos costos, ya que dichos insumos deben adquirirse en moneda extranjera, frente a la cual la moneda local es débil. Además, se suman fluctuaciones en la tasa de cambio, tiempos de espera prolongados y restricciones y costos aduaneros. Estas limitaciones



se evidenciaron principalmente durante la pandemia de COVID-19, cuando la interrupción global de las cadenas de suministro afectó el acceso a reactivos esenciales, lo cual comprometió tanto proyectos de investigación como de diagnóstico (Artecona y Jorge, 2021; Guzmán et al., 2024). Entre estos insumos se encuentra la Taq ADN polimerasa, una enzima termoestable derivada de *Thermus aquaticus*, esencial para la PCR.

Diversos estudios han descrito estrategias para la expresión heteróloga y purificación de Taq ADN polimerasa recombinante, con enfoques dirigidos principalmente a optimizar su rendimiento y ampliar su rango de aplicaciones. Entre estas aproximaciones se incluyen el desarrollo de variantes Hot Start, diseñadas para reducir la formación de productos inespecíficos (Noma et al., 2006), y la construcción de enzimas quiméricas con mayor procesividad (Yamagami et al., 2014). Otros trabajos se han centrado en mejorar la amplificación de blancos difíciles, como regiones ricas en GC (Śpibida et al., 2017), así como en generar mutantes con funciones específicas, como la resistencia aumentada a inhibidores comunes en la PCR (Kermekchiev et al., 2009) o con propiedades catalíticas mejoradas (Barnes et al., 2021).

En conjunto, la literatura disponible se ha centrado principalmente en aspectos de ingeniería enzimática, optimización de variantes y caracterización bioquímica detallada de Taq ADN polimerasa. No obstante, son considerablemente menos frecuentes los trabajos que abordan la producción de Taq recombinante desde una perspectiva operativa, es decir, mediante protocolos diseñados para facilitar su implementación en laboratorios que requieren enzimas funcionales para uso rutinario. Esto es importante porque, aunque el costo de las preparaciones comerciales de Taq ADN polimerasa ha disminuido con el tiempo, continúa representando una carga económica para laboratorios que utilizan la PCR de forma intensiva, particularmente aquellos que procesan grandes volúmenes de muestras. Esta situación ha impulsado a numerosos grupos a producir la enzima localmente.

En este contexto, el desarrollo de protocolos técnicamente accesibles para la producción de Taq recombinante constituye una contribución valiosa para laboratorios académicos y centros de investigación que buscan reducir su dependencia de insumos importados, fortalecer capacidades locales en biología molecular y avanzar hacia modelos de autosuficiencia biotecnológica. En este sentido, la expresión heteróloga de proteínas en *Escherichia coli* se ha consolidado como una plataforma robusta y de alto rendimiento para la producción de proteínas recombinantes (Rosano y Ceccarelli, 2014; Berlec y Strukelj, 2013).

Adicionalmente, la termoestabilidad de la Taq ADN polimerasa permite implementar métodos de purificación simplificados, como la precipitación por calor. Esta estrategia elimina la necesidad de equipos sofisticados o de agregar a la proteína recombinante secuencias adicionales que faciliten su purificación, lo cual permite su aplicación en laboratorios con infraestructura o recursos limitados (Teng et al., 2023; Vieille y Zeikus, 2001).

El presente estudio propone desarrollar un protocolo funcional, escalable y económicamente accesible para la producción nacional de una Taq ADN polimerasa recombinante (rTaq DNA-pol), cuya actividad enzimática, evaluada en términos de rendimiento en reacciones de PCR (cantidad y calidad del amplicón obtenido), resulte comparable con la de las preparaciones comerciales. Esta estrategia busca no solo satisfacer las necesidades operativas de los laboratorios nacionales, sino también ofrecer un modelo potencialmente transferible a instituciones académicas e industriales, con el fin de promover la autosuficiencia tecnológica en biotecnología y fortalecer las capacidades científicas y productivas locales.

En este marco, la investigación responde a una necesidad concreta del ecosistema científico colombiano: garantizar el acceso continuo a reactivos críticos, reducir la dependencia de insumos importados y fomentar la soberanía científica mediante la implementación racional de herramientas de biología molecular e ingeniería genética.

Metodología

El laboratorio responsable de este estudio cuenta con una amplia trayectoria en el diseño y ejecución de protocolos para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*, mediante el uso de técnicas de ADN recombinante ampliamente validadas. A lo largo de más de una década de trabajo, ha desarrollado metodologías para la expresión heteróloga de proteínas con alta complejidad estructural y funcional y ha evaluado estrategias destinadas a mejorar los niveles de expresión, la solubilidad y el rendimiento de producción. Estas estrategias incluyen el empleo de diferentes cepas bacterianas, diversas condiciones de inducción y sistemas de proteínas de fusión (Castañeda et al., 2007; Guerra et al., 2016; Morales et al., 2017; Hernández et al., 2018; Morales et al., 2018). Con base en esta experiencia acumulada, el laboratorio ha consolidado protocolos robustos y reproducibles para las distintas etapas del proceso de expresión y producción de proteínas recombinantes.

Salvo indicación explícita, los protocolos empleados aquí no presentaron modificaciones sustanciales respecto a los descritos convencionalmente en la literatura. No obstante, su aplicación efectiva requirió una cuidadosa evaluación, ya que la producción de cada proteína recombinante implica una combinación particular de condiciones que no pueden extrapolarse directamente de protocolos previos. En este caso, la estandarización de parámetros específicos para la producción de una enzima funcional, como la Taq ADN polimerasa, representa un desafío adicional, ya que no solo se busca una expresión eficiente, sino también la conservación de su actividad catalítica.

Estandarización de la expresión en pequeña escala

Transformación en cepas de *E. coli*

Las bacterias *E. coli* BL21(DE3) (Thermo Scientific), químicamente competentes, se transformaron con el plásmido pOpen_taq (AddGene: Plasmid#153315) mediante choque

térmico (42 °C durante 45 s, seguido de incubación en hielo por 5 min). Posteriormente, las bacterias transformadas se incubaron durante una hora a 37 °C en medio SOC (triptona 2 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 10 mM, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 20 mM glucosa) y se sembraron en placas de Petri con LB-agar suplementado con ampicilina (100 µg/mL). Finalmente, las placas se incubaron a 37 °C durante la noche. Este ensayo se hizo dos veces de manera independiente.

Expresión de las proteínas recombinantes

Se tomó una colonia transformada con el plásmido recombinante y se inoculó en 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL). El cultivo se mantuvo en incubación a una temperatura constante de 37 °C durante toda la noche, con el fin de favorecer el crecimiento óptimo de las colonias bacterianas. Posteriormente, se realizó una dilución 1:50 del cultivo y se continuó el crecimiento hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de aproximadamente 0,6. La inducción de la expresión de la proteína recombinante se realizó mediante la adición de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

De la misma manera, se evaluaron dos concentraciones del inductor: 0,5 mM y 1 mM. El cultivo se mantuvo en agitación a 200 rpm y se evaluaron dos temperaturas de inducción: 37 °C y 22 °C. Las alícuotas se tomaron a las 2, 4, 6 y 16 horas posteriores a la inducción, con el fin de analizar los niveles de expresión de la proteína mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Finalmente, las bacterias se recolectaron por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente; luego, se descartó el sobrenadante y se determinó el peso húmedo del pellet bacteriano. Cada condición experimental se evaluó en dos ensayos independientes.

Lisis celular

Los sedimentos bacterianos se suspendieron en 5 mL de tampón de lisis por cada gramo de peso húmedo bacteriano. El tampón de lisis contenía 50 mM fosfato de sodio (pH 7,8), 400



mM NaCl, 100 mM KCl, 10 % glicerol y 0,5 % Triton X-100. A esta suspensión se añadió lisozima (1 mg/mL), un cóctel de inhibidores de proteasas 1X (Sigma P8340: 1 mM AEBSF, 14 μ M E64, 15 μ M pepstatina A, 40 μ M bestatina, 20 μ M leupeptina, 0,8 μ M aprotinina), DNasa I (5 μ g/mL) y CaCl₂ (1 mM). La mezcla se sometió a un ciclo de congelamiento a -80 °C, seguido de una incubación a 37 °C durante 2 horas sin agitación.

Purificación por calor

El lisado celular se incubó a 75 °C durante una hora, seguido de centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se recuperó la fracción soluble, la cual se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 %, para evaluar la presencia y el grado de pureza de la proteína recombinante.

Estandarización de la purificación a gran escala

Con base en las condiciones óptimas establecidas en pequeña escala, se realizó la expresión recombinante en 500 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL). La lisis bacteriana se llevó a cabo según el protocolo descrito.

Purificación térmica secuencial

El extracto crudo se incubó inicialmente a 75 °C durante 1 hora y posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min. La fracción soluble obtenida se sometió a un segundo tratamiento térmico a 85 °C durante 1 hora y luego se centrifugó bajo las mismas condiciones. Finalmente, se recuperó la fracción soluble resultante.

Precipitación con sulfato de amonio

A la fracción soluble obtenida en la etapa anterior se añadió sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración del 30 % (p/v). Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos. El precipitado resultante se resuspendió en 3 mL de tampón

de almacenamiento, compuesto por 50 mM de Tris-HCl (pH 8,6), 50 mM de NaCl, 0,1 mM de EDTA, 1 mM de DTT y 10 % de glicerol.

Purificación por filtración en gel

Se inyectaron 200 μ L de muestra proteica en una columna Enrich™ SEC 650 (Bio-Rad), previamente equilibrada con tampón Tris-HCl pH 8,6 (al menos dos volúmenes de columna). La cromatografía se llevó a cabo a un flujo constante de 1 mL/min a temperatura ambiente, para lo cual se utilizó un sistema BioLogic DuoFlow (Bio-Rad). Durante la elución, el sistema registró en tiempo real el perfil de absorbancia a 280 nm, lo que permitió identificar las fracciones con mayor concentración proteica.

Las fracciones seleccionadas se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 %, se empleó un marcador de peso molecular precoloreado (PageRuler™ Plus, Thermo Fisher Scientific) como referencia para estimar el tamaño de las bandas.

Verificación de la actividad catalítica

La actividad catalítica de la Taq ADN polimerasa recombinante (rTaq DNA polimerasa) se evaluó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semicuantitativa, dirigida a la amplificación de un fragmento de 234 pb del gen de β -actina de ratón (*Mus musculus*), para lo cual se utilizaron oligonucleótidos (cebadores) previamente diseñados y reportados en la literatura (Westin et al., 2004; Zhang et al., 2020).

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 15 μ L. Para cada reacción, se empleó 0,1 μ L de Taq ADN polimerasa comercial (5 U/ μ L) (GoTaq®, Promega) o 0,1 μ L de rTaq DNA polimerasa. Como plantilla, se utilizaron 50 ng de ADN genómico de ratón, proveniente del banco de ADN del laboratorio. Este material fue obtenido de ratones BALB/c silvestres mediante extracción con fenol-cloroformo, seguida de precipitación con etanol (Sambrook y Russell, 2001).

Los procedimientos de obtención del material biológico original y de la extracción de ADN no formaron parte del presente estudio y, en su momento, fueron realizados bajo los principios éticos de experimentación con animales establecidos por el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad El Bosque (Acta 017 de 2022) (Rozo et al., 2025).

Se incluyó un control negativo sin ADN. Las secuencias de los oligonucleótidos, las condiciones de reacción y el programa de amplificación se describen en el material suplementario. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador T100 (BioRad). Para comparar el rendimiento de ambas enzimas, se prepararon seis réplicas por grupo y se retiró una alícuota cada cinco ciclos. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, teñido con bromuro de etidio. Los geles fueron fotodocumentados en el Sistema Gel Doc XR+ (Bio-Rad) y cuantificados mediante el *software* ImageLab (Bio-Rad).

Eficacia de amplificación de la rTaqDNA-pol

La eficacia de la rTaq DNA-pol se evaluó mediante diversas reacciones de PCR, mediante tres plantillas provenientes del banco de ADN del laboratorio. Se usó ADN genómico de *Enterococcus faecalis* y ADN genómico de *Blastocystis*, ambos obtenidos a partir de cultivos mediante extracción con fenol-cloroformo, seguida de precipitación etanólica (Sambrook y Russell, 2001). Adicionalmente, se usó ADN total extraído de muestras fecales humanas con el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen). Los procedimientos de obtención del material biológico original y de la extracción de ADN no formaron parte del presente estudio.

Para los ensayos de PCR se usaron oligonucleótidos descritos previamente para amplificar un fragmento de 397 pb del gen 16S de *E. faecalis* (Hyman et al., 2005; Palmer et al., 2007), el gen completo 18S de *Blastocystis* (1750 pb) (Scicluna et al., 2006; Stensvold et al., 2012) y un fragmento de 500 pb del mismo gen (Santín et al., 2011). Las secuencias de los oligonucleótidos, las condiciones de reacción y

el programa de amplificación se describen en el material suplementario.

Evaluación de la sensibilidad de la rTaqDNA-pol

Se realizaron ensayos de PCR para amplificar el gen 18S ribosomal completo de *Blastocystis*. Para evaluar la sensibilidad de la rTaqDNA-pol, se emplearon diluciones seriadas de ADN total extraído de una muestra de materia fecal positiva para *Blastocystis*, proveniente del banco de ADN del laboratorio y obtenido previamente mediante el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen).

Los oligonucleótidos utilizados fueron los descritos en la sección anterior (Scicluna et al., 2006; Stensvold et al., 2012). Las reacciones se prepararon añadiendo diferentes cantidades de ADN molde en cada tubo: 71,6 ng, 7,1 ng, 0,7 ng, 0,007 ng, además de un control negativo sin ADN. A cada reacción se agregó 0,1 µL de rTaq DNA polimerasa.

Como referencia, se realizaron ensayos paralelos bajo las mismas condiciones experimentales, pero utilizando 0,1 µL de Taq ADN polimerasa comercial (GoTaq®, Promega). Las secuencias de los oligonucleótidos, así como las condiciones de reacción y el programa de amplificación, se describen en el material suplementario.

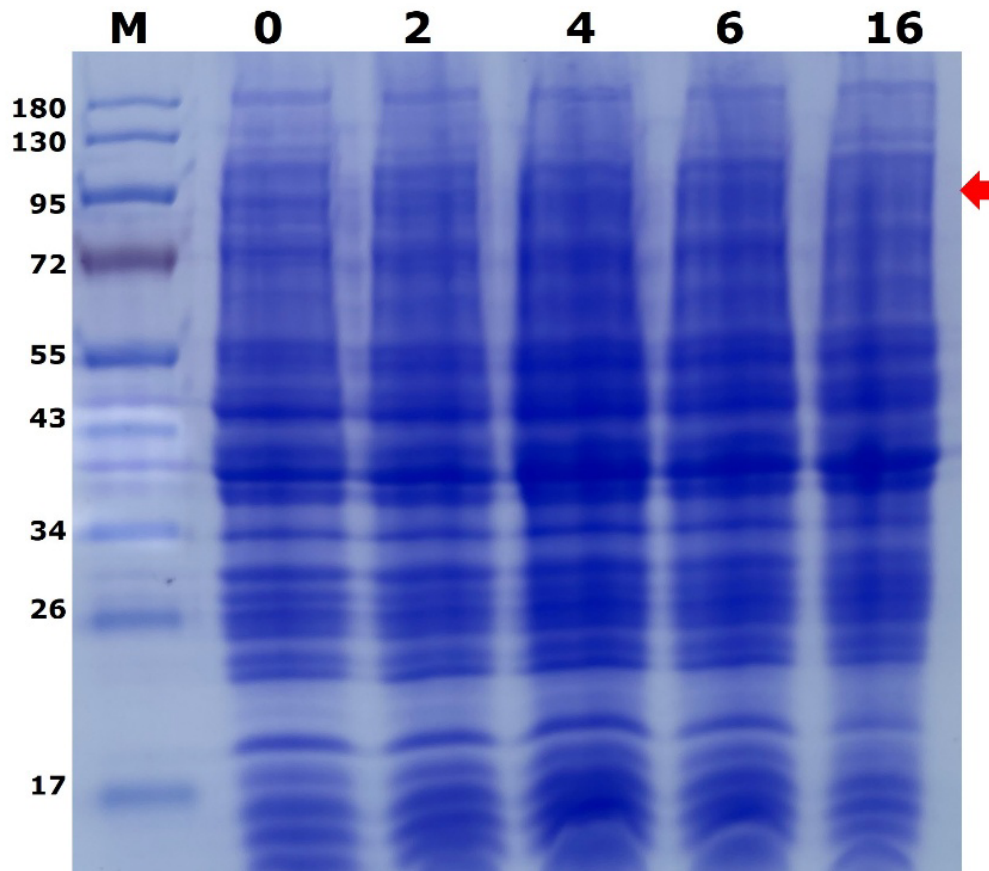
Resultados

Estandarización de la expresión de la rTaqDNA-pol

La expresión de la rTaqDNA-pol en *E. coli* BL21(DE3) fue inducida mediante dos concentraciones de IPTG (0,5 y 1 mM) y dos temperaturas de incubación (22 °C y 37 °C). No obstante, en el primer ensayo, al usar 1 mM de IPTG y temperatura de 37 °C, el análisis por SDS-PAGE de proteínas totales no reveló una banda evidentemente distinguible al peso esperado (93,2 kDa), lo que sugiere una expresión baja o enmascarada por proteínas endógenas de pesos moleculares similares (ver Figura 1).

Figura 1

Expresión en *E. coli* BL21(DE3) a diferentes horas posinducción



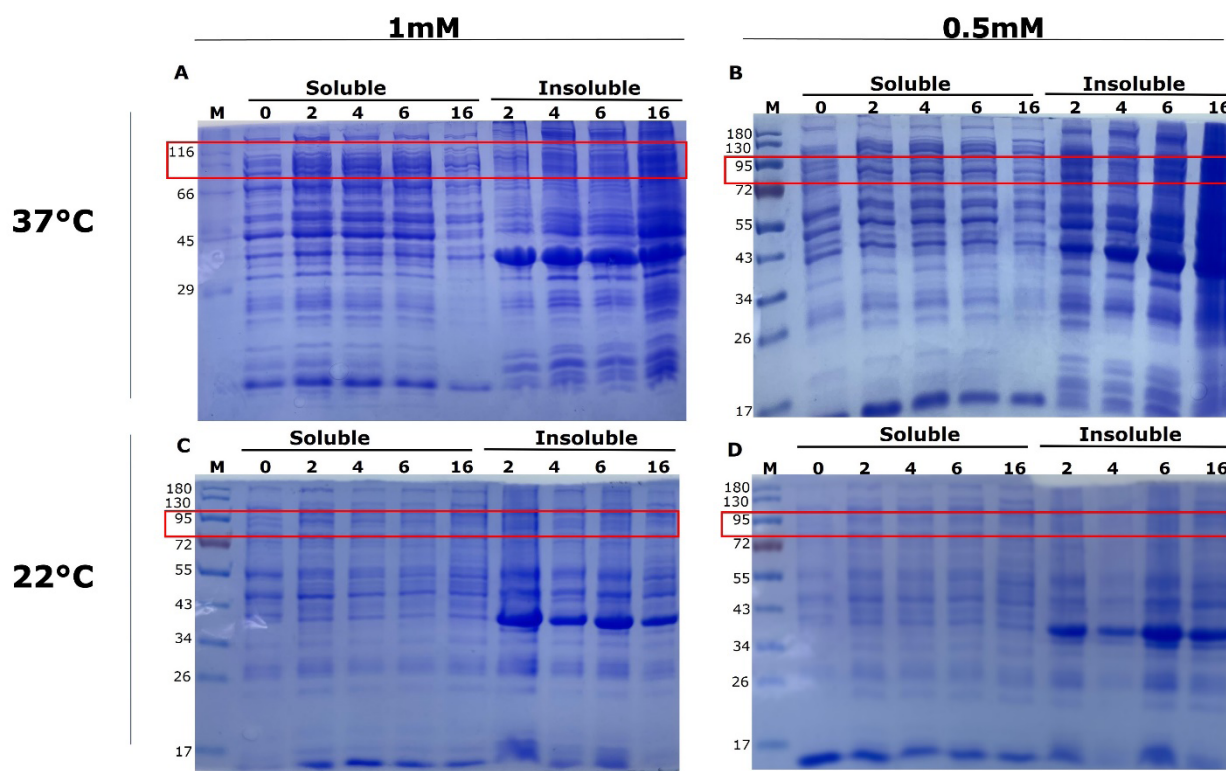
Nota. M: marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™). Se evaluó la expresión de la Taq ADN polimerasa recombinante a los tiempos 0, 2, 4, 6 y 16 horas, utilizando 1 mM de IPTG y una temperatura de inducción de 37 °C. La flecha roja indica la posición esperada de la banda correspondiente a la proteína recombinante, con un peso molecular teórico de 93,2 kDa. Los extractos fueron analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 % y teñidos con azul de Coomassie R-250.

Con el objetivo de aumentar la resolución y reducir la interferencia de otras proteínas, se procedió con la lisis bacteriana. El SDS-PAGE permitió identificar una banda tenue en la fracción soluble de las cuatro condiciones de inducción evaluadas (ver Figura 2), cuya migración fue compatible con el peso esperado de la rTaqDNA-pol, lo que sugiere una posible expresión en forma soluble.



Figura 2

Evaluación de diferentes condiciones de expresión de la rTaqDNA-pol en *E. coli* BL21 (DE3)

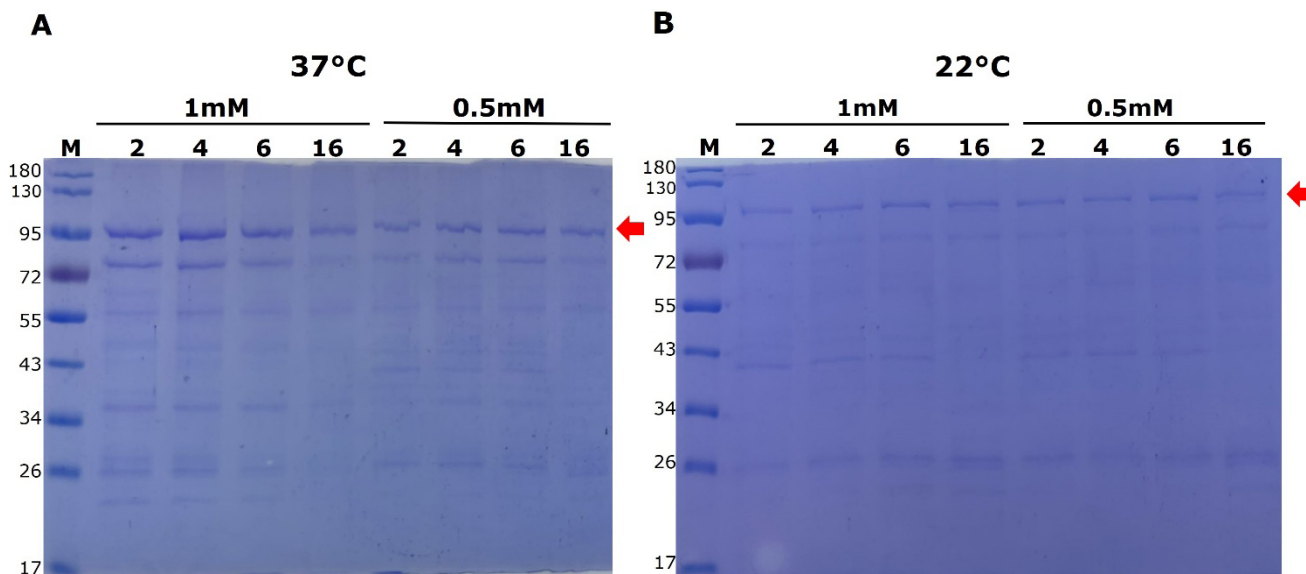


Nota. P: marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™). A) Fracciones solubles e insolubles bajo condiciones de inducción con 1 mM de IPTG a 37 °C. B) 0,5 mM de IPTG a 37 °C. C) 1 mM de IPTG a 22 °C. D) 0,5 mM de IPTG a 22 °C. La flecha roja indica la posición esperada de la proteína recombinante (peso molecular teórico de 93,2 kDa). Análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Geles de poliacrilamida al 12 % teñidos con azul de Coomassie.

Con el fin de tener una mayor certeza, se implementó una estrategia preliminar de purificación basada en precipitación térmica, aprovechando la termoestabilidad de la Taq ADN polimerasa. El tratamiento a 75 °C permitió un enriquecimiento selectivo de la proteína en los sobrenadantes de inducción a 37 °C (ver Figura 3A) en comparación con las inducciones a 22 °C (ver Figura 3B). Sin embargo, la comparación de las concentraciones de inductor reveló una mayor concentración cualitativa de la proteína cuando se utilizó 1mM de IPTG, específicamente a las 4 h posinducción (ver Figura 3A).

Figura 3

Evaluación de la purificación térmica a 75 °C de las fracciones solubles obtenidas tras la expresión de la rTaqDNA-pol en *E. coli*



Nota. M: marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™). A) Fracciones solubles e insolubles bajo condiciones de inducción con 1 mM y 0,5 mM de IPTG a 37 °C. B) 1 mM y 0,5 mM de IPTG a 22 °C. Se recolectaron muestras a las 2, 4, 6 y 16 horas de inducción. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína recombinante tras un primer paso de purificación, con un peso molecular teórico de 93,2 kDa. Los extractos fueron analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 % y teñidos con azul de Coomassie R-250.

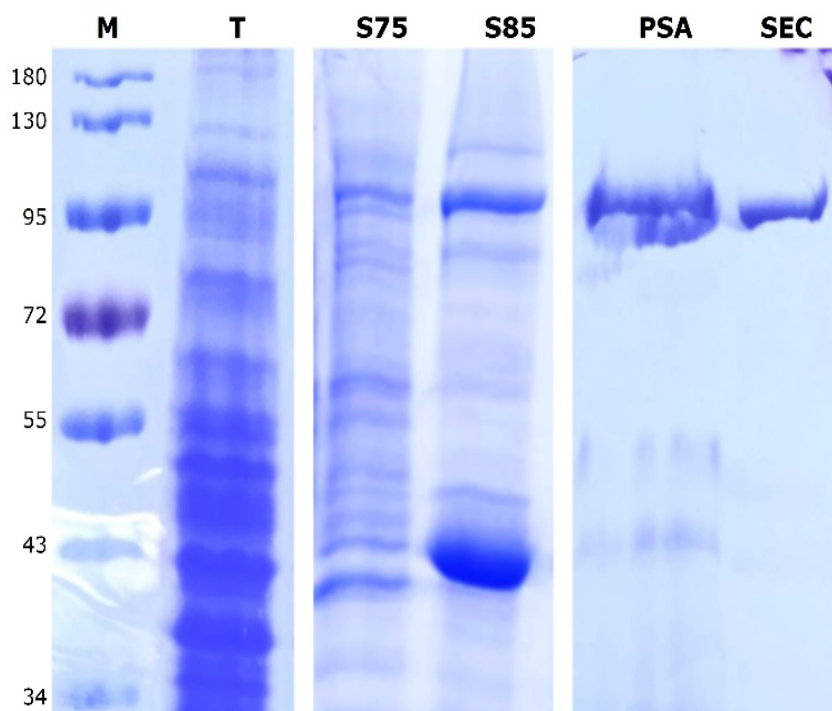
Estandarización de la purificación de la rTaqDNA-pol

Con el objetivo de obtener una mayor pureza de la proteína recombinante, se realizó una segunda precipitación térmica, orientada a eliminar contaminantes termoestables remanentes (ver Figura 4). No obstante, el análisis por SDS-PAGE evidenció la presencia de impurezas menores, tanto de peso molecular superior como inferior al esperado. Por esta razón, se implementó una estrategia adicional de purificación mediante precipitación con sulfato de amonio al 30 % p/v, seguida de cromatografía de exclusión por gel (SEC). El monitoreo de la elución a 280 nm reveló un mayor enriquecimiento proteico en las fracciones 13 y 14, las cuales, según el análisis por SDS-PAGE, correspondieron a la proteína rTaqDNA-pol purificada (ver Figura 4).



Figura 4

Resumen del proceso de purificación de la rTaqDNA-pol



Nota. M: marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™). T: proteínas totales de *E. coli* BL21(DE3) que expresa la rTaqDNA-pol. S75: proteínas solubles después de la precipitación con calor a 75 °C por 1 hora. S85: proteínas solubles después de la precipitación con calor a 85 °C por 1 hora. PSA: proteínas resuspendidas en buffer de almacenamientos posterior de la precipitación con sulfato de amonio al 30 % p/v. SEC: proteína purificada mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), fracción 14. Análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 %, teñida con azul de Coomassie R-250.

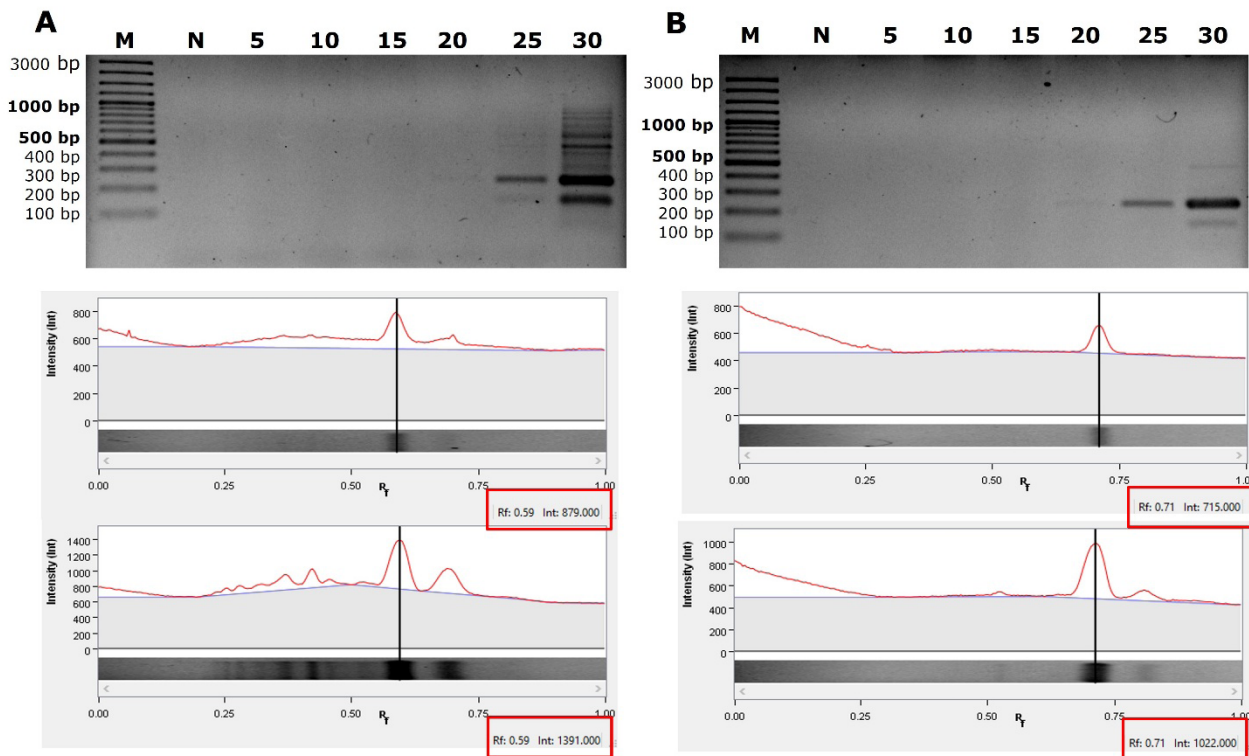
Evaluación catalítica de la rTaqDNA-pol

La actividad catalítica de la rTaq DNA polimerasa purificada se evaluó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semicuantitativa, amplificando un fragmento de 234 pb del gen β -actina a partir de ADN genómico de ratón. La enzima recombinante mostró una eficiencia de amplificación comparable e incluso superior a la Taq ADN polimerasa comercial, con una intensidad de banda un 36 % mayor en el ciclo 30 (1391 vs. 1022 unidades arbitrarias, UA) y un 22 % mayor en el ciclo 25 (879 vs. 715 UA), según análisis densitométrico de las bandas obtenidas (ver Figura 5).



Figura 5

Cuantificación de la actividad de la rTaqDNA-pol mediante PCR semicuantitativa



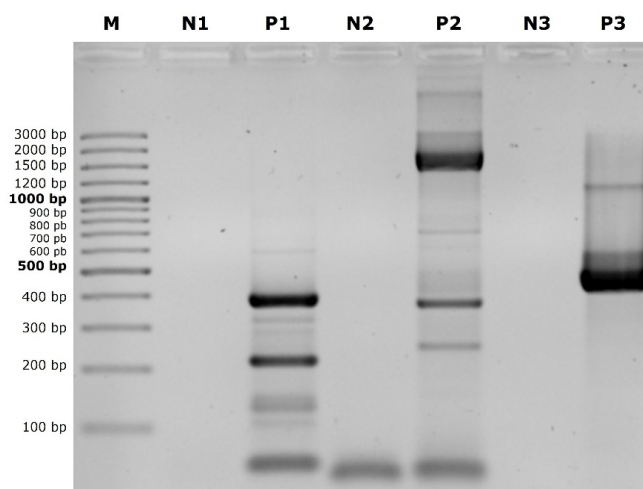
Nota. Amplificación del fragmento de 234 pb del gen β -actina de ratón, utilizando ADN genómico como plantilla. M: marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler). N: control negativo de la PCR. Ciclos 5–30: productos de PCR obtenidos entre los ciclos 5 y 30. A) Resultados de la PCR empleando Taq ADN polimerasa recombinante (rTaq DNA polimerasa), con su respectiva cuantificación en el ciclo 25 (879 UA) y ciclo 30 (1391 UA). B) Resultados de la PCR empleando Taq ADN polimerasa comercial, con su respectiva cuantificación en el ciclo 25 (715 UA) y ciclo 30 (1022 UA). Los productos fueron separados en un gel de agarosa al 1 % y teñidos con bromuro de etidio.

Con el objetivo de evaluar la versatilidad funcional de la enzima obtenida, se realizó un ensayo de eficacia mediante la amplificación de blancos genéticos de diferente tamaño y complejidad, con el fin de determinar su aplicabilidad en diversos escenarios experimentales. En los carriles correspondientes a las muestras P1, P2 y P3, se observaron bandas claramente definidas en las posiciones esperadas: ~ 397 pb, ~ 1750 pb y ~ 500 pb, respectivamente. Estos resultados demuestran la capacidad de la rTaqDNA-pol para amplificar eficazmente fragmentos de ADN de distintas longitudes (ver Figura 6).



Figura 6

Verificación de la eficacia de la rTaqDNA-pol



Nota. M: marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler). N1, N2 y N3: controles negativos de las reacciones. P1: amplificación de un fragmento del gen SSuRNA 16S de *E. faecalis* (~397 pb), utilizando ADN genómico de *E. faecalis* como plantilla. P2: amplificación completa del gen SSuRNA 18S de *Blastocystis* (~1750 pb), utilizando ADN extraído de materia fecal positiva para *Blastocystis* como plantilla. P3: amplificación de un fragmento del gen SSuRNA 18S de *Blastocystis* (~500 pb), utilizando ADN genómico de *Blastocystis* como plantilla. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % y teñidos con bromuro de etidio.

Particularmente, fue destacable su desempeño en la amplificación del gen completo SSU rRNA 18S de *Blastocystis* (~1750 pb), a partir de ADN total extraído de materia fecal, una matriz de alta complejidad en la que predomina el ADN bacteriano. La capacidad de amplificación en estas condiciones indica no solo una buena eficiencia catalítica, sino también una posible tolerancia a inhibidores presentes en muestras biológicas complejas.

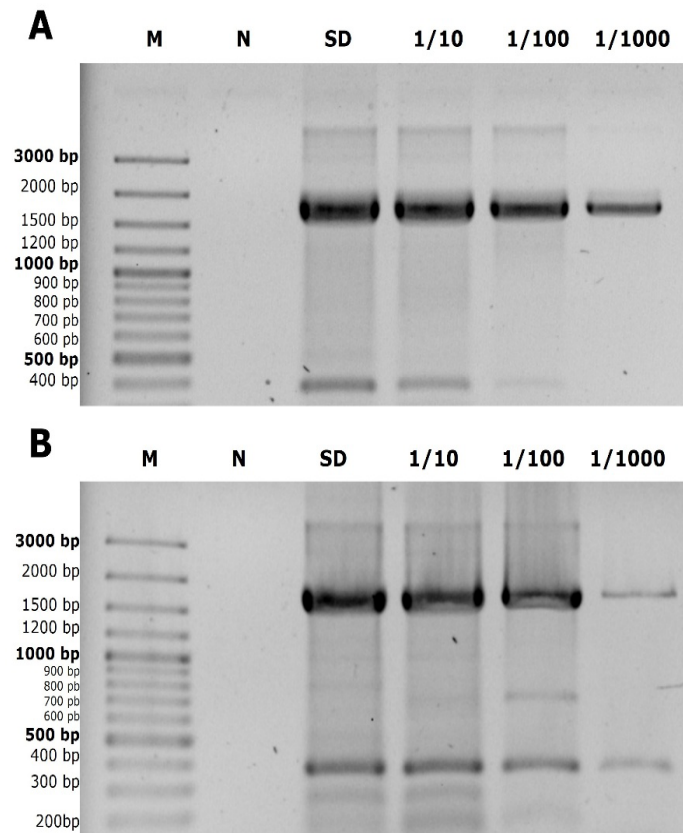
Sensibilidad de la rTaqDNA-pol

Con el objetivo de evaluar la sensibilidad de la rTaq DNA polimerasa, se realizó un ensayo de PCR convencional dirigido a la amplificación del gen ribosomal 18S de *Blastocystis*, para lo cual se utilizaron diluciones seriadas de ADN extraído a partir de una muestra de materia fecal positiva para el parásito.

Los resultados evidenciaron una amplificación exitosa en todas las diluciones evaluadas, incluso en la menor cantidad de ADN ensayada (0,07 ng), tanto con la rTaqDNA-pol como con la Taq polimerasa comercial. Es importante señalar que, en este tipo de muestras, la proporción de ADN correspondiente a *Blastocystis* fue relativamente baja, ya que el ADN bacteriano constituyó la mayor fracción del material genético presente en las heces. La capacidad de la rTaq DNA polimerasa para amplificar la secuencia blanco en un contexto altamente complejo, caracterizado por una alta abundancia de ADN no perteneciente al parásito y por la posible presencia de inhibidores de la PCR, proporciona evidencia de su sensibilidad y de su desempeño robusto bajo condiciones experimentales desafiantes.

Figura 7

Ensayos de sensibilidad de la rTaqDNA-pol



Nota. A) Amplificación utilizando r_TaqDNA-pol. B) Amplificación utilizando Taq polimerasa comercial. Se realizó una PCR para la amplificación del gen completo 18S de *Blastocystis* a partir de ADN extraído de una muestra de materia fecal de un tamaño de 1750 pb. M: marcador de peso molecular de 100pb (GeneRuler). N: control negativo. SD: reacción sin dilución del ADN plantilla (71,6 ng). Diluciones del ADN plantilla: 1:10, 1:100 y 1:1000: dilución 1:1000. Los productos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio.

Se logró la producción de un lote funcional de rTaqDNA-pol, conformado por 30 alícuotas de 100 μ L cada una, con una concentración de 9,4 μ g/mL, equivalente a más de 5 unidades por microlitro, según la comparación funcional con una enzima comercial. Este lote garantiza el suministro del insumo para diversas aplicaciones de biología molecular dentro del Laboratorio de Parasitología Molecular.

Asimismo, se estableció y documentó un protocolo estandarizado para la expresión, purificación y conservación de la rTaq DNA polimerasa, lo cual permite la reproducción del proceso en futuros ciclos de producción y asegura la continuidad operativa, además de favorecer la autosuficiencia del laboratorio en la producción de esta enzima.

Estimación del costo de producción de la rTaqDNA-pol

Para obtener una estimación reproducible del costo directo del lote producido, se realizó un cálculo detallado basado en los precios vigentes de los insumos empleados durante las etapas de expresión, purificación y almacenamiento de la enzima. Se consideraron los costos de medios de cultivo, antibióticos, inductores, tampones, sales para lisis, precipitación, enzimas auxiliares,



reactivos de cromatografía y consumibles, a los cuales se sumó el valor correspondiente de la mano de obra técnica requerida para ejecutar el protocolo completo. La suma de estos componentes resultó en un costo aproximado de 9,2 millones de COP por lote, equivalente a 30 alícuotas funcionales de 100 µL cada una. Para contextualizar este valor frente a opciones importadas, se consultó el precio actualizado de una Taq ADN polimerasa comercial con características comparables de actividad y estabilidad. Con base en esta referencia, se estimó que un lote con volumen equivalente tendría un costo comercial cercano a 52,2 millones de COP. Esta comparación evidencia un ahorro aproximado del 80 %, asociado a la producción local de la enzima.

Discusión

La producción de enzimas recombinantes, como la Taq ADN polimerasa, constituye una estrategia para fortalecer la autosuficiencia biotecnológica. Este estudio desarrolla y valida un protocolo optimizado para la expresión funcional de la Taq ADN polimerasa en *Escherichia coli*, y evalúa su desempeño en términos de expresión, purificación y actividad enzimática.

La expresión inicial de la proteína fue moderada, probablemente debido al uso del promotor híbrido tac del plásmido pOpenTaq, cuya eficiencia transcripcional es menor que la de los sistemas basados en T7 (Rosano y Ceccarelli, 2014; Studier, 2005). Sin embargo, la estrategia de producción y purificación permitió obtener la enzima en forma abundante y catalíticamente activa, lo que demuestra la efectividad y robustez del protocolo diseñado.

La estrategia de purificación, basada en tratamiento térmico y precipitación con sulfato de amonio (Teng et al., 2023; Wingfield, 2001), seguida de exclusión por tamaño, permitió aislar la enzima con >90 % de pureza, sin recurrir a etiquetas de afinidad ni equipamiento especializado. Este enfoque es reproducible y de bajo costo, lo cual lo hace adecuado para entornos con recursos limitados.

Adicionalmente, durante los análisis por SDS-PAGE fue posible observar, en algunas fracciones de purificación, la presencia de bandas adicionales con pesos moleculares distintos al esperado para la rTaqDNA-pol. Este patrón es común en procesos de producción *in house* de enzimas recombinantes, especialmente cuando se utilizan metodologías de purificación sin etiquetas de afinidad y basadas en propiedades generales como la termoestabilidad. Estas bandas pueden corresponder a productos de degradación, isoformas truncadas o proteínas bacterianas coenriquecidas durante los pasos térmicos y salinos (Schein, 1989; Gaberc-Porekar y Menart, 2001). Aunque estas impurezas no afectaron la funcionalidad de la enzima en los ensayos de PCR, su identificación resulta relevante para la estandarización de futuros lotes y sugiere que podrían incorporarse pasos adicionales si se requieren mayores niveles de pureza para aplicaciones más exigentes.

Funcionalmente, la rTaqDNA-pol mostró un desempeño comparable y, en algunas pruebas, superior al de formulaciones comerciales, incluso sobre matrices complejas como ADN extraído de materia fecal, lo que respalda su aplicabilidad en contextos diagnósticos reales (Schrader et al., 2012; Hoorfar et al., 2003).

Los resultados demuestran tanto la viabilidad técnica como el impacto estratégico de producir Taq polimerasa a nivel local, al reducir la dependencia de insumos importados y fortalecer la capacidad de respuesta del sistema científico ante posibles interrupciones en el suministro. La producción en *E. coli* BL21 (DE3) constituye una plataforma replicable y escalable, especialmente relevante en países en desarrollo como Colombia. La pandemia por SARS-CoV-2, como ejemplo concreto de este tipo de situaciones, evidenció cómo eventos globales pueden limitar o incluso cortar el acceso a insumos biotecnológicos esenciales (Artecona y Jorge, 2021; Berlec y Strukelj, 2013; Guzmán et al., 2024; Ivanov, 2020).

El protocolo propuesto ofrece una base para desarrollar otras enzimas, lo que facilita la creación de una plataforma nacional de producción de reactivos estratégicos, como

ya se ha implementado exitosamente en Asia y Europa del Este ([Vásárhelyi et al., 2023](#); [Zhang et al., 2024](#)). Futuras optimizaciones podrían incluir sistemas de expresión con otros promotores y la incorporación de etiquetas de purificación, así como la estandarización bajo normas GMP para su potencial transferencia al sector diagnóstico.

Además, resulta pertinente considerar la viabilidad de implementar este protocolo en un laboratorio convencional. Las etapas de expresión, lisis y purificación térmica pueden ejecutarse con infraestructura básica de biología molecular (incubadora, centrífuga, baño térmico y equipamiento estándar) y no requieren instrumentación especializada. Aunque la cromatografía de exclusión molecular optimiza la pureza final, es el único paso que demanda un equipo robusto; sin embargo, la enzima obtenida previamente a este proceso, pese a presentar un nivel de pureza menor, mantiene actividad catalítica suficiente para aplicaciones rutinarias de PCR, como se evidenció en los ensayos comparativos. Esto implica que laboratorios con recursos limitados pueden adoptar una versión simplificada del protocolo sin comprometer la funcionalidad de la enzima.

A nivel de personal, el procedimiento requiere únicamente formación básica en técnicas de manipulación bacteriana y SDS-PAGE, por lo que puede ser implementado por equipos con competencias estándar en biología molecular. Aunque los resultados aquí presentados demuestran la robustez del método, la validación externa en otros contextos operativos y con distintos tipos de matrices biológicas contribuirá a fortalecer su reproducibilidad y facilitar su adopción en entornos de investigación y diagnóstico.

Finalmente, el análisis económico realizado, aunque exploratorio y no orientado a establecer un precio de mercado, permitió dimensionar el impacto de producir la enzima a nivel local. La estimación del costo por lote reveló una diferencia sustancial respecto al valor de una formulación comercial con características equivalentes, lo que se traduce

en una reducción cercana al 80 % en los costos operativos del laboratorio.

Igualmente, evaluaciones similares han sido reportadas en otros modelos de producción biotecnológica a pequeña escala, en los cuales el aprovechamiento de plataformas bacterianas y protocolos de purificación basados en termoestabilidad permiten disminuir de manera significativa los costos totales ([Teng et al., 2023](#); [Berlec y Strukelj, 2013](#)).

Es importante señalar que esta aproximación no constituye un análisis económico formal, sino una estimación del beneficio de la producción *in house*, lo cual está en concordancia con estudios que destacan la utilidad de evaluaciones de costo simplificadas en contextos de biotecnología aplicada ([Sahakijpijarn et al., 2019](#)). Aunque la estimación fue intencionalmente cautelosa, el ahorro calculado es congruente con reportes internacionales en los que la producción local de enzimas recombinantes ha demostrado mejorar la estabilidad operativa de laboratorios de diagnóstico e investigación ([Mendoza-Rojas et al., 2021](#)).

En el contexto latinoamericano, donde los costos de importación y los tiempos de entrega están sujetos a una alta incertidumbre en la disponibilidad de insumos, la capacidad de producir enzimas estratégicas representa una ventaja significativa. La pandemia por COVID-19 reforzó esta necesidad, al exponer la vulnerabilidad de las cadenas globales de suministro y el riesgo que supone depender exclusivamente de productos importados para actividades críticas de diagnóstico molecular ([Artecona y Jorge, 2021](#); [Guzmán et al., 2024](#)).

En este sentido, la reducción observada en los costos evidencia la eficiencia del protocolo desarrollado y respalda la pertinencia de avanzar hacia modelos de autosuficiencia biotecnológica, alineados con recomendaciones internacionales para sistemas científicos de países en desarrollo.

En síntesis, este trabajo valida una alternativa técnica funcional y aporta una solución tangible para avanzar hacia la soberanía científica en biotecnología.

Conclusiones

Este estudio demuestra la viabilidad de establecer sistemas locales de producción de insumos biotecnológicos, como la enzima Taq ADN polimerasa recombinante (rTaqDNA-pol), mediante el uso de equipamiento accesible y protocolos de bajo costo. Además de establecer un procedimiento técnico confiable, los resultados constituyen una contribución concreta frente a la problemática de la dependencia estructural de insumos biotecnológicos importados.

El enfoque desarrollado evidencia que la autosuficiencia tecnológica en biotecnología es factible, a través de metodologías adaptables a contextos con recursos limitados. La capacidad de sintetizar reactivos críticos a nivel local representa una ventaja estratégica, tanto frente a posibles interrupciones en las cadenas de suministro globales —como las experimentadas durante la pandemia por COVID-19— como para asegurar la continuidad operativa de laboratorios que realizan actividades de diagnóstico e investigación en forma rutinaria.

La plataforma diseñada para la producción de rTaqDNA-pol ofrece un modelo escalable que puede ser adaptado para la expresión y purificación de otras proteínas de uso frecuente en biología molecular y sienta las bases para el establecimiento de líneas locales de producción de insumos biotecnológicos.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Fuentes de financiación

Esta investigación fue financiada por la Universidad El Bosque (PCI-2024-001).

Referencias

- Artecona, R., & Jorge, M. F. (2021). *United States supply chains resiliency: The key role Latin America and the Caribbean could play*. CEPAL. <https://repositorio.cepal.org/bitstreams/3202daef-c586-4652-add3-c33cc55af4f2/download>
- Barnes, W. M., Zhang, Z., & Kermekchiev, M. B. (2021). A Single Amino Acid Change to Taq DNA Polymerase Enables Faster PCR, Reverse Transcription and Strand-Displacement. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 553474. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.553474>
- Berlec, A., & Strukelj, B. (2013). Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40(3-4), 257-274. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1235-0>
- Castañeda, N. Y., Chaparro-Olaya, J. y Castellanos, J. E. (2007). Producción y caracterización de un anticuerpo policlonal dirigido contra la fosfoproteína del virus de la rabia. *Biomedica Revista del Instituto Nacional de Salud*, 27(2), 257-267. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i2.221>
- Gaberc-Porekar, V., & Menart, V. (2001). Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49(1-3), 335-360. [https://doi.org/10.1016/s0165-022x\(01\)00207-x](https://doi.org/10.1016/s0165-022x(01)00207-x)
- Guerra, Á. P., Calvo, E. P., Wasserman, M., & Chaparro-Olaya, J. (2016). Production of recombinant proteins from *Plasmodium falciparum* in *Escherichia coli*. *Biomedica*, 36(Sup 1), 97-108. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3011>



- Guzmán, C., Mattar, S., Alvis-Guzmán, N., De la Hoz, F., & Arias, E. (2024). Biotechnological sovereignty is not a mere nationalist concept, it is a necessity for Colombia and Latin America. *Cadernos de Saúde Pública*, 40(9), e00202323. <https://www.scielosp.org/article/csp/2024.v40n9/e00202323/>
- Hernández, P. C., Wasserman, M., & Chaparro-Olaya, J. (2018). In vitro interaction between Plasmodium falciparum myosin B (PfMyoB) and myosin A tail interacting protein (MTIP). *Parasitology Research*, 117, 3437–3446. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6039-8>
- Hoorfar, J., Cook, N., Malorny, B., Wagner, M., De Medici, D., Abdulmawjood, A., & Fach, P. (2003). Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5835. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5835.2003>
- Hyman, R. W., Fukushima, M., Diamond, L., Kumm, J., Giudice, L. C., & Davis, R. W. (2005). Microbes on the human vaginal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(22), 7952–7957. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503236102>
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (Eds.). (1990). *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, INC.
- Ivanov D. (2020). Predicting the impacts of epidemic outbreaks on global supply chains: A simulation-based analysis on the coronavirus outbreak (COVID-19/SARS-CoV-2) case. *Transportation research. Part E, Logistics and Transportation Review*, 136, 101922. <https://doi.org/10.1016/j.tre.2020.101922>
- Kermekchiev, M. B., Kirilova, L. I., Vail, E. E., & Barnes, W. M. (2009). Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Research*, 37(5), e40. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1055>
- Mendoza-Rojas, G., Sarabia-Vega, V., Sanchez-Castro, A., Tello, L., Cabrera-Sosa, L., Nakamoto, J. A., Peñaranda, K., Adai, V., Alcántara, R., & Milón, P. (2021). A low-cost and open-source protocol to produce key enzymes for molecular detection assays. *STAR Protocols*, 2(4), 100899. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100899>
- Morales, L., Hernández, P., & Chaparro-Olaya, J. (2018). Systematic Comparison of Strategies to Achieve Soluble Expression of Plasmodium falciparum Recombinant Proteins in E. coli. *Molecular Biotechnology*, 60(12), 887–900. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0125-0>
- Morales, L., Velandia, M. L., Calderon, M. A., Castellanos, J. E., & Chaparro-Olaya, J. (2017). Anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante NS3 del virus del dengue. *Biomédica*, 37(1), 131-140. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3249>
- Mullis, K., & Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335–350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Noma, T., Sode, K., & Ikebukuro, K. (2006). Characterization and application of aptamers for Taq DNA polymerase selected using an evolution-mimicking algorithm. *Biotechnology Letters*, 28(23), 1939–1944. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9178-4>
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*, 5(7), e177. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050177>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>

- Sahakijpijarn, S., Moon, C., Koleng, J. J., & Williams, R. O. (2019). Formulation composition and process affect counterion for CSP7 peptide. *Pharmaceutics*, *11*(10), 498. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11100498>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3.rd ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santín, M., Gómez-Muñoz, M. T., Solano-Aguilar, G., & Fayer, R. (2011). Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitology Research*, *109*(1), 205–212. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2244-9>
- Schein, C. H. (1989). Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Nature Biotechnology*, *7*(11), 1141–1149. <https://doi.org/10.1038/nbt1189-1141>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, *113*(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Scicluna, S. M., Tawari, B., & Clark, C. G. (2006). DNA barcoding of *blastocystis*. *Protist*, *157*(1), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.12.001>
- Śpibida, M., Krawczyk, B., Olszewski, M., & Kur, J. (2017). Modified DNA polymerases for PCR troubleshooting. *Journal of Applied Genetics*, *58*(1), 133–142. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0371-4>
- Stensvold, C. R., Ahmed, U. N., Andersen, L. O., & Nielsen, H. V. (2012). Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(6), 1847–1851. <https://doi.org/10.1128/JCM.00007-12>
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, *41*(1), 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>
- Teng, X. C., Nag, S. Y., Citartan, M., & Tang, T. H. (2023). Simple approach for expression and rapid purification of Taq DNA polymerase in three *Escherichia coli* strains. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, *31*(1), 45–52 <https://doi.org/10.35118/apjmbb.2023.031.1.05>
- Vásárhelyi, B., Kappelmayer, J., Miseta, A., & Nagy Jr, B. (2023). 61st National Congress of the Hungarian Society of Laboratory Medicine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *61*(8). <https://doi.org/10.1515/cclm-2023-0485>
- Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *65*(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001>
- Westin, M. A., Alexson, S. E., & Hunt, M. C. (2004). Molecular cloning and characterization of two mouse peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-regulated peroxisomal acyl-CoA thioesterases. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(21), 21841–21848. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313863200>
- Wingfield, P. T. (2001). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, *89*. <https://doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs13>
- Yamagami, T., Ishino, S., Kawarabayasi, Y., & Ishino, Y. (2014). Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 461. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00461>

Zhang, F., Icyuz, M., Bartke, A., & Sun, L. Y. (2020). The effects of early-life growth hormone intervention on tissue specific histone H3 modifications in long-lived Ames dwarf mice. *Aging*, 13(2), 1633–1648. <https://doi.org/10.18632/aging.202451>

Zhang, L., Guo, W., & Lv, C. (2024). Modern technologies and solutions to enhance surveillance and response systems for emerging zoonotic diseases. *Science in One Health*, 3, 100061. <https://doi.org/10.1016/j.soh.2023.100061>

Contribución

Luna Torres-Hichster: metodología, análisis formal, visualización, redacción.

Carlos Nieto-Clavijo: conceptualización, metodología, análisis formal, visualización, redacción.

Liliana Morales: conceptualización, análisis formal, redacción.

Jacqueline Chaparro-Olaya: conceptualización, análisis formal, redacción, revisión, supervisión, administración del proyecto, adquisición de financiación.

Todos los autores participaron en la elaboración del manuscrito, lo leyeron y aprobaron.

Declaración uso inteligencia artificial

En la elaboración de este artículo, los autores no utilizaron ninguna herramienta o servicio de inteligencia artificial para elaborar el manuscrito.