

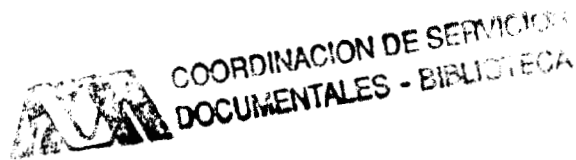
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

CBS

FERMENTACION DE SUBPRODUCTOS PROTEIN-QUITINOSOS (DESECHOS DE CAMARON) POR *Bacillus thuringiensis*, PARA LA PRODUCCION DE PROTEASA EXTRACELULAR Y CRISTALES INSECTICIDAS.



T E S I S
que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Biológicas
P R E S E N T A
M. en C. LUZ IRENE ROJAS AVELIZAPA

SEPTIEMBRE / 1999

225703

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT, y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio número. PFP-200-93”

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

M. en C. LUZ IRENE ROJAS AVELIZAPA

El día 9 de Septiembre de 1999

Comité Tutorial:

Tutor: Dra. Isabel Guerrero Legarreta

Asesor: Dr. Ramón Cruz Camarillo

Asesor: Dra. Refugio Rodríguez Vázquez

Sinodal: Dra. María del Refugio Trejo Hernández

Sinodal: Dr. Jorge Eugenio Ibarra Rendón

Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo recibido mediante una beca, para la realización de mis estudios de Doctorado durante el periodo Abril 1995- Octubre 1998.

RESUMEN

RESUMEN

La presente tesis forma parte de una línea de investigación tendiente a aprovechar los desechos de camarón por vía microbiana, utilizando a *Bacillus thuringiensis* para la producción de proteasas, quitinasas, cristales insecticidas y un remanente sólido útil para la obtención de quitina y quitosana. Sin embargo, por la amplitud y complejidad que presenta una investigación de tal envergadura, el presente estudio aborda sólo los tres aspectos siguientes: i). La selección y caracterización de una cepa de *Bacillus thuringiensis*, capaz de crecer en un medio conteniendo como único ingrediente desechos secos y molidos de camarón, suspendidos en agua de suministro, para producir proteasas, quitinasas y cristales bioinsecticidas. ii). El estudio de materia prima y de algunas variables fisico-químicas que influyen en la producción de la proteasa a escala de matraz y fermentador, y iii). La caracterización parcial de la proteasa a nivel de extracto crudo.

♦ La selección en su fase primaria se llevó a cabo con 152 cepas de *B. thuringiensis*, sembrándolas en placas con medios sólidos específicos, para evaluar la producción de caseinasas y quitinasas extracelulares, por el tamaño y el aspecto de los halos de hidrólisis en torno a las colonias de cada cepa. También se evaluó la producción de queratinasa extracelular (otro tipo de proteasa), sembrando las bacterias en un medio con lana teñida con azul brillante de remazol, cuya hidrólisis es evaluada por el incremento en la absorbancia a 585 nm. De este estudio resultaron ocho cepas cristalíferas, con un adecuado balance en la producción de caseinasas, queratinasas y quitinasas. La selección secundaria consistió en cultivar las ocho cepas promisorias, en un medio líquido conteniendo carapacho molido de camarón al 2% en agua de suministro, para hacer estudios cinéticos de la producción de proteasas. Cabe mencionar que en las fases primaria y secundaria de la selección se utilizaron

también cepas patrón como Bt-149 especialmente proteolítica; *Serratia marcescens* WF, muy proteo-quitinolítica, así como Bt-HD-1 y Bt-HD-73 usadas como referencia debido a su alta capacidad bioinsecticida. Al final quedaron sólo las cepas Bt-103 y Bt-112 para abordar una selección terciaria, en base a la capacidad insecticida de sus cristales purificados; aunque se hicieron estudios complementarios sobre la caracterización de ambas cepas. Los resultados obtenidos después de realizar bioensayos contra insectos modelo, abarcando dípteros, coleópteros y lepidópteros, mostraron que Bt-112 era moderadamente tóxica hacia el lepidóptero *Manduca sexta*, el gusano del tabaco, y por lo mismo se adoptó como cepa de trabajo para continuar la investigación. Cabe destacar que Bt-112 posee cristales bipiramidales asociados a inclusiones cuboidales y esféricas, con proteínas cry de 65-70 y 130 kDa, semejantes a las encontradas en la cepa patrón internacional HD-1, aunque su perfil plasmídico (5.8, 7, 8.7 y 34 MDa) es muy diferente. Además, la serotipificación mostró que Bt-112 pertenece a la variedad *tolworthi*, en tanto que HD-1 corresponde a la variedad *kurstaki*.

Por su parte la cepa Bt-103 pertenece al serovar. *finitimus*, sus cristales pleomorficos están fuertemente asociados a la espora, y posee plásmidos de 47 y 80 MDa.

En suma, aún cuando sólo Bt-112 fue insecticida, ambas cepas resultaron muy interesantes, sobre todo en cuanto a su perfil plasmídico, el cual no ha sido reportado en ninguna otra cepa. Por otro lado, la morfología de los cristales de la cepa Bt-103 también resultó ser novedosa. Tanto Bt-112 como Bt-103, fueron tipificadas y conservadas en la colección del Instituto Pasteur, Francia, que es el centro de acopio y referencia de cepas de *B. thuringiensis* más importante a nivel internacional.

♦ En cuanto a los estudios para mejorar la producción de la proteasa extracelular de Bt-112, en cultivo sumergido a escala de matraz, éstos se iniciaron relacionando análisis bromatológicos de la materia prima, con su capacidad para propiciar la síntesis de la enzima. De este modo se encontró que el contenido proteico actúa favorablemente, no así el contenido de grasas, de sal y de amonio. Luego se demostró haciendo estudios cinéticos, que la producción de proteasa alcanza un máximo (374 UP/ml) a 31°C, empleando el sustrato al 2%, suspendido en agua de suministro, con una agitación de 180 rpm y sin ningún ajuste en el pH inicial del medio (alrededor de 8.8), al cabo de 32 h de incubación.

Al intentar aumentar los rendimientos llevando el proceso a escala de fermentador de laboratorio (New-Brunswick Bioflo III, 4 l), se encontró que utilizando las condiciones óptimas de los experimentos en matraz, aún con un mejor control y aireación (0.5 vvm y 375 rpm), no se mejoró la producción de la enzima (350 UP/ml), aún cuando se redujo el tiempo de máxima producción de 32 a 22 h de incubación. Tampoco se logró elevar la concentración enzimática en el caldo, al mantener constante el pH del medio a 7, o al aumentar la agitación y la aireación. Bajo estas condiciones se propició la solubilización de las proteínas presentes en el sustrato y con ello la formación de espuma. Esto obligó a la adición de antiespumante, el cual pareció tener un efecto dual, tanto sobre el microorganismo como sobre la proteasa ya presente en el medio, afectando drásticamente el rendimiento de la proteasa.

Cabe destacar que los cristales insecticidas de Bt-112 se produjeron satisfactoriamente en el medio con carapacho de camarón a partir de las 24 h de incubación, tanto a nivel de matraz como de fermentador. Así mismo se produjeron modestas cantidades de quitinasa. Esto se debe a que en general, todas las cepas de *B. thuringiensis* estudiadas son poco quitinolíticas.

♦ En cuanto a la caracterización parcial de la proteasa extracelular de Bt-112, en forma de extracto crudo, puede destacarse que es una tiol-proteasa, sensible a los agentes quelantes, la cual mostró su máxima actividad a pH 8 y 45°C. Su vida media de anaquel en refrigeración (5°C) es de 1.9 meses, y de 2.7 meses en congelación (-15°C). El CaCl₂ favoreció la acción de la proteasa, y según la concentración de la sal puede darse un efecto de activación, o de mayor estabilización al efecto de la temperatura. Los detergentes neutros favorecen la acción enzimática, lo contrario ocurre con la urea y los detergentes aniónicos. Finalmente, los experimentos de electroforesis sugieren la presencia de una sola proteasa de un peso molecular aproximado de 36 kDa.

En suma, pueden considerarse como contribuciones del presente trabajo:

- a) La propuesta de uso novedoso para los desechos de camarón, como sustrato de fermentación para la producción de proteasa y cristales bioinsecticidas.
- b) Ampliar los usos biotecnológicos para *B. thuringiensis*; ya que hasta ahora su empleo se ha restringido a la producción de cristales.
- c) Las exoenzimas de *B. thuringiensis* en lo general han sido poco estudiadas. En este trabajo se describen algunas características de la proteasa alcalina de esta bacteria.

ABSTRACT

ABSTRACT

This research involved three different aspects: i).- Selection and characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain to produce extracellular proteases and chitinases as well as intracellular protein crystals with bioinsecticide activity. These strains were selected for their ability to grow in a medium containing dried and milled shrimp wastes, as the sole ingredient in tap water. ii).- Chemical analysis of raw materials were performed, in order to study the influence of its components on the protease production. The influence of some environmental physico-chemical variables, both at flask and fermentator levels, on protease production were also studied iii).- Partial characterization of the crude protease extract.

In an initial screening, 152 strains of *B. thuringiensis* were inoculated by striking on solid specific media, in order to evaluate the production of extracellular caseinase and chitinase. This evaluation was carried out according to the size and aspect of the hydrolysis haloes, surrounding the colonies of each particular strain. In addition, the production of keratinase, another type of proteolytic enzyme was also evaluated. In this case all strains were cultured in a medium with 0.4% milled wool, previously stained with remazol brilliant blue, and production of the enzyme was followed by digestion of the solid substrate, that release a soluble dye into the medium, its absorbance was read at 585 nm. From this part, eight crystalliferous strains were chosen based on their appropriate enzymatic balance.

A second selection consisted of culturing the eight chosen strains in a liquid medium containing only 0.2% milled shrimp waste in fresh water, to study their protease production kinetics during a total study time of 45 h. In these two experiments, some strains were included as references, these strains were *Serratia marcescens* WF due to its very high proteolytic and chitinolytic extracellular activities; Bt-149 for its high proteolytic activity, and

Bt-HD-1 as well as Bt-HD-73 due to their production of entomocidal crystals. After the secondary selection, only Bt-103 and Bt-112 strains were considered for further studies.

In a third selection, bioassays were carried out with previously purified crystals of Bt-103 and Bt-112, against coleopterous, lepidopterous and dipterous plague-model insects. Additionally, a complementary characterization of both strains was also done. The results obtained showed that Bt-112 was moderately toxic against *Manduca sexta* larvae, a lepidopterous known as tobacco worm, whereas Bt-103 was not toxic against any of the tested insects. Therefore Bt-112 was chosen to continue the experiments. However it is important to note that Bt-112 produced bipyramidal crystals associated to semicuboidal and spherical inclusions. The electrophoretic pattern of their cry-proteins showed a mayor band around 130 kDa, and two minor components between 65 and 70 kDa. These data were similar to these found in HD-1 protein crystal composition. However their plasmid electrophoretic profiles were different. Bt-112 had four plasmids of 5.8, 7, 8.7 and 34 MDa. In addition, further characterization of Bt-112 indicated that it corresponded to serovar. *tolworthi*, whilst it is known that HD-1 belongs to serovar. *kurstaki*. With respect to Bt-103, it corresponded to serovar. *finitimus*, its crystals are pleomorphic in shape, strongly associated to spores.

In conclusion although only Bt-112 was entomocidal, both strains resulted interesting because of their peculiar plasmids profiles, the morphology of their crystals (particularly Bt-103) and their biotechnological possibilities, and therefore they were sent to the Pasteur Institute of France for their sero-characterization and storage. This Institution is the more important international center for reference and storing of *B. thuringiensis* strains in the world.

With regard to optimization of the production of extracellular protease of Bt-112 in submerged cultures at evaluatory scale, an initial comparison of the chemical composition of

raw materials (different shrimp-waste meals) and their efficiency to trigger the enzyme synthesis was carried out. It was found that high protein content promoted protease production, but salt, fats and ammonia did not. Studies on enzyme kinetics production showed that the optimal conditions were: 31°C, shaking at 130 rev/min, and 2% substrate concentration in tap water. These results were not improved by using a conventional mineral medium, or by changing the initial pH of the medium to 7, which normally is 8.8. Under these optimal conditions, the enzyme concentration reached 350 protease units/ml, after 32 h of incubation.

Subsequent experiments in 4 l fermentator (New Brunswick Bioflo III), under the previously mentioned optimal conditions, and aeration-shaking of 0.5 vvm – 375 rev/min, demonstrated that no more enzyme concentration was obtained. However, the time required to produce 350 UP/ml was reduced from 32 h to 22. Not more enzyme concentration was obtained by maintaining constant the pH of the medium to 7, nor by rising the aeration-shaking. Conversely, under these conditions solubility of proteins associated to the substrate was increased, making necessary of antifoaming substances during fermentation. Antifoaming agents affected both bacterial integrity as well as protease molecules already present in the culture, causing a fall in protease yield.

It is important to emphasize that there was a considerable production of entomocidal crystals, with Bt-112 grown in the shrimp-waste medium, both in flask and in a fermentator experiments. Likewise, in both levels a small amount of chitinase was produced. This could be explained by the fact that, of the initial 152 strains studied *B. thuringiensis* strains, all them very little chitinolytic activity as compared to *S. marcescens* WF.

The last experiments consisted on partial characterization of Bt-112 crude protease. They suggested the presence of a single enzyme, of 36 kDa. It was a thiol-dependent protease inhibited by chelating agents such as EDTA. Its highest activity occurred at pH 8 and 45°C, and had a half life of 1.9 months at 5°C or 2.7 months at -15°C. The protease was activated and stabilized by the addition of CaCl₂. Neutral detergents can also favored the enzymatic activity, whereas urea and anionic detergents could have an opposite effect.

Finally as contributions of the present research can be considered:

- i) The proposal of a new use for shrimp refuses as fermentation substrate, for producing extracellular protease and bioinsecticide crystals.
- ii) The proposal to extend the biotechnological application of *B. thuringiensis* as an exoenzyme producer. This bacterium has been used only to produce bioinsecticides.
- iii) In spite of *B. thuringiensis* produces several extracellular enzymes that could have practical applications, the studies about these enzymes are very scarce. In this research several characteristics of its alkaline protease are described.

INDICE GENERAL

CONTENIDO

	Pág.
1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Los subproductos proteín-quitinosos; su abundancia y usos prácticos.....	2
1.1.2 Aprovechamiento de los desechos de camarón por vía fermentativa con <i>Serratia Marcescens WF (Sm WF)</i>	5
A). La proteasa extracelular.....	7
B). Las quitinasas y quitobiasas extracelulares de <i>Sm WF</i>	7
C). La N-acetil-D-glucosamina (NAG).....	8
D). El residuo sólido remanente al final de la fermentación.....	8
E). La biomasa bacteriana.....	9
1.1.3 Fermentación de los desechos de camarón con <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
1.2 Las proteasas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
1.3 Las quitinasas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
1.4 Justificación	21
1.5 Objetivos	22
1.5.1 Objetivo General.....	22
1.5.2 Objetivos específicos.....	23
1.5.3 Actividades realizadas y metas conseguidas.....	24

	Pág.
2. Metodología	28
2.1 Cepas bacterianas	29
2.2 Selección primaria de las cepas mediante técnicas de tinción y ensayos enzimáticos	29
2.2.1 Técnicas de tinción.....	29
2.2.1.1 Tinción de esporas por el método de Shaeffer y Fulton.....	29
2.2.1.2 Tinción para diferenciar células, esporas y cristales.....	30
2.2.2 Actividad caseinolítica en placa.....	31
2.2.3 Actividad queratinolítica.....	31
2.2.4 Actividad quitinolítica en placa.....	32
2.3 Selección secundaria mediante estudios cinéticos de secreción de enzimas	33
2.3.1 Determinación de proteasa.....	33
2.3.2 Determinación de quitinasa.....	34
2.3.2.1 Preparación de quitina coloidal.....	35
2.3.2.2 Preparación del reactivo de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS).....	35
2.4 Selección terciaria mediante bioensayos, para evaluar la toxicidad de los cristales proteicos de las cepas promisorias	35
2.4.1 Purificación de los cristales intracelulares.....	35
2.4.2 Bioensayos para evaluar la toxicidad de los cristales proteicos de la cepa Seleccionada.....	36
2.4.2.1 Bioensayo para un coleóptero.....	37
2.4.2.2 Bioensayo para un díptero.....	37

	Pág.
2.4.2.3 Bioensayo para un lepidóptero.....	38
2.4.3 Bioensayo para evaluar la producción de β -exotoxina en la cepa seleccionada.....	39
2.5 Caracterización de las cepas de interés.....	40
2.5.1 Análisis plasmídico de la cepa seleccionada.....	40
2.5.2 Perfil electroforetico de las proteínas componentes de los cristales (proteína cry).....	42
2.6 Microscopía electrónica de los cristales proteicos.....	43
2.7 Serotipificación de la cepa seleccionada.....	43
2.8 Estudios de materia prima.....	43
2.8.1 Colección, procesado y análisis de la materia prima.....	44
2.8.2 Capacidad inductora de proteasa, de los diferentes sustratos ensayados como materia prima.....	45
2.8.3 Estudios cinéticos sobre la producción de proteasa.....	45
2.8.3.1 Estudios cinéticos a nivel de matraz agitado, para evaluar el crecimiento y la producción de proteasa a 28 y 37°C.....	47
2.8.3.2 Efecto de la temperatura y la concentración de sustrato, para la producción de proteasa.....	47
2.8.3.3 Producción de cristales proteicos intracelulares en el medio de carapacho de camarón al 2 % en agua de la llave.....	48

	Pág.
2.8.3.4 Perfiles electroforéticos de las proteínas formadas durante el cultivo a 28°C en el medio a base de desechos de camarón al 2 % en agua de la llave.....	49
2.9 Estudios a nivel de fermentador.....	50
2.10 Caracterización de la actividad proteolítica extracelular de <i>B. thuringiensis</i> cepa cepa Bt-112 a nivel de extracto crudo.....	51
2.10.1 Obtención del extracto crudo.....	51
2.10.1.1 Determinación de proteína.....	52
2.10.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica.....	52
2.10.3 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima.....	53
2.10.4 Efecto del pH sobre la actividad proteolítica.....	53
2.10.5 Estabilidad de la proteasa a diferentes pH's.....	53
2.10.6 Requerimientos iónicos.....	54
2.10.7 Inactivación por agentes mercuriales.....	54
2.10.8 Inactivación por agentes desnaturizantes.....	54
3. Resultados.....	55
3.1 Selección primaria.....	57
3.1.1 Capacidad para formar cristales y esporas.....	57
3.1.2 Producción de proteasas.....	57
3.1.3 Producción de queratinasa.....	58
3.1.4 Producción de quitinasa.....	58

	Pág.
3.2 Selección secundaria	70
3.3 Selección terciaria	75
3.3.1 Actividad insecticida de los cristales proteicos de Bt-103 y Bt-112.....	75
3.4 Caracterización de las cepas Bt-103 y Bt-112	82
3.4.1 Perfil electroforético de plásmidos y proteínas cry.....	82
3.4.2 Morfología del cristal.....	85
3.4.3 Serotipificación.....	85
3.4.4 Producción de β -exotoxina.....	88
3.5 Estudio de la materia prima	91
3.6 Producción de proteasa por Bt-112 en medios con desperdicios de camarón de distintas procedencias (selección de sustrato)	93
3.7 Estudios cinéticos a nivel de matraz agitado, para evaluar el crecimiento y la producción de proteasas por Bt-112 a 28 y 37°C (para tener datos preliminares de la temperatura y tiempo óptimo)	97
3.8 Perfiles electroforéticos de las proteínas formadas durante la fermentación a 28°C de los desechos proteín-quitinosos por <i>B. thuringiensis</i> cepa Bt-112	103
3.9 Efecto de la temperatura y la concentración de sustrato, para la producción de Proteasas por <i>B. thuringiensis</i>, cepa Bt-112	107
3.10 Producción de cristales proteicos intracelulares en un medio a base de carapacho de camarón al 2 % en agua de la llave	115

	Pág.
3.11 Cinética de producción de proteasas por <i>B. thuringiensis</i> cepa Bt-112, a nivel de fermentador.....	118
3.12 Caracterización del extracto crudo.....	127
3.12.1 Estabilidad de la enzima a temperatura de congelación y refrigeración.....	127
3.12.2 Efecto de la temperatura de reacción sobre la actividad proteolítica.....	128
3.12.3 Efecto de la temperatura de preincubación, sobre la estabilidad enzimática.....	129
3.12.4 Efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	130
3.12.5 Efecto del pH sobre la estabilidad enzimática.....	131
3.12.6 Efecto de agentes quelantes sobre la proteasa.....	132
3.12.7 Estudio sobre los requerimientos catiónicos de la proteasa.....	133
3.12.8 Efecto de mercuriales y reductores sobre la actividad enzimática.....	134
3.12.9 Efecto de agentes desnaturizantes sobre la proteasa de Bt-112.....	136
3.12.10 Efecto protector del cloruro de calcio sobre la proteasa extracelular de Bt-112.....	138
4. Discusión.....	140
5. Conclusiones y perspectivas.....	155
6. Bibliografía.....	163

LISTA DE TABLAS

No.	NOMBRE	Pág.
1	Las proteasa extracelulares descritas en <i>Bacillus thuringiensis</i>	16
2	Estudios realizados en torno a las quitinasas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
3	Selección primaria de cepas promisorias, por su capacidad formadora de cristal, y altas actividades de caseinasa, queratinasa y quitinasa, a partir de una colección de 152 cepas de <i>B. thuringiensis</i>	65
4	Actividades enzimáticas de las ocho cepas cristalíferas más promisorias escogidas a partir de una selección primaria con 152 cepas de <i>B. thuringiensis</i>	69
5	Resumen de los resultados obtenidos al realizar ensayos “gruesos” sobre el efecto bioinsecticida de los cristales de Bt-112 contra tres insectos modelo.....	80
6	Parámetros estadísticos de los bioensayos realizados con los cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt-112), sobre larvas de primer instar de <i>Manduca sexta</i>	81
7	Análisis bromatológico de desperdicios molidos de camarón de diferentes procedencias, colectados y procesados por diferentes autores.....	92
8	Producción de proteasa (UP/ml) por <i>Bacillus thuringiensis</i> , cepa Bt-112 en medios conteniendo desperdicios de camarón de diferentes procedencias.....	94
9	Secreción de exoproteasa por <i>Bacillus thuringiensis</i> cepa Bt-112 en medios conteniendo desperdicios molidos de camarón al 2 % en agua de la llave, con y sin ajuste de pH inicial.....	96
10	Efecto de la temperatura y concentración de sustrato, para la producción de proteasa por <i>Bacillus thuringiensis</i> , cepa Bt-112.....	108
11	Efecto de la temperatura y concentración de sustrato para la producción de quitinasas por <i>Bacillus thuringiensis</i> , cepa Bt-112.....	113
12	Acción de iones metálicos divalentes sobre la exoproteasa de Bt-112, previamente inactivada con agentes quelantes.....	134
13	Efecto de mercuriales y reductores sobre la proteasa de Bt-112.....	135
14	Efecto de agentes desnaturalizantes sobre la proteasa de Bt-112.....	137
15	Composición de un medio de cultivo típico, y condiciones experimentales recomendadas para obtener altos rendimientos de <i>Bacillus thuringiensis</i>	150

LISTA DE FIGURAS

No.	NOMBRE	Pág.
1	Volúmen de captura de camarón de 1950 a 1997 en la República Mexicana.....	3
2	Balance de materiales de la fermentación del carapacho de camarón por <i>Serratia marcescens</i> WF.....	6
3	Mecanismo de acción de las δ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
4	Balance de materiales de la fermentación del carapacho de camarón por <i>Bacillus thuringiensis</i>	20
5	Diferentes técnicas utilizadas para estudiar las 152 cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	60
6	Arreglo fotográfico donde se muestran los diferentes tipos de cristales presentes en las 152 cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	61
7	Producción de proteasa en placas de caseína, por las 152 cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	62
8	Producción de queratinasa mediante la técnica de la lana teñida, por las 152 cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	63
9	Producción de quitinasa en placas de quitina coloidal, por las 152 cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	64
10	Cinéticas de secreción de proteasa en un medio a base de carapacho de camarón al 2 % en agua de suministro, de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> que mostraron menor actividad que la cepa de referencia.....	72
11	Cinéticas de secreción de proteasa en un medio a base de carapacho de camarón al 2 % en agua de suministro, de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> que mostraron una actividad similar a la de la cepa de referencia.....	73
12	Comparación de la actividad proteolítica secretada en un medio a base de carapacho de camarón al 2 % en agua de suministro entre las cepas seleccionadas Bt-103 y Bt-112 y las cepas HD-1 y HD-73.....	74
13	Bioensayo para un coleóptero.....	77
14	Bioensayo para un díptero.....	78

No.	NOMBRE	Pág.
15	Bioensayo para un lepidóptero.....	79
16	Purificación de los cristales proteicos intracelulares de las cepas Bt-103 y Bt-112, para luego determinar el perfil electroforético de sus proteínas cry.....	83
17	Determinación de plásmidos de las cepas Bt-103 y Bt-112.....	84
18	Fotografías al microscópio electrónico de barrido, de los cristales proteicos intracelulares de la cepa Bt-112.....	86
19	Fotografías al microscópio electrónico de barrido, de los cristales proteicos intracelulares de la cepa Bt-103.....	87
20	Bioensayo para determinar la producción de β -exotoxina por cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	89
21	Cinéticas de concentración celular y secreción de proteasa de cultivos de la cepa Bt-112, crecidos en un medio a base de desechos molidos de camarón al 2% en agua de la llave a 28°C.....	99
22	Cinéticas de concentración celular y secreción de proteasa de cultivos de la cepa Bt-112, crecidos en un medio a base de desechos molidos de camarón al 2 % en agua de la llave a 37°C.....	101
23	Comparación de las cinéticas de crecimiento y secreción de proteasa a 28 y 37°C de la cepa Bt-112, crecida en medios con desperdicios de camarón al 2 % en agua de la llave.....	102
24	Seguimiento electroforético de las proteínas solubles secretadas por la cepa Bt-112 al crecer en un medio con carapacho de camarón al 2 % en agua de la llave, a 28°C.....	106
25	Comparación de la producción de proteasa extracelular y de la concentración de la proteína extracelular mayoritaria, durante el crecimiento de Bt-112 en un medio con carapacho molido de camarón al 2 % en agua de la llave.....	106
26	Secreción de proteasa por Bt-112, en medios conteniendo concentraciones crecientes de carapacho de camarón (0.5-5 %) en agua de la llave, en condiciones de agitación (180 rpm) y a diferentes temperaturas (28-40°C).....	110

No.	NOMBRE	Pág.
27	Secreción de quitinasa por Bt-112, en medios conteniendo concentraciones crecientes de carapacho de camarón (0.5-5 %) en agua de la llave, en condiciones de agitación (180 rpm) y a diferentes temperaturas (28-40°C).....	114
28	Microfotografías del crecimiento y producción de cristales proteicos por Bt-112, en un medio a base de carapacho de molido de camarón al 2 % en agua de la llave a diferentes tiempos de incubación.....	117
29	Producción de proteasa por Bt-112 a nivel de fermentador, bajo las condiciones óptimas encontradas en cultivos por lote en matraz (31°C, concentración de sustrato al 2 %, vol. de operación de 4 l y 370 rpm).....	121
30	Correlación entre el crecimiento y la producción de proteasas en cultivos de Bt-112, en medios a base de carapacho de camarón al 2 % en agua de la llave a nivel de fermentador de 4 l.....	122
31	Demanda de oxígeno durante la fermentación de los desechos de camarón al 2 % en agua de la llave, por Bt-112 a nivel de fermentadorde 4 l	124
32	Estabilidad de la proteasa de Bt-112 a temperatura de congelación (-15°C) y refrigeración (5°C).....	127
33	Efecto de la temperatura de reacción, sobre la actividad proteolítica extracelular de Bt-112 a nivel de extracto crudo.....	129
34	Estabilidad a la temperatura de la exoproteasa de Bt-112 a nivel de extracto crudo.....	130
35	Efecto del pH de reacción sobre la actividad proteolítica extracelular de Bt-112, a nivel de extracto crudo.....	131
36	Efecto del pH sobre la estabilidad de la proteasa extracelular de Bt-112 a nivel de extracto crudo.....	132
37	Efecto del EDTA sobre la actividad proteolítica de Bt-112 a nivel de extracto crudo.....	133
38	Estabilización-activación de la proteasa extracelular de Bt-112, por cloruro de calcio a diferentes concentraciones.....	139

1. INTRODUCCION

1.1. Antecedentes

1.1.1. Los subproductos proteín-quitinosos; su abundancia y usos prácticos.

La captura e industrialización del camarón, genera importantes volúmenes de desechos proteín-quitinosos, particularmente en países como la India, Estados Unidos, Tailandia, Malasia, Filipinas, el Sur de Africa y México. Así por ejemplo, desde 1976 se reporta en Tailandia una producción anual de desechos de camarón de alrededor de 110,000 ton, y para la India de alrededor de 60,000 ton (54).

En nuestro país, según reportes de la Secretaría de Pesca (2), los volúmenes de captura de camarón desde 1950 a 1997 han oscilado entre 40,000 a 80,000 ton al año, calculándose que de un 30-40% de este volumen lo representan desechos como carapachos, patas y cabezas del crustáceo, los cuales se desechan originando problemas de contaminación.

En la Figura 1, se observan los volúmenes de captura de camarón en peso vivo y en peso desembarcado, puesto que la mayoría de las veces en el mismo barco en que se capturan, estos crustáceos son desprovistos de su carapacho y cabeza, los cuales regularmente son devueltos al mar.

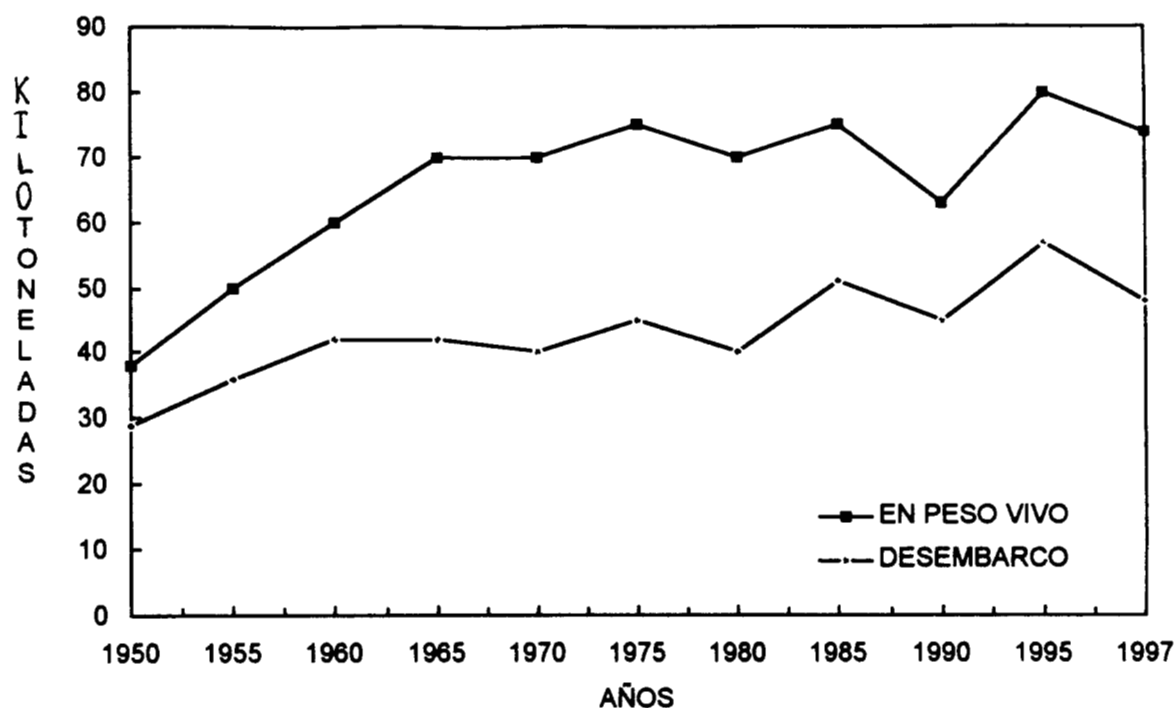


Fig. 1 Volumen de captura de camarón de 1950 a 1997 en la República Mexicana.

Fuente: SEMARNAP. Anuario Estadístico de Pesca, (varios años).

Cabe destacar que existe también una estimación de la captura sin registro oficial, que en base a una investigación de campo realizada por la Secretaría de Pesca de 1990 a 1994, significa alrededor de un 18 % más.

Debido a estos grandes volúmenes de generación, así como a su composición química promedio (quitina 27%, proteína 40% y minerales 33%), en algunos países como la India y Japón, estos desechos son utilizados principalmente, para la producción de quitina y quitosana. Estos polisacáridos tienen múltiples aplicaciones en industrias como la farmacéutica donde se usan como excipiente, cicatrizante, adyuvante y coagulante; en la industria alimentaria donde se recomiendan como hipocolesterolémico,

espesante, estabilizante, acarreador de sabores y nutrientes y protector de frutas; en el tratamiento de efluentes donde son útiles como adsorbentes de metales pesados y como agentes precipitantes, así como en la elaboración de cosméticos, shampoos, pinturas, membranas, películas, telas, etc (1, 7, 34, 53, 54, 73, 78). Para la obtención de quitina y quitosana se emplean tradicionalmente tratamientos químicos; de modo que los desechos de camarón, de langosta o de otros crustáceos, se someten por un lado a una descalcificación con ácido clorhídrico, y por otro a una desproteínización con hidróxido de sodio. Dado lo contaminante de ambos procesos, se han propuesto tratamientos mixtos donde la desproteínización se hace por vía enzimática usando proteasas como tripsina o papaína, o por preparaciones proteolíticas bacterianas (29), en tanto que la descalcificación se realiza por acción del ácido clorhídrico. Más recientemente se ha propuesto el ensilaje de los desechos quitino-proteicos con cultivos lácticos, de modo que la descalcificación ocurre en parte por la acumulación de ácido láctico (68).

Es importante recalcar que para los desechos de camarón se han propuesto otros usos muy variados, por ejemplo para la elaboración de medios de cultivo (36, 74); como materia prima para la extracción de pigmentos y proteínas, que puedan emplearse después en la formulación de alimentos en acuicultura y alimentación animal en general (57); para el acondicionamiento de suelos y combate de nemátodos parásitos presentes en los mismos (8); para la inmovilización de enzimas (17) y para la producción de alimentos y/o quitina – quitosana, mediante ensilaje y una fermentación láctica (68).

En nuestro país, los desechos de camarón únicamente tienen aplicación en industrias caseras para la elaboración de alimentos para animales y saborizantes, pero a muy baja escala; sin embargo su aprovechamiento como sustrato de fermentación puede ofrecer amplias

posibilidades. A este respecto, en el Laboratorio de Enzimas Microbianas (LEM) de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, se han hecho investigaciones sobre el aprovechamiento integral de subproductos proteín-quitinosos (desechos de camarón), utilizando como microorganismos biodegradantes a *Serratia marcescens WF* y a *Bacillus thuringiensis*. A continuación se hará una breve descripción de los avances más relevantes conseguidos.

1.1.2. Aprovechamiento de los desechos de camarón por vía fermentativa con

Serratia marcescens WF (Sm WF).

No es ocioso volver a recalcar que hasta la fecha los desechos de camarón se han utilizado principalmente mediante tratamientos químicos para obtener quitina-quitosana, y que su aprovechamiento por vía fermentativa ha merecido menos atención. En este contexto, desde 1975 se llevan a cabo en el LEM, estudios relacionados con la degradación microbiológica de los desechos quitino-proteicos. De esta forma, cuando el carapacho de camarón seco y molido es suspendido en un medio sintético, o solamente en agua de suministro, y se inocula la bacteria proteo-quitinolítica *Sm WF*, ocurre una fermentación que da como productos enzimas como quitinasas, quitobiasas y proteasas. También se acumula en el caldo el aminoazúcar N-acetil-D-glucosamina (NAG), quedando además un sólido residual y produciéndose una biomasa bacteriana. En la Figura 2 se muestra el balance de materiales de la fermentación.

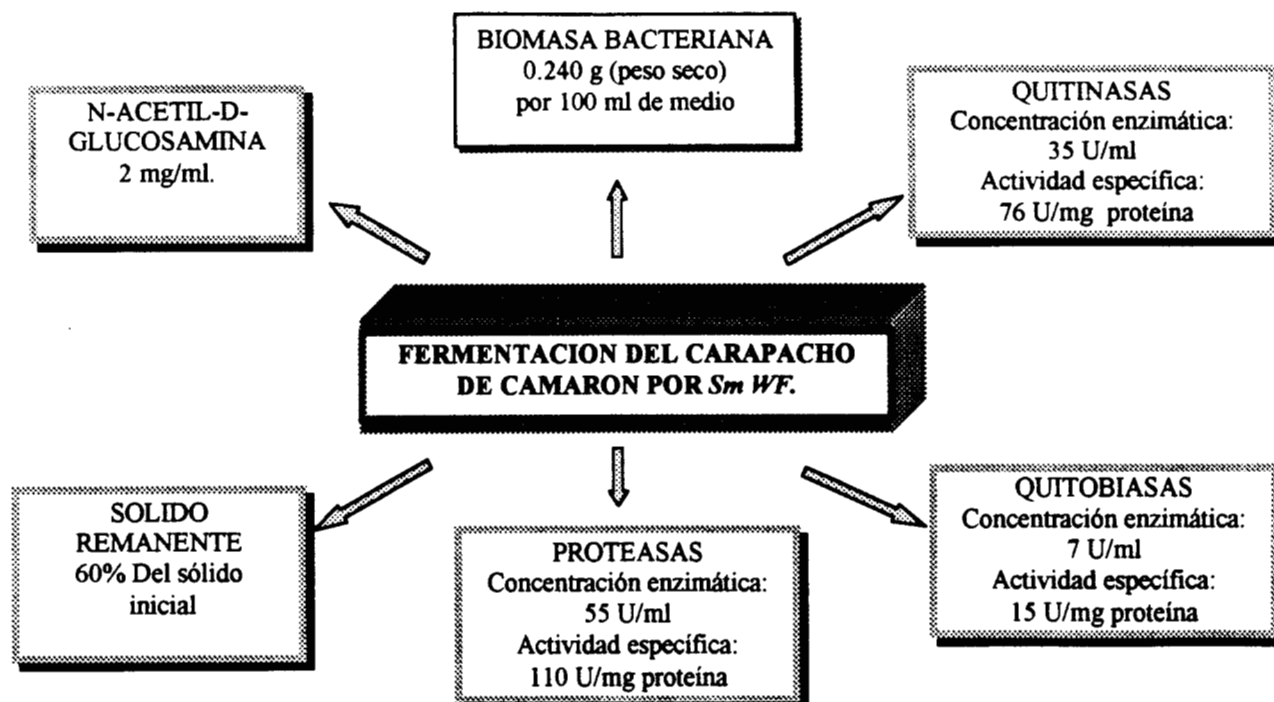


Fig. 2 Balance de materiales de la fermentación del carapacho de camarón por *Serratia marcescens WF*. Condiciones: sustrato al 6%, 48 h de incubación a 28°C en cultivo agitado por lote (50).

Aún cuando los estudios mencionados han comprendido diversos aspectos sobre la producción, regulación de la síntesis, purificación y caracterización de las enzimas secretadas al medio durante la fermentación de los desechos de camarón por *S. marcescens*, en esta ocasión sólo se abordarán brevemente algunos estudios realizados para explorar posibles usos prácticos para los productos indicados en la Figura 2.

A).- **La proteasa extracelular.** *Sm WF* se cultiva fácilmente en cualquier tipo de medio adicionado de sustratos proteicos, por ejemplo las harinas de soya ó de plumas. En estas condiciones secreta una proteasa que por su pH óptimo de 9 podría emplearse en la formulación de detergentes biológicos (15, 79). También se han hecho estudios sobre esta enzima, pero producida en medios conteniendo desperdicios de camarón, encontrándose que podría utilizarse para producir hidrolizados de carne de pescado de especies grasosas (60) y no grasosas (32). La solubilización de dichos sustratos alcanzó valores cercanos al 90%, semejante a los mejores reportados por otros autores al utilizar enzimas de origen animal, vegetal o microbiano.

B).- **Las quitinasas y quitobiasas extracelulares de *Sm WF*.** A diferencia de las proteasas, estas enzimas han resultado muy inestables y difíciles de purificar (3, 65). Su inestabilidad puede deberse en parte a que ambas enzimas son tiol-dependientes (16); además, al parecer poseen estructura cuaternaria y se encuentran en diferentes formas isoenzimáticas y funcionan más como sistemas que como enzimas individuales (16). En cuanto a sus usos prácticos a nivel de extracto crudo, se ha demostrado que las quitinasas y quitobiasas se pueden utilizar para sacarificar quitina coloidal y producir altas concentraciones de NAG (10, 33). Los usos que puede tener este aminoazúcar se abordarán más adelante. También se ha comprobado que las quitinasas y quitobiasas presentan un efecto lítico muy marcado sobre la pared celular de hongos del género *Aspergillus*, lo cual se ha aprovechado en la producción de protoplastos y para la liberación de enzimas intracelulares de interés biotecnológico, como la invertasa y la glucosa oxidasa (4, 51).

Las quitinasas en lo general, por otra parte, se han propuesto como enzimas importantes para el control biológico, por ejemplo como aditivo de bioinsecticidas o para la formulación de fúngicidas.

C).- **La N-acetil-D-glucosamina (NAG)**. Este aminoazúcar puede provenir tanto de su acumulación en el medio de fermentación de los desechos de camarón por *Sm WF*, como de la sacarificación *in vitro* de materiales quitinosos coloidizados, por acción de las quitinasas y quitobiasas. Entre los usos que se han propuesto para este aminoazúcar, puede ser su utilización para producir biomasa-levadura (*Candida ingens*), que podría ser empleada en acuicultura (58). Más recientemente se ha propuesto el uso de la NAG como edulcorante y para combatir problemas de artritis, úlceras pépticas, enteritis y colitis (5, 81). La NAG puede por otra parte, ser un sustrato de fermentación novedoso para producir compuestos de alto valor agregado.

D).- **El residuo sólido, remanente al final de la fermentación**. Se demostró también que durante la fermentación del carapacho de camarón, el 40% del material sólido original es solubilizado por la acción microbiana, valiéndose en gran medida de la acción de sus proteasas, quitinasas y quitobiasas. El remanente posee proteínas, sales y quitina, por lo que se le aplicaron procedimientos químicos suaves y fue posible obtener quitina pura. Esto permite proponer un proceso mixto para la obtención de este polisacárido, primero fermentativo –donde podrían generarse compuestos con utilidad práctica como proteasas, quitinasas, quitobiasas y NAG-, y después químico, para obtener quitina a partir del remanente sólido (50).

E).- **La biomasa bacteriana.** Durante la fermentación se produce también una rápida proliferación del microorganismo, sin embargo, como *S. marcescens* es considerado un microorganismo patógeno oportunista (83), no se han considerado usos prácticos para esta biomasa, antes bien resulta importante sustituirlo por otro microorganismo aceptable desde el punto de vista sanitario, de manera que dicha biomasa también pueda utilizarse.

Por lo anterior, en los últimos años se han venido realizando en el LEM, estudios para encontrar un microorganismo alternativo que degrade los desechos proteín-quitinosos tan eficientemente como *Sm WF*, pero que no presente riesgos en su manejo. Las investigaciones se han llevado a cabo con *Bacillus thuringiensis*, encontrándose que esta bacteria, además de tener un perfil de enzimas extracelulares tan variado como *S. marcescens* (26), fermenta con igual eficiencia los desechos de camarón (67), pero en este caso se tiene la ventaja de que el microorganismo es biotecnológicamente aceptado, pues ya se emplea en la producción de bioinsecticidas. A continuación se dan más detalles sobre este bioproceso.

1.1.3. Fermentación de los desechos de camarón con *Bacillus thuringiensis*.

A pesar de que esta bacteria se emplea intensivamente en la producción de bioinsecticidas, sorprende que los estudios referentes a su perfil exoenzimático sean muy escasos; los existentes hacen mención a que algunas cepas son capaces de producir quitinasas (13, 21, 70, 71, 72), nucleasas (22), proteasas (25, 43, 77) y amilasas (76).

En base a estos antecedentes, los estudios realizados en el LEM se iniciaron desde aspectos tan preliminares, como investigar en 150 cepas la producción de seis enzimas extracelulares empleando diferentes medios y mediante ensayos en placas. Estas enzimas

fueron: amilasas, nucleasas, esterases, pectinasas, quitinasas y proteasas. Los resultados mostraron que tales cepas producían proteasas y amilasas con una alta frecuencia y a niveles elevados; mientras que para quitinasas, esterases y nucleasas, tanto la frecuencia como los niveles de actividad fueron bajos. Además, ninguna de las cepas estudiadas produjo pectinasas. Paralelamente se pudo demostrar que era posible obtener cepas mejoradas en la producción de quitinasas, sometiendo a procesos de doble mutación con luz UV y nitrosoguanidina a la cepa nativa denominada Bt-47. No obstante, las mutantes obtenidas mostraron una alta frecuencia de reversión (26, 66).

Paralelamente se llevaron a cabo también, estudios sobre la producción de la proteasa extracelular de *B. thuringiensis* y su caracterización a nivel de extracto crudo. Para ello se seleccionó a la cepa más proteolítica de la colección, realizando primero ensayos en placa y después estudios cinéticos cuantitativos sobre la producción de enzima en un medio conteniendo carapacho de camarón molido, y suspendido al 6% en agua de la llave. Se encontró que la proteasa de la cepa seleccionada (Bt-149) es de carácter inducible, está asociada al crecimiento, tiene un pH óptimo de 9.0, una temperatura óptima de 37°C, presenta requerimientos iónicos y se manifiesta como tiol-enzima (67).

Posteriormente se comprobó que como extracto crudo estéril, esta proteasa es capaz de hidrolizar sustratos de pescados modelo, tanto grasos como magros, así como harinas de tipo proteico de diferente origen, tales como las de fauna de acompañamiento, anchoveta, atún fileteado, desperdicios de carnicerías, de tenerías, de plumas y de sangre. El efecto hidrolítico se evaluó por un método gravimétrico, y mediante cromatografía de exclusión molecular se analizaron los productos formados durante la hidrólisis. Los resultados mostraron una solubilización de 85% para los pescados modelo, y solubilizaciones de 60 a 70% para las

otras harinas. Cabe mencionar que los porcentajes de solubilización obtenidos con la proteasa de Bt-149, fueron más altos que los obtenidos con preparados proteolíticos crudos de origen comercial (Sigma), provenientes de *Bacillus subtilis*, microorganismo ampliamente utilizado para la obtención de hidrolizados proteicos. Como conclusión se propuso estudiar a Bt-149 en un bioproceso en el que además de la proteasa, se pudieran obtener una biomasa utilizable y un residuo remanente, utilizables en la formulación de bioinsecticidas y de quitina, respectivamente (62).

Sin embargo, investigaciones posteriores demostraron que Bt-149 era una cepa acristalífera, aún cuando se le sembrara en medios propicios para la formación del cristal. Por ello se consideró conveniente hacer de nuevo la selección de una cepa de *B. thuringiensis*, que además de producir altos niveles de proteasa, fuera cristalífera con acción bioinsecticida. Este aspecto constituye la parte inicial de la presente tesis, cuyos resultados ya han sido aceptados para publicación (63).

Ahora bién, con objeto de tener un panorama más amplio sobre el estado del arte en el campo de las proteasas de *B. thuringiensis*, se abordan a continuación los siguientes aspectos:

1.2. Las proteasas de *Bacillus thuringiensis*

Dado que esta especie pertenece al género *Bacillus*, es menester mencionar que dicho género se caracteriza particularmente, por su gran capacidad para secretar una gran variedad de enzimas, particularmente de tipo hidrolítico como: alfa y beta amilasas, celulasas, arabinasas, quitinasas, quitosanasas, dextranasas, pectinasas, glucanasas de diversos tipos, maltasas, mananasas, nucleasas, sacarosas, lipasas, fosfolipasas, etc. (59). También produce proteasas de diversos tipos como metalo-proteasas, proteasas serínicas y metalo-serínicas. Sin embargo los estudios se han restringido a sólo unas pocas especies de este género, particularmente *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. thermoproteolyticus*, *B. polymyxa* y *B. cereus*. (59, 77).

En este contexto conviene destacar que *B. thuringiensis* es un microorganismo ampliamente estudiado en cuanto a su capacidad de producir cristales proteicos bioinsecticidas, así como la genética y composición química de los mismos, en tanto que los reportes relativos a su perfil de enzimas extracelulares en general son muy escasos. Los estudios acerca de sus proteasas intracelulares se enfocan frecuentemente hacia su posible participación en la formación de la spora y al efecto coadyuvante que pueden tener en la actividad tóxica de sus cristales bioinsecticidas (20). En cuanto a sus proteasas extracelulares, las investigaciones han llegado hasta su caracterización parcial, pero no se han purificado, ni se han descrito sus posibles usos biotecnológicos (77).

Los antecedentes descritos permiten concluir que *B. thuringiensis* es un microorganismo hasta cierto punto inédito en cuanto a su potencialidad para producir enzimas de interés biotecnológico, no obstante ser el microorganismo más utilizado mundialmente para la producción de bioinsecticidas.

Conviene por tanto recordar que *B. thuringiensis* es una bacteria esporogénica, Gram-positiva, cuyas células vegetativas son bacilos de 2 a 5 micras de longitud por una de ancho, presentan flagelos peritricos y se reproducen por fisión binaria. Su característica morfológica principal es la presencia de un cuerpo proteico parasporal comúnmente llamado cristal, que se forma paralelamente a la espora, el cual algunas veces presenta toxicidad hacia una gran diversidad de larvas de insectos.

El cristal requiere ser ingerido para llevar a cabo su efecto patotóxico, y al ocurrir esto se disuelve en el mesenterón del insecto debido a su contenido altamente alcalino, y las proteínas del cristal sufren una proteólisis por las enzimas digestivas; sin embargo su degradación no es completa, quedando intacta una proteína de aproximadamente 65 kDa, llamada delta-endotoxina, la cual adquiere una conformación tridimensional que le confiere gran especificidad para acoplarse a un receptor de la membrana de las células epiteliales del insecto susceptible. Esta unión desequilibra la estructura de la membrana y “abre” un poro por el cual penetran iones, seguidos de agua.

Por acción de la delta endotoxina se destruyen amplias áreas del epitelio, las cuales se manifiestan como huecos por donde pasa el contenido altamente alcalino del mesenterón, hacia la hemolinfa que presenta un pH casi neutro, y de la hemolinfa hacia el lumen del mesenterón. Estos dos fenómenos traen consecuencias dañinas para el insecto, pues por un lado al aumentar el pH de la hemolinfa, la conducción nerviosa cesa y la larva se paraliza y deja de comer. Por otro, al disminuir el pH del contenido estomacal se crea un ambiente favorable para la germinación de las esporas pudiendo sobrevenir la muerte por septicemia o por toxemia (6). En la Figura 3 se muestran los fenómenos descritos de manera esquemática.

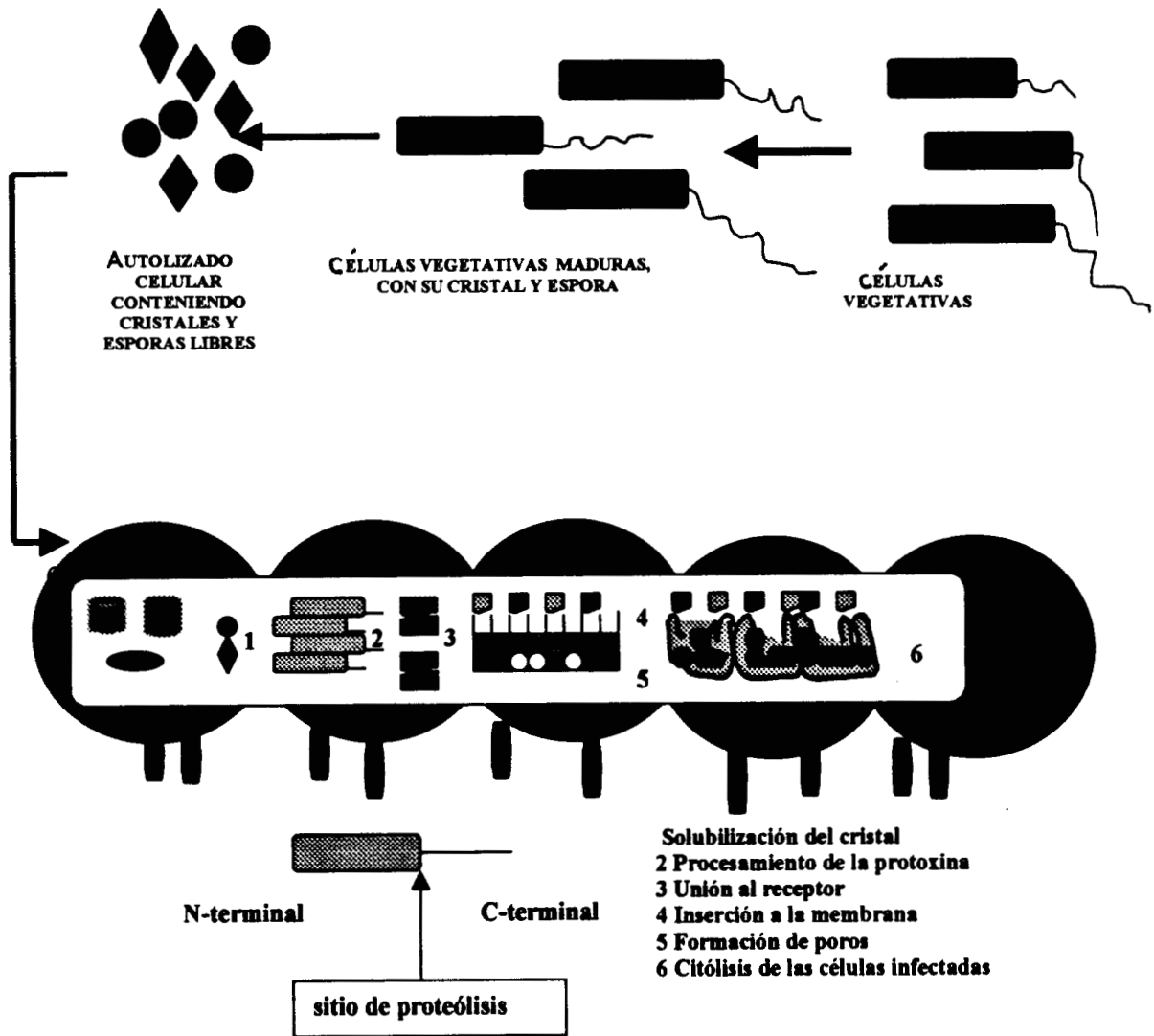


Fig. 3 Mecanismo de acción de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (44).

Respecto a la posible participación de las proteasas intracelulares como factores coadyuvantes en la toxicidad de los cristales y la formación de la espora, Bulla y col. (12) sugirieron que a pH alcalino, el cristal es solubilizado y activado por un mecanismo autolítico que involucra una proteasa que se encuentra presente en la superficie del cristal. Evidencia adicional fue obtenida por Chilcott y col. (20), quienes obtuvieron constancia experimental de que los cristales de *B. thuringiensis var. israelensis*, llevan consigo una proteasa alcalina, de modo que si los cristales purificados se incuban a pH 9.5 y 37°C y luego se hacen separaciones electroforéticas en gel, aparecen 5 bandas cuyos pesos moleculares son: 70, 40, 37, 25 y 20 kDa. Si se incuban al mismo pH pero a 80°C, sólo aparece una banda con un peso molecular algo superior a los 70 kDa y otra cercana a los 37 kDa. También se observó que cuando los cristales se incuban a temperaturas entre 40-80°C, su toxicidad va disminuyendo gradualmente. Estos resultados enfatizan la importancia de proteger las proteasas presentes en los cristales, durante su producción y recuperación industrial, así como durante su aplicación en el campo.

Por otro lado, Chestukhina y col. (18), en un estudio con 3 cepas formadoras de cristales y esporas y 2 acristalíferas esporuladas de *B. thuringiensis*, demostraron la presencia de varias serín-proteasas extra e intracelulares. No encontraron ninguna relación entre la formación de la espora y las proteasas intra o extracelulares, sin embargo sí observaron que durante la biosíntesis del cristal, los niveles de proteínas cry presentes en los cristales bioinsecticidas correlacionaban directamente con el nivel de proteasas intracelulares presentes.

En otro orden de ideas y como ya fue apuntado, existen algunos estudios referentes a las exoproteasas de *B. thuringiensis*. En la Tabla 1 puede observarse que al menos son cinco de acuerdo a su pH óptimo de actividad.

Tabla 1. Las proteasas extracelulares descritas en *B. thuringiensis**

Tipo	pH óptimo	Inhibidor	Características	Referencia
Proteasa A (metaloenzima)	6	EDTA ^a	Se activa con Ca ⁺⁺ y Mg ⁺⁺	Kucera y col, 1979 (39)
Proteasa neutra (metaloenzima)	6.5-7.5	agentes quelantes	Zn-Proteasa	Li & Yousten, 1975 (43)
Tiol-proteasa	7.4-10	Cu ⁺⁺	Se activa con H ⁺ , Mg ⁺⁺ , Ca ⁺⁺	Egorov y col, 1978 (24)
Proteasa B (metaloenzima)	7.5	EDTA	Se activa con Ca ⁺⁺ y Mg ⁺⁺	Kucera y col, 1979 (39)
Proteasa Semicalina (serínica)	8.5	PMSF ^b		Epremyan y col, 1981 (25)

^a Acido etilendiaminotetracético

^b Fluoruro de fenil metil sulfonilo

*Tomado de la referencia (77).

Como datos complementarios a la Tabla 1, puede agregarse que Li y Yousten (43), demostraron que una cepa de *B. thuringiensis var. kurstaki* producía una metaloproteasa extracelular durante etapas tempranas de la esporulación. La producción de la enzima ocurría en caldo nutritivo adicionado de Mn²⁺ o Ca²⁺. La adición de calcio era requerida para la estabilización de la enzima, la cual mostraba su actividad óptima en un intervalo de pH de 6.5 a 7.5, era inhibida por agentes quelantes, y tenía un peso molecular determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida de 37.5 kDa. En presencia de Ca²⁺, la enzima

parcialmente purificada retuvo el 78% de su actividad, después de calentar a 70°C durante 10 min, y sólo el 8% si se calentaba a 80°C durante 10 min.

Por su lado Epremyan y col. (25), llevaron a cabo el aislamiento y caracterización de una proteasa de *B. thuringiensis* cepa 69-6R, por fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía de afinidad. La enzima era inactivada totalmente por inhibidores de serín-proteasas; presentaba un PM de 29 kDa, mostraba su máxima actividad y estabilidad a pH 8.5, y era rápidamente inactivada abajo de pH 4 y arriba de pH 10 a temperaturas cercanas a 60°C.

1.3 Las quitinasas de *Bacillus thuringiensis*

En cuanto a las quitinasas se tiene muy poca información, los estudios son muchas veces cualitativos y no indican casi nada sobre su modo de acción y sus características moleculares y cinéticas. Es importante destacar que casi todos abordan aspectos sobre control biológico.

En la Tabla 2, se resume la información más relevante concerniente a las quitinasas de esta bacteria.

Tabla 2. Estudios realizados en torno a las quitinasas de *Bacillus thuringiensis*.

REFERENCIA	PRINCIPALES HALLAZGOS
Smirnof, 1971 y 1977 (70, 72)	Sugirió la adición de quitinasas comerciales a preparaciones espora-cristal de <i>B. thuringiensis</i> para potenciar su acción bioinsecticida, basándose en bioensayos con larvas de <i>C. fumiferana</i> , <i>Heliothis spp.</i> , <i>Ephithyas postuitana</i> y <i>Pteris brassicae</i> .
Chigaleichik, 1976 (19)	Demostó que varias cepas de <i>B. thuringiensis</i> eran capaces de hidrolizar quitina coloidal (proveniente de cabeza de cangrejo), en un tiempo de 3 a 5 días. Este es el único estudio donde se ha realizado una caracterización parcial de la quitinasa de <i>B. thuringiensis</i> , particularmente de la var. <i>caucasicus</i> INMI Arm. 837, encontrando que la actividad quitinolítica se manifiesta al comienzo de la fase estacionaria del crecimiento, su pH óptimo es de 8.0 a una temperatura de 60 °C a las 48 h de incubación.
Smirnof, W, & Valero, J. 1977 (71)	Encontró actividad de quitinasa mediante ensayos en placa en las siguientes subespecies de <i>B. thuringiensis</i> : <i>alesti</i> , <i>kurstaki</i> , <i>sotto</i> , <i>dendrolimus</i> , <i>galleriae</i> , <i>entomocidus</i> , <i>aizawai</i> , <i>finitimus</i> y <i>thuringiensis</i> .
Cody, 1989 (13)	Demostó la presencia de quitinasas/quitobiasas en una cepa de <i>B. thuringiensis</i> subespecie <i>entomocidus</i> y bacterias quitinolíticas, resultando un sinergismo insecticida contra <i>Spodoptera littoralis</i> .
Sneh, et al, 1983 (69)	Aplicaron una baja concentración de una mezcla de espora cristal de la δ -endotoxina de <i>B. thuringiensis</i> y una endoquitinasa bacteriana contra <i>Spodoptera littoralis</i> .
Regev, et al, 1996 (61)	Observaron la actividad sinérgica de la δ -endotoxina <i>B. thuringiensis</i> y una endoquitinasa bacteriana contra <i>Spodoptera littoralis</i> .
Wiwat, et al, 1996 (80)	Realizaron la expresión de quitinasas codificadas por genes de <i>Aeromonas hydrofila</i> y <i>Pseudomonas maltofila</i> en <i>Bacillus thuringiensis</i> .

Puede agregarse finalmente, que falta mucha información sobre la producción de estas enzimas en diferentes medios de cultivo y condiciones ambientales, sobre la regulación de su síntesis, su purificación y caracterización, y sobre todo sobre los usos prácticos que pudiera dárseles.

A este respecto, en la presente investigación se propone el empleo de los desechos de camarón como substrato en un proceso fermentativo, usando a *B. thuringiensis* como microorganismo biodegradante para la producción de proteasas extracelulares y cristales bioinsecticidas. Sin embargo, sería importante aclarar que se decidió considerar a la quitinasa como un criterio importante para la selección de la cepa de trabajo, considerando que se empiezan a poner las bases de un bioproceso para el aprovechamiento de los desechos de camarón, del cual podrían obtenerse además de proteasa y cristales, otros productos como quitinasas, quitobiasas y N-acetil-D-glucosamina; además de quitina a partir del remanente sólido que queda al final de la fermentación. Es obvio que el estudio de un bioproceso tan complejo, requerirá de múltiples investigaciones, una de las cuales es la presente, avocada fundamentalmente al estudio de la proteasa y los cristales, de manera poco profunda ^u al caso de la quitinasa, ya ^{para el} que otras personas están realizando estudios más amplios en torno a la misma.

De este modo se pretende dar un nuevo uso biotecnológico a *B. thuringiensis* como productor de enzimas extracelulares, pues los estudios llevados a cabo en el LEM-ENCB-IPN, muestran que durante la fermentación del carapacho de camarón por Bt-149 (una cepa acristalifera), se obtiene una degradación del 40% del sustrato sólido inicial.

Es importante mencionar que Bt-149, a diferencia de *Sm* WF, no produce en forma significativa quitinasas y quitobiasas, y por lo tanto casi no se acumula N-acetil-D-glucosamina en el caldo. Sin embargo, la actividad proteolítica es más alta (216 UP/ml) que con *Sm* WF. Por tanto, en ambos casos se obtiene al final de la fermentación un 60% de sustrato remanente y un 3 a 4% de biomasa, que para el caso de una cepa apropiada de *B. thuringiensis* podría utilizarse en la elaboración de bioinsecticidas; en tanto que con *S. marcescens* se tiene inconveniente de que es un patógeno oportunista.

En las figuras 2 y 4, se resumen los balances de materiales de la fermentación de desechos de camarón, por las dos bacterias mencionadas.

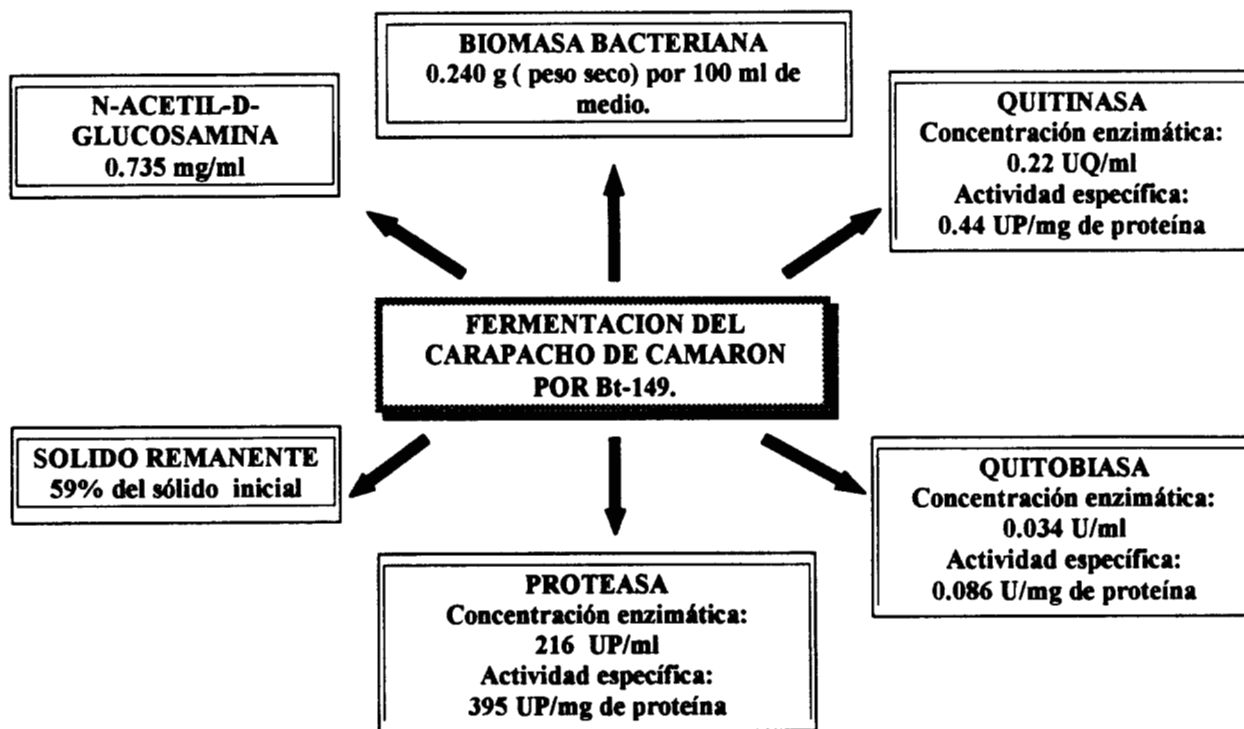


Fig. 4. Balance de materiales de la fermentación del carapacho de camarón por *Bacillus thuringiensis*, cepa 149. Condiciones: sustrato al 2%, 30 h de incubación a 28°C en cultivo agitado por lote (67).

1.4. JUSTIFICACIÓN

- La disponibilidad de los desperdicios de camarón en nuestro país es alta, puesto que la captura del crustáceo alcanza cifras de 60,000 a 80,000 toneladas al año en peso vivo, calculándose que de un 30 a un 40% son carapachos, patas, colas y cabezas que se desechan originando problemas de contaminación.
- Los estudios llevados a cabo a nivel internacional sobre el aprovechamiento de estos subproductos involucran casi siempre tratamientos químicos, específicamente para la obtención de quitina/quitosana. En cambio casi no existen estudios que propongan la fermentación microbiana de estos residuos, para obtener enzimas de gran uso comercial como es el caso de las proteasas, y de otras enzimas con empleos inéditos como las quitinasas y quitobiasas. Simultáneamente podrían obtenerse aminoazúcares; un remanente del cual separar la quitina y una biomasa bioinsecticida, si en el proceso se involucra a una cepa apropiada de *B. thuringiensis*.
- En la presente investigación se pretende dar un nuevo uso biotecnológico a *B. thuringiensis* como productor de enzimas extracelulares, pues los estudios llevados a cabo hasta la fecha sólo se han enfocado a su genética, composición química y la capacidad bioinsecticida de sus cristales proteicos intracelulares.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general:

Estudiar el aprovechamiento de los desechos de camarón por una fermentación con *B. thuringiensis*, para la producción de proteasa extracelular y cristales bioinsecticidas.

1.5.2 Objetivos específicos:

- 1.5.2.1 Seleccionar una cepa de *B. thuringiensis* capaz de crecer en medios a base de desechos de camarón, en los cuales produzca altos niveles de proteasas, quitinasas y cristales intracelulares, los cuales deben tener acción bioinsecticida. Además, la cepa debe ser beta-exotoxina negativa.
- 1.5.2.2 Llevar a cabo la caracterización de la cepa seleccionada, en lo concerniente a sus plásmidos, perfil de proteínas cry y microscopía ultramicroscópica.
- 1.5.2.3 Hacer estudios a nivel de matraz para seleccionar la materia prima, el medio basal, el pH del medio, la temperatura y la concentración del sustrato adecuados, para la máxima producción de proteasa.
- 1.5.2.4 Hacer estudios cinéticos a escala de fermentador, reuniendo las condiciones más propicias encontradas anteriormente para la máxima producción de proteasa.
- 1.5.2.5 Caracterizar parcialmente la proteasa a nivel de extracto crudo, determinando pH óptimo, temperatura óptima, estabilidad al pH y a la temperatura y el efecto de agentes quelantes, mercuriales, detergentes y iones metálicos, así como su estabilización por iones calcio.

1.5.3 Actividades realizadas y metas conseguidas:

- 1.5.3.1 Se realizó una selección primaria con 150 cepas de *B. thuringiensis*, evaluando mediante tinciones adecuadas la presencia de esporas y cristales; y por ensayos enzimáticos en placa y con sustratos teñidos, la producción de proteasas y quitinasas extracelulares; todo ello para escoger un grupo reducido de cepas cristalíferas y proteolíticas promisorias.
- 1.5.3.2 Se llevó a cabo una selección secundaria con las cepas escogidas anteriormente, mediante estudios cinéticos en matraz, determinando la producción de proteasas en un medio con carapacho molido de camarón, suspendido en agua de suministro. Esto para escoger las dos o tres cepas cristalíferas fermentadoras de carapacho de camarón, más proteolíticas.
- 1.5.3.3 Se efectuó una selección terciaria, para escoger sólo una cepa productora de cristales bioinsecticidas, mediante el cultivo de las cepas altamente proteolíticas, en medios apropiados para la producción de cristales intracelulares, los cuales se purificaron para realizar bioensayos con insectos plaga-modelos, abarcando un díptero, un lepidóptero y un coleóptero.

Esta etapa fue crítica, ya que sólo el 1% de las cepas de *B. thuringiensis* produce cristales entomotóxicos. De no haber tenido éxito en el primer intento, hubiera habido necesidad de probar otras cepas, hasta encontrar una insecticida.

- 1.5.3.4 Se realizaron bioensayos con *Musca domestica* para determinar si la cepa producía beta-exotoxina, la cual puede representar un riesgo potencial a mamíferos.
- 1.5.3.5 Contando ya con la cepa idónea, se procedió a su caracterización realizando: Su tipificación serológica, su perfil plasmídico mediante electroforesis en geles de agarosa, la purificación de sus cristales por ultracentrifugación en gradientes, para luego investigar su perfil de proteínas cry por electroforesis en gel de poliacrilamida y además la observación de sus cristales purificados en el microscopio electrónico de barrido, para determinar tamaño, forma y presencia de inclusiones.
- 1.5.3.6 La siguiente etapa fue la selección del sustrato, realizando análisis bromatológicos de muestras de desechos de camarón de diferentes tipos y procedencias, así como una harina de camarón comercial. Luego se ensayó la capacidad inductora de proteasa de dichos sustratos, en diferentes medios. De este modo pudo relacionarse la composición química de los sustratos, con su capacidad para propiciar la síntesis de la enzima.
- 1.5.3.7 Se realizaron estudios en matraz para ver la ventaja de suspender el sustrato en agua de la llave, o en un medio sintético basal, para producir mayores niveles de proteasa.

- 1.5.3.8 Conociendo la composición del medio, se exploró la conveniencia de ajustar el pH inicial, para obtener mayor cantidad de enzima.
- 1.5.3.9 A través de estudios cinéticos en matraz se exploró luego la influencia de la temperatura (28, 31, 34, 37 y 40°C), y de la concentración de sustrato (0.5, 1, 2, 3, 4 y 5%), para la producción de proteasa.
- 1.5.3.10 Se realizó así mismo un estudio de seguimiento electroforético de las proteínas formadas durante la fermentación, para correlacionar la secreción de proteínas con las cinéticas de actividad proteolítica.
- 1.5.3.11 Después se realizó un estudio de seguimiento microfotográfico de la producción de cristales, sembrando al microorganismo en las condiciones propicias para la síntesis de proteasa, para constatar que durante la fermentación de los desechos de camarón, se producen tanto la enzima como las estructuras proteicas mencionadas.
- 1.5.3.12 La siguiente etapa fue realizar experimentos a escala de fermentador de mesa, reuniendo en principio las condiciones más propicias a nivel de matraz, (T°C , (S), rpm, pH, etc.) para la producción de proteasa. Después se hicieron algunos experimentos explorando la demanda de oxígeno, aireación, agitación, pH libre y controlado, buscando mejorar la producción de la enzima. No se emprendió una optimización a nivel de fermentador, por considerar que ésto es una investigación aparte, (la cual, se está realizando actualmente por otros investigadores en el LEM).

1.5.3.13 La última parte de la presente investigación consistió en caracterizar parcialmente la enzima a nivel de extracto crudo, determinando: La influencia del pH sobre la actividad y la estabilidad. La influencia de la temperatura sobre la actividad, la estabilidad y la vida de anaquel. El efecto del agente quelante EDTA sobre la actividad, (un efecto inhibitorio sugiere que la enzima es una metaloenzima). El efecto de mercuriales como el HgCl_2 y el para cloro mercuribenzoato, (cuya inhibición sugiere la presencia de una tiol-enzima). El efecto de la urea (que permite especular sobre la participación de puentes de hidrógeno en la molécula enzimática). El efecto de detergentes polares y neutros, (cuya acción puede o no sugerir la participación de enlaces hidrofóbicos en la molécula enzimática). El conjunto de propiedades moleculares y cinéticas, permitió especular sobre las características de la proteasa y los usos prácticos que pudiera dársele.

La enumeración y breve descripción de las acciones emprendidas para alcanzar las metas de la presente investigación, permitirá ahora desglosar la metodología utilizada, en el próximo capítulo.

2. METODOLOGIA

2.1 Cepas Bacterianas.

El estudio se llevó a cabo con 152 cepas de *B. thuringiensis*, donadas por el Dr. Luis Galán Wong (Universidad Autónoma de Nuevo León) al Laboratorio de Enzimas Microbianas de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (LEM-ENCB-IPN). Como testigos en diferentes determinaciones, tales como perfiles plasmídicos, perfiles electroforéticos de proteínas cry y estudios de toxicidad, se usaron las cepas patrones internacionales HD-1 y HD-73 (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*) y la IPS 82 (*B. thuringiensis* var. *israelensis*). Dichas cepas fueron proporcionadas por el Dr. Jorge E. Ibarra Rendón del Laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV-Irapuato. Fueron incluidas también la cepa *WF* de *S. marcescens*, como referencia por su habilidad para producir quitinasas y proteasas y una cepa acristalífera de *B. thuringiensis* (Bt-149), obtenida de la colección del LEM- ENCB-IPN.

Las cepas se conservaron en tubos con agar nutritivo inclinado en refrigeración a 4°C, haciendo las resiembras periódicas necesarias para contar siempre con bacterias frescas y viables. Para su conservación a largo plazo la colección fue sometida a liofilización.

2.2 Selección primaria de las cepas mediante técnicas de tinción y ensayos enzimáticos.

2.2.1 Técnicas de Tinción

2.2.1.1 Tinción de esporas por el método de Schaeffer y Fulton (23).

Para cada cepa se hizo un frotis de su respectivo cultivo autolizado en un porta objetos y se fijó con calor. Las preparaciones se cubrieron con verde de malaquita al 5 %, y se calentaron hasta emisión de vapores durante 10 min, se lavaron con agua y se escurrieron. Después se

a las cepas en un medio adicionado con lana teñida y molida. Las fibras de lana fueron primero limpiadas y luego tratadas con sulfito de sodio 0.3 M. Después se tiñeron con azul brillante de remazol al 1 %. El color se fijó con bicromato de potasio al 3 % y ácido tartárico al 3 %. El exceso de colorante fue removido lavando primero con agua caliente y luego con etanol. La lana teñida y seca se molió en un molino Willey con una malla 40 y se adicionó al 0.4 % al medio de Castañeda (12). La actividad de queratinasa se midió en los sobrenadantes de los cultivos por la absorbencia a 585 nm del colorante liberado en el medio, por la acción lítica de las bacterias después de un periodo de 24 h de incubación. Como control positivo se utilizó a *Sm WF*, y como control negativo a matraces con el medio sin inocular, e incubados en las mismas condiciones que los problemas.

2.2.4 Actividad quitinolítica en placa.

Esta fue evaluada en placas conteniendo quitina coloidal al 13-14 % peso húmedo y agar al 2.3 %, suspendidos en el medio sintético de Castañeda (12).

La quitina coloidal se preparó pesando 10 g de quitina comercial (Sigma, previamente molida en un molino Willey, con malla 40), a la cual se adicionaron 100 ml de H_3PO_4 concentrado y se homogeneizó dejándose después en refrigeración durante 24 h. Posteriormente se añadió agua en exceso para lograr el hinchamiento del polisacárido, se filtró a través de tres capas de gasa y se lavó con agua hasta la eliminación total del ácido. La quitina coloidal se esterilizó en autoclave y se almacenó hasta su uso. Para preparar las placas se mezclaron el medio base, el agar y la quitina coloidal, en las proporciones ya indicadas, y se esterilizó en autoclave a 5 lb/15 min. Después se repartió en placas estériles teniendo la precaución de agitar constante y suavemente, a fin de repartir el material de manera

uniforme. Cuando un microorganismo secreta quitinasas, se puede observar un halo transparente en torno a su colonia, debido a la digestión de las partículas insolubles de quitina. La actividad de quitinasa se evaluó midiendo el ancho en mm del halo traslucido alrededor de las colonias, después de 48 h de incubación. Este tipo de evaluación fue adoptado debido a la gran variabilidad en tamaños y formas de las colonias de las diferentes cepas ensayadas. *S. marcescens* WF se usó como control positivo.

2.3 Selección secundaria mediante estudios cinéticos de secreción de enzimas.

Las cepas seleccionadas en la etapa anterior, así como las diferentes cepas de referencia, se sembraron en un medio conteniendo carapacho de camarón seco y molido, suspendido al 2 % en agua de la llave, y se incubaron a 28°C en agitación a 180 rpm, colectándose muestras a intervalos de 5 h, en las que se evaluó actividad de proteasa y quitinasa. Esto con la finalidad de observar la secreción de ambas enzimas, ya en el medio de producción. Las técnicas empleadas para evaluar ambas enzimas fueron:

2.3.1 Determinación de proteasa (40).

Se mezclaron 0.5 ml del sobrenadante (sin diluir hasta las 24 h de incubación; diluido 1:40 de las 48 a 72 h y diluido 1:80 a tiempos posteriores) con 0.1 ml de caseína al 1 % en regulador de glicina-NaOH 0.2 M a pH de 9.0, y se incubó a 37 °C durante 15 min. La reacción se detuvo con 3.5 ml de ácido tricloroacético al 4 % y se dejó en refrigeración por 30 min mínimo. Luego se centrifugó a 10,000 rpm (7840 x g) y el sobrenadante se leyó a 280 nm, (en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Coleman 55). A esta longitud de onda absorben aminoácidos aromáticos como tirosina, triptofano y fenilalanina, así como los péptidos que los

contengan, los cuales son liberados en este caso, por la acción hidrolítica de la proteasa. La lectura obtenida se interpoló en una curva tipo de tirosina hecha a concentraciones entre 0-300 $\mu\text{g/ml}$, los resultados se expresaron en unidades, siendo una unidad de proteasa, la cantidad de enzima que produce un microgramo de tirosina por minuto (14).

2.3.2 Determinación de quitinasa (16).

Está basada en la reducción que sufre el ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS), por la acción de la N-acetil-D-glucosamina (NAG), producto de la hidrólisis enzimática de la quitina, misma que puede medirse por la absorbencia a 535 nm del color desarrollado en la reacción.

En tubos de ensayo se mezclaron 1 ml de los sobrenadantes de los cultivos, (que en el caso de *Sm WF* se diluyó 10 veces, y para las cepas de *B. thuringiensis* se empleó sin diluir), con 1 ml de quitina coloidal, los cuales se incubaron a 50 °C durante 1 h en un baño metabólico con ajuste de temperatura. Después la reacción se detuvo con 1 ml de NaOH al 1%, y luego se centrifugó a 1960 x g durante 5 min para separar la quitina remanente. Del sobrenadante se tomó 1 ml para determinar azúcares reductores, mezclándolo con 1 ml de DNS, y se calentó 5 min en baño maría a ebullición, para desarrollar color. Se enfrió y se diluyó con 2 ml de agua destilada y se midió la absorbencia a 535 nm. Los valores obtenidos se interpolaron en una curva tipo de NAG de concentración conocida (0-10 μM) para determinar las unidades de quitinasa, considerándose que una de éstas es la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μM de NAG en 1 h, bajo las condiciones experimentales mencionadas.

2.3.2.1 Preparación de quitina coloidal (ver rubro 2.2.4).

2.3.2.2 Preparación del reactivo de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS).

Se pesaron 5 g de DNS que se disolvieron en caliente, en 100 ml de NaOH 2N y se añadieron 250 ml de agua destilada. Después se añadieron 150 g de tartrato doble de sodio y potasio, los cuales se disolvieron con agitación en caliente. Finalmente se aforó a 500 ml.

2.4 Selección terciaria mediante bioensayos, para evaluar la toxicidad de los cristales proteicos de las cepas promisorias.

Una condicionante para seleccionar finalmente la cepa de trabajo, era que sus cristales debían tener actividad bioinsecticida, por lo cual fue necesario realizar la purificación de éstos, y realizar bioensayos para determinar si alguna de las cepas escogidas en la selección secundaria presentaba tal característica. Además la cepa en cuestión no debía producir beta-exotoxina, la cual puede representar riesgos hacia mamíferos. Para aclarar estos aspectos se siguió la siguiente metodología:

2.4.1 Purificación de los cristales intracelulares (45).

Las cepas se sembraron en matraces Fernbach conteniendo 500 ml de un medio de leche peptonizada, que contiene en g/l los siguientes ingredientes, ajustando el pH final a 7.4 ± 0.1 : 10 g de leche peptonizada; 10 g de glucosa; 2 g de extracto de levadura; 0.3 g de sulfato de magnesio. $7H_2O$; 0.02 g de sulfato de fierro. $7H_2O$; 0.02 g de sulfato de zinc. $7H_2O$ y 0.02 g de sulfato de manganeso.

Los cultivos se incubaron a 30 °C y 340 rpm durante 3 a 4 días para lograr la autólisis celular, lo cual se observó al microscopio. Los cultivos autolizados se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min y se desechó el sobrenadante. El sedimento se lavó, resuspendiéndolo con agua destilada estéril y se volvió a centrifugar a 10,000 rpm (7840 x g) durante 15 min. Este procedimiento se repitió 4 veces.

Por otra parte, en un tubo de ultracentrífuga se preparó un gradiente discontinuo de sacarosa colocando sucesivamente 6 ml de sacarosa al 79 %; 5 ml de sacarosa al 75 %; 5 ml al 67 %; 5 ml al 63 % y 5 ml al 59 %. Sobre la capa superior se colocó la pastilla del autolizado celular suspendido y homogeneizado en 5 ml de agua destilada.

Después se centrifugó en un rotor de columpio a 20,000 rpm (32,000 x g) durante 1 h, se separaron con gran cuidado las diferentes bandas del gradiente y se examinaron al microscopio. La banda que contiene los cristales se lavó por centrifugación con agua desionizada.

Las muestras autolizadas y lavadas, o los cristales purificados se guardaron en congelación a -20 °C después de haberlas liofilizado.

2.4.2 Bioensayos para evaluar la toxicidad de los cristales proteicos de la cepa seleccionada.

Esta parte se llevó a cabo en el CINVESTAV-Irapuato, bajo la asesoría del Dr. Jorge Ibarra. Los bioensayos fueron sobre larvas de tres tipos de insectos, conocidos por su alta susceptibilidad a diferentes cepas de *B. thuringiensis*: *Manduca sexta* (lepidópteros), *Aedes aegypti* (dípteros) y *Leptinotarsa texana* (coleópteros) (38, 45). A continuación se describen cada uno de ellos.

2.4.2.1 Bioensayo para un coleóptero

En este caso se utilizaron larvas de la catarinita (de la papa) *Leptinotarsa sp* de 3^{er} instar. Los insectos fueron confinados en celdas individuales durante 24 h para someterlos a un ayuno forzado; enseguida se pesaron grupos de 10 larvas.

Por otra parte, los cristales proteicos previamente purificados o el complejo esporacristal, en aquellas cepas donde estas estructuras están fuertemente asociadas, se suspendieron en sacarosa al 20 % en Tween 20 al 0.02 %. Después se colocaron gotas de 2 μ l sobre papel encerado, conteniendo la dosis a probar. Enseguida se pusieron a beber únicamente una gota por larva. Después cada grupo se confinó dentro de cajas cerradas de vidrio con suficiente alimento (hojas de trompillo), esto con el fin de que la pérdida del peso fuera por el efecto tóxico sobre las larvas y no por falta de alimento. La toxicidad se evaluó por la pérdida de peso en las larvas, que al ingerir los cristales presentaron una parálisis intestinal que les impidió comer. Esto se realizó a las 24, 48 y 72 h en cada grupo. Las dosis añadidas a los tres grupos problema fueron 10 μ g, 1 μ g y 100 ng en gotas de 2 μ l.

2.4.2.2 Bioensayo para un díptero

En vasitos de plástico (para gelatina) se colocaron 100 ml de agua de la llave desclorada y 20 larvas de *Aedes aegypti* de 4^o instar por cada vaso. Luego se agregó una suspensión de los cristales en agua destilada, de manera que la concentración final en la suspensión era de 10 μ g, 1 μ g y 100 ng/ml. A las 24 h se hizo el conteo de larvas muertas.

2.4.2.3 Bioensayo para un lepidóptero

Para éste se emplearon larvas de *Manduca sexta*, mejor conocida como el “gusano de cuerno del tabaco”. Las larvas de primer instar a ensayar fueron mantenidas 24 h sobre cajas de Petri conteniendo una dieta especial gelificada. El objeto era “aclimatarlas” a alimentarse de esta manera, ya que en forma natural lo hacen de hojas de tabaco. Las larvas fueron obtenidas a partir de los huevecillos que este gusano deposita en las hojas tabaquillo.

El ensayo consistió en colocar 500 µl de suspensiones del cristal o complejo esporacristal sobre cajas de Petri, conteniendo una capa de la dieta especial. La toxina se repartió homogéneamente, se dejó secar y luego se colocó una rejilla que permitió colocar cada larva en una celdilla individual. Los bioensayos se realizaron a 28 ± 2 °C, con una humedad relativa del 70 % y un fotoperíodo de 16:8 horas luz: oscuridad. La mortalidad se evaluó hasta el 6° día de exposición. Se usaron 20 larvas por dosis y 30 para el testigo negativo. Las dosis que se emplearon para este bioensayo fueron 10 µg, 1 µg y 100 ng/cm². Para el caso específico de Lepidópteros, se hizo posteriormente el cálculo de la concentración letal media (CL₅₀), utilizando larvas de primer instar. La CL₅₀ se calculó por análisis Probit después de 6 días de incubación en las mismas condiciones que para los bioensayos burdos, pero utilizando seis concentraciones más finas y realizando un mínimo de cuatro replicas por cada concentración. En estos bioensayos se empleó como comparación la cepa patrón internacional *B. thuringiensis* HD-1.

2.4.3 Bioensayo para evaluar la producción de β -exotoxina en la cepa seleccionada.

Para corroborar la producción de β -exotoxina, se llevaron a cabo bioensayos de tipo cualitativo, de acuerdo a la técnica desarrollada en el laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato. Esta consistió en sembrar la cepa a probar por estría masiva en placas conteniendo “ agar nutritivo para métodos estándar”, incubando a 28°C por espacio de 72 h, o hasta observar lisis celular en el microscopio óptico de contraste de fases, de por lo menos el 70 % de las células.

Una vez revisadas las placas, se colocaron 10 larvas del 3er instar tardío de *Musca domestica*. Inmediatamente después se colocaron en un cuarto de incubación a 28 °C y 70 % de humedad relativa. La lectura de los bioensayos se llevó a cabo de 8-10 días después, anotando el número de larvas muertas, larvas vivas, pupas normales, pupas deformes y adultos emergidos, considerándose positivamente tóxicas a la cepas que presentaron menos del 30 % de emergencia de adultos, y negativamente tóxicas a las que presentaron emergencia de adultos mayor al 70 %. Para el testigo negativo se consideraron los datos obtenidos, al colocar el mismo número y tipo de larvas sobre placas conteniendo agar nutritivo sin inocular.

2.5 Caracterización de las cepas de interés

Cuando se trabaja con cepas de *B. thuringiensis*, es importante determinar su perfil de plásmidos y de proteínas Cry, además de llevar a cabo su serotipificación, pues si éstas resultan tóxicas, debe determinarse si corresponden o no a un nuevo serotipo. Esta parte de la investigación, igual que la concerniente a los bioensayos, se realizaron en el CINVESTAV-Irapuato.

2.5.1 Análisis plasmídico de la cepa seleccionada (45).

El protocolo a seguir fue el siguiente: se tomó una asada muy pequeña del cultivo guardado en refrigerador y se inoculó en 20 ml de medio de Spizizen, el cual contiene 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 14 g de K_2HPO_4 ; 6 g de KH_2PO_4 ; 1 g de citrato de sodio; 0.2 g de MgSO_4 ; 0.1 g de extracto de levadura; 1 g de casaminoácidos y 5 g de glucosa en 1 litro de agua . Luego se dejó crecer toda la noche.

Los 20 ml del cultivo anterior se transfirieron a un matraz conteniendo 500 ml del mismo medio, y se cultivaron en agitación (340 rpm) a 28 °C durante 2 a 3 h, hasta alcanzar una turbiedad de 0.4 a 0.6 a 600 nm.

Las células se separaron por centrifugación a 6,000 rpm (2860 x g) durante 10 min en el rotor GSA de la centrífuga refrigerada Sorvall. El paquete celular se resuspendió y se lavó varias veces por centrifugación con el buffer TE pH 8.0, que contenía 0.5 M de sacarosa; 10 nM de EDTA y 25 mM de Tris. Con esto se inhibió la acción de las proteasas unidas a las células. La pastilla o sedimento lavado se resuspendió en 4.8 ml de una solución conteniendo lisozima 5-10 mg/ml dejando incubar a 37 °C durante 20 min para reblandecer la pared celular. Luego se incubó en hielo durante 10 min.

Después se adicionaron 9.6 ml de la solución II (NaOH 0.2 M y SDS al 1 %) recién preparada, se mezcló por inversión del tubo, y se dejó reposar 5 min en baño de hielo. Cabe aclarar que cuando ocurre una buena lisis celular, la solución se torna más clara, y por otra parte que el mezclado de los reactivos debe ser lento para no dañar al DNA.

Después se adicionaron 7.2 ml de la solución III (acetato de sodio 3 M pH 4.8), se mezcló suavemente e incubó a 20 °C durante 20 min, observándose la aparición de un precipitado blanco que contenía los restos celulares, DNA cromosómico y proteínas. Los plásmidos quedaron en el sobrenadante. Este se centrifugó a 13,000 rpm (10,192 x g) durante 15 min y nuevamente el sobrenadante se repartió en dos tubos en porciones de aproximadamente 10 ml cada uno. Se añadieron dos volúmenes de etanol o isopropanol fríos, para precipitar el DNA plasmídico. Después se mantuvo a -80 °C durante 30 min.

Como los plásmidos obtenidos en el sedimento anterior iban aun contaminados con RNA y carbohidratos, se hizo necesaria otra etapa de purificación en la ultracentrífuga, empleando un gradiente de CsCl. Primero se mezcló la pastilla de plásmidos con 700 µl de una solución con bromuro de etidio (10 mg/ml), suavemente y por inversión en un tubo Eppendorf.

En tubos Quick seal (polialómero) se colocó la muestra anterior sobre un gradiente de CsCl y se centrifugó a 80,000 rpm (128,000 x g) durante 3 h. La banda correspondiente a los plásmidos se hizo visible por iluminación con luz UV y posteriormente se extrajo con una jeringa, para después ser aplicada sobre geles horizontales de agarosa al 0.6 %. La solución reguladora para el corrimiento electroforético contenía Tris-ácido acético-EDTA a pH 8.0.

Para hacer visibles las bandas plasmídicas, el gel se tiñó con una solución conteniendo 200 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) para un litro de agua, dejando actuar durante 5 min.

Los geles se colocaron sobre un transiluminador y se tomaron fotografías utilizando un filtro naranja.

2.5.2 Perfil electroforético de las proteínas de los cristales intracelulares (proteínas Cry).

Para este análisis se tomaron 1.5 mg de cristales liofilizados, que se disolvieron en 750 μ l del buffer de desnaturalización, el cual contiene para 10 ml (2X): 5 ml de Tris HCl 0.5M pH 8.8; 2 ml de SDS al 20%; 2 ml de glicerol; 1 ml de 2-mercaptotanol y 1 ml de azul de bromofenol al 0.02 %.

La muestra se hirvió 5 min y de ahí se aplicaron muestras de 5 μ l (10 μ g) en el gel de poliacrilamida. El gel de separación se preparó al 10 % y el de concentración al 3 %. En uno de los carriles se colocó una mezcla de marcadores de peso molecular conocido, que fueron: anhidrasa carbónica (29 kDa); albúmina de huevo (45 kDa); albúmina bovina (66 kDa); fosforilasa B (97.4 kDa); beta galactosidasa (116 kDa) y miosina (205 kDa). Con las distancias recorridas en mm, por los marcadores de peso molecular, y el logaritmo de dicho peso, se construyó una gráfica en la que se interpolaron los valores de las bandas de las proteínas cry, para deducir su correspondiente peso molecular.

2.6 Microscopía electrónica de los cristales proteicos.

Las preparaciones fueron hechas en el CINVESTAV-Irapuato, suspendiendo una pequeña cantidad de los cristales (previamente purificados por centrifugación en un gradiente de densidad), en una gota de agua bidestilada, y homogeneizando cuidadosamente. Luego se colocaron porciones pequeñas de la suspensión en los portaobjetos para el microscopio electrónico, cubriéndolas con un cubreobjetos de vidrio. La preparación se introdujo en un desecador y se hizo vacío hasta desecar completamente. Después se sombreó utilizando un filamento de oro.

Las observaciones se realizaron en el microscopio electrónico de barrido Carl Zeiss, Modelo DSM-940 de la UAM-Iztapalapa.

2.7 Serotipificación de la cepa seleccionada.

La cepa fue enviada a la Dra. Marguerite Lecadet, para su serotipificación en el Instituto Pasteur de Francia. Por otro lado, se realizaron también las pruebas bioquímicas necesarias, descritas en el manual Bergey, como un criterio taxonómico suplementario.

2.8 Estudios de materia prima.

Sean los experimentos a nivel de matraz o de fermentador, debe tomarse en cuenta el sustrato orgánico a utilizar. En nuestro caso se trata de desechos de camarón, sin ningún pretratamiento químico para no encarecer el proceso. Sin embargo, en estas condiciones la materia prima puede no estar “estandarizada”, y por tanto su composición puede diferir dependiendo de su procedencia, de la época de colecta, de la clase de camarón, del tipo

particular de desecho (colas, patas, cefalotórax, cabezas, etc), de cómo se procesen y manejen los desechos, etc. Naturalmente esto puede influir en los rendimientos de la fermentación.

2.8.1 Colección, procesado y análisis de la materia prima.

Para seleccionar la materia prima a utilizar en la presente investigación, se colectaron desechos sobrantes del pelado de camarón, procedentes de los muelles de Alvarado, Veracruz y del mercado de la Viga en el D.F. También se adquirió una harina comercial de cáscara de camarón, vendida al menudeo en la ciudad de México para alimento de aves, y para la elaboración de saborizantes y consomés.

Las muestras procedentes del pelado de camarón se colectaron frescas, se limpiaron manualmente de basuras y cuerpos ajenos; se lavaron al chorro del agua y se dejaron secar al sol. Después se molieron en un molino eléctrico de cuchillas (Willey), y las partículas se tamizaron a través de una malla del No. 40. La harina de cáscara de camarón se utilizó como tal.

Los tres sustratos obtenidos fueron estudiados en cuanto a su composición, sometiéndolos a un análisis bromatológico por las técnicas acostumbradas (28):

- **nitrógeno total**, por el método de Kjeldahl
- **determinación de cenizas** por calcinación
- **extracto etéreo** por extracción continua a reflujo, con éter etílico.
- **fibra cruda**, mediante digestión de la muestra con H_2SO_4 y $NaOH$, ambos al 1.25 %.

2.8.2 Capacidad inductora de proteasa, de los diferentes sustratos ensayados como materia prima.

A esta altura de la investigación ya se tenían evidencias de que la cepa más adecuada para continuar, era la Bt-112; por tanto se realizaron experimentos en matraz en lo que este microorganismo se sembró en medios conteniendo los tres sustratos a ensayar, suspendidos al 2 % ya fuera en agua de suministro, o en el medio sintético de Castañeda, cuya composición se describió en el inciso 2.2.2. La concentración fue tomada de estudios previos, en los que se demostró que los desechos de camarón al 2% propiciaban la síntesis de proteasa (67). Concomitantemente se hicieron experimentos en los que se ajustó a 6.5 el pH inicial de los medios, o se dejó al valor que resultaba después de la esterilización, que siempre fue alcalino y cercano a 8.8. En todos los casos los cultivos se realizaron a 28°C, con una agitación de 180 rpm, evaluándose la actividad proteolítica a las 24 h.

Estos experimentos permitieron relacionar la eficiencia inductora de proteasa, con la composición bromatológica de los sustratos; y la ventaja o inconveniencia de suspender tales sustratos en agua de suministro o en medio sintético basal. También se pudo aclarar la importancia de ajustar o no el pH inicial del medio.

2.8.3 Estudios cinéticos sobre la producción de proteasa.

Una vez establecidos los procesos primarios del proceso, como la selección de la cepa y materia prima; la composición del medio y la necesidad o no de controlar el pH inicial; los siguientes experimentos fueron ya evaluaciones cinéticas de la producción de proteasas, a lo largo de 72 h de incubación, por lo menos, en condiciones de agitación. En estos experimentos interesó estudiar principalmente el efecto de la temperatura y de la

concentración de sustrato. El protocolo para cada una de las corridas, ya a nivel de matraz como de fermentador comprendió las siguientes etapas:

- a) Comprobación de la pureza del cultivo de Bt-112
- b) Comprobación de su capacidad para producir cristales, proteasas y quitinasas
- c) Siembra y resiembra de la cepa en el medio de carapacho de camarón al 2% en agua de la llave por tres periodos consecutivos de 18 h cada uno, para tener un inóculo vigoroso y sincronizado en fase logarítmica
- d) Inoculación en medios con diferentes concentración de sustrato, según el objetivo del experimento. La proporción de inóculo fue de 0.1 ml de inóculo por 125 ml de medio.
- e) Incubación en condiciones de agitación (generalmente a 180 rpm), a diferentes temperaturas, según los objetivos experimentales.
- f) Colecta de las muestras a intervalos que variaron de 2 hasta 80 h, según el tipo de experimento.
- g) Centrifugación de las muestras de cultivo, a 7,000 rpm (3290 x g) para separar células. El sobrenadante se colectó y se desechó el sedimento.
- h) Distribución del sobrenadante en porciones de 4 ml, que fueron luego congeladas a -15°C hasta que se concluyó el experimento y pudieron reunirse todas las muestras a analizar.
- i) Descongelación de una serie completa de muestras, pasándolas del congelador al refrigerador durante una noche. En las muestras descongeladas se evaluó la actividad proteolítica presente.

Si bién la descripción anterior, da una pauta general de la metodología empleada en los estudios cinéticos, vale la pena mencionar los detalles particulares de algunas de estas evaluaciones, según se muestra a continuación.

2.8.3.1 Estudios cinéticos a nivel de matraz agitado, para evaluar el crecimiento y la producción de proteasa a 28 y 37°C.

Estos experimentos se realizaron a 28 y 37°C, con objeto de obtener cinéticas exploratorias que permitieran de una manera rápida, conocer el comportamiento del microorganismo en un intervalo amplio de temperatura, y tener una idea de los tiempos requeridos para la óptima producción de la enzima, empleando como sustrato a los desperdicios derivados del procesado de camarones del Golfo de México (camarón café), particularmente de Alvarado, Ver; suspendido al 2 % en agua de la llave y sin ajuste del pH del medio. En estos experimentos se evaluó la concentración bacteriana mediante el conteo de células viables, por la técnica convencional de hacer diluciones de las muestras tomadas a diferentes tiempos, y luego siembra de alícuotas conocidas sobre placas con agar nutritivo, haciendo el conteo de las colonias crecidas a las 24 h a 28°C. La actividad de proteasa se determinó como fue indicado en el inciso 2.3.1.

2.8.3.2 Efecto de la temperatura y la concentración de sustrato, para la producción de proteasa.

Este aspecto comprendió 5 experimentos diferentes, en los que se hicieron estudios cinéticos en matraces a las temperaturas: 28, 31, 34, 37 y 40°C. Para cada una de estas temperaturas se prepararon triplicados de matraces conteniendo carapacho de camarón a las

concentraciones: 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5%, o sea 18 matraces; sin embargo, como se tomaron muestras a las 20, 26 y 32 h de incubación (tiempos que habían sido tomados de cinéticas previas), para cada experimento se requirieron al menos 54 matraces. Como fueron 5 experimentos distintos (sin tomar en cuenta algunas repeticiones), fue necesario procesar un total de 270 muestras, en las que se determinaron tanto la producción de proteasas como de quitinasas, por las técnicas ya descritas.

2.8.3.3 Producción de cristales proteicos intracelulares en el medio de carapacho de camarón al 2% en agua de la llave.

Si bien los datos obtenidos en estudios anteriores, habían demostrado que *B. thuringiensis* es capaz de crecer en el medio de carapacho molido de camarón suspendido al 2% en agua de la llave, y producir altos niveles de proteasas, así como medianas cantidades de quitinasas, no se había demostrado que en estas condiciones produjera también sus cristales proteicos intracelulares. Casi toda la bibliografía disponible refiere la necesidad de usar medios ricos para obtener una adecuada formación de los cristales. Por otra parte, la evaluación cuantitativa de los cristales ofrece más dificultades que las que se presentan en la determinación de actividades enzimáticas, particularmente si son de tipo extracelular. Por esta razón se decidió hacer un seguimiento de la producción de los cristales mediante tinciones específicas con amido negro y por microfotografía.

2.8.3.4 Perfiles electroforéticos de las proteínas formadas durante el cultivo a 28°C en el medio a base de desechos de camarón al 2% en agua de la llave.

Se empleó una cámara para electroforesis vertical, Protean II XI de Bio Rad, con sistema de enfriamiento a base de agua corriente y dos placas de gel. Se usaron geles de poliacrilamida al 5 % para la concentración de muestras, y al 12 % para su resolución. Para el corrimiento se utilizó un regulador de glicina 0.19 M, Tris 0.25 M y SDS al 0.1 %, a un pH de 8.3. Se colocaron en los pozos del gel 50 µl de muestras de sobrenadantes del cultivo colectadas a las 0, 3, 6, 10, 14, 18, 21, 24, 28, 32, 38, 42, 46, 48, 52, 56, 62, 66, 72, 76 y 80 h de incubación. Para incorporar las muestras al gel se usaron 80 mA y 60 mA para su separación electroforética. Al cabo de 4 ½ h se terminó el corrimiento y se procedió a teñir los geles con azul de coomassie R-250 al 0.125 %, metanol al 40 % y ácido acético al 10 %. Luego se destiñó con una solución de metanol al 40 % - ácido acético 10 %.

2.9 Estudios a nivel de Fermentador.

El sistema consistió esencialmente de un fermentador New Brunswick Bioflo III con controles de temperatura, pH, oxígeno, agitación, aireación y sensor de espuma y un vaso cuyo volumen total es de 7 l. Las condiciones de operación fueron en principio:

Tipo de proceso:	aerobio por lote
Microorganismo:	<i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt-112)
Medio de cultivo:	carapacho de camarón suspendido en agua de suministro, generalmente al 2 %.
Esterilización del medio:	15 lb de presión por 30 minutos.
Inóculo:	4 %
Volúmen de trabajo:	4 l
Temperatura:	31°C.
pH	300 rpm inicialmente (variaba según los
agitación :	requerimientos del microorganismo hasta
	375 rpm)
aireación	0.5 vvm

Esencialmente se hicieron estudios cinéticos en las condiciones establecidas a nivel de matraz, con objeto de determinar la producción de la enzima en condiciones más controladas, en cuanto a temperatura y pH. Así mismo, mediante la agitación y aireación se procuró mantener las partículas del medio homogéneamente dispersas, y por otro lado, que no hubiera limitación de oxígeno en el medio. Los experimentos cinéticos tuvieron una duración de al menos 48 h, con toma de muestras cada 3 h. En dichas muestras se determinó en los

experimentos iniciales, la concentración celular, el pH del medio, la actividad proteolítica extracelular, y la presencia de cristales proteicos intracelulares.

Los primeros experimentos permitieron establecer la ventaja o no de ajustar el pH del medio, al valor requerido (pH 7.0) para su mejor crecimiento y producción de cristales, según datos bibliográficos. También se averiguó la influencia del pH alcalino que resulta al esterilizar el medio de cultivo, sobre la estabilidad de los cristales, ya que hay reportes indicando que estas estructuras se solubilizan a pH alcalino. No obstante estudios previos mostraron que no se afectan el crecimiento y la producción de enzima (62).

2.10 Caracterización parcial de la actividad proteolítica extracelular de *B. thuringiensis* cepa Bt-112 a nivel de extracto crudo.

2.10.1 Obtención del extracto crudo.

La producción de la enzima se hizo en un medio conteniendo carapacho molido de camarón suspendido al 2% en agua de la llave. El inóculo fue de 0.8% (v/v) de una suspensión fresca de un tercer subcultivo de Bt-LIRA en el mismo medio. Tales subcultivos se sembraron cada 18 h con objeto de obtener células en la fase logarítmica y por tanto muy activas metabólicamente. Las condiciones de la fermentación fueron: cultivo sumergido, agitado a 180 rpm e incubado a 31°C durante 48 h. Después de este tiempo se separó el paquete celular por centrifugación a 7,000 rpm (5480 x g) durante 20 min. El sedimento se descartó y el sobrenadante representó la enzima cruda, la cual fue adicionada de azida de sodio al 0.02% para evitar contaminación microbiana. Al extracto crudo se le determinó proteína

por el método de Lowry y actividad proteolítica en la forma habitual ya descrita. Con ambos valores se determinó su actividad específica.

2.10.1.1 Determinación de proteína.

Se hizo por la técnica de Lowry (46), basada en la determinación espectrofotométrica de los complejos coloridos formados por la reducción de la mezcla de ácido fosfomolibdico y ácido fosfotúngstico, por acción de un complejo de cobre-proteína. Se tomó 1 ml de la muestra previamente diluída con H₂O. Posteriormente se agregó a los tubos 2.5 ml del reactivo D, y se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente. Luego se agregó 0.5 ml del reactivo de Folin 1 N, dejando en reposo durante 30 minutos. Después se leyó a 660 nm, y los datos se interpolaron en una curva tipo realizada paralelamente, en la que se usó albúmina sérica bovina (20-200 µg) como estándar. El reactivo D se preparó al momento de usarse, mezclando 100 ml de Na₂CO₃ al 2 % en NaOH 0.1 N; 1 ml de CuSO₄ · 5H₂O al 1 % y 1 ml de tartrato de sodio y potasio al 2 %. El reactivo de Folin 1 N se obtuvo diluyendo 1:1 el reactivo comercial, y para la curva tipo de albúmina se usó una solución madre de albúmina (2 mg/ml).

2.10.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica.

Se incubó durante 20 min una mezcla de 0.5 ml de extracto crudo de proteasa con 1.0 ml de caseína al 1%, a las temperaturas de 5, 20, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55 y 60°C. Después se inactivó la enzima adicionando 3.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 4%. Después se

centrifugó a 7,000 rpm (5480 x g) durante 20 min, para separar las proteínas precipitadas y el sobrenadante se leyó a 280 nm.

2.10.3 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima.

Muestras de 0.5 ml de extracto crudo se preincubaron durante 1 h a las temperaturas mencionadas en el inciso anterior. Después se llevaron a un baño a la temperatura óptima observada en el experimento previo, durante 20 min para equilibrar la temperatura, y se les añadió 1.0 ml de caseína al 1%. La reacción debida a la actividad remanente de las proteasas se dejó proseguir durante 20 min. Luego se detuvo la reacción con 3.5 ml de ácido tricloroacético al 4 % , se centrifugó y el sobrenadante fue leído a 280 nm.

2.10.4 Efecto del pH sobre la actividad proteolítica.

Se compararon varios lotes del sustrato de caseína cuyo pH se ajustó desde 4 hasta 10, a intervalos de 0.5 unidades, luego se puso en presencia de la enzima en las proporciones acostumbradas para medir la reacción a la temperatura óptima durante 20 min.

2.10.5 Estabilidad de la proteasa a diferentes pH's.

Para conocer el intervalo de pH al cual es estable el extracto enzimático, éste se mezcló con reguladores apropiados que cubrieran el intervalo de 4 hasta 10, y se preincubó durante 1 h a 37 °C. Luego se midió la actividad remanente en las condiciones acostumbradas, al pH y temperaturas óptimas.

2.10.6 Requerimientos iónicos.

Una muestra del extracto proteolítico crudo se dializó contra el agente quelante EDTA (10^{-2} M). Luego se adicionaron en forma independiente soluciones de las siguientes sales: $ZnCl_2$, $CaCl_2$, $MgCl_2$ y $CoCl_2$ de modo que se obtuvieran concentraciones finales entre 10^{-4} a 10^{-2} M, y se evaluó la actividad en la forma acostumbrada para determinar si hubo o no algún grado de recuperación.

2.10.7 Inactivación por agentes mercuriales.

Si las exoproteasas de Bt-112 presentes en el extracto crudo tienen grupos sulfhidrilo en su sitio activo deben inactivarse ante compuestos como el cloruro mercúrico, la yodoacetamida o el paracloro-mercuribenzoato. En este caso se preincubaron muestras de la enzima cruda en presencia de los inhibidores mencionados a concentraciones 10^{-4} y 10^{-3} M. Después se evaluó la actividad proteolítica remanente en la forma acostumbrada.

2.10.8 Inactivación por agentes desnaturalizantes.

En este apartado se estudió el efecto de la urea 10^{-3} y 10^{-2} M y algunos detergentes de carácter neutro como el tween 20 o el Brij 35 (0.25-1%). También se ensayaron detergentes aniónicos (SDS 0.25-1%) y catiónicos (CTAB 0.25-1%). La técnica seguida consistió en preincubar durante 1 h el extracto crudo con los inhibidores mencionados, y medir luego la actividad proteolítica remanente, mediante la técnica habitual.

3. RESULTADOS

**PRIMERA PARTE. SELECCIÓN Y CARACTERIZACION DE UNA
CEPA ENTOMOTOXICA Y PROTEO-QUITINOLITICA DE *Bacillus
thuringiensis*, CAPAZ DE DESARROLLARSE EN MEDIOS A BASE DE
DESECHOS DE CAMARON.**

3.1 Selección primaria

3.1.1 Capacidad para formar cristales y esporas

Esta primera parte de la investigación, se estudió mediante microscopía óptica empleando tinciones con amido negro y fucsina amido negro para los cristales proteicos, y verde de malaquita-fucsina para las esporas, además se observaron preparaciones en fresco en un microscopio de contraste de fases. En la Figura 5 se muestran los tipos de microscopios empleados y las diferentes preparaciones obtenidas. Cabe destacar que la técnica original para diferenciar células y esporas, era utilizando verde de malaquita y safranina, sin embargo no se obtenían preparaciones muy claras, por lo que se probó la fucsina, con la cual sí se logró un mejor contraste. Mediante esta técnica pudo comprobarse la producción de esporas por todas las cepas. Por otro lado, tanto la tinción de amido negro, como la de amido negro-fucsina funcionaron muy bien para la identificación de los cristales, encontrando que únicamente 80 cepas los produjeron, de estas, 63 (78.75%) presentaban un cristal de tipo bipiramidal; 10 (12.5%) un cristal amorfo; 5 (12.5%) un cristal unido a la espora y 2 (2.5%) un cristal triangular (Figura 6). Debido a que ambas tinciones funcionaron para nuestro objetivo, se decidió de aquí en adelante utilizar la más simple, la de amido negro que sólo implica fijación de la muestra y 70 segundos con el colorante.

3.1.2 Producción de proteasas

Al ensayar la actividad proteolítica de las 152 cepas de *B. thuringiensis*, medida por la digestión de la caseína en placas, se encontró una alta frecuencia, ya que 137 fueron positivas, aún cuando la actividad varió de cepa a cepa (Figura 7). De este modo, 15 cepas no mostraron actividad, 4 presentaron la más baja actividad (1 cruz); 45 y 56 cepas tuvieron

niveles moderados (dos y tres cruces respectivamente), mientras que 4 y 28 cepas mostraron la más alta actividad proteolítica (4 y 5 cruces respectivamente). Las 28 cepas más proteolíticas fueron superiores a *S. marcescens* y semejantes a la cepa de referencia Bt-149. Debido a que 28 cepas todavía constituyen un grupo muy grande para realizar una selección secundaria, se decidió realizar ensayos con otra actividad proteolítica (queratinasa), la cual tiene la ventaja de ser una determinación rápida y más cuantitativa por ser un ensayo espectrofotométrico. Con base en la facilidad de realizar estas determinaciones y con objeto de conocer el perfil de todo el cepario, se decidió evaluar a las 152 cepas.

3.1.3 Producción de queratinasa

Para el caso de esta actividad proteolítica, al menos 48 cepas dieron valores negativos o muy bajos; el resto presentó gran dispersión de la actividad y solamente dos cepas (Bt-137 y Bt-140) superaron a la cepa de referencia *S. marcescens WF* (Figura 8 F). Cuando se comparan los perfiles de caseinasas y queratinasas es evidente que no se parecen, por lo que probablemente se están expresando dos actividades diferentes y no una proteasa inespecífica, según muestran los perfiles de caseinasa (Figura 7 B) y de queratinasa (Figura 8 F).

3.1.4 Producción de quitinasa

De acuerdo a la escala arbitraria adoptada para evaluar la quitinasa extracelular, basada en el tamaño del halo de digestión de las partículas de quitina coloidal alrededor de las colonias, se encontró que 53 cepas no mostraron actividad, 46 produjeron halos de 1 mm; 24 mostraron halos de 2 mm y 29 mostraron halos de 3 mm. La cepa de referencia *S. marcescens WF* produjo halos transparentes de 5-6 mm (Figura 9). Es importante destacar que al hacer

el análisis de los resultados obtenidos entre las actividades de quitinasa, caseinasa y queratinasa, no se encontró ninguna correlación, según se consigna en la Tabla 3 donde se reúnen todos los datos obtenidos con las 152 cepas estudiadas durante la selección primaria. Es evidente que el perfil de producción de enzimas extracelulares es una característica particular de cada cepa.

La selección primaria concluyó con la integración de un grupo promisorio de ocho cepas, cuyas características se resumen en la Tabla 4. Todas ellas son cristalíferas y producen aceptables niveles de las enzimas investigadas.

Cabe añadir que algunas cepas como la 137, 143 y 144, presentaban actividades más altas, al menos en alguna de las enzimas determinadas, sin embargo no produjeron cristales, por lo cual fueron eliminadas en la selección.

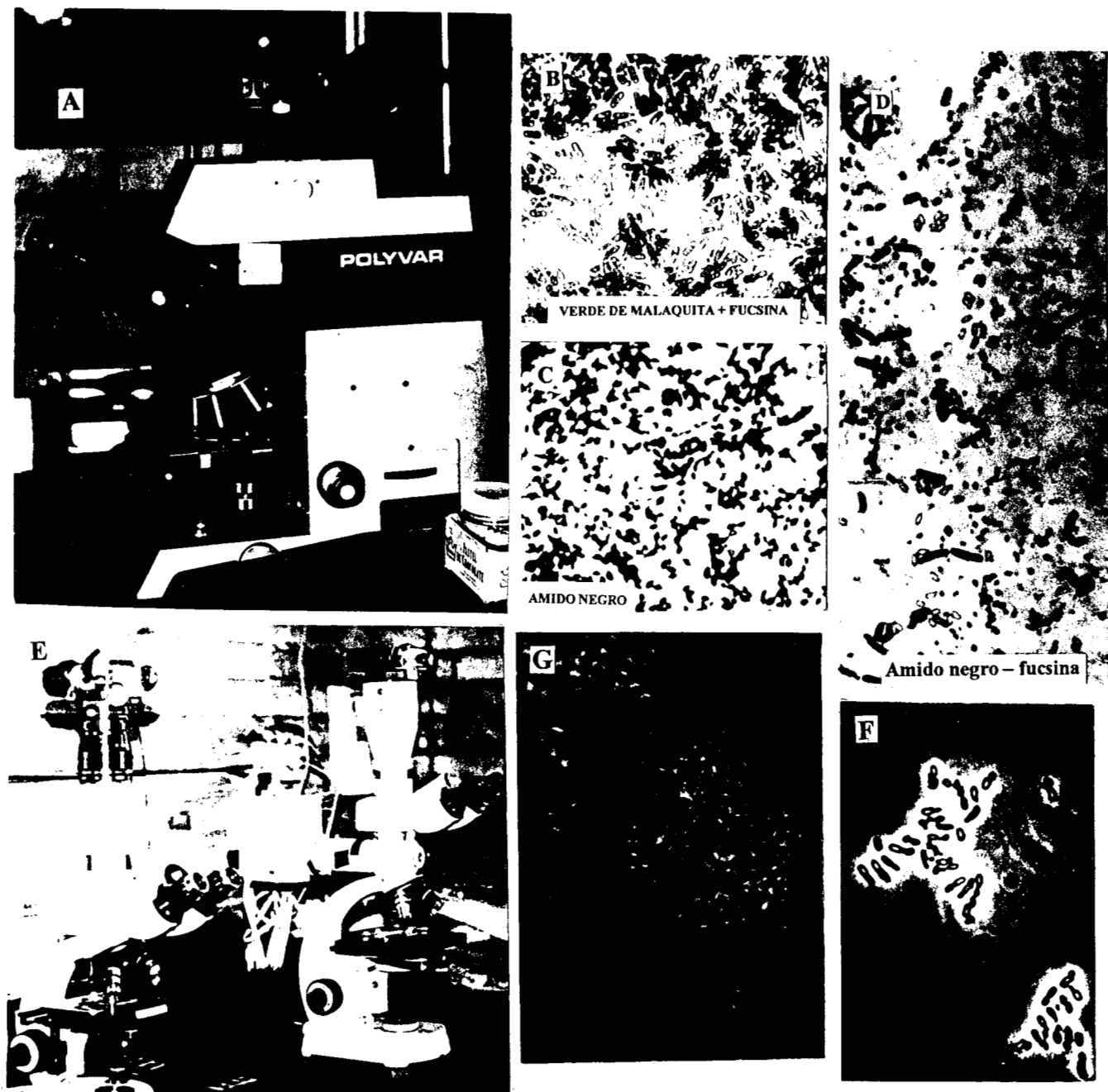


Fig. 5 En la parte superior A, se muestra el microscópio empleado y algunas fotografías obtenidas (B,C,D) de tinciones de esporas y cristales de *B. thuringiensis* (Bt). Por esta técnica se estudiaron y fotografiaron preparaciones de 152 cepas de Bt. Las esporas se tiñen con el verde de malaquita; los cristales con amido negro y/o fucsina. Ampliación 1500 X. En la parte E, se muestra el microscópio de contraste de fases empleado para observar directamente los cristales e inclusiones intracelulares en cultivos autolisados de Bt. Puede verse el cristal unido a la espora en el caso de Bt-103 (F), y la forma bipiramidal de los cristales proteicos de Bt-112 (G).

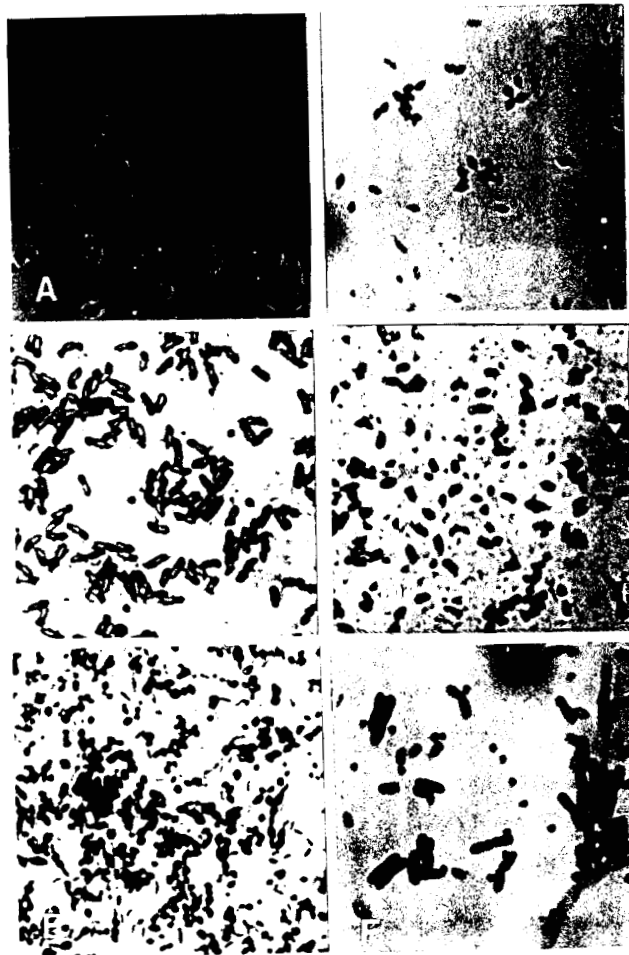


Fig. 6 En el arreglo fotográfico se muestran los diferentes tipos de cristales presentes en la colección de 152 cepas de *B. thuringiensis*. Por ejemplo, las cepas Bt-112 y 36 (A y B) presentan un cristal de tipo bipiramidal; Bt-103 (C), un cristal pegado a la espora; Bt-33 (D), un cristal triangular; Bt-99 (E), un cristal amorfo y Bt-107 (E) la cual presenta un cristal en cada extremo de la espora.

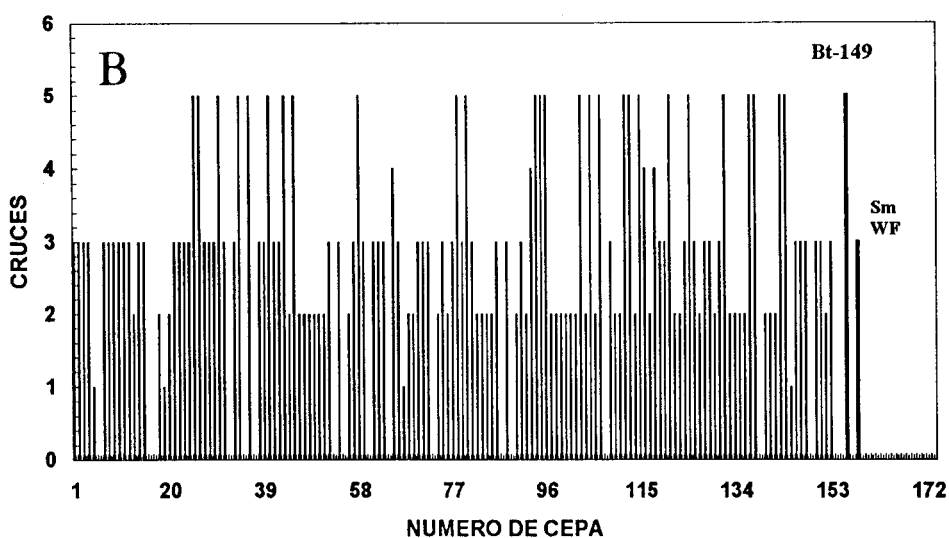
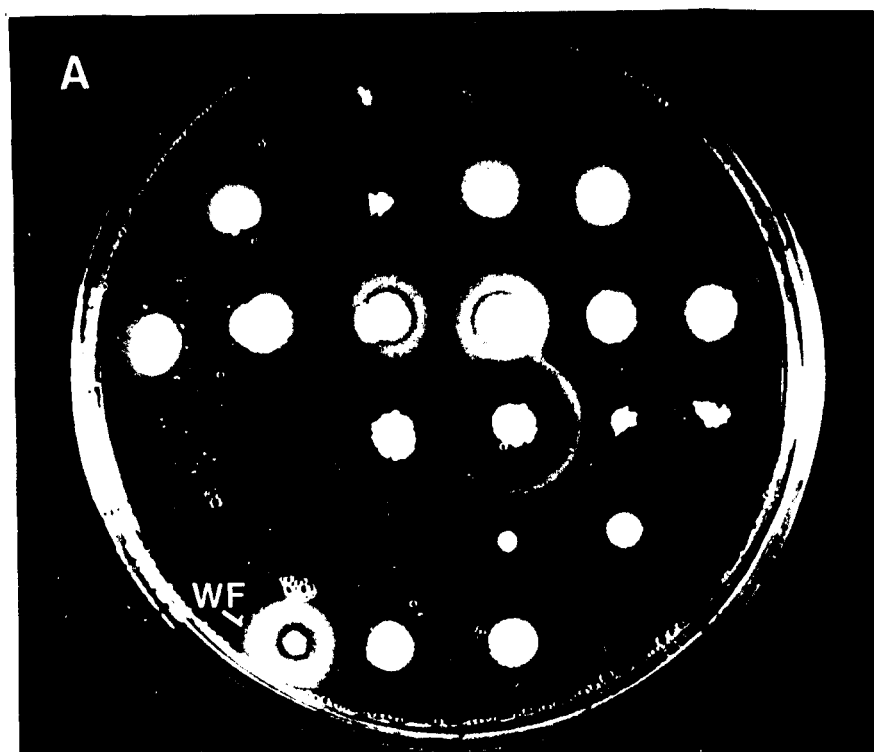


Fig. 7. En A se muestra la morfología colonial y los halos de proteólisis de algunas cepas de *B. thuringiensis* crecidas en un medio con caseína. Las colonias centrales con halos muy grandes y transparentes, tienen una actividad muy superior a la mostrada por la cepa de referencia *S. marcescens* WF. En la figura 7 B, se integran los datos obtenidos con las 152 cepas. Puede verse que al menos 28 de ellas tuvieron una actividad igual o superior a la de referencia Bt-149.

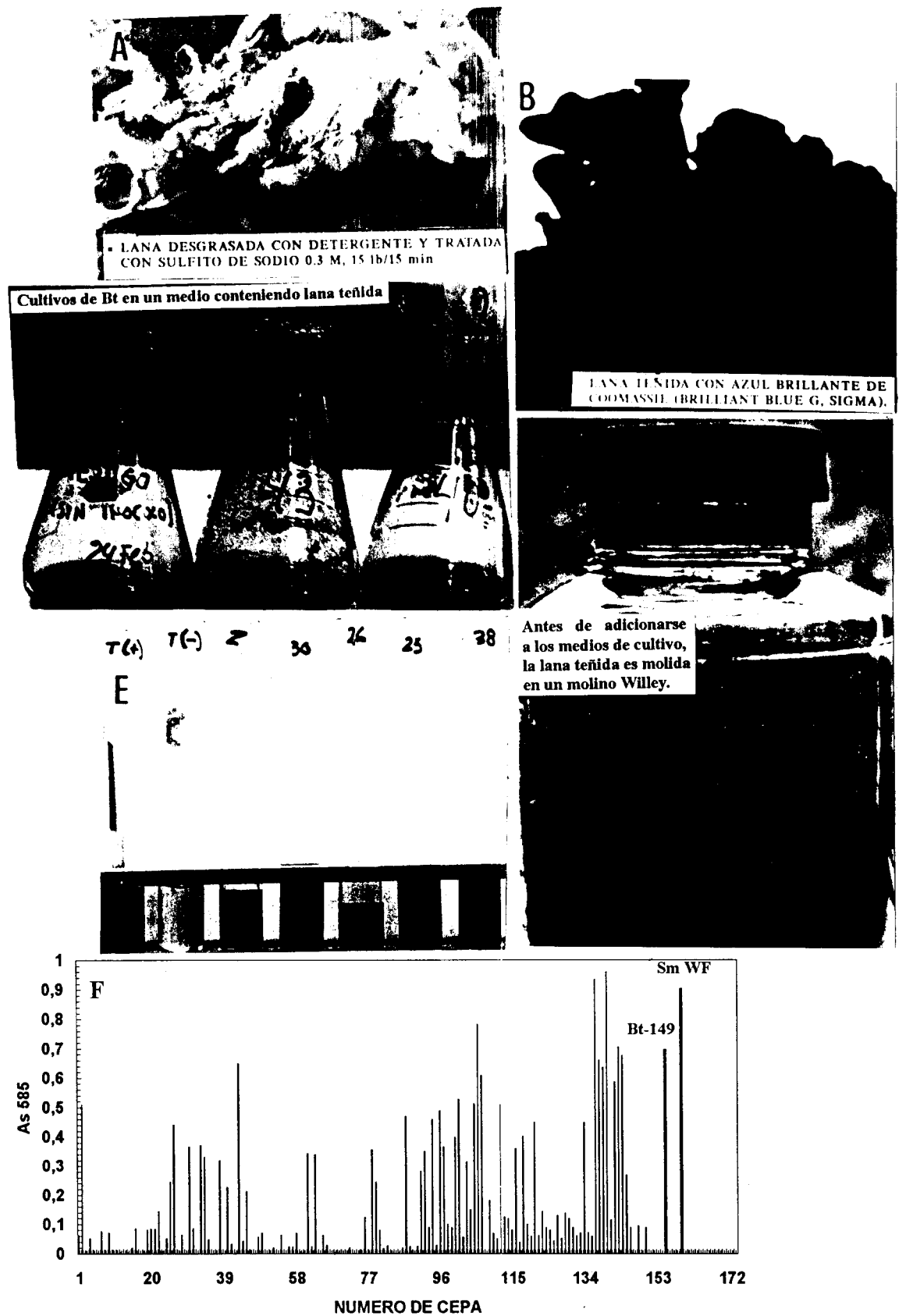


Fig. 8. Arreglo fotográfico que resume la preparación de la lana teñida, usada como nutriente (A, B y C), y cuando se adiciona a un medio de cultivo (D). Al ser utilizada por los microorganismos, la lana es solubilizada por la acción hidrolítica de las queratinasas secretadas al medio, de modo que la evaluación espectrofotométrica del colorante es directamente proporcional a la producción de enzima (E). La figura F muestra el perfil de producción de queratinasas por una colección de 152 cepas de *B. thuringiensis*.

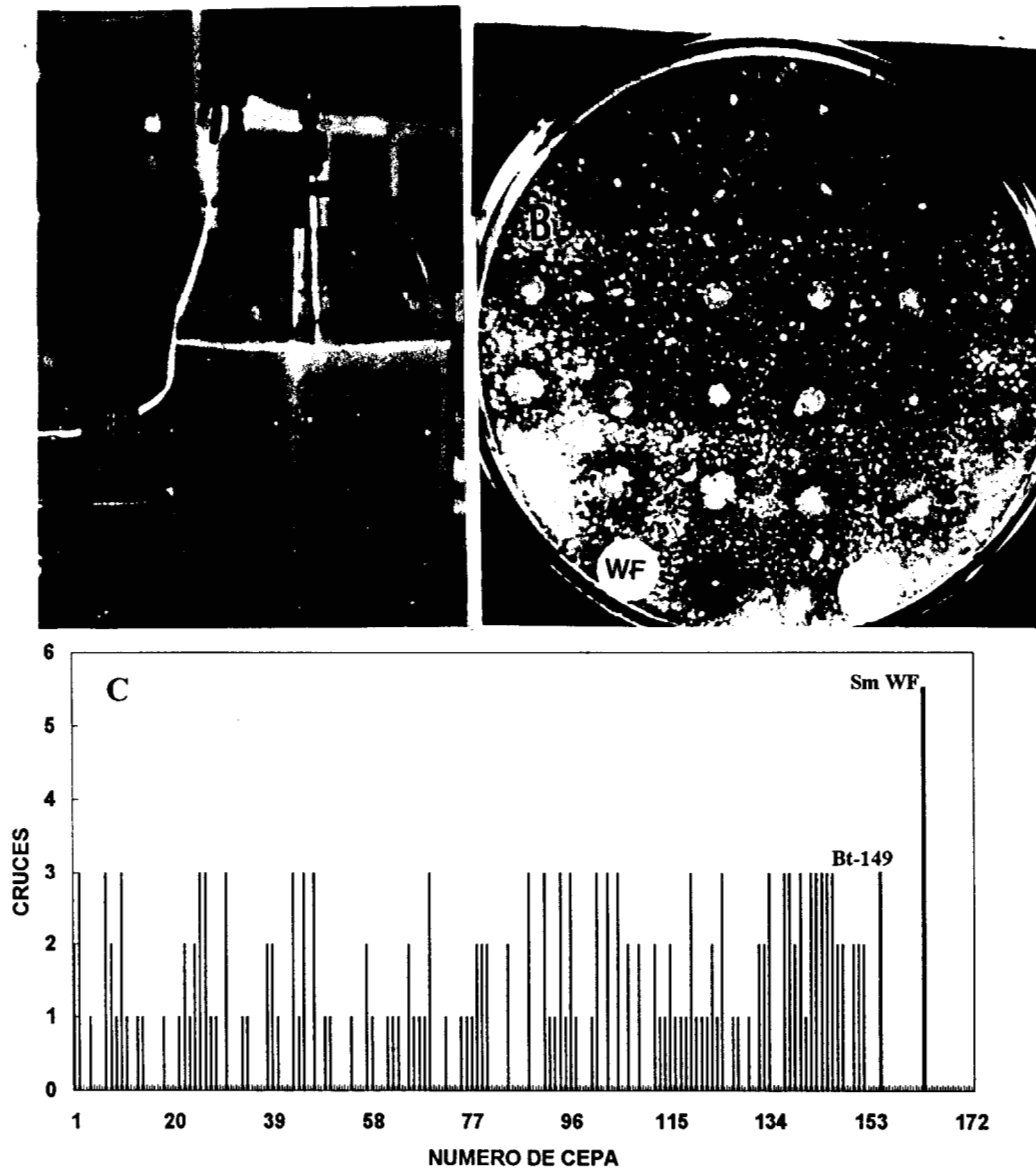


Fig. 9. Preparación de quitina coloidal mediante tratamiento de quitina nativa con ácido fosfórico (A). Las colonias quitinolíticas muestran halos transparentes en su periferia en un medio adicionado de quitina coloidal (B). La gráfica C muestra el perfil de quitinasas en una colección de 152 cepas de *B. thuringiensis*.

Tabla 3. Selección primaria de cepas promisorias, por su capacidad formadora de cristal, y altas actividades de caseinasa, queratinasa y quitinasa, a partir de una colección de 152 cepas de *Bacillus thuringiensis*.

CEPA	CRISTAL	CASEINASA (cruces)	QUERATINASA As 585 nm	QUITINASA (mm)
Bt-1	+	3	0.061	2
Bt-2	-	3	0.511	3
Bt-3	+	3	0.011	0
Bt-4	+	3	0.051	1
Bt-5	+	1	0.001	0
Bt-6	+	0	0.001	0
Bt-7	+	3	0.076	3
Bt-8	+	3	0.013	2
Bt-9	+	3	0.071	1
Bt-10	+	3	0.013	3
Bt-11	-	3	0.013	1
Bt-12	-	3	0.006	0
Bt-13	+	2	0	1
Bt-14	+	3	0.003	1
Bt-15	+	3	0.021	0
Bt-16	+	0	0.086	0
Bt-17	-	0	0.01	0
Bt-18	+	2	0.009	1
Bt-19	+	1	0.080	0
Bt-20	+	2	0.085	0
Bt-21	+	3	0.084	1
Bt-22	+	3	0.145	2
Bt-23	-	3	0.009	1
Bt-24	-	3	0.052	2
Bt-25	-	5	0.245	3
Bt-26	-	5	0.441	3
Bt-27	+	3	0	1
Bt-28	-	3	0.063	1
Bt-29	-	3	0	0
Bt-30	-	5	0.366	3
Bt-31	-	3	0.086	0
Bt-32	-	0	0.02	1
Bt-33	+	3	0.371	1
Bt-34	-	5	0.332	1
Bt-35	+	0	0.048	0
Bt-36	+	5	0	0
Bt-37	+	0	0	0
Bt-38	+	3	0.319	2
Bt-39	+	3	0	2
Bt-40	-	5	0.226	1

Tabla 3 (continuación)

CEPA	CRISTAL	CASEINASA (cruces)	QUERATINASA As 585 nm	QUITINASA (mm)
Bt-41	+	3	0.032	0
Bt-42	-	3	0.004	0
Bt-43	+	5	0.650	3
Bt-44	+	2	0.043	1
Bt-45	+	5	0.213	3
Bt-46	-	2	0.014	0
Bt-47	+	2	0	3
Bt-48	+	2	0.057	0
Bt-49	-	2	0.070	1
Bt-50	+	2	0	1
Bt-51	-	2	0.002	0
Bt-52	-	3	0.021	0
Bt-53	-	0	0	1
Bt-54	-	3	0.064	1
Bt-55	+	0	0	0
Bt-56	-	2	0.024	0
Bt-57	+	3	0.024	2
Bt-58	+	5	0.070	1
Bt-59	+	3	0.007	0
Bt-60	-	0	0.006	0
Bt-61	-	3	0.343	1
Bt-62	-	3	0.025	1
Bt-63	-	3	0.34	1
Bt-64	-	0	0	1
Bt-65	-	4	0.063	2
Bt-66	+	3	0.029	1
Bt-67	+	1	0	1
Bt-68	+	2	0.006	1
Bt-69	-	2	0.004	3
Bt-70	-	3	0	0
Bt-71	+	3	0	0
Bt-72	-	3	0.021	1
Bt-73	-	0	0	1
Bt-74	+	2	0	0
Bt-75	+	3	0.013	1
Bt-76	-	2	0.123	1
Bt-77	-	3	0.014	1
Bt-78	-	5	0.357	2
Bt-79	+	3	0.245	2
Bt-80	+	5	0.081	2

Tabla 3 (continuación)

CEPA	CRISTAL	CASEINASA (cruces)	QUERATINASA As 585 nm	QUITINASA (mm)
Bt-81	-	3	0.019	0
Bt-82	-	2	0.027	0
Bt-83	-	2	0.007	0
Bt-84	-	2	0	0
Bt-85	-	2	0.004	0
Bt-86	-	3	0.020	0
Bt-87	-	0	0.470	0
Bt-88	-	3	0.026	3
Bt-89	-	0		0
Bt-90	-	2	0.026	0
Bt-91	-	3	0.284	3
Bt-92	-	2	0.351	1
Bt-93	+	4	0.089	1
Bt-94	+	5	0.460	3
Bt-95	+	5	0.030	1
Bt-96	+	5	0.490	3
Bt-97	+	2	0.367	1
Bt-98	+	2	0.100	0
Bt-99	+	2	0.090	0
Bt-100	-	2	0.400	1
Bt-101	+	2	0.530	3
Bt-102	-	2	0.057	0
Bt-103	+	5	0.317	3
Bt-104	-	2	0.150	0
Bt-105	+	5	0.514	3
Bt-106	+	2	0.784	0
Bt-107	+	5	0.610	2
Bt-108	-	0	0	1
Bt-109	-	3	0.182	2
Bt-110	+	2	0.071	0
Bt-111	-	2	0.051	0
Bt-112	+	5	0.510	2
Bt-113	-	5	0.125	1
Bt-114	-	2	0.120	1
Bt-115	+	5	0.080	2
Bt-116	-	4	0.361	1
Bt-117	+	2	0.040	1
Bt-118	-	4	0.402	1
Bt-119	+	3	0.100	3
Bt-120	-	3	0.060	1

Tabla 3 (continuación)

CEPA	CRISTAL	CASEINASA (cruces)	QUERATINASA As 585 nm	QUITINASA (mm)
Bt-121	+	5	0.451	1
Bt-122	+	2	0.061	1
Bt-123	+	2	0.145	2
Bt-124	+	3	0.090	1
Bt-125	+	5	0.080	3
Bt-126	+	3	0.045	0
Bt-127	+	2	0.130	1
Bt-128	+	3	0.054	1
Bt-129	-	3	0.140	0
Bt-130	-	2	0.120	1
Bt-131	+	3	0.090	0
Bt-132	+	5	0.062	2
Bt-133	+	2	0.070	2
Bt-134	-	2	0.451	3
Bt-135	+	2	0.072	0
Bt-136	+	2	0.060	0
Bt-137	-	5	0.934	3
Bt-138	-	5	0.661	3
Bt-139	+	0	0.637	2
Bt-140	-	2	0.960	3
Bt-141	-	2	0.115	1
Bt-142	-	2	0.587	3
Bt-143	-	5	0.707	3
Bt-144	-	5	0.677	3
Bt-145	-	1	0.270	3
Bt-146	-	3	0.090	3
Bt-147	-	3	0.01	2
Bt-148	-	3	0.095	2
Bt-149	-	5	0.695	3
Bt-150	+	3	0.090	2
Bt-HD-1	+	3	0.030	2
Bt-HD-73	+	2	0.023	2
<i>Sm WF</i>		3	0.900	5.5

Tabla 4. Actividades enzimáticas de las ocho cepas cristalíferas más promisorias escogidas a partir de una selección primaria con 152 cepas de *Bacillus thuringiensis*.

Cepa	actividad de caseinasa ¹	actividad de queratinasa ²	actividad de quitinasa ¹
Bt-43	5	0.650	3
Bt-45	5	0.213	3
Bt-94	5	0.460	3
Bt-96	5	0.490	3
Bt-103	5	0.317	3
Bt-105	5	0.514	3
Bt-107	5	0.610	2
Bt-112	5	0.510	2
Bt-149 ³	5	0.695	3
<i>S. marcescens</i> WF ³	3	0.900	5-6

¹, escala arbitraria; ², AS₅₈₅ ³, cepas de referencia

3.2 Selección secundaria

Como ya se indicó, con los datos anteriores fue posible escoger ocho cepas que siendo cristalogénicas, presentaban una alta actividad proteolítica (caseinolítica y queratinolítica), así como una buena actividad de quitinasa (Tabla 4). Sin embargo, tomando en cuenta que para el proceso fermentativo se utilizarían desechos proteín-quitinosos suspendidos en agua de la llave como fuente de carbono y nitrógeno, fue necesario realizar una nueva selección con dichas cepas, haciéndolas crecer en matraces conteniendo dicho medio, y estudiando el curso cinético de la liberación de la proteasa. En la Figura 10 se muestran los datos obtenidos con las cuatro cepas que produjeron niveles de proteasa inferiores a los de la cepa Bt-149, que es el patrón de referencia, y aún más proteolítica que *S. marcescens* WF. Estas cepas fueron descartadas. En la Figura 11 se consignan las cinéticas de producción de proteasa de las cuatro cepas restantes, todas ellas de tipo acampanado, mostrando una máxima producción de proteasa entre las 25-30 h de incubación. Todas las cinéticas mostraron un comportamiento similar al del patrón proteolítico Bt-149, pero a diferencia de éste, tales cepas sí son cristalogénicas. En esta fase de la investigación se escogieron las cepas Bt-103 y Bt-112, por haber sido consistentemente las más proteolíticas en los diferentes experimentos realizados.

También se hicieron estudios cinéticos de la producción de proteasas en un medio de carapacho de camarón al 2% en agua de suministro, con las cepas patrón HD-1 y HD-73, las cuales son utilizadas comercialmente para la producción de bioinsecticidas. Los datos obtenidos mostraron que las cepas Bt-149, Bt-112 y Bt-103 presentan cinéticas muy similares (Figura 12), con una elevada producción de proteasa (260 UP/ml) entre las 25 y 30 h de incubación. La cepa HD-1 es comparativamente poco proteolítica, en tanto que la HD-73

llega a alcanzar hasta 220 UP/ml a las 30 h de incubación y puede por consiguiente considerarse buena.

La actividad quitinolítica de las cepas de Bt mencionadas, también se evaluó en este medio de carapacho de camarón; sin embargo, los niveles más altos que se obtuvieron fueron de 2 UQ/ml, en contraste con la cepa de referencia *S. marcescens WF*, la cual produjo entre 30 y 40 UQ/ml.

En suma, después de las selecciones primaria y secundaria, quedaron dos cepas igualmente interesantes, la Bt-103 y la Bt-112.

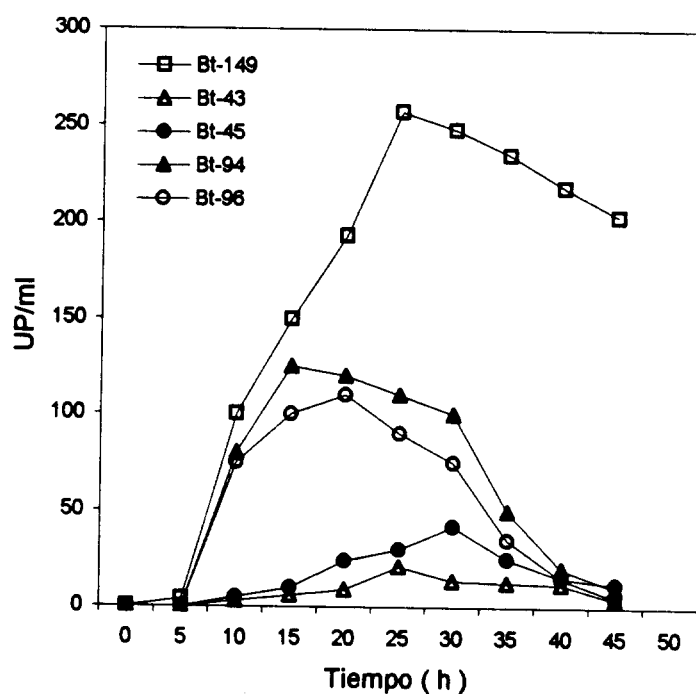


Fig. 10. Cinéticas de secreción de proteasas en un medio a base de carapacho de camarón al 2% en agua de suministro, de las cepas de *B. thuringiensis* que mostraron menor actividad que la cepa de referencia Bt-149.

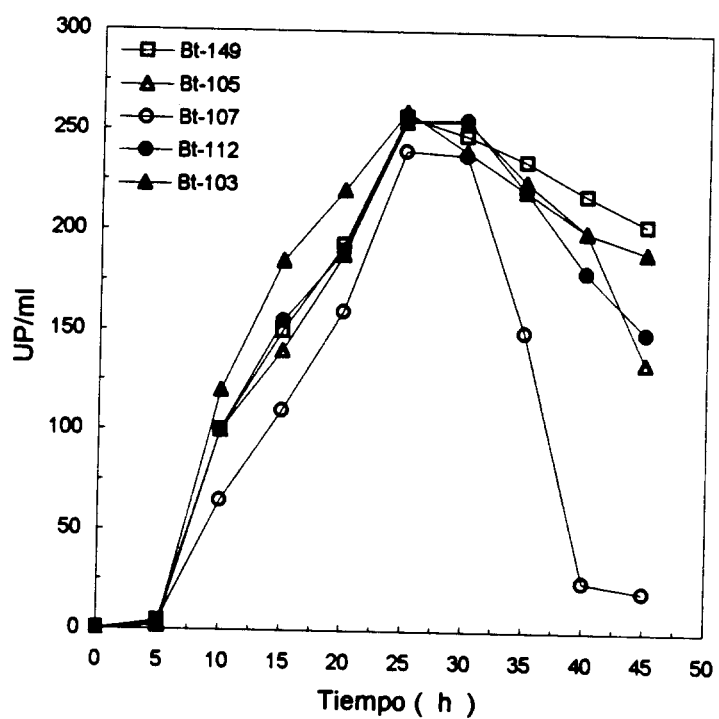


Fig. 11. Cinéticas de secreción de proteasas en un medio a base de carapacho de camarón al 2% en agua de suministro, de las cepas de *B. thuringiensis* que mostraron una actividad similar a la de la cepa de referencia Bt-149.

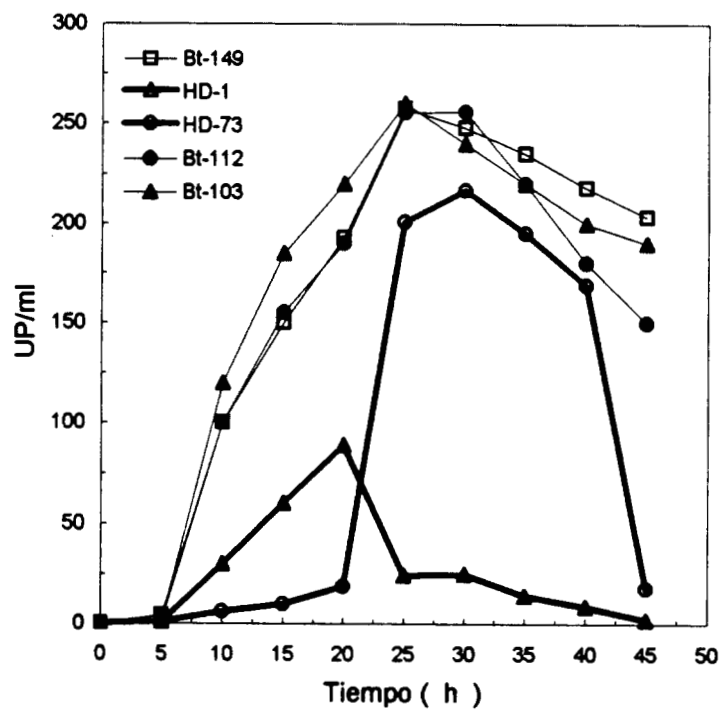


Fig. 12. Comparación de la actividad proteolítica secretada en un medio a base de carapacho de camarón al 2% en agua de suministro entre las cepas seleccionadas Bt-103 y Bt-112 y las cepas patrón HD- 1 y HD-73.

3.3 Selección terciaria

3.3.1 Actividad insecticida de los cristales proteicos de Bt-103 y Bt-112

Como fue señalado previamente, la cepa a utilizar en el aprovechamiento de los desechos de camarón, debía no sólo producir un elevado y adecuado balance de enzimas proteoquitinolíticas, sino que además sus cristales debían ser tóxicos para algunos de los insectos usados como modelo de dípteros, coleópteros y lepidópteros. Para realizar estos bioensayos fue necesario primero purificar los cristales de las cepas Bt-103 y Bt-112, escogidas en la selección secundaria. Al respecto se encontró que el rendimiento de los cristales purificados a partir de autolisados de la cepa Bt-112, fue mucho más alto (400 a 500 mg/500 ml de medio de cultivo), que el obtenido con autolisados de la cepa Bt-103. El rendimiento en el último caso, fue más difícil de medir, debido a que los cristales fueron difíciles de purificar debido a que los cristales se encontraban fuertemente asociados a la espora y no fue posible separarlos, no obstante el complejo espora cristal fue utilizado en los bioensayos.

La actividad insecticida de los cristales purificados de las dos cepas previamente seleccionadas (Bt-103 y Bt-112), fueron probados contra larvas de *Manduca sexta*, *Aedes aegypti* y *Leptinotarsa texana* de acuerdo a los protocolos resumidos en las figuras 13, 14 y 15, realizando primero ensayos “gruesos” (dosis altas de 10 µg, 1 µg y 100 ng), las cuales probaron que sólo los cristales purificados de la cepa Bt-112 eran tóxicos hacia *Manduca sexta*, en tanto que las esporas-cristales de Bt-103 resultaron inactivos en todos los casos. Los resultados correspondientes a esta parte de la investigación se resumen en la Tabla 5.

Con objeto de establecer el adecuado nivel de toxicidad de la cepa Bt-112 contra *Manduca sexta*, se realizaron una serie de bioensayos para estimar la concentración letal media (CL_{50}). En la Tabla 6, se muestran los resultados obtenidos al hacer los ensayos, encontrando una CL_{50} de 458 ng/cm², estimado por un análisis Probit de cuatro repeticiones. Se observó una variación muy pequeña entre las repeticiones y la desviación estándar (D.S. = 57.35) y el coeficiente de variación fue muy bajo (C.V.= 12.5 %). Si bien los primeros bioensayos en crudo parecían indicarnos una actividad tóxica muy elevada, después de hacer el análisis Probit con las debidas repeticiones, se encontró que la cepa Bt-112 presenta una actividad moderada contra *Manduca sexta* en relación a la cepa de referencia Bt-HD-1.

Con estos resultados, fue evidente que la cepa seleccionada para realizar los estudios de producción de proteasa, fue la Bt-112, por lo que se decidió terminar de caracterizarla en cuanto a su perfil electroforético de plásmidos y proteínas cry, y la ultraestructura de sus cristales al microscopio electrónico. A pesar de que la cepa Bt-103 no resultó tóxica, se determinaron también sus características, sobre todo tomando en cuenta que los estudios podrían realizarse al mismo tiempo que los de Bt-112.

BIOENSAYOS PARA UN COLEOPTERO

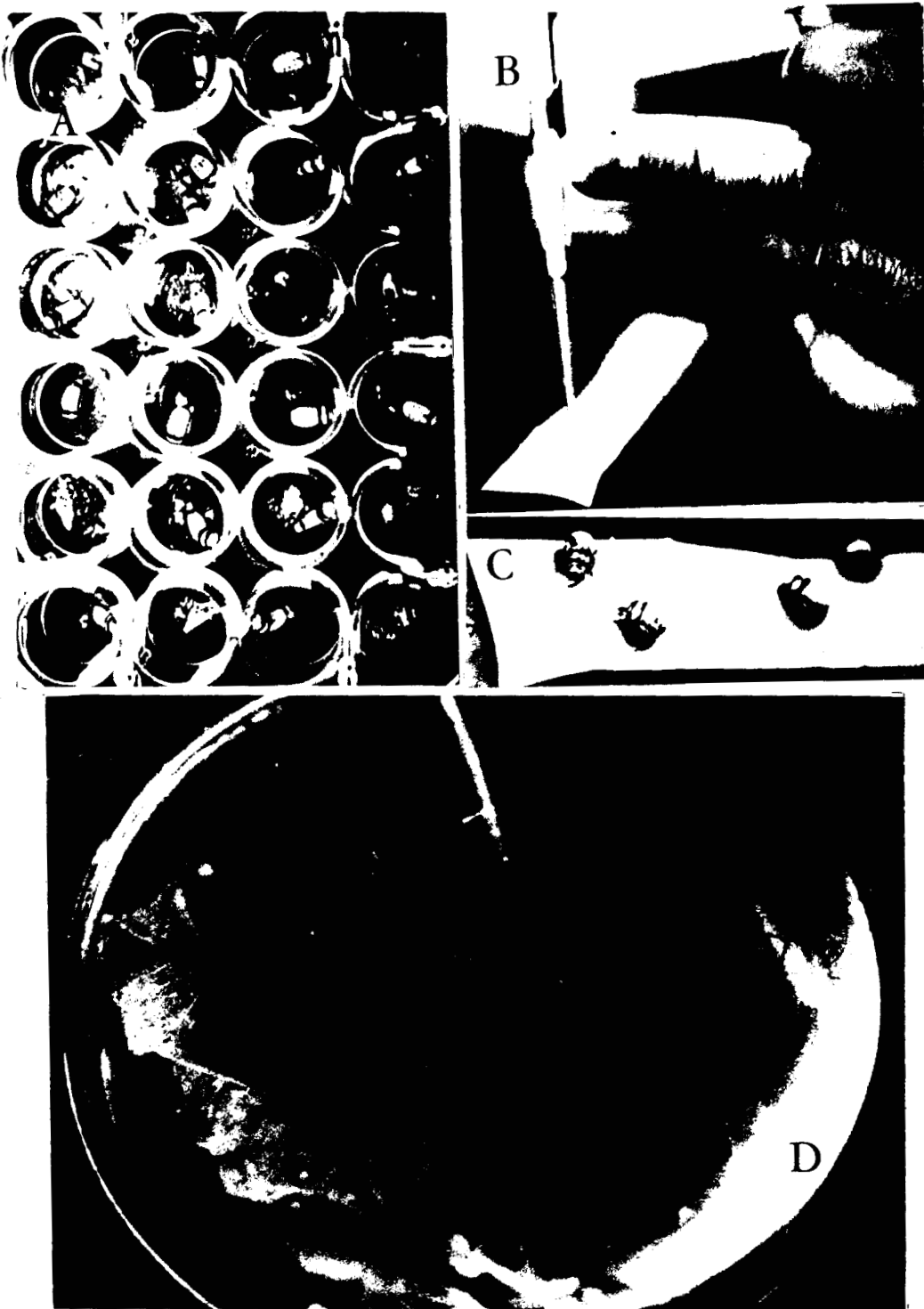


Fig. 13. Ensayo biológico para evaluar la toxicidad de los cristales de las cepas Bt-103 y Bt-112. Larvas de *Leptinotarsa texana* de 3^{er} instar (coleóptero) se confinan para un ayuno forzado (A). Los cristales o complejo espora-cristal se dosifican en gotas de 2 μ l sobre papel encerado (B). La prueba se realiza con 10 individuos que se pesan como grupo. Después de que cada catarinita bebe de su respectiva gota (C), el grupo es colocado en cajas con suficiente alimento. La pérdida de peso evaluada a las 24, 48 y 72 h deberá observarse cuando el ensayo es positivo.

BIOENSAYO PARA UN DIPTERO

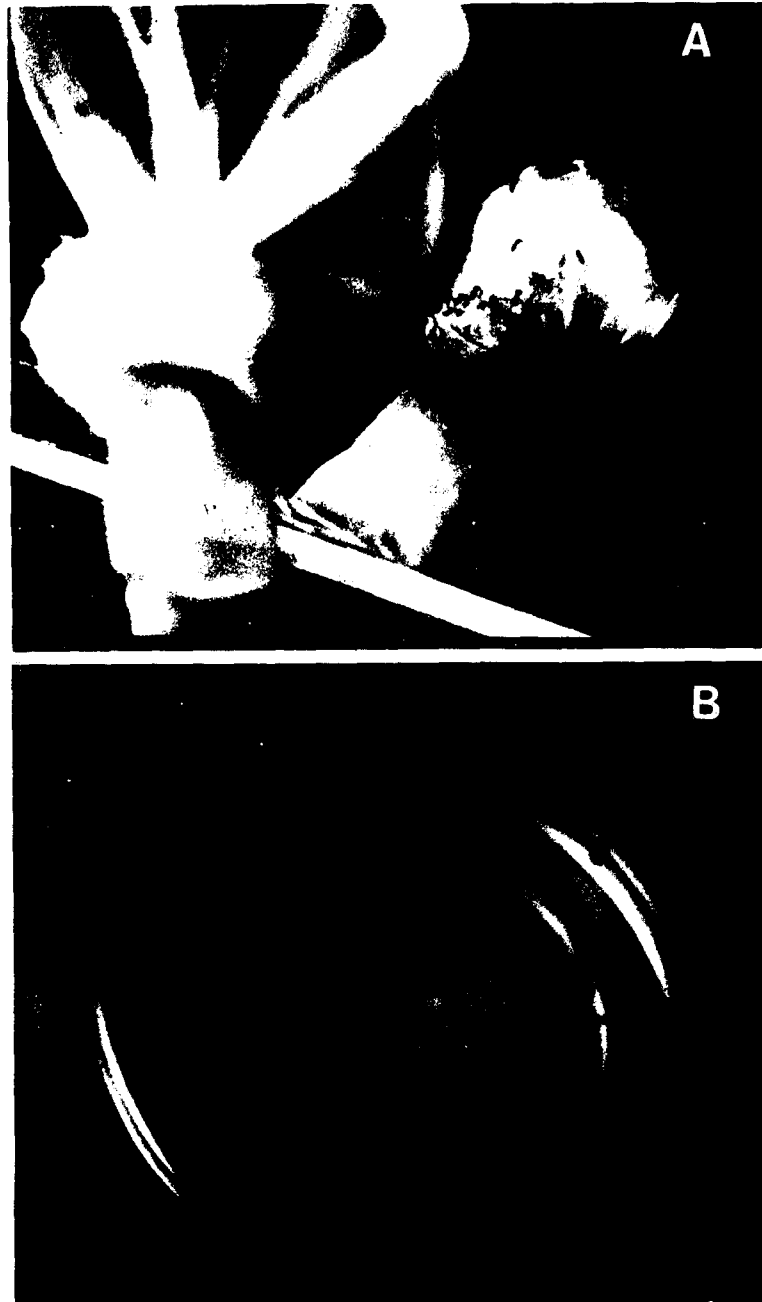


Fig. 14. En la parte A se muestra como son mantenidos los mosquitos de *Aedes aegypti* dentro de espacios cerrados, donde son alimentados introduciéndoles ratones inmovilizados con una tela, y rasurados en una parte de su cuerpo; el roedor es retirado después de que los mosquitos chupan su sangre. Los insectos eclosionan dentro de vasitos con agua y se desarrollan las larvitas, que luego son usadas para los bioensayos (parte B), introduciéndolos en agua conteniendo dosis conocidas de cristales o complejos espora - cristal.

BIOENSAYO PARA UN LEPIDOPTERO

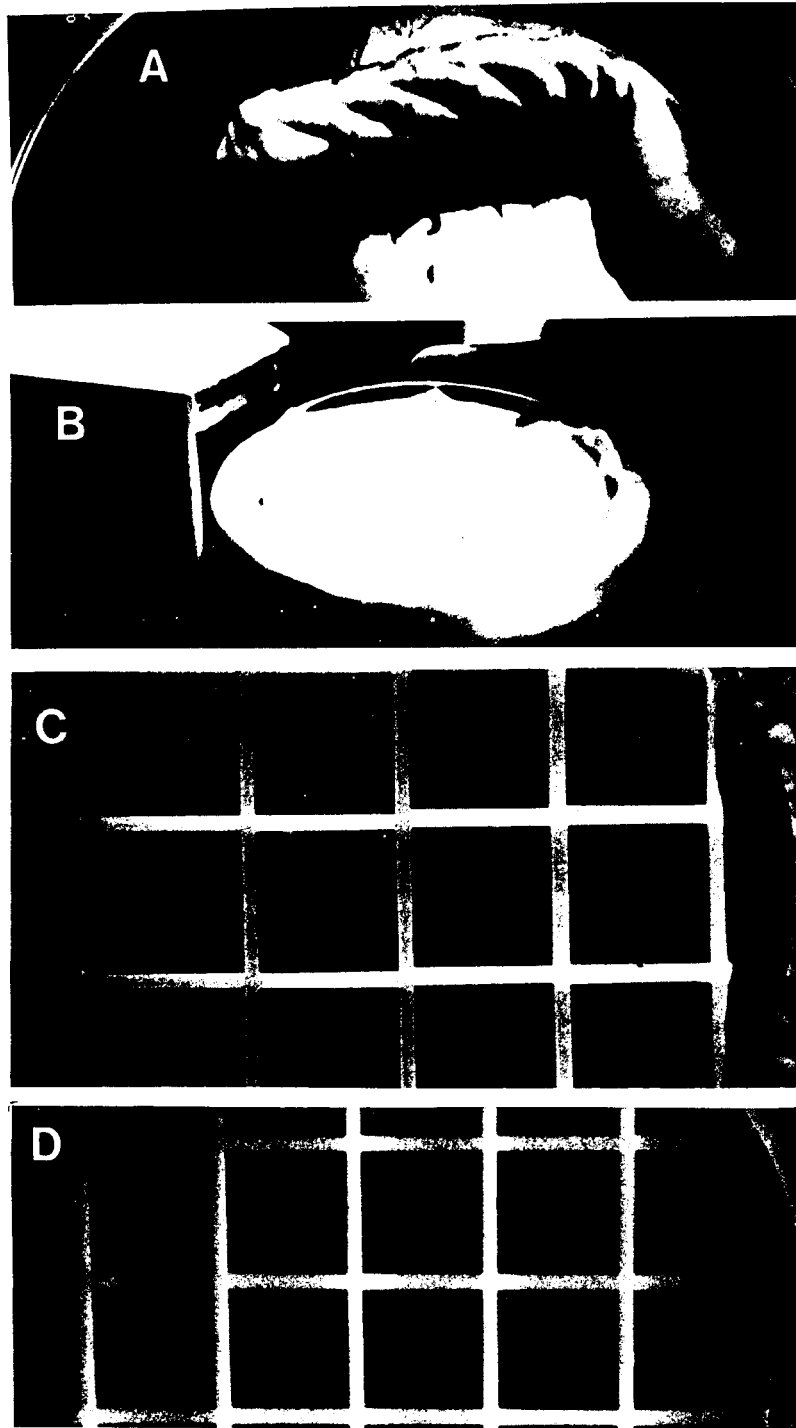


Fig. 15. Bioensayo de la toxicidad de los cristales de *B. thuringiensis*. En la parte A se muestra el aspecto del gusano adulto de *Manduca sexta* o gusano del tabaco. Las larvas de este lepidóptero se colocan sobre una capa gelificada conteniendo un alimento especial más las dosis a ensayar de las suspensiones tóxicas (B). Las larvas se acomodan dentro de rejillas individuales (C), y se dejan bajo condiciones de temperatura, iluminación y humedad relativa controladas durante 7 días, cuando se hace el conteo de mortalidad (D).

Tabla 5. Resumen de los resultados obtenidos al realizar ensayos “burdos” sobre el efecto bioinsecticida de los cristales de Bt-112 contra tres insectos modelo.

DOSIS EMPLEADA DE CRISTALES	LEPIDOPTERO <i>Manduca sexta</i>⁺	DIPTERO <i>Aedes aegypti</i>	COLEOPTERO <i>Leptinotarsa texana</i>
10 µg/cm² o ml	100 % mortalidad	sin efecto	sin efecto
1 µg/cm² o ml	100 % mortalidad	sin efecto	sin efecto
100 ng/cm²	99 % mortalidad	sin efecto	sin efecto

+ se usó como referencia la cepa patrón internacional HD-1

* Con la cepa Bt-103 no hubo efecto tóxico en ningún caso.

Table 6. Parámetros estadísticos de los bioensayos realizados con los cristales de *Bacillus thuringiensis* (Bt-112), sobre larvas de primer instar de *Manduca sexta*.

R	n	pendiente±ES	CL ₅₀ * (95% LC)	χ ²
1	150	3.4±0.8	480.5 (356-650)	5.8
2	150	2.8±0.57	393.6 (293-529)	2.1
3	150	2.2±0.54	525.9 (330-837)	4.8
4	150	3.0±0.65	433.3 (321-585)	3.82
CL ₅₀ = 458 ng/cm ²			DS= 57.4	CV=12.5%

R, repetición; n, larvas totales por repetición; ES, error estándar; *, ng/cm² agar-alimento para insectos; LC, limite de confianza; χ², valor de chi cuadrada; DE, desviación estándar; CV, coeficiente de variación.

3.4 Caracterización de la cepas Bt-103 y Bt-112

3.4.1 Perfil electroforético de plásmidos y proteínas cry

Algo importante a destacar es que los cristales de Bt-112 mostraron un forma bipiramidal típica y lograron purificarse adecuadamente. Los de Bt-103 mostraban mediante microscopía óptica, una forma aparentemente bipiramidal pero de menor tamaño que la Bt-112. Cuando los cristales de la cepa Bt-112 fueron analizados para determinar su composición proteica, mediante electroforésis en geles de poliacrilamida SDS, se observó una proteína mayor muy cercana a los 130 kDa y dos menores entre 65 y 70 kDa (Figura 16). Este perfil fue muy similar en la migración de sus bandas con la cepa HD-1, por lo cual se pensó que pudiera tratarse de la misma variedad, sin embargo al observar su patrón plasmídico (Figura 17), éste fue muy peculiar ya que presentaba 4 plásmidos de 5.8, 7, 8.7 y 34 MDa (también se observan otras bandas correspondientes a DNA de cadena abierta), por lo que podemos inferir que se trata de una nueva cepa cuyo perfil de plásmidos aún no se ha reportado. El perfil de proteínas cry de la cepa Bt-103 no se pudo obtener, esto debido a que sus cristales se encontraban fuertemente unidos a la espora y fueron difíciles de purificar, sin embargo se pudo determinar su perfil de plásmidos. Los resultados muestran que esta cepa presenta un plásmido apenas aparente de 80 MDa, y uno bien definido de 47 MDa. En la Figura 17 se muestra el bien conocido perfil de plásmidos de la cepa HD-1, la IPS-82, Bt-112 y la cepa Bt-103.

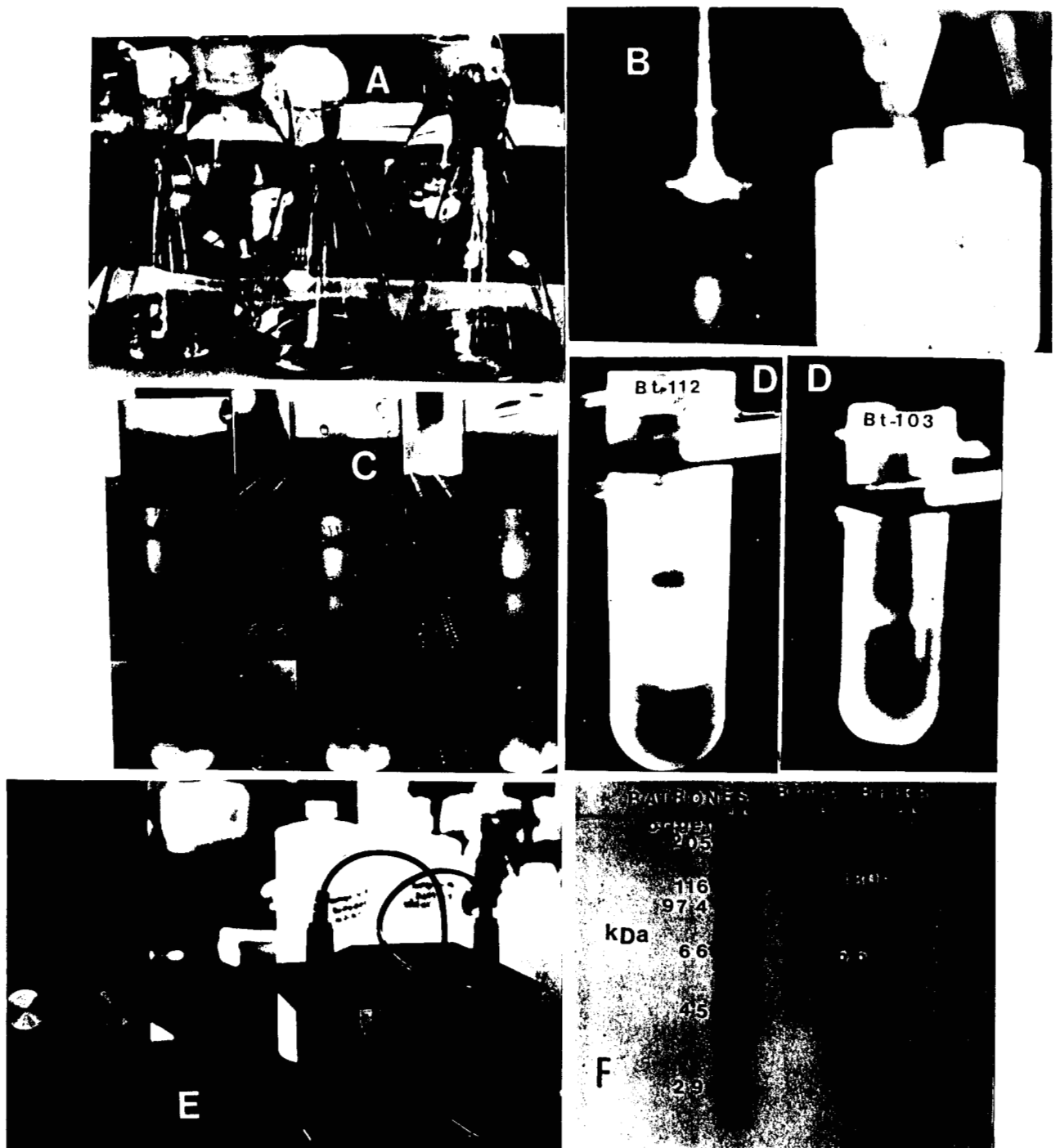


Fig. 16. Etapas principales para la purificación de los cristales proteicos intracelulares de las cepas Bt-103 y Bt-112, para luego determinar el perfil electroforético de sus proteínas cry. Las células se cultivan primero en el medio de leche peptonizada hasta su autólisis (A). Después el autólisis contenido los cristales se separa y se lava varias veces por centrifugación (B). Luego se centrifugan sobre un gradiente discontinuo de sacarosa de 59-79 % (C). Los cristales se ubican en bandas entre 63 y 67 % de sacarosa (D). La electroforésis de las proteínas cry presentes en los cristales purificados y solubilizados, se realiza en gel de poliacrilamida (10 %) y SDS (E). En F, se tienen los patrones de peso molecular y los correspondientes a las proteínas cry de Bt-112, en el caso de Bt-103 no fue posible determinarlos ya que el cristal se encontraba asociado fuertemente a la espóra.

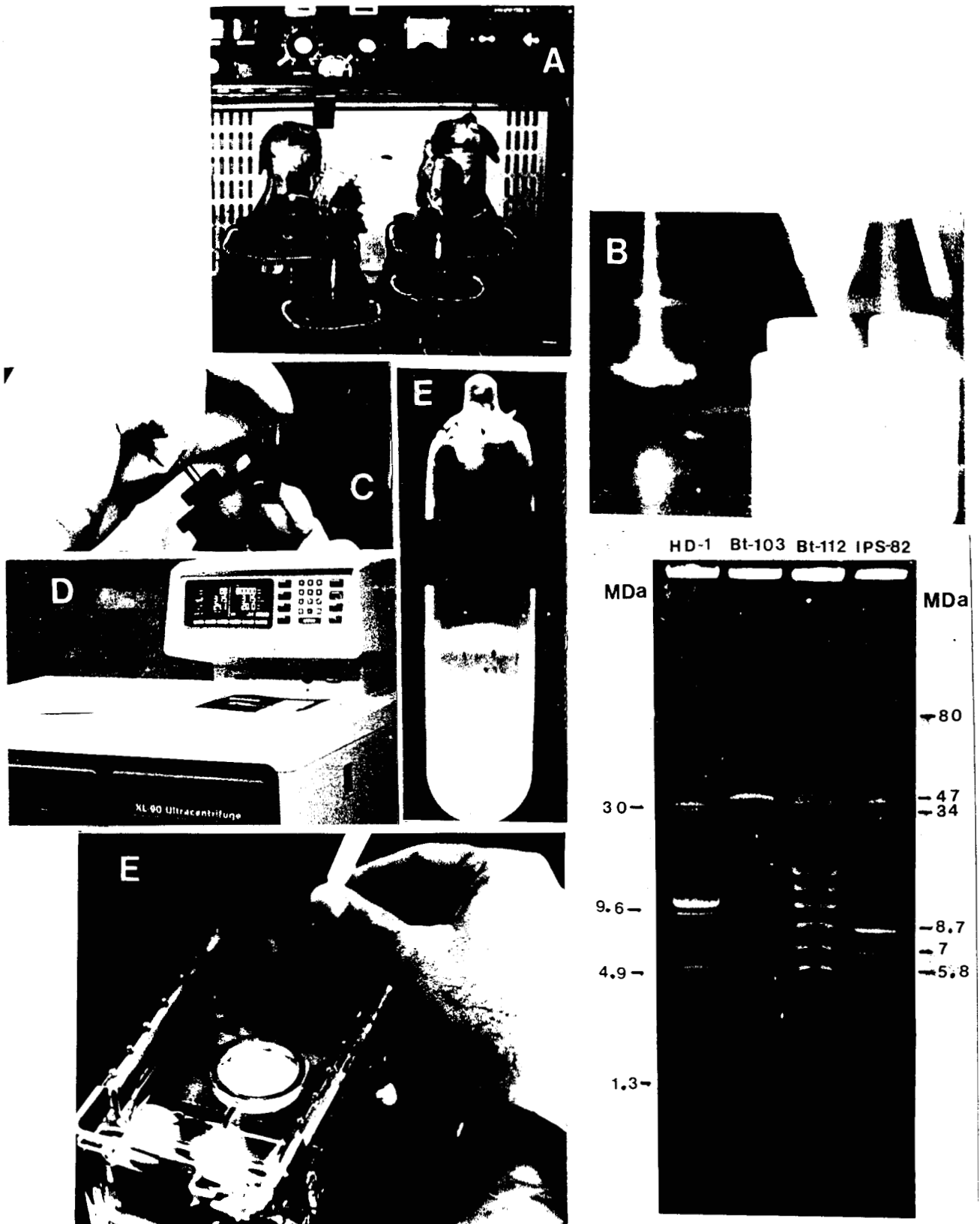


Fig. 17. Arreglo fotográfico que muestra algunos de los pasos seguidos para aislar los plásmidos de Bt-103 y Bt-112. Las células se cultivan en un medio pobre y por un lapso de apenas 2-3 h (A). Estas se separan y se lisan en pasos consecutivos con lisozima y NaOH-SDS (B). El DNA plasmídico se depura en varios pasos y se mezcla suavemente con bromuro de etidio (C). Luego se coloca en tubos Quick seal sobre un gradiente de cloruro de cesio y se centrifuga a 80,000 rpm (D). La banda correspondiente a los plásmidos se somete a una separación electroforética sobre un gel de agarosa (E). En F, se observa el perfil de plásmidos característicos de las cepas de referencia, HD-1 e IPS-82, así como los de Bt-103 (47 y 80 MDa) y Bt-112 (5.8, 7, 8.7 y 34 MDa).

3.4.2 Morfología del cristal

Mediante microscopía electrónica se pudo demostrar que la cepa Bt-112 produce cristales típicos de forma bipiramidal con inclusiones cuadradas y cúbicas, las cuales parcialmente penetran los cristales bipiramidales. El tamaño del cristal es de 1.77 μm de largo por 0.7 μm de ancho. Cabe destacar que también fueron observados otros cuerpos de forma redonda que algunas veces aparecen pegados al cristal, pero no fue posible identificarlos (Figuras 18 A y B).

Por otra parte, a pesar de que la cepa Bt-103 no resultó tóxica, se creyó interesante determinar las características de sus cristales, encontrando que presentó un sorprendente polimorfismo, pues sus cristales tenían formas bipiramidales, en forma de flama y salchichas cortas. Sus tamaños variaron entre 670 y 705 nm, y siempre se encontraron asociados a la espora. Las esporas tenían generalmente 529 nm de largo (Figuras 19 A hasta D). Los cristales de esta cepa si bien no tuvieron actividad tóxica en los bioensayos realizados, si parecen tener gran interés por sus peculiaridades morfológicas.

3.4.3 Serotipificación

Esta parte del trabajo fue realizada por la Dra. Marguerite Lecadet en el Instituto Pasteur en Francia, que es el Centro Internacional de referencia para la tipificación de las cepas de *B. thuringiensis*. Los resultados mostraron, que los antígenos flagelares de la cepa Bt-112 mostraron reacción cruzada con el antisuero de la serovariedad *tolworthi* y la cepa Bt-103 resultó ser variedad *finitimus*.

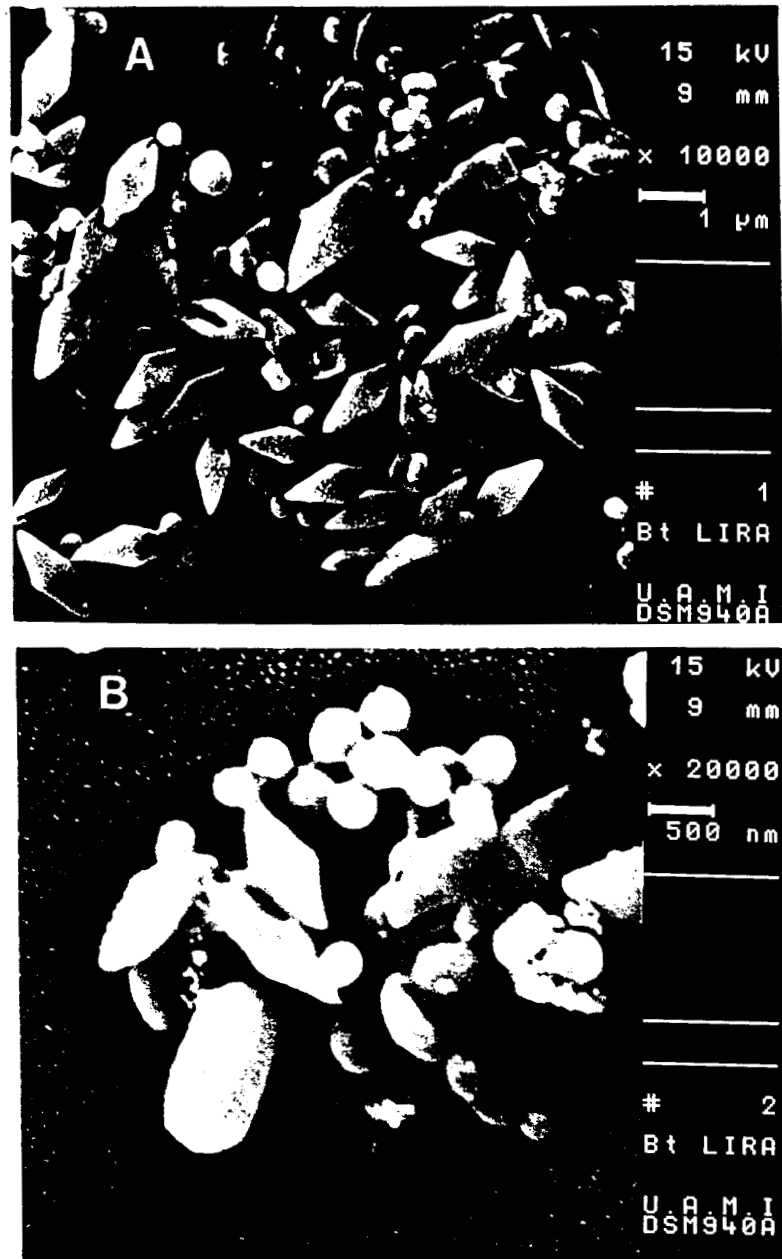


Fig. 18. Fotografías al microscópio electrónico de barrido, de los cristales proteicos e inclusiones intracelulares de la cepa Bt-112. Estos cristales resultaron ser tóxicos hacia *Manduca sexta*. Ampliación 10 000 y 20 000 X (A, B).

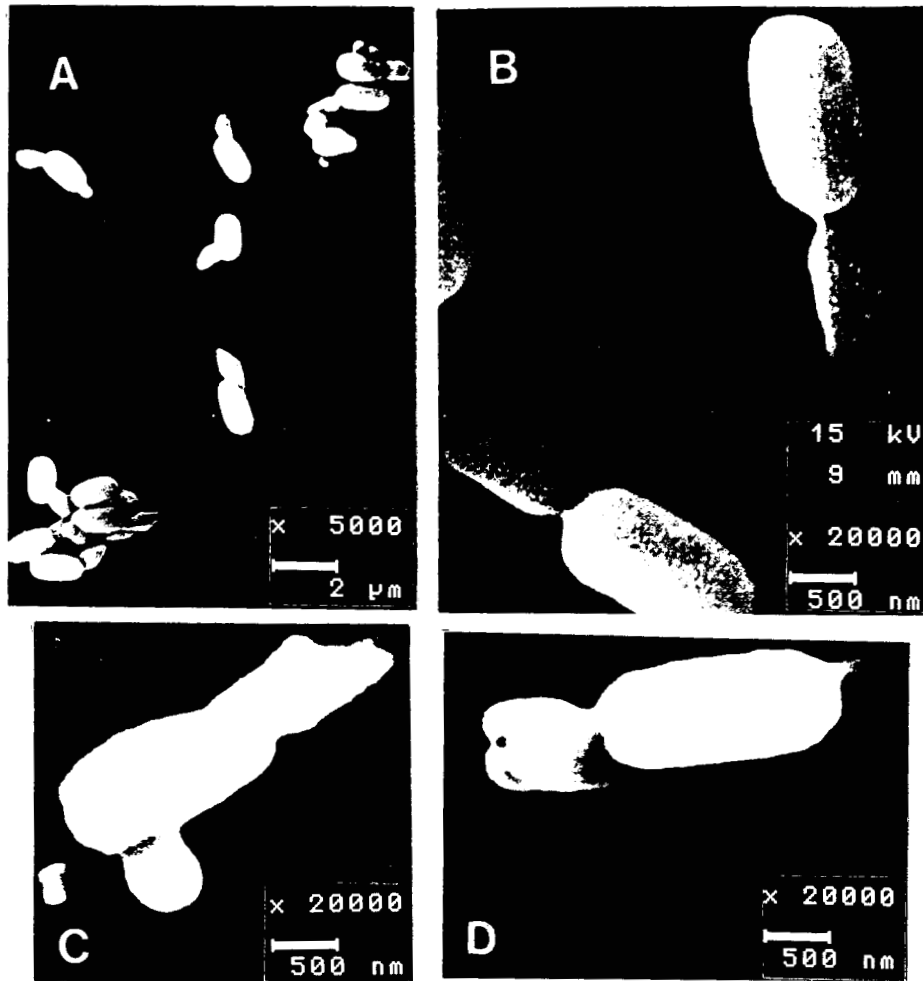


Fig. 19. Fotografías al microscópio electrónico de barrido, de las inclusiones proteicas intracelulares de Bt-103. En las figuras A y B , pueden verse algunos cristales bipiramidales (5 000 y 20 000 X), asociados a la espora. En C y D, se observan cristales con formas atípicas (20 000 X), ambos unidos a la espora.

3.4.4 Producción de β - exotoxina

Como ya se explicó en el capítulo de materiales y métodos, el bioensayo para determinar beta-exotoxina se realiza utilizando larvas de *Musca domestica*, las cuales se ponen en contacto con un lisado celular de *B. thuringiensis*. Los resultados mostraron que todas las larvas emergieron sin problema alguno y no presentaron ninguna anomalía, por lo que los resultados fueron negativos (Figura 20). Un resultado positivo indicaría que Bt-112 podría ser potencialmente tóxica hacia mamíferos, por lo tanto, Bt-112 puede ser empleada en procesos biotecnológicos sin problema alguno.

Con este experimento, concluyó una larga serie de estudios, conducentes a la selección y caracterización de una cepa de *B. thuringiensis* capaz de crecer en medios a base de desperdicios de camarón, en los que produce cristales con acción bioinsecticida hacia *Manduca sexta*, así como altas concentraciones de proteasa y quitinasa. Dicha cepa resultó ser *B. thuringiensis* serovar. *tolworthi*.

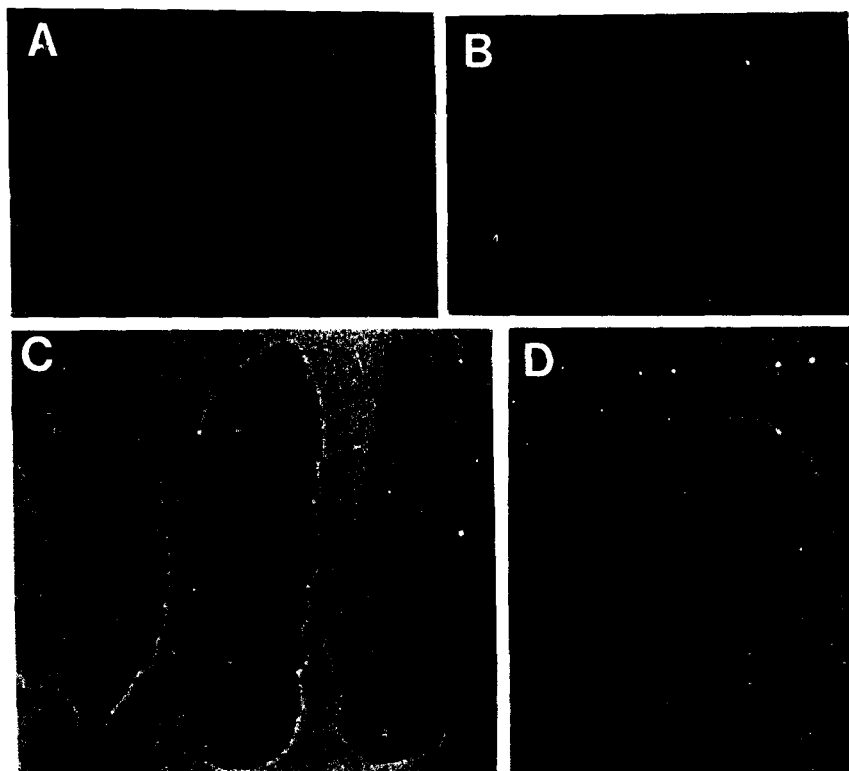


Fig. 20 Bioensayo para determinar la producción de β -exotoxina por cepas de *B. thuringiensis*.

En A se observan larvas de *Musca domestica* sobre una placa de agar nutritivo para métodos estándar, conteniendo un autolizado de la cepa Bt-112. En B se muestra el aspecto de las larvas de este mismo insecto sobre una placa, pero sin el autolizado. En C se observa la apariencia que presentan las pupas cuando hay daño por la β -exotoxina, y en D se puede ver el aspecto de las pupas normales. En el caso de Bt-112 los resultados fueron negativos, todas las pupas fueron normales y los adultos emergieron.

**SEGUNDA PARTE. INVESTIGACION DEL MEDIO DE CULTIVO, Y
CONDICIONES PROPICIAS PARA LA MAYOR PRODUCCION DE LA
PROTEASA EXTRACELULAR DE Bt-112, EN MEDIOS A BASE DE
DESECHOS DE CAMARON.**

3.5 Estudio de la materia prima

En la Tabla 7 se muestran los resultados de los análisis bromatológicos efectuados con las muestras colectadas de Alvarado, Ver., la Viga y de una harina comercial. Los datos obtenidos indican un bajo contenido de humedad en las muestras, particularmente en el carapacho procedente de la Viga (4.62%) en relación a las muestras de Alvarado (9.085 %) y la harina comercial (8.25 %). El contenido de grasas (extracto etéreo) fue muy similar en las muestras de carapacho colectadas y procesadas en el laboratorio (1.45 % la Viga; 1.38 % Alvarado). Estos valores fueron significativamente inferiores al encontrado en la harina comercial (4.41 %), lo que puede indicar que los fabricantes adicionan algún componente de tipo graso. Esto parece confirmarse al comparar el contenido proteico que es más alto en los sustratos “no adulterados” procedentes de la Viga (20.6 %) y de Alvarado (28.85 %), que son significativamente mayores al observado en la harina comercial (16.5 %), el cual posiblemente al ser adicionado de sustancias ajenas disminuye su contenido proteico. La fibra cruda sin embargo fue similar en las muestras de carapacho de la Viga y la comercial (10.9 %) con respecto al carapacho de Alvarado (7.44%). Finalmente el contenido de cenizas es alto en las tres muestras, aunque lo es más en la harina comercial (38.8%), en relación a las otras muestras (La Viga 32.3%, Alvarado 30.2%). Esto coincide con el fuerte sabor salado de la harina comercial, la cual probablemente está adicionada de sal común como un conservador.

Vale la pena comentar que no hay mucha información en relación con análisis bromatológicos de desperdicios de camarón realizados por otros autores, por ello en la Tabla 7 se incluyen datos obtenidos en 1989 en el LEM con un lote de carapacho procedente de la Viga, y otro realizado en Sudáfrica por Oke y col. (57), para una harina de camarón preparada para la alimentación comercial de pollos. Puede verse que en términos generales las muestras

colectadas y procesadas en el LEM, tienen una composición bromatológica similar; muy distinta a la reportada por Oke y col. (57), que manifiesta un contenido muy alto de proteína 49.5% y de grasas 4.3%, y que difieren también de la harina comercial que está aparentemente adicionada de sal (posiblemente como conservador) y de otras sustancias, lo que eleva el contenido de grasas y cenizas, y disminuye las proteínas.

Tabla 7. Análisis Bromatológico de desperdicios molidos de camarón de diferentes Procedencias, colectados y procesados por diferentes autores.

VARIABLE	LA VIGA* 1989	LA VIGA* 1996	ALVARADO* 1996	HARINA COMERCIAL (DISTRITO FEDERAL)	HARINA PARA ALIMENTACION DE POLLOS. Oke y col. (sudafrica).
HUMEDAD	4.3	4.62	9.085	8.25	6.3
EXTRACTO ETEREO	1.74	1.45	1.38	4.41	4.3
PROTEINA	26.3	20.6	28.8	16.5	49.5
CENIZAS	34.88	32.3	30.2	38.8	27.3
FIBRA CRUDA	NSD	10.9	7.44	10.9	12.1

* Muestras procesadas en el LEM-ENCB-IPN.

3.6 Producción de proteasa por Bt-112 en medios con desperdicios de camarón de distintas procedencias, (selección del sustrato y medio de cultivo).

La bacteria se sembró en medios de cultivo conteniendo desperdicios molidos de camarón al 2%, que es la concentración óptima de acuerdo a trabajos previos (62), en condiciones de agitación (180 rpm), durante 24 h. Los desechos se suspendieron en un caso en el medio sintético de Castañeda Agulló, que contiene citrato, glicerol, y sales diversas a un pH de 6.5, y el otro en agua de suministro. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 8, donde se aprecia con claridad que no hay ninguna ventaja en suspender los sustratos en un medio de cultivo convencional, posiblemente porque el sustrato posee de por sí un alto contenido en proteínas, carbohidratos y sales, y pueden constituir un medio adecuado al suspenderlos en agua de la llave, en donde incluso la bacteria produce y secreta mayor cantidad de enzimas proteolíticas. Por otra parte, es posible que el glicerol y el citrato del medio basal puedan ejercer una cierta actividad represora, como se ha demostrado al estudiar la inducción de múltiples enzimas extracelulares en *B. thuringiensis* (16, 75).

Cabe agregar además, que al comparar los diferentes sustratos, resultaron mucho más eficientes par propiciar la producción de proteasa, los desperdicios procedentes de Alvarado, Veracruz, los cuales pertenecen a la variedad conocida como “camarón café”, y que contiene mayor cantidad de proteína (casi 29%), que el procedente de la Viga, perteneciente a camarones del pacífico que corresponden a la variedad “azul”, de mayor talla, pero con menor contenido de proteína (20.6%). El que pueda haber una relación directa entre el contenido proteico del sustrato y la proteasa secretada al medio, se ve apoyado por los datos obtenidos con la harina comercial que tiene 16.5% de proteína y no es propicia para la síntesis de la enzima, aún cuando el microorganismo crece igual que en los otros medios de cultivo.

Sin embargo en este caso la baja producción de la enzima pudiera deberse no sólo a una disminución en el contenido proteico del sustrato, sino más fuertemente a la alta concentración de sal, y posiblemente de otras sustancias inhibidoras. Esto se ve apoyado en el hecho de que si la harina comercial se lava con agua, la producción de la enzima se eleva significativamente, aunque nunca llega a alcanzar los valores obtenidos en los medios formulados con desechos de camarón sin aditivos. Es posible que también influya como factor negativo para no propiciar la síntesis de proteasa, el mayor contenido de grasas, las cuales no pueden removerse en la harina comercial con un lavado con agua.

Tabla 8. Producción de proteasa (UP/ml) por *B. thuringiensis* cepa Bt-112, crecida en medios Conteniendo desperdicios molidos de camarón de diferente procedencia.

SUSTRATO	CC al 2% en medio basal pH 6.5	CC al 2% en agua de la llave pH 6.5
CC Alvarado, Ver	270	300
CC La Viga	152	187
Harina de CC Comercial (salada)	11	36
Harina de CC Comercial (lavada)	35	82

CC es la abreviatura para carapacho de camarón molido.

Otro aspecto interesante es que los desperdicios de camarón al ser suspendidos en agua de la llave, propician en general la producción de un medio muy alcalino, aunque el pH varía de uno a otro caso; por ejemplo los medios preparados con desperdicios de camarón de Alvarado, tienen un pH de 8.8; y los formulados con los de la Viga y con harina comercial 8.1 (Tabla 9). Sin embargo no parece haber un efecto inhibitorio del pH sobre el crecimiento o la producción de proteasa. Incluso los más altos rendimientos de esta enzima se obtienen en medios con desperdicios de camarón de Alvarado, que como ya se dijo tienen un pH inicial de 8.8, pero que también tienen el más alto contenido de proteínas. La poca influencia del pH inicial sobre la síntesis de proteasa queda manifiesta en los otros datos consignados en la Tabla 8, en donde puede verse que ajustando el pH inicial a 6.5, apenas si se eleva un poco la producción de la enzima, aunque las tendencias generales no se modifican; es decir, el mejor sustrato siguen siendo los desechos de camarón de Alvarado, luego los de camarón de la Viga, y muy por debajo la harina comercial de camarón lavada, y al final, con una síntesis insignificante de enzima, la harina de desperdicios de camarón, tal como se expende en el comercio.

Todos estos datos parecen apuntar que el factor más importante para favorecer la producción de proteasa, es el contenido de proteínas en los desechos de camarón, y que la adición de sales y material graso como se hace en las harinas comerciales, anula la capacidad de estos materiales para servir como sustratos de fermentación microbiana en la producción de esta enzima. Así mismo, los datos obtenidos muestran que estos sustratos en lo general dan lugar a medios muy alcalinos, en los que *B. thuringiensis* se desarrolla muy bien y puede secretar altos niveles de enzima, no obstante que de acuerdo a la literatura, esta bacteria tiene

un pH de crecimiento óptimo entre 6.5 - 7. El ajustar el pH inicial a valores más fisiológicos no mejoró significativamente la síntesis de la exoproteasa.

En suma, el conjunto de experimentos descritos, permite concluir que el mejor sustrato para la producción de la enzima son los desperdicios de camarón procedentes de alvarado, Veracruz, los cuales deben suspenderse en agua de suministro, sin necesidad de ajustar el pH inicial del medio. Todos estos factores hacen más económico y sencillo esta parte del bioproceso de producción de la proteasa extracelular.

Tabla 9. Secreción de exoproteasa por *B. thuringiensis* cepa Bt-112 en medios conteniendo Desperdicios molidos de camarón al 2% en agua de la llave, con y sin ajuste de pH Inicial.

SUSTRATO	pH inicial (sin ajuste)	UP/ml	pH inicial (ajustado)	UP/ml
CC Alvarado	8.8	206	6.5	236
CC La Viga	8.1	180	6.5	188
Harina comercial (salada)	9.0	17	6.5	16
Harina comercial (lavada)	8.1	88	6.5	98

CC es la abreviatura para carapacho molido de camarón.

3.7 Estudios cinéticos a nivel de matraz agitado, para evaluar el crecimiento y la producción de proteasa por Bt-112 a 28 y 37°C (para tener datos preliminares de la temperatura y tiempo óptimos).

En base a los datos anteriores, para estos experimentos se empleó como sustrato a los desperdicios molidos de camarón del Golfo de México, particularmente de Alvarado, Ver., al 2 % en agua de la llave y sin ajuste de pH del medio.

En la Figura 21, puede apreciarse con claridad, que la curva de crecimiento obtenida a 28°C muestra un trazo diáuxico. La población inicial es algo superior a 10^4 UFC/ml, y en apenas 6 h que dura la primera etapa de crecimiento, la población se incrementa hasta 10^6 UFC/ml. El cultivo muestra en este caso una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.69 h^{-1} y un tiempo de duplicación de 1h. Durante este breve período, el microorganismo utiliza los productos solubles liberados durante la esterilización en la autoclave de los desechos de camarón suspendidos en agua de suministro. En esta etapa no se producen proteasas extracelulares. A continuación se observa una segunda fase, donde la población se mantiene casi constante, desde las 6 hasta las 17 h de incubación, los datos obtenidos muestran un tiempo de duplicación de 190 h y una μ de 0.00363 h^{-1} ; es decir, se trata de una población bacteriana no proliferante, pero no obstante, metabólicamente se encuentra muy activa. Puede verse que al final de la segunda fase se inicia la producción de proteasa. Esto da lugar a un nuevo incremento de la población, que en un lapso que abarca desde las 17 hasta las 28 h se multiplica activamente, aumentando la población desde 10^6 hasta un valor intermedio entre 10^8 y 10^9 UFC/ml. Esta tercera fase muestra una μ de 0.46 h^{-1} y un tiempo de duplicación de 1.5 h; el crecimiento se sostiene por la producción de una elevada cantidad de proteasa, cuya

síntesis se inicia desde las 17 h, y se incrementa paulatinamente y en forma sostenida hasta las 48 h con casi 170 UP/ml. Este nivel enzimático se mantiene con algunas fluctuaciones hasta el término del experimento. Las fluctuaciones pueden ser debidas a fenómenos regulatorios o a errores experimentales en la evaluación. En cuanto a la población bacteriana, ésta se sostiene en fase estacionaria desde las 28 h de incubación hasta el término del experimento a las 80 h. Como ya se indicó, la concentración celular máxima en la fase estacionaria, está entre 10^8 y 10^9 UFC/ml.

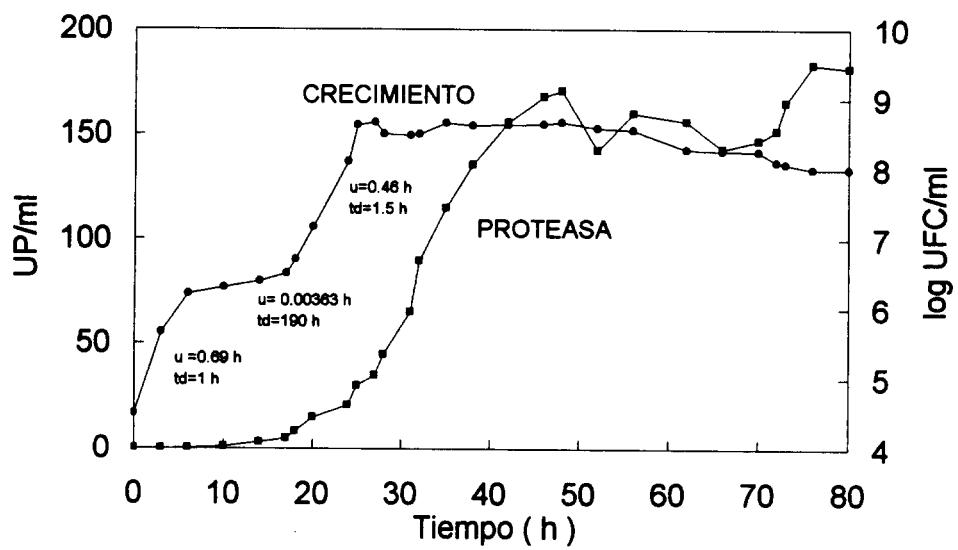


Fig. 21 Cinética de crecimiento y secreción de proteasa de cultivos de *B. thuringiensis* cepa Bt-112, crecidos a 28°C en medios con desperdicios de camarón al 2 % en agua de la llave en condiciones de agitación (180 rpm).

Las cinéticas obtenidas al cultivar a *B. thuringiensis* en el mismo medio pero a 37°C se observan en la Figura 22, donde queda claro que el crecimiento sigue un comportamiento distinto al descrito a 28°C. A 37°C no se aprecia con claridad un comportamiento diáuxico en el crecimiento, de modo que sin una fase lag, las células empiezan a multiplicarse más aceleradamente que a 28°C, con una μ de 0.847 h⁻¹ y con un tiempo de duplicación más corto de 49 min. Esta primera fase de crecimiento acelerado abarca las primeras 14 h de incubación, incrementándose la población desde 10⁴ hasta 10⁹ UFC/ml. A continuación se tiene una fase estacionaria corta desde las 14 h hasta las 25 h donde la población oscila ligeramente en valores cercanos a 10⁹ UFC/ml, pero enseguida ocurre una disminución acelerada de la población desde las 25 hasta las 31 h de incubación, donde aparentemente se logra un nuevo equilibrio poblacional, manteniéndose el cultivo en una nueva fase estacionaria a valores cercanos a 10⁸ UFC/ml, hasta el fin del experimento.

La primera fase del crecimiento acelerado puede sostenerse por el consumo de los nutrientes solubles liberados durante la esterilización del medio de cultivo en sus primeras 10 h, ya que después de este tiempo se dispara la producción de proteasa.

Para propósitos de comparación, en la Figura 23, se muestran las cinéticas de crecimiento y producción de proteasa a 28 y 37°C, con objeto de apreciar mejor las similitudes o diferencias.

Cabe señalar por último, que estos experimentos sirvieron de base para otros en los cuales se probó el efecto de la temperatura y la concentración de sustrato sobre la producción de proteasa a tiempos de incubación definidos, los cuales serán descritos posteriormente.

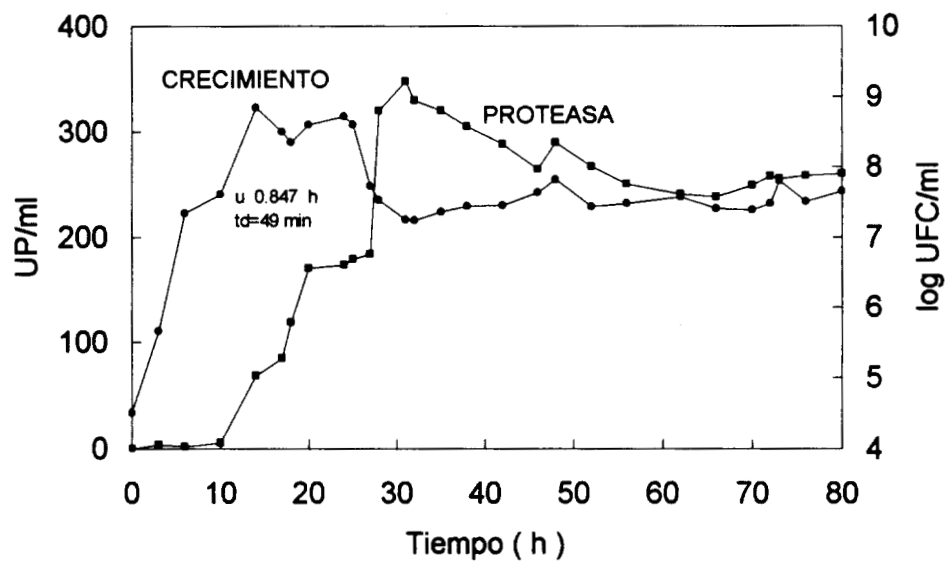


Fig. 22 Cinética de crecimiento y secreción de proteasa de cultivos de *B. thuringiensis* cepa Bt-112, crecidos a 37°C en medios con desperdicios de camarón al 2% en agua de la llave en condiciones de agitación (180 rpm).

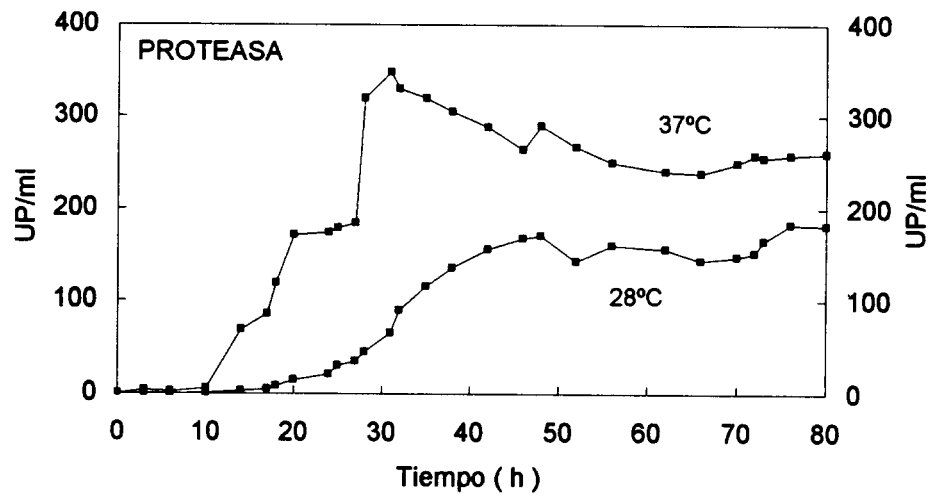
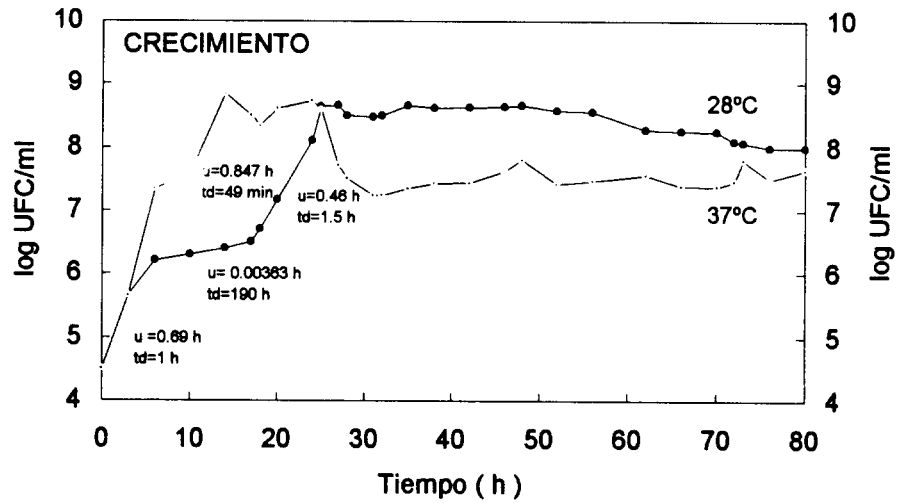


Fig. 23 Comparación de las cinéticas de crecimiento y secreción de proteasa a 28 y 37°C, de *B. thuringiensis* cepa Bt-112, en medios con desperdicios de camarón al 2 % en agua de la llave en condiciones de agitación (180 rpm).

3.8 Perfiles electroforéticos de las proteínas formadas durante la fermentación a 28°C de los desechos proteín-quitinosos por *B. thuringiensis* cepa Bt-112.

Considerando que en la etapa final de la presente investigación, se realizarían estudios de caracterización de la o las proteasas producidas durante la fermentación, se creyó conveniente definir si se producían una o más enzimas. Para este propósito se intentó primero separar las proteínas por electroforesis y posteriormente revelar su actividad en los geles mediante técnicas de revelado *in situ*. Lo anterior consistió en realizar una electroforesis convencional para proteínas en geles de poliacrilamida SDS y posteriormente sumergir los geles en una solución de caseína al 1 % para que esta se difundiera a través del gel, posteriormente se incubaron un tiempo determinado y a una temperatura adecuada (20 min a 37°C), en un regulador a un pH 7 y se tiñeron. Sin embargo, a pesar de los múltiples intentos realizados, no se obtuvieron resultados satisfactorios. Por tal razón se decidió recurrir a la electroforesis de proteínas convencional en geles de poliacrilamida SDS. Para ello, se aprovechó la circunstancia de tener muestras frescas correspondientes a los estudios cinéticos anteriores. Cabe advertir que el experimento se repitió con las muestras a 37°C con resultados muy parecidos.

Los resultados que se ven en la Figura 24, corresponden a un arreglo fotográfico de dos geles, donde se corrieron las muestras colectadas durante el estudio cinético descrito en la Figura 21, con objeto de apreciar la cinética o dinámica de la población proteica presente en los sobrenadantes de muestras de los cultivos tomados a diferentes tiempos de incubación. Puede observarse que al inicio del experimento hay pequeñas cantidades de 5-6 proteínas, de pesos moleculares bajos, entre 14-29 kDa, que seguramente proceden de la solubilización de las proteínas presentes en el carapacho de camarón empleado como sustrato. Estas proteínas

desaparecen rápidamente, porque seguramente son empleadas como nutrientes por la bacteria. Puede notarse hasta las 10 h, la aparición apenas perceptible de una proteína de 36 kDa, que rápidamente incrementa su concentración y acaba siendo, -con mucho-, la proteína mayoritaria en los cultivos.

El incremento en la concentración de esta proteína, dada como el incremento del área relativa, obtenida mediante un densitómetro, se ajustó adecuadamente al aumento en la actividad proteolítica en el experimento de referencia mostrado en la Figura 21, según se aprecia en la Figura 25, y por ello se sugiere que esta banda puede representar la proteasa única ó quizá la proteasa mayoritaria en el caso de que se secretaran dos o más proteasas al medio.

Cabe señalar sin embargo, que *B. thuringiensis* inicia a partir de las 14 h de incubación la secreción de un número cada vez mayor de proteínas, de manera que a las 21 h ya se aprecian con claridad 13 bandas proteicas con pesos moleculares que oscilan desde arriba de 66 hasta los 20 kDa. Sorprendentemente a las 24 h desaparecen las bandas más pesadas, pero rápidamente reaparecen, y el perfil electroforético se complica cada vez más, aunque sí se aprecia una mejor definición de las mismas, lo que indica cambios importantes desde las 42 h hasta las 80 h de incubación, pudiéndose contar al menos 20 bandas proteicas.

Es posible que tan alto número de bandas sea un artefacto, ya que en el carril de los patrones de peso molecular conocido, aparecen bien definidas las bandas de tales patrones; pero también hay otras bandas menos aparentes que pueden representar péptidos provenientes de una degradación enzimática de los patrones originales, ya que las muestras eran viejas. Otra explicación es que las condiciones disociantes utilizadas empleando SDS y alta temperatura hayan despolimerizado también a las proteínas presentes en los sobrenadantes de

los cultivos, y de esta forma provocar la aparición de múltiples bandas proteicas. De cualquier modo, esto no invalida la conclusión de que la proteína mayoritaria tenga un peso molecular de 36 kDa y ésta pudiera corresponder a la proteasa en estudio.

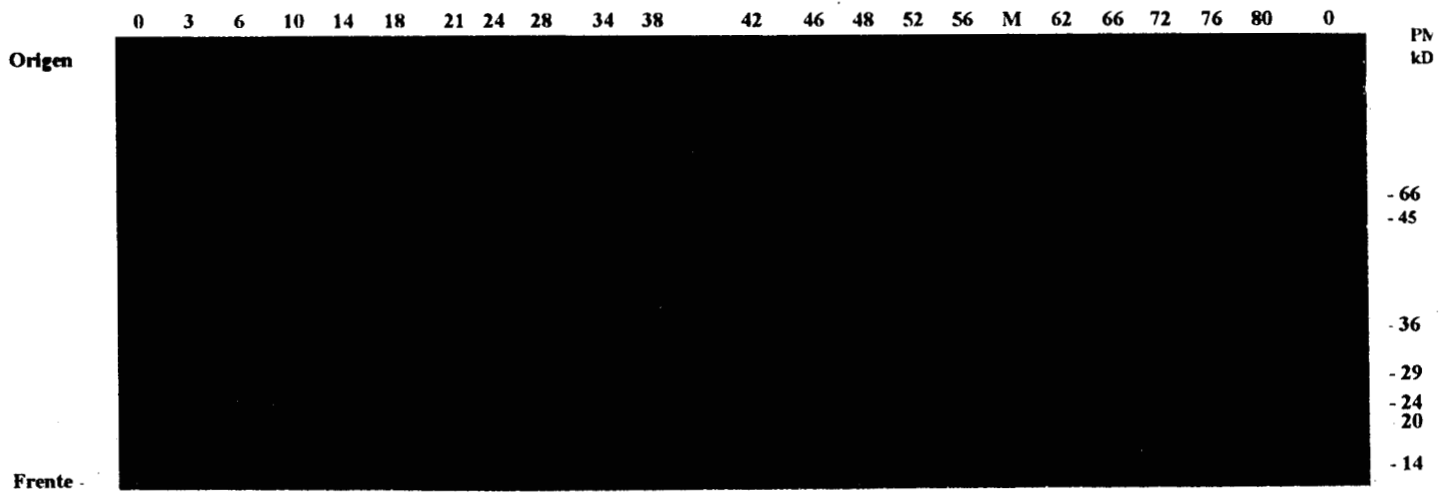


Fig. 24 Seguimiento electroforético de las proteínas solubles secretadas por Bt-112 al crecer en un medio con carapacho de camarón al 2% en agua de la llave, a 28°C y 180 rpm. En la parte superior se indican las horas de incubación. En el carril M se colocaron los patrones de peso molecular.

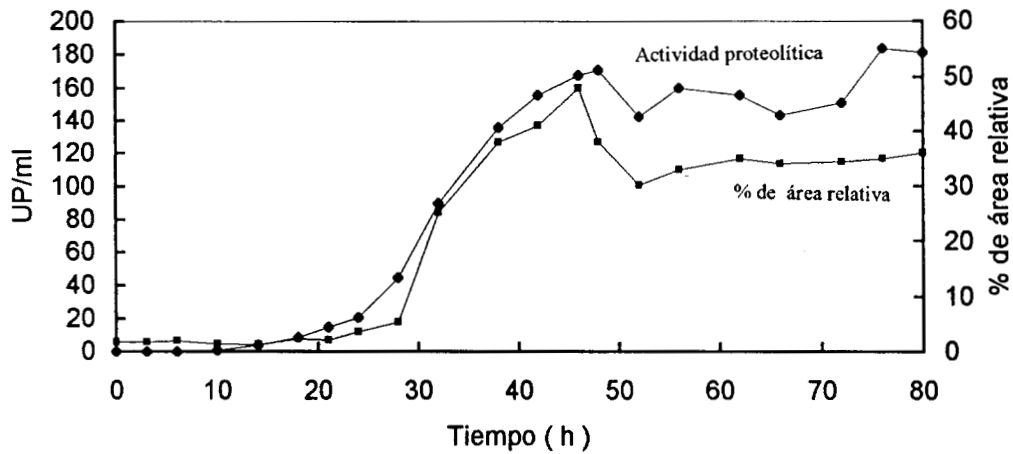


Fig. 25 Comparación de la actividad proteolítica extracelular de Bt-112 al crecer en un medio con carapacho de camarón al 2% en agua de suministro, y de la concentración de proteína mayoritaria secretada en el mismo experimento y separada por electroforesis en gel de poliacrilamida, dada como el incremento del área relativa, obtenida mediante un densitómetro.

3.9 Efecto de la temperatura y la concentración de sustrato, para la producción de proteasa por *B. thuringiensis*, cepa Bt-112.

El estudio sobre el efecto de la temperatura y la concentración de sustrato comprendió en realidad 5 experimentos diferentes, en los que se hicieron estudios cinéticos en matraces a temperaturas de 28, 31,34,37 y 40 °C. Para cada una de estas temperaturas se prepararon triplicados de matraces conteniendo carapacho de camarón a las concentraciones: 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5%, o sea 18 matraces; sin embargo, como se tomaron muestras a las 20, 26 y 32 h de incubación, (tiempos que fueron tomados de cinéticas previas), para cada experimento se requirieron al menos 54 matraces. Como fueron 5 experimentos distintos (sin tomar en cuenta algunas repeticiones), fue necesario procesar un total de 270 muestras.

Las muestras colectadas a los diferentes tiempos, fueron usadas para evaluar la actividad de proteasa por el método de Kunitz (40). Los datos referentes a la actividad proteolítica están reunidos en la Tabla 10, y están expresados en unidades de proteasa/ml.

Tales datos muestran que a las cinco temperaturas ensayadas en el intervalo de 28 a 40 °C, la actividad proteolítica máxima se observa entre las concentraciones de sustrato del 1 al 3%, aunque es claramente evidente que la mayoría de los valores óptimos se encuentran a la concentración del 2%. Hablando en términos absolutos, el valor más alto de actividad proteolítica (374 UP/ml) ocurre cultivando a Bt-112 a 31°C, en un medio con carapacho molido de camarón al 2%, al cabo de 32 h de incubación.

Tabla 10. Efecto de la temperatura y la concentración de sustrato, para la producción de proteasa por *B. thuringiensis* cepa Bt-112*

T(°C)	CONCENTRACION DE SUSTRATO						Tiempo de incubación (h)
	0.5 %	1%	2%	3%	4%	5%	
28	47.5	113.5	149	109	69	4	20
	84	126	163.5	199	127	15.4	26
	107	182	212	234	204	25	32
31	126	156.5	196.5	12.5	4	22.5	20
	94.4	91.6	276	43	11	24	26
	137.5	238.9	374	204	39	30	32
34	44	107	140	7.85	9	11.5	20
	50	112.6	166	15.4	14	8.3	26
	46	114	158.5	70.6	50.5	9.6	32
37	17	79.6	121	48	9.6	2	20
	34	104.6	160	122	47	14	26
	32	95	112.6	161	90	19.6	32
40	24	76	169	53	28	20	20
	23.5	64	21	33.6	10	7.5	26
	48.8	111.5	22.3	39.6	12	6.4	32

* Los datos incluidos en la tabla, expresan la actividad proteolítica en UP/ml y son el promedio de tres determinaciones diferentes.

Con objeto de observar más claramente las tendencias de las diferentes cinéticas, los datos de la Tabla 10 se graficaron y concentraron en la Figura 26 , donde es evidente que la síntesis de la proteasa es muy baja, casi inexistente a concentraciones de 5% de sustrato, quizá porque el alto contenido de sólidos dificulta la aireación de los cultivos.

La muy baja producción de enzima ocurre también en presencia de concentraciones muy bajas de sustrato, como 0.5%, quizá porque los nutrientes disponibles son insuficientes. Los valores mejoran apreciablemente si se eleva el contenido de sustrato, particularmente al 2%.

Si se observan las escalas de las gráficas se aprecia que los datos más altos están entre 28 y 31°C; y es notable la diferencia en la producción de la enzima dentro de este intervalo de apenas 3°C es muy significativa, lo que muestra claramente la influencia crítica de esta variable.

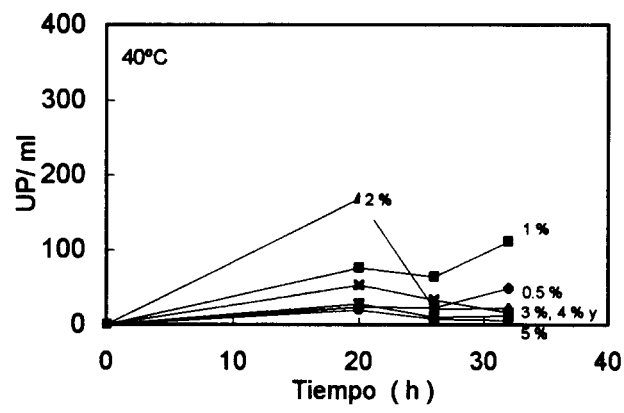
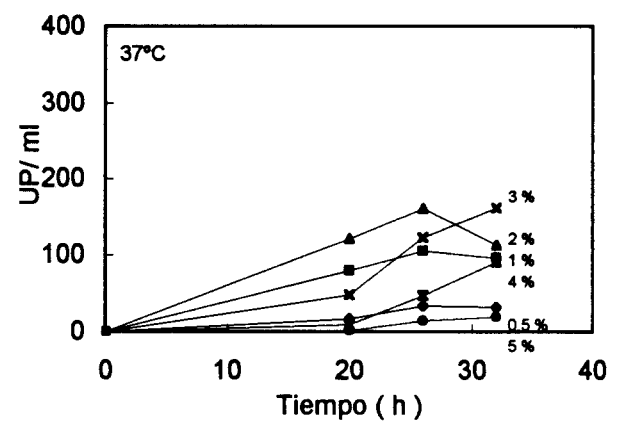
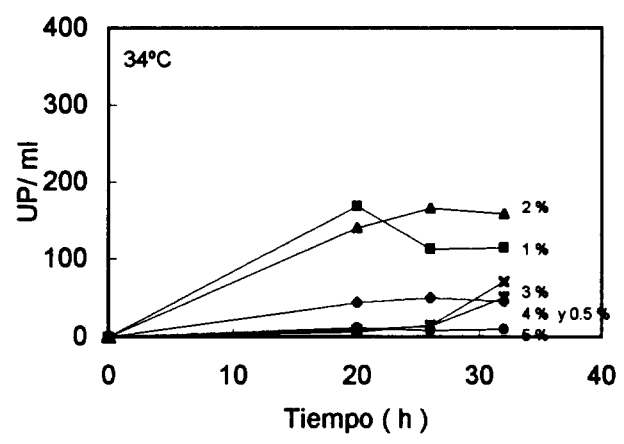
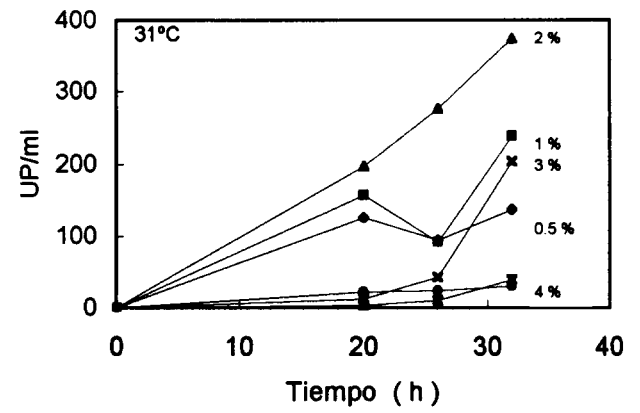
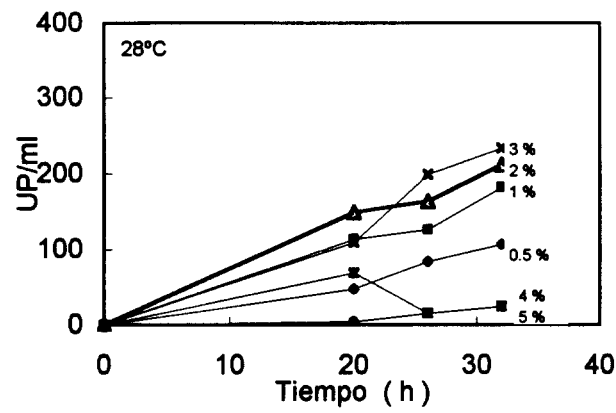


Fig. 26 Secreción de proteasas por *Bacillus thuringiensis*, en medios conteniendo concentraciones crecientes de carapacho de camarón 0.5% (- 5%) en agua de la llave, en condiciones de agitación (180 rpm) y diferentes temperaturas (28-40°C).

Como se contaba con suficientes muestras obtenidas de estos mismos experimentos, realizados específicamente para ver el efecto de la temperatura y concentración de sustrato sobre la proteasa, se decidió evaluar en estas mismas muestras, lo que estaba ocurriendo con la actividad de quitinasa. Por lo que se evaluó la producción de esta enzima, expresándola en unidades, siendo una de éstas la cantidad de enzima que libera 1 uM de N-acetil-D-glucosamina en una hora de incubación a 50 °C. Como puede apreciarse, para esta enzima los valores más altos se encuentran entre 3 y 4 % (Tabla 11). Cabe señalar que la cepa Bt-112, es una quitinolítica muy pobre, pues el valor máximo observado al incubar a 34 °C con 4 % de sustrato, después de 32 h de incubación, es apenas de 1.86 UQ/ml, valor muy bajo en comparación con los mostrados por *Serratia marcescens* WF, la cual produce entre 30 y 60 UQ/ml. Si se expresan los datos de la Tabla 11 de manera gráfica, se tienen las cinco que componen la Figura 27, donde puede apreciarse que en términos generales la producción de quitinasa mejora al incrementar la concentración de sustrato en el medio, de modo que los valores más altos se obtienen al emplear de 3-4% del mismo. Incluso al emplear hasta 5 % de sustrato se observa una buena producción de quitinasa, lo que sugiere que la síntesis de enzima no es tan sensible a la aireación de los cultivos.

Para el caso de la quitinasa, sería muy importante realizar otros experimentos con intervalos aún más estrechos entre 31 y 36°C, pero sobre todo deben hacerse estudios cinéticos para definir el tiempo más apropiado en que debiera evaluarse la actividad, ya que los que se tomaron en estas cinéticas fueron los correspondientes a la máxima producción de la proteasa y pudiera ser que la quitinasa tenga su óptimo en tiempos diferentes.

En suma, después de cinco muy laboriosos experimentos puede concluirse que la producción máxima de proteasa (374 UP/ml) ocurre a 31°C, empleando carapacho de camarón como sustrato al 2 % en agua de la llave, después de 32 h de incubación.

Para la quitinasa podemos mencionar con las debidas reservas, que se obtuvo una producción máxima de 1.86 UQ/ml y que las mejores condiciones en estas muestras fueron: 34°C, 32 h de incubación y 3 % de concentración de sustrato.

Tabla 11. Efecto de la temperatura y la concentración de sustrato, para la producción de quitinasa por *B. thuringiensis* cepa Bt-112*

T(°C)	CONCENTRACION DE SUSTRATO						Tiempo de incubación (h)
	0.5 %	1%	2%	3%	4%	5%	
28	0.17	0.242	0.239	0.296	0.623	0.39	20
	0.215	0.283	0.212	0.232	0.808	0.289	26
	0.434	0.394	0.583	0.657	0.842	0.525	32
31	0.32	0.347	0.343	0.822	0.367	0.502	20
	0.33	0.421	0.566	1.719	1.098	0.936	26
	0.171	0.242	1.048	1.412	1.324	0.852	32
34	0.283	0.532	0.093	1.334	1.321	1.03	20
	0.269	0.431	0.7	1.57	1.395	1.476	26
	0.222	1.395	0.694	1.866	1.472	1.489	32
37	0.134	0.34	0.657	0.653	0.518	0.129	20
	0.158	0.306	0.926	0.997	0.92	0.721	26
	0.087	0.32	0.684	1.004	1.118	0.576	32
40	0	0.215	0.593	0.724	0.64	0.397	20
	0	0.117	0.69	0.674	0.717	0.357	26
	0	0.094	0.599	0.623	0.721	0.545	32

* Los datos incluidos expresan la actividad quitinolítica en UQ/ml y son el promedio de tres determinaciones diferentes.

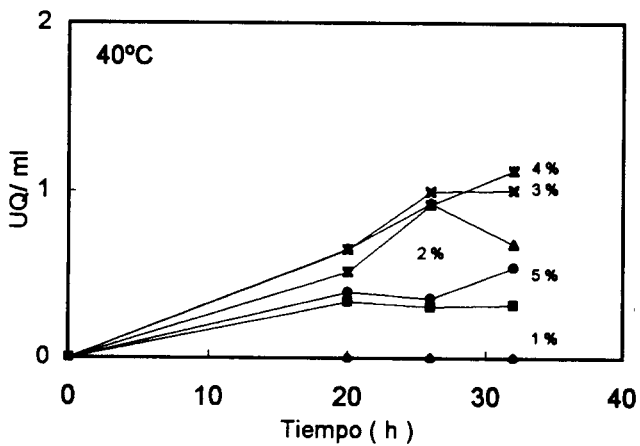
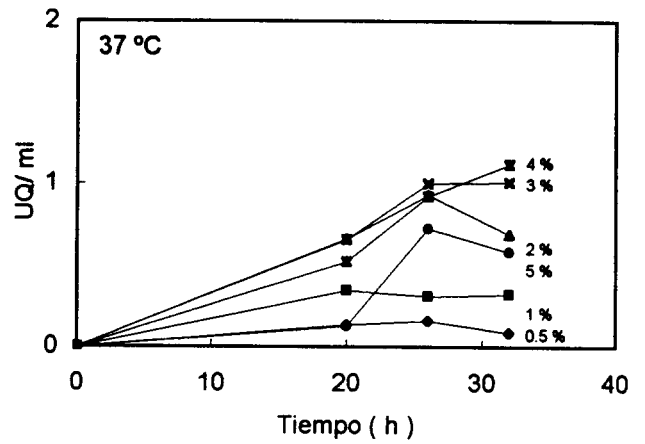
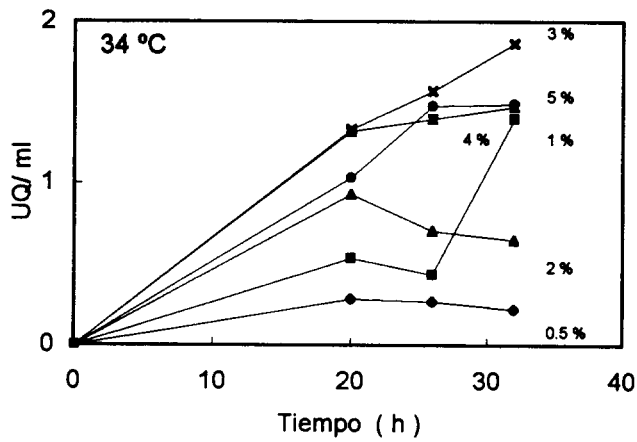
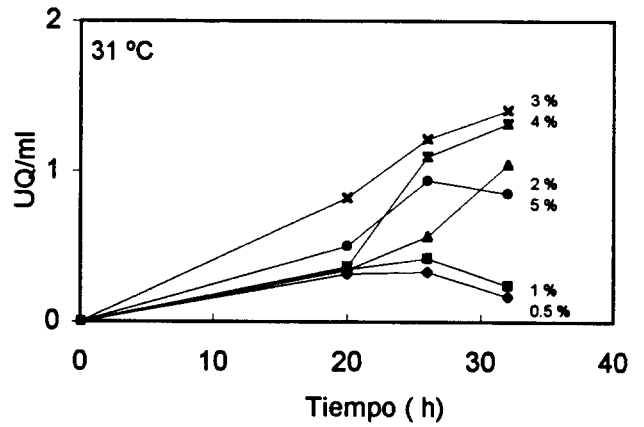
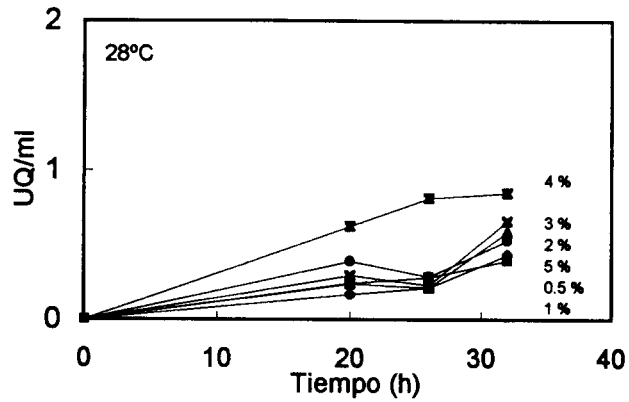


Fig.27 Producción de quitinasas por *Bacillus thuringiensis* cepa Bt -112 en medios conteniendo concentraciones crecientes de carapacho de camarón (0.5-5%) en agua de la llave, en condiciones de agitación (180 rpm) a diferentes temperaturas (28 - 40 °C).

3.10 Producción de Cristales Proteicos Intracelulares en un medio a base de carapacho de camarón al 2% en agua de la llave.

Si bien los datos obtenidos demuestran que Bt-112 es capaz de crecer en un medio tan simple como carapacho molido de camarón suspendido al 2% en agua de suministro, y producir altos niveles de proteasas, así como medianas cantidades de quitinasas, no habíamos demostrado que en estas condiciones se produjeran también los cristales proteicos intracelulares. Casi toda la bibliografía disponible refiere la necesidad de usar medios ricos para observar una adecuada formación de los cristales. Por otra parte la evaluación cuantitativa de este proceso ofrece más dificultades que las que se presentan en la determinación de actividades enzimáticas, particularmente si son de tipo extracelular. Por esta razón se decidió monitorear la producción de cristales mediante tinciones específicas con amido negro y por microfotografía. En la Figura 28 se muestra que desde las 20 h hay una alta concentraciones celulares de Bt cuando es cultivado en un medio de carapacho de camarón al 2% en agua de la llave, encontrando tanto bacterias aisladas como otras alineadas formando estructuras pseudomiceliales. Lo más importante es que pueden observarse en el campo, cantidades significativas de cristales de forma bipiramidal, aunque presentan cierta variación en su tamaño. También se aprecia una gran cantidad de esporas. A las 28 h de incubación el panorama es semejante; sin embargo a las 72 h se nota un acúmulo mucho mayor de células, muchas de ellas formando hileras pseudomiceliales; pero sobre todo se encuentra una gran cantidad de cristales, lo que sugiere que éste podría ser el tiempo ideal para separarlos del caldo de fermentación. Los cristales, por otra parte, conservan su forma bipiramidal y tienen mayor uniformidad en sus dimensiones. Las observaciones posteriores

siguen mostrando un gran cúmulo de células libres y asociadas, pero la cantidad de cristales disminuye notablemente a las 96 y más aún a las 120 h de incubación. Es posible que las proteasas intracelulares liberadas al medio después de la autólisis celular, (que permite también la salida de los cristales), aunada a la acumulación de las proteasas extracelulares producidas por las bacterias viables, digieran las proteínas de los cristales y por tanto desaparezcan estas estructuras. Es probable también que la digestión de los cristales tenga la finalidad de proveer a las células viables, que aún se encuentran en gran número, de los aminoácidos que requieren para su sobrevivencia.

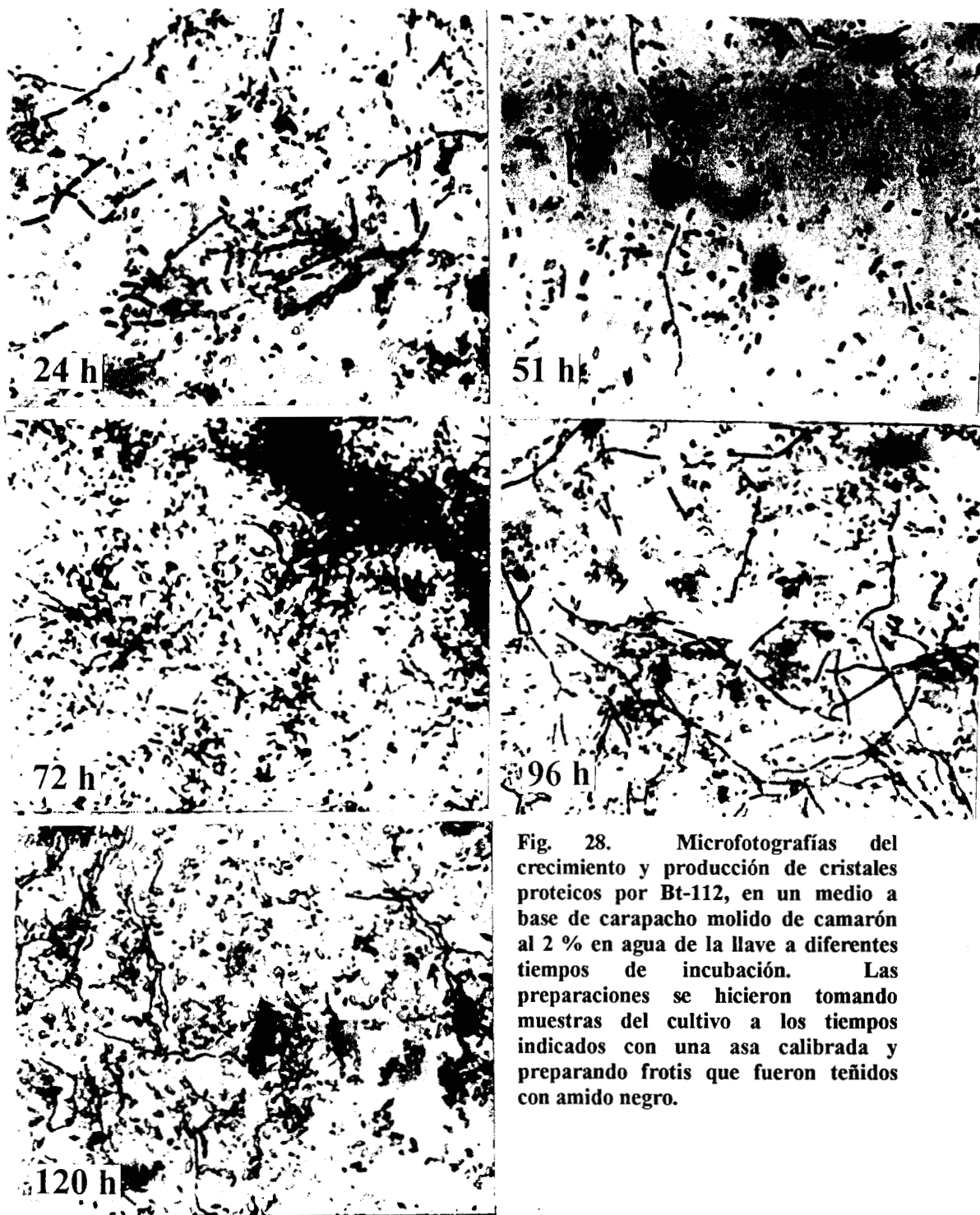


Fig. 28. Microfotografías del crecimiento y producción de cristales proteicos por Bt-112, en un medio a base de carapacho molido de camarón al 2 % en agua de la llave a diferentes tiempos de incubación. Las preparaciones se hicieron tomando muestras del cultivo a los tiempos indicados con una asa calibrada y preparando frotis que fueron teñidos con amido negro.

3.11 Cinética de producción de proteasas por *B. thuringiensis* cepa 112, a nivel de fermentador.

La última fase de esta segunda parte de la investigación, fueron los estudios llevados a cabo en fermentador empleando las condiciones previamente establecidas a nivel de matraz. Fueron cuatro los experimentos realizados. En la Figura 29 se muestra que la producción de proteasa a nivel de fermentador, se inicia rápidamente tanto si se trabaja sin ajuste de pH inicial del medio de cultivo (Figura 29 A), como si se ajusta a un valor fisiológico de 7.0 durante todo el proceso (Figura 29 B). De hecho las cinéticas de producción de enzima bajo ambas condiciones son prácticamente lo mismo, e incluso los niveles de proteasa son algo mayores cuando no se ajusta el pH. Esto es ventajoso porque simplifica el proceso biotecnológico, al no ser necesario mantener un pH constante.

Por otra parte, la simple extrapolación de las condiciones óptimas encontradas a nivel de matraz, para los estudios cinéticos a nivel de fermentador, no mejoró el valor máximo de producción enzimática. Así, el valor máximo en fermentador se alcanza entre las 22 y 25 h de incubación, y es de 350 UP/ml. A nivel de matraz se obtienen niveles de hasta 374 UP/ml, pero se requieren 32 h de incubación. Estos datos sugieren la conveniencia de volver a ajustar algunas condiciones ambientales para una nueva optimización a nivel de fermentador. De cualquier modo, el hecho de que el tiempo se pueda reducir de 32 a 22 h es una gran ventaja desde el punto de vista de los costos para el bioproceso.

Continuando la descripción de los resultados mostrados en la Figura 29, puede verse que cuando el cultivo crece en condiciones de fermentador, el pH inicial del medio es cercano a 8.5; después desciende rápidamente hasta 7.8 en las primeras 4 h de incubación,

y enseguida se empieza a elevar, de manera que ya para las 6 h se tiene un pH de 8.7, y continua elevándose más aún hasta valores de 9.0 - 9.1, lo que sugiere que la biodegradación del carapacho de camarón en buena medida comprende la utilización de la quitina, que es hidrolizada hasta compuestos metabolizables por la célula, como son la quitobiosa y en menor proporción la N-acetil-D-glucosamina, los cuales al ser incorporados a diversas vías metabólicas generan compuestos aminados que alcalinizan el medio. Dichas condiciones son perfectamente soportadas por Bt-112, según se puede apreciar en la Figura 30, donde se correlacionan las cinéticas de crecimiento y síntesis de proteasa. Puede verse que la bacteria se adapta rápidamente al medio y al pH alcalino inicial y prolifera sin necesidad de una fase lag. La población inicial es del orden de 10^4 UFC/ml y ya para las 5 h de incubación su número ha aumentado 100 veces (cerca de 10^6 UFC/ml), y con esta misma tasa de crecimiento sigue aumentando hasta alcanzar cuentas viables algo superiores a 10^8 UFC/ml, desde las 15 h de incubación.

El trazo de la cinética de la síntesis de proteasa es casi paralelo a la proliferación celular, lo que sugiere que la proteasa está asociada al crecimiento, y la bacteria la secreta para hidrolizar las proteínas solubilizadas en el medio, que muy rápidamente se agotan. Después se solubilizan e hidrolizan aquellas que se encuentran estructuradas en el carapacho de camarón, y que se encuentran físicamente insolubles. En ambos casos, la acción hidrolítica de la proteasa permite el abasto de péptidos y aminoácidos libres, que ya pueden ser incorporados y metabolizados por la bacteria.

Cabe enfatizar sin embargo, que la producción de proteasa ofrece una cinética acampanada, en donde la máxima producción (350 UP/ml) se alcanza entre las 22-30 h de

incubación, y posteriormente tiende a descender rápidamente; ésto pudiera deberse al agotamiento de las proteínas asequibles físicamente a las proteasas en el sustrato insoluble *quasi* cristalino, que es el carapacho de camarón, o bien puede ser que la acumulación de compuestos aminados en el medio, derivados de la metabolización de la quitina, repriman la síntesis de la proteasa.

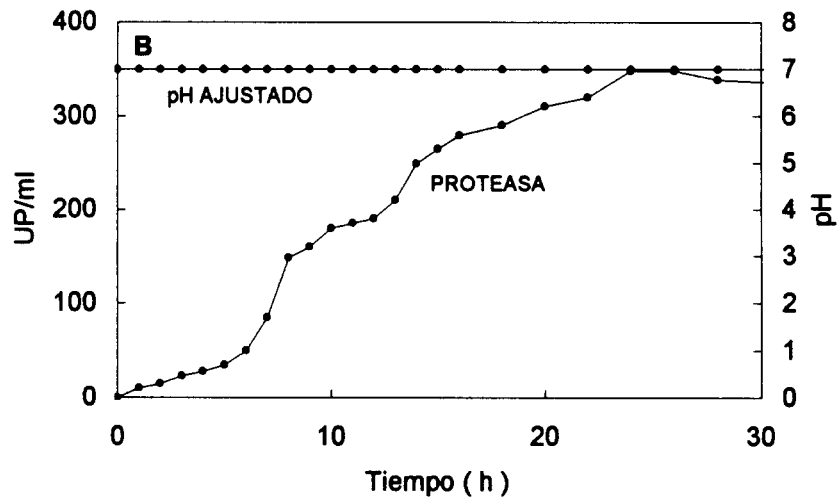
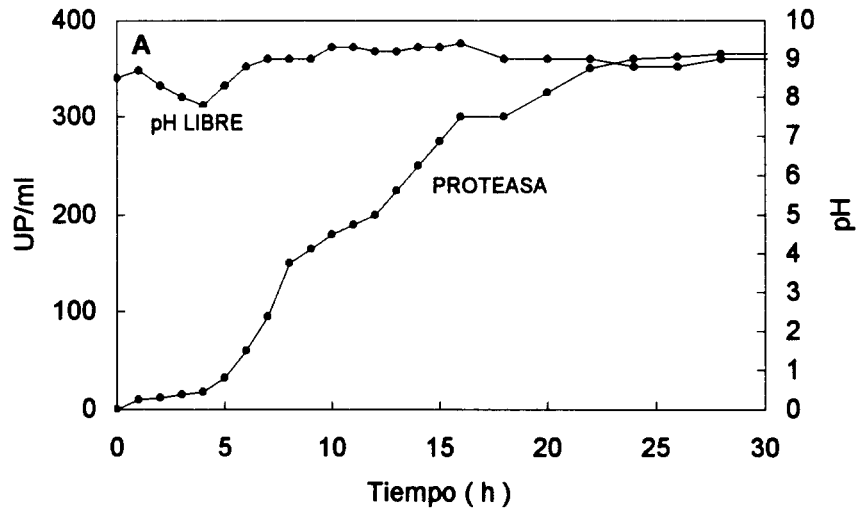


Fig. 29 Producción de proteasa por *B. thuringiensis* cepa Bt-112, a nivel de fermentador, bajo las condiciones óptimas encontradas en cultivos por lote en matraz (31°C, concentración de sustrato al 2 %, volúmen de operación de 4 l y 370 rpm). En la parte superior se observa la cinética sin ajuste del pH inicial del medio, y en la parte inferior con ajuste constante del pH a 7.

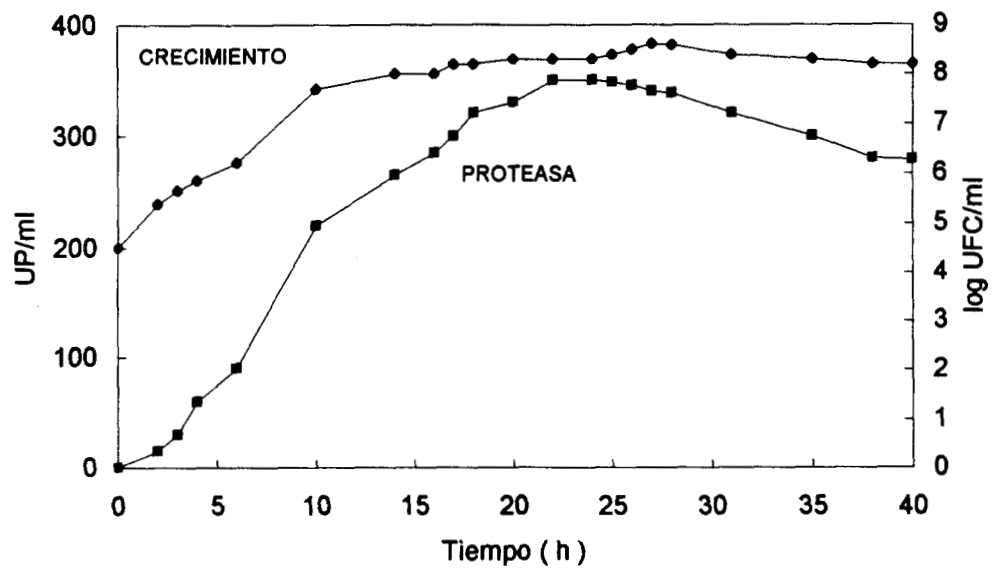


Fig. 30 Correlación entre el crecimiento y la producción de proteasa en cultivos de *B. thuringiensis* cepa Bt-112, en medios a base de carapacho de camarón al 2 % en agua de la llave, a nivel de fermentador. (volumen de operación de 4l, 31°C y agitación variable de 300 a 375 rpm, sin ajuste del pH del medio de cultivo).

Una de las determinaciones que se realizaron a nivel de fermentador fue la evaluación del oxígeno disuelto en el medio, durante el bioproceso degradativo de los desperdicios de camarón, suspendidos al 2 % en agua de la llave. Como puede verse en la Figura 31, el experimento se inició con una aireación de 0.5 vvm y una agitación de 300 rpm, ajustando en estas condiciones la escala del equipo a un valor de 100%. Tan pronto se inoculó, las células agotaron rápidamente el oxígeno, de modo que a las 2 h ya su presencia era nula y debió aumentarse la agitación hasta 375 rpm. De esta manera, lentamente fue restaurándose la disponibilidad del gas hasta valores cercanos al 80 % al cabo de 8 h de incubación. Un inconveniente es que no se puede elevar la agitación más allá de este valor por la excesiva formación de espuma, que obliga a la adición de una buena cantidad de antiespumante. Por otra parte, las partículas de sustrato tienden a adherirse fuertemente en las aspas del fermentador si la agitación se incrementa. Debido a esta razón fue necesario bajar a 300 rpm la agitación después de las 10 h de incubación, y mantener así el proceso hasta su término. Como puede verse, de esta manera se tienden a equilibrar las condiciones y a tener una disponibilidad de oxígeno que va incrementándose pausadamente hasta 80 %, al final del experimento.

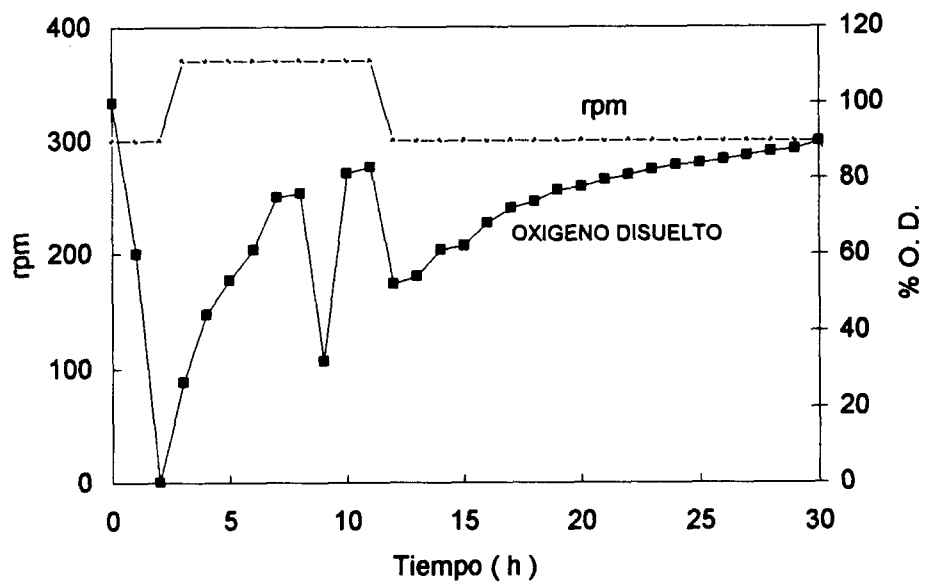


Fig. 31 Demanda de oxígeno durante la fermentación de subproductos proteín-quitinosos (carapacho de camarón) al 2 % en agua de la llave por *B. thuringiensis* cepa Bt-112. Condiciones: volúmen de operación 4 l y 31°C, sin ajuste del pH del medio.

Con estos experimentos concluyó la segunda parte de esta tesis, cuyo gran objetivo era establecer las condiciones propicias para que Bt-112 se desarrollara en medios conteniendo desechos molidos de camarón, y produjera los mayores niveles posibles de proteasas y cristales proteicos intracelulares. Dichos estudios se iniciaron a nivel de matraz desde la selección de la materia prima, el medio de cultivo, y el estudio del efecto de la concentración del sustrato y la temperatura.

Se encontró en suma que Bt-112 produce la máxima cantidad de proteasa empleando los desechos del camarón, procedente de Alvarado, Ver, suspendidos al 2% en agua de suministro, sin ajuste del pH inicial, a una temperatura de 31°C y una agitación de 180 rpm, lográndose la máxima acumulación de enzima a las 32 h de incubación. Bajo estas condiciones se produce en apariencia una sola proteasa y también se acumulan en el caldo cristales proteicos bipiramidales, cuya máxima concentración se consigue a las 72 h.

Cuando se realizaron experimentos a nivel de fermentador, bajo los parámetros óptimos obtenidos a escala de matraz, no se logró incrementar la producción de la enzima, pero sí se logró reducir de 32 a 22 el tiempo necesario para lograr la máxima acumulación de proteasa.

**TERCERA PARTE. CARACTERIZACION DE LA PROTEASA
EXTRACELULAR DE Bt-112 A NIVEL DE EXTRACTO CRUDO.**

3.12 Caracterización del extracto crudo.

3.12.1 Estabilidad a temperatura de congelación y refrigeración.

El tiempo de anaquel de una enzima es un factor que debe tomarse en cuenta para estudios de purificación y caracterización, y para proponerle usos prácticos. En la Figura 32, se observa que en condiciones de congelación a -15°C , hay una pérdida de la actividad proteolítica cercana al 10 % en el primer mes, y hasta un 80 % en el quinto mes. Este fenómeno de inactivación es más evidente cuando la enzima se conserva en refrigeración a 5°C , pues se obtiene una pérdida de la actividad de un 90 % en cuatro meses.

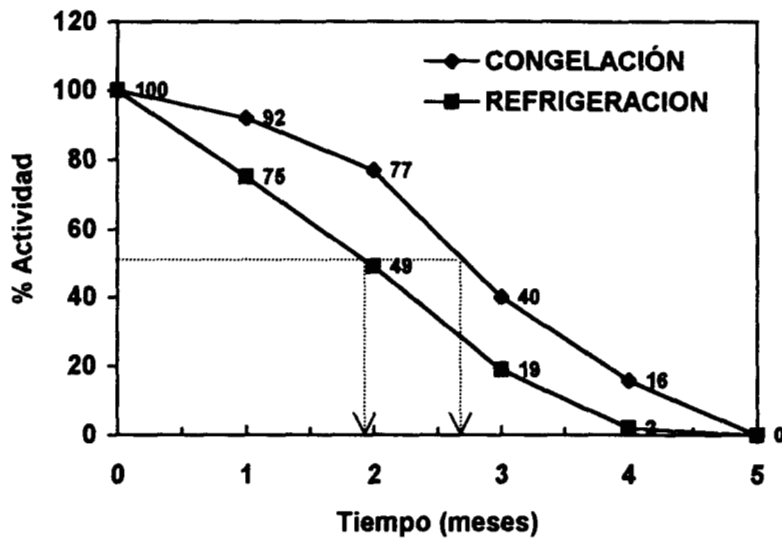


Fig. 32. Estabilidad de la proteasa de Bt-112 a temperatura de congelación (-15°C) y de refrigeración (5°C). En la gráfica se muestra la vida media de la enzima a las dos temperaturas, interpolando el 50 % de actividad. Los datos específicos de % de actividad remanente se muestran a los diferentes tiempos estudiados.

Haciendo la interpolación correspondiente, la vida media de la enzima en congelación es de 2.7 meses y 1.9 meses en refrigeración, como también se observa respectivamente en la Figura 32. Estos datos sugieren que el proceso de purificación de esta enzima debe ser de un mes cuando mucho; y si se desea darle usos prácticos debe buscarse la forma de aumentar su estabilidad mediante la adición de sustancias reductoras, o por liofilización, o adicionando sales que permitan estabilizar su conformación activa durante periodos muy largos. Al final del presente estudio se presentan datos que muestran claramente, que la adición de sales de calcio incrementa notablemente la estabilidad de la proteasa (Figura 38).

3.12.2 Efecto de la temperatura de reacción sobre la actividad proteolítica

Para este estudio se trabajó con 2 lotes diferentes de enzima, obtenidas de cultivos crecidos en medios con carapacho molido de camarón proveniente de Alvarado, Ver. y de la Viga, D.F. Las temperaturas de incubación fueron 10, 20, 30, 37, 40, 50, 55 y 60 °C. En la Figura 33 se muestra que con ambas muestras enzimáticas se presenta la misma tendencia, obteniéndose a 45 °C la máxima actividad proteolítica. Cabe comentar que como se observa una ligera meseta en el intervalo de 30 a 40 °C, más aparente cuando se empleó carapacho molido de Alvarado, Ver., podría especularse la presencia de otra proteasa.

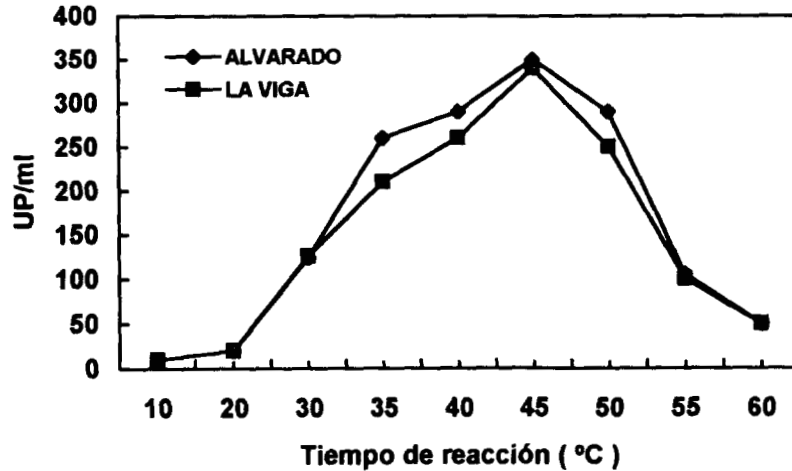


Fig. 33. Efecto de la temperatura de reacción, sobre la actividad proteolítica extracelular de Bt-112 a nivel de extracto crudo. Los ensayos se efectuaron a las temperaturas mencionadas durante 20 min a pH 9.

3.12.3 Efecto de la temperatura de preincubación, sobre la estabilidad de enzimática

Para este estudio se consideraron temperaturas de 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50 y 55 °C. En este caso se preincubó a la enzima durante 1 h a dichas temperaturas evaluando en seguida la actividad proteolítica remanente. Los resultados se muestran en la Figura 34, donde se aprecia que la actividad tiende a incrementarse ligeramente entre 10 y 30 °C; luego sube un poco más mostrando un pico discreto cuya cresta es 35 °C; después la actividad disminuye en forma muy acentuada al aumentar la temperatura. Los datos obtenidos muestran claramente que la estabilidad de la enzima en intervalos cortos de tiempo (1 h), es aceptable entre 10 y 37 °C. Arriba de 37 °C la actividad se pierde rápidamente. Esto habla otra vez de la necesidad de buscar condiciones propicias para incrementar su estabilidad.

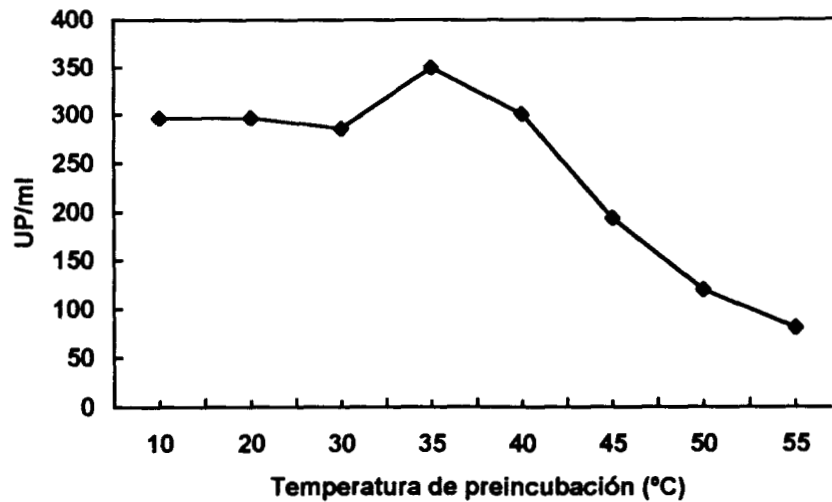


Fig. 34. Estabilidad a la temperatura de la exoproteasa de Bt-112 a nivel de extracto crudo. Las muestras se preincubaron 1 h a las temperaturas indicadas, determinándose después la actividad remanente a 45°C durante 20 min.

3.12.4 Efecto del pH sobre la actividad enzimática

El intervalo estudiado de pH de 6 a 10, ensayando específicamente 6, 7, 8, 9 y 10. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 35, observándose una zona de actividad máxima desde 7 hasta 9, con un máximo a pH 8. A valores mayores de 9 la actividad se pierde aceleradamente.

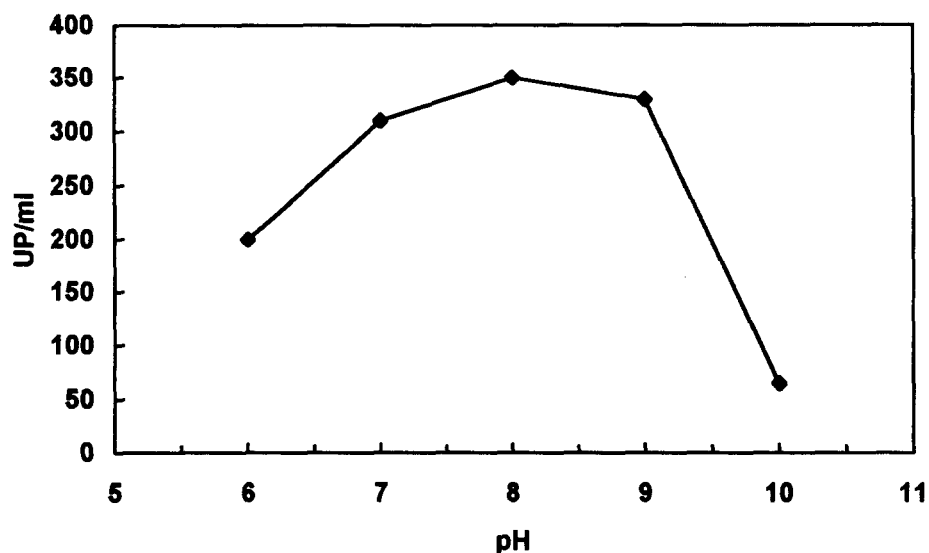


Fig. 35. Efecto del pH de reacción sobre la actividad proteolítica extracelular de Bt-112, a nivel de extracto crudo. La actividad se evaluó a 45°C durante 20 min.

3.12.5 Efecto del pH sobre la estabilidad enzimática

La determinación se realizó preincubando la enzima a los pH's 6, 7, 8, 9, 10 y 11 durante 1 h a temperatura ambiente, evaluándose después la actividad remanente a pH 8 y 45°C. Bajo estas condiciones se observa en la Figura 36, que la mayor estabilidad ocurre entre los pH's 6 y 8, con un máximo muy marcado en 7. También se aprecia una pequeña meseta entre 8 y 9, que pudiera corresponder a otra proteasa. Estos datos sugieren la presencia de dos enzimas, una más tolerante al efecto del pH, con una estabilidad máxima en 7, y otra que se inactiva fácilmente, o se encuentra en menor proporción y presenta un máximo de estabilidad a pH's 8 y 9. Estos datos son diferentes a los obtenidos con la proteasa de la cepa Bt-149, donde también se sugiere la presencia de dos enzimas, pero la mayoritaria o más tolerante tiene un pH de máxima estabilidad en 9 (67).

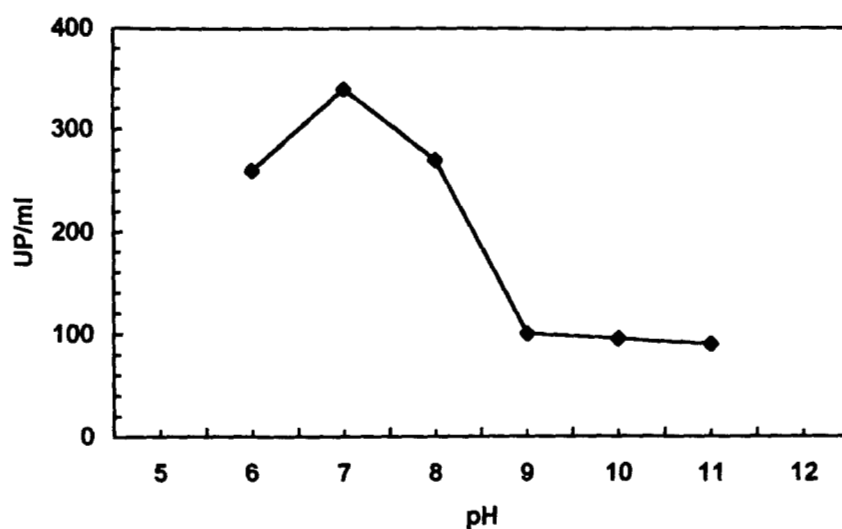


Fig. 36. Efecto del pH sobre la estabilidad de la proteasa extracelular de Bt-112 a nivel de extracto crudo. Las muestras fueron preincubadas durante 1 h al pH indicado, determinándose después la actividad residual a pH 8 durante 20 min.

3.12.6 Efecto de agentes quelantes sobre la proteasa.

En esta determinación la enzima se dializó contra 2 concentraciones distintas de EDTA (0.01 M y 0.1 M), a diferentes tiempos, y se evaluó después la actividad remanente. En la Figura 37, se observa cómo se afecta significativamente la actividad enzimática en presencia del agente quelante, sobre todo a la concentración 0.1 M; ésto sugiere fuertemente que la enzima requiere de la presencia de iones para su actividad proteolítica. Resultados similares se obtuvieron al estudiar la proteasa de la cepa Bt-149 (67).

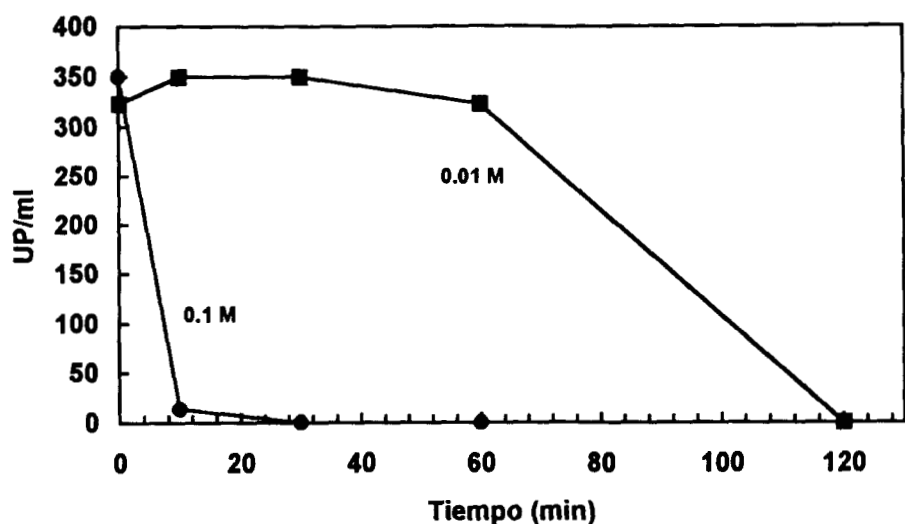


Fig. 37. Efecto del EDTA sobre la actividad proteolítica de Bt-112 a nivel de extracto crudo. La enzima se dializó primero contra EDTA a la concentración indicada y posteriormente se determinó la actividad remanente a 45°C y pH 8.

3.12.7 Estudio sobre los requerimientos catiónicos de la proteasa

Debido a la inactivación de la proteasa en presencia de secuestradores de iones, se estudió la posibilidad de recuperar la actividad proteolítica adicionando iones metálicos como Co^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} y Mg^{++} (en forma de cloruros) a una concentración 10^{-2} M. Los resultados se muestran en la Tabla 12, donde se observa que no ocurrió una recuperación de la actividad; ésto sugiere que el efecto del agente quelante es irreversible.

Tabla 12. Acción de iones metálicos divalentes sobre la exoproteasa de Bt-112, previamente inactivada con agentes quelantes.

ENSAYO	UP/ml	% ACTIVIDAD
TESTIGO	350	100
ENZIMA + EDTA	1.02	3.6
+CaCl ₂ (10 ⁻² M)	0.042	0.015
+CoCl ₂ (10 ⁻² M)	0.025	0.09
+ZnCl ₂ (10 ⁻² M)	0.017	0.06
+MgCl ₂ (10 ⁻² M)	0.011	0.04

3.12.8 Efecto de mercuriales y reductores sobre la actividad enzimática

Para este estudio se utilizaron para-cloromercuribenzoato (PCMB) 10⁻³M, y el HgCl₂ y la Yodoacetamida (IAM) a las concentraciones 10⁻⁴ y 10⁻³ M. El efecto se evaluó colocando la enzima en presencia de éstos durante 30 min y determinando después la actividad remanente a 45 °C y pH 8. En otros experimentos, después de la preincubación con mercuriales se adicionó β-mercaptoetanol (B-ME) 10⁻³M como agente reductor, dejándolo actuar durante 30 min y luego se evaluó la actividad proteolítica remanente. También se hicieron ensayos adicionando simultáneamente los mercuriales y el reductor, dejándolos en contacto durante 30 min. Después se evaluó la actividad remanente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 13, donde se aprecia que la IAM 10⁻³ M y el HgCl₂ 10⁻⁴ M reducen hasta un 25 % la actividad. La inactivación es más severa con HgCl₂ 10⁻³M que reduce la actividad hasta un 4% o menos. El β-mercaptoetanol 10⁻³ M produce un modesto efecto

reactivante, incrementando la actividad de 25 a 32% cuando se inhibió con HgCl_2 10^{-4} M, y de un 27 a un 47% cuando se inhibió con IAM 10^{-3} M.

Cuando los mercuriales IAM y HgCl_2 , así como el agente reductor β -mercaptoetanol se adicionaron simultáneamente, la enzima se inactivó más aún que cuando sólo se añadieron los inhibidores. Es decir no hubo ningún efecto protector por parte del agente reductor.

Comparando estos resultados con los obtenidos con la proteasa de Bt-149 se encuentran semejanzas en cuanto a que en ambos casos las enzimas se inactivan fuertemente con agentes mercuriales; sin embargo la proteasa de Bt-149 inhibida por estas sustancias se reactiva hasta en un 90% por efecto de agentes reductores como el β -mercaptoetanol, en cambio la proteasa del presente estudio se reactiva ligeramente. De cualquier manera los datos obtenidos apoyan la observación de que la exoproteasa de Bt-112, al igual que la de Bt-149 son tiol-dependientes.

Tabla 13. Efecto de mercuriales y reductores sobre la proteasa de Bt-112.

ENSAYO	UP/ml	% ACTIVIDAD
TESTIGO	350	100
+ agentes oxidantes		
IAM (10^{-3} M)	94.5	27
HgCl_2 (10^{-3} M)	14	4
HgCl_2 (10^{-4} M)	87.5	25
PCMB (10^{-3})	84	0.24
β-Mercaptoetanol (10^{-3} M)		
IAM (10^{-3} M)	164.5	47
HgCl_2 (10^{-4} M)	112	32
Agente reductor + Agente oxidante		
IAM (10^{-3} M) + B-ME	57.75	16.5
HgCl_2 (10^{-4} M) + B-ME	56	16

3.12.9 Efecto de agentes desnaturalizantes sobre la proteasa de Bt-112.

Para este estudio se utilizaron urea 10^{-3} M y 10^{-4} M, y detergentes de tipo aniónico y neutro a diferentes concentraciones. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 14. Respecto al efecto de la urea, llama la atención de que a pesar de que ésta se usó a concentraciones muy bajas (10^{-4} y 10^{-3} M) originó una significativa inactivación, cercana al 50%, lo que sugiere que en la conformación activa de la molécula participan de manera muy importante los puentes de hidrógeno. Cabe mencionar que la urea suele utilizarse a concentraciones 2 o 6 M para provocar disociaciones moleculares sostenidas por puentes de hidrógeno.

También en la Tabla 14, se muestra que el detergente aniónico SDS tiene un efecto ligeramente inhibitorio a las concentraciones 10^{-4} hasta 10^{-2} M; en cambio los detergentes neutros brj 35 y Tween 20 aumentan al doble la actividad, particularmente a concentraciones de 0.25% a 0.5%. Este dato es relevante y pudiera deberse a que la enzima en solución tiende a agregarse, y los detergentes neutros probablemente propicien una disociación y/o una conformación más activa. Sin embargo, esto deberá confirmarse en futuras investigaciones.

Tabla 14. Efecto de agentes desnaturizantes sobre la proteasa de Bt-112.

SUSTANCIA	UP/ml/min	% ACTIVIDAD
TESTIGO	350	100
UREA 10^{-3} M	143.5	41
UREA 10^{-4} M	206.5	59
Detergentes neutros		
Brij 35 (0.25%)	630	180
Brij (0.5%)	686	196
Brij (1 %)	728	208
Detergentes neutros		
Tween 20 (0.25%)	724.5	207
Tween 20 (0.5%)	581	166
Tween 20 (1%)	308	88
Detergente aniónico		
SDS 10^{-4} M	325.5	93
SDS 10^{-3} M	329	94
SDS 10^{-2} M	318.5	91

3.12.10 Efecto protector del cloruro de calcio sobre la proteasa extracelular de Bt-112.

Es un fenómeno conocido que las sales de calcio pueden estabilizar la estructura terciaria de algunas enzimas; el fenómeno se atribuye a cambios en la fuerza iónica de la solución, y/o a la interacción de los iones Ca^{++} con algunos grupos cargados negativamente, como los carboxilatos del aspartato y/o del glutamato.

Cuando la proteasa de Bt-112 se preincubó con CaCl_2 (Figura 38), pudo observarse una notable activación si la concentración era 0.05 M, particularmente si se incubaba a 40°C, de modo que la actividad siempre era mayor que en la enzima sin tratamiento. Si la concentración es 0.1 M la actividad se mantiene sin mengua aún a 60°C, lo que habla más bien de un efecto protector – estabilizador. Un efecto protector menos estable se observa con CaCl_2 0.5 M, y puede ocurrir un efecto inhibitorio a la concentración 1 M. Esta información es valiosa pues da pautas para explorar alternativas de uso del ión Ca^{++} para proteger y activar la enzima durante su purificación, y para emplearla a temperaturas elevadas para hidrolizar sustratos proteicos. Quedaría por averiguar si el efecto es debido exclusivamente a la modificación en la fuerza iónica, o es un efecto específico de los iones Ca^{++} .

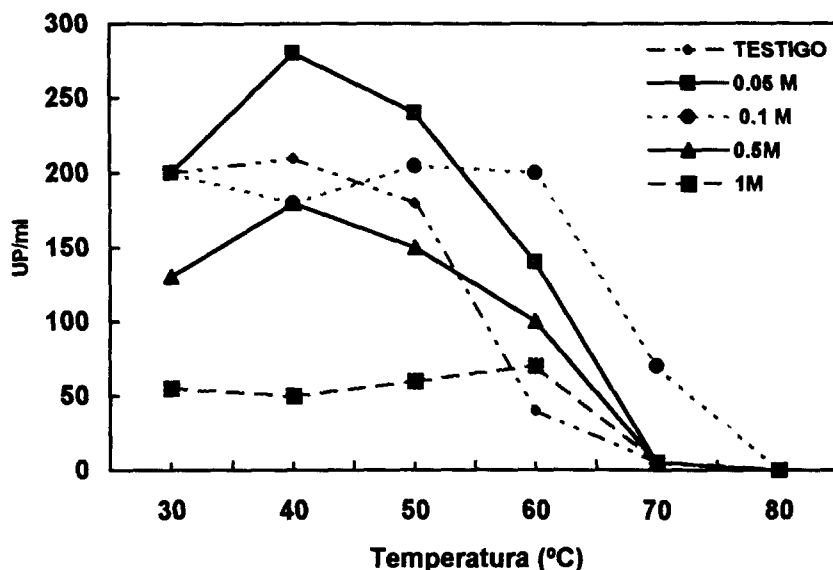


Fig. 38. Estabilización-activación de la proteasa extracelular de Bt-112 por cloruro de calcio a diferentes concentraciones.

Concluye así la tercera y última parte del presente estudio, encaminada a conocer algunas de las propiedades relevantes de la proteasa de Bt-112, como es su vida media en congelación (casi tres meses), y en refrigeración (1.8 meses). La enzima tiende a inactivarse fácilmente arriba de 40°C, aunque el CaCl₂ desde 0.05 hasta 0.1 M tiene un importante efecto activador-estabilizador que le permite soportar temperaturas entre 60-65°C. La enzima por otra parte mostró su mayor eficacia de reacción, en presencia de caseína como sustrato a 45°C y un pH de 8, aunque cabe señalar que tenía una actividad muy alta a pH's entre 7-9, y por tanto se puede catalogar como una proteasa alcalina. La máxima estabilidad se observó sin embargo a pH 7. Por último la proteasa es muy sensible a la acción de agentes quelantes, probablemente porque es una metaloenzima, aunque no se logró reactivarla por adición de cationes divalentes, además mostró ser una tior enzima, que pudiera ser reactivada o activada según el caso, por agentes reductores y detergentes neutros.

4. DISCUSSION

4. Discusión

A nivel mundial, el gran interés hacia *B. thuringiensis* ha estado dirigido al estudio de las propiedades insecticidas de sus cristales proteicos intracelulares (27, 37, 55), lo cual ha conducido a que una gran parte de la investigación en este campo, se lleve a cabo bajo la hipótesis de que su función ecológica es “matar insectos” (48). Sin embargo, es importante mencionar que *B. thuringiensis* no causa epizootias, ni vive en asociación con su hospedero; además crece, esporula y produce cristales insecticidas en una gran variedad de medios artificiales.

Por otra parte, la información existente acerca de sus exoenzimas es muy escasa (59), a pesar de que esta bacteria puede secretar altos niveles de proteasas (77) y amilasas (76), y menores cantidades de quitinasas (13), pectinasas (26), nucleasas (59), esterases (82), lipasas (26) y en general todas aquellas enzimas descritas en el género *Bacillus*. En este contexto es oportuno añadir que desde el punto de vista industrial, los estudios sobre el potencial exoenzimático de *B. thuringiensis* son importantes por dos razones (63):

- i).- La selección de cepas con una alta actividad enzimática, combinada con una alta actividad insecticida, pueden ayudar a ampliar la gran diversidad de materiales (entre otros, los desechos quitinosos y proteinosos), usados para la producción de bioinsecticidas.

- ii).- La selección de cepas con alta actividad enzimática puede aumentar el uso de *B. thuringiensis* tanto como productor de enzimas como productor de biomasa en medios a base de materiales de desecho.

Otro argumento a favor de que *B. thuringiensis* puede tener aplicaciones diversas en Biotecnología, deriva del hallazgo reciente de esta bacteria en suelos contaminados con elevadas concentraciones de hidrocarburos lineales y aromáticos, pero particularmente de bifenilos clorados (64). Estudios en desarrollo han confirmado que la cepa aislada en dichos suelos, es capaz de biodegradar aceite de transformador con alto contenido de mezclas clorobifenilos y otros hidrocarburos (75). Esto abre la posibilidad de que *B. thuringiensis* puede emplearse también en estudios de biorrestauración de suelos.

Volviendo al tema particular de las exoenzimas de *B. thuringiensis*, y refiriéndose al caso particular de la proteasa extracelular, el presente trabajo muestra que la producción de proteasa (caseinasa), varió entre las 152 diferentes cepas analizadas. Resultados similares en cuanto a la variación de cepa a cepa, se encontraron cuando se evaluó la actividad de queratinasa (otro tipo de proteasa). Sin embargo, los perfiles de distribución de ambas enzimas no muestran ninguna relación, lo cual parece indicar que no se trata de una proteasa inespecífica, sino de dos enzimas diferentes. En ambos casos, además, las cepas con más altos niveles enzimáticos, presentaron valores comparables a los mostrados por los microorganismos de referencia: *S. marcescens* WF (patrón proteo-quitinolítico) y *B. thuringiensis* 149 (proteolítico).

En cambio esto no fue observado cuando se determinó la actividad de quitinasa en las 152 cepas, ya que ninguna de ellas igualó a la cepa de referencia *S. marcescens* WF, aunque la habilidad de algunas cepas para degradar la quitina es indudable. Este hallazgo reviste particular interés, debido a que existen algunos reportes donde se propone el empleo combinado de quitinasas y cristales proteicos de *B. thuringiensis*, para formular nuevos

productos insectidas. Las quitinasas pueden ser producidas por microorganismos particularmente quitinolíticos como *S. marcescens* WF, y en un segundo paso ser adicionadas a los cristales de *B. thuringiensis*. Otra posibilidad es la combinación de ambos factores, cristales y enzima, en una sola cepa de *B. thuringiensis* (52, 71, 72). Al respecto se investigan distintas opciones, tanto de genética clásica como de Biología Molecular, para obtener cepas hiperproductoras de quitinasas, y cristales.

En cuanto a las ocho cepas escogidas después de la selección primaria, por presentar una adecuada combinación de actividades proteo-quitinolíticas y queratinolíticas, se observó que sólo la Bt-103 y la Bt-112 presentaban consistentemente la mayor capacidad para crecer y producir proteasas en un medio conteniendo carapacho molido de camarón, suspendido en agua de suministro. Asimismo, las mencionadas cepas Bt-103 y Bt-112 también superaron ampliamente a las cepas HD-1 y HD-73, reconocidas como patrones internacionales por su alta capacidad bioinsecticida, en cuanto a la producción de proteasa extracelular al crecer en el medio de carapacho de camarón en agua de suministro. Cabe advertir, que no existen estudios sobre algún tipo de relación entre la producción de cristales (particularmente si estos son tóxicos), y la producción de proteasa extracelular. Existen sin embargo datos que muestran a nivel industrial, la presencia de proteasas extracelulares en los caldos de fermentación de los cultivos de *B. thuringiensis*, destinados a la producción de cristales, sin que se haya encontrado alguna correlación entre éstas y la formación de las esporas y los cristales (30). Sin embargo, algunos autores han atribuido a las proteasas extracelulares un efecto perjudicial sobre los cristales insecticidas, ya que algunas veces las preparaciones comerciales de cristales de *B. thuringiensis*, van perdiendo su capacidad tóxica después de algún tiempo, lo cual se atribuye a una degradación por este tipo de enzimas.

Otros estudios por el contrario, sugieren la posible participación de las proteasas intracelulares como factores coadyuvantes en la toxicidad de los cristales (20). Para ello proponen un mecanismo autolítico que involucra una proteasa asociada o unida en la superficie del cristal, la cual puede en las condiciones adecuadas, degradar la protoxina hasta su forma activa, para que sea tóxica en el intestino del insecto. A este respecto existe un estudio, donde se obtuvo constancia experimental de que los cristales de *B. thuringiensis* llevan consigo una proteasa alcalina, de modo que si los cristales se purifican y se inactiva a la enzima, la toxicidad se ve disminuída. Otros opinan que las verdaderas responsables de esta degradación, son las proteasas presentes en el tracto digestivo del mismo insecto.

En suma, unos enfatizan la importancia de proteger a las proteasas presentes en los cristales tanto en su producción, recuperación industrial y aplicación en campo, debido a su efecto coadyuvante, y otros piensan que deberían eliminarse para conservar mejor y durante un mayor tiempo a las preparaciones comerciales. Cabe destacar que este es un campo poco explorado, donde todavía existe mucho por investigar, particularmente en lo referente a las relaciones que puedan darse entre la producción de cristales proteicos intracelulares y las proteasas extracelulares, dado que los cristales son útiles, una vez que la bacteria se autoliza y los libera, momento en el cual los cristales pueden quedar a merced de las proteasas extracelulares, y aún de las intracelulares, que también son liberadas durante el proceso autolítico.

Pasando ahora a la etapa final de la selección de la cepa mediante bioensayos contra insectos modelo, conviene recordar que Bt-112 fue seleccionada como cepa de trabajo debido a que sus cristales resultaron tóxicos hacia *Manduca sexta*. No obstante la caracterización se realizó también con la cepa no tóxica Bt-103. En esta parte de la investigación se encontró

que el tipo de proteínas presentes en los cristales de Bt-112 (una proteína de 130 kDa y otra entre 65 y 70 kDa), son muy similares a las de HD-1, su cristal contiene proteínas Cry 1 de 130 kDa y la inclusión contiene proteínas Cry 2 de cerca de 65 kDa (35). Otra semejanza es que los cristales en ambos casos son de tipo bipiramidal con inclusiones proteicas semicuboidales en una de las caras.

Por lo tanto, cualitativamente tanto Bt-112 como HD-1 parecieran ser semejantes, si sólo se consideran los pesos moleculares de las proteínas Cry presentes en sus respectivos cristales; sin embargo cabe destacar que las proteínas Cry presentan subclases (Cry 1, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, etc....), de las cuales se han reportado, hasta septiembre de 1998 alrededor de 100; lo cual da una idea de lo complejo que podría ser realizar un estudio para diferenciar el tipo de proteínas Cry presentes en las dos cepas en estudio. La diferencia entre estas subclases están basadas en cambios en la secuencia de sus aminoácidos, lo cual puede derivar en cambios en el nivel de toxicidad. A pesar de lo anterior puede analizarse en suma que la actividad contra *Manduca sexta* es típica de las cepas con cristales bipiramidales del patotipo 1, activo contra Lepidópteros (27), pero el nivel de toxicidad depende del tipo de proteínas Cry 1 contenidas en el cristal (31). La razón por la cual Bt-112 presentó una CL₅₀ que indica una actividad insecticida moderada hacia el gusano de cuerno del tabaco, podría explicarse entonces, ya sea por diferencias en la proporción de las proteínas Cry, o por diferencias en su composición y/o secuencia de aminoácidos.

Por otro lado, otro aspecto que puede explicar la diferente toxicidad, es que la serotipificación indica que HD-1 y Bt-112 pertenecen a diferentes serovariedades. HD-1 pertenece a la variedad *kurstaki* y Bt-112 resultó ser de la variedad *tolworthi*, la cual comúnmente produce también un cristal bipiramidal, y ya que se toca el tema, cabe mencionar

que Bt-103 resultó ser de la variedad *finitimus*. Sin embargo, un criterio más contundente para tipificar y caracterizar una cepa, puede ser la determinación de plásmidos y la ribotipificación, técnicas que son capaces de distinguir entre cepas de una misma serovariedad (42), a este respecto tanto el perfil de plásmidos de Bt-103 como el de Bt-112 parecen ser muy peculiares. El primero tiene dos plásmidos, uno de 80 y otro de 47 MDa, y Bt-112 posee cuatro plásmidos de 5.8, 7, 8.7 y 34 MDa. No se encontraron en la bibliografía consultada, perfiles plasmídicos semejantes, por lo que ambas cepas pudieran considerarse, *a priori*, novedosas y peculiares, y por lo mismo, dignas de seguirse estudiando.

Cabe destacar, que tanto Bt-112 como Bt-103 fueron tipificadas y depositadas en el Instituto Pasteur, que es el centro de referencia para *B. thuringiensis* más importante a nivel internacional.

Además de lo anterior, conviene resaltar que en el caso de la cepa Bt-103, no fue posible determinar el perfil de proteínas de sus cristales, ya que éstos se encontraban fuertemente unidos a la espora, y no fue posible obtenerlos en forma pura. Sin embargo, las observaciones al microscopio electrónico mostraron que además de su asociación a la espora, presentaban dimensiones y formas variadas, encontrándose cristales amorfos, bipiramidales irregulares y algunos en forma de salchichas cortas. Tales complejos espora-cristal no presentaron actividad tóxica en los bioensayos realizados, sin embargo estas peculiaridades morfológicas contribuyen también a hacer de la cepa Bt-103, digna de un estudio más profundo. Cabe enfatizar empero, que la no toxicidad de los cristales de algunas cepas de *B. thuringiensis* no es algo raro. Al respecto, varios grupos de investigación han reportado que las cepas con poca o ninguna actividad tóxica, son más abundantes que aquellas que presentan un efecto insecticida (48, 55). Sin embargo, resulta difícil explicar la razón de su

predominancia en la naturaleza, además de las posibles ventajas evolutivas que pudieran presentar respecto a las tóxicas. En relación con esto, es importante destacar que son pocos los estudios realizados con respecto al papel ecológico de *B. thuringiensis* en la naturaleza (49). Todo lo anterior conduce a recalcar, que la probabilidad de aislar una cepa con alta capacidad insecticida es muy baja (47). Esto explica el que varios grupos de investigadores, dirigen sus esfuerzos a la modificación de las proteínas Cry, utilizando la Ingeniería Genética, con el propósito de obtener nuevas toxinas que presenten niveles de toxicidad más altos, y un espectro mayor de insectos-blanco. Sin embargo, la opinión de muchos autores es en el sentido de que es importante conocer en detalle las propiedades de las cepas con baja capacidad insecticida, en virtud de que pueden ayudar a entender mejor el mecanismo de acción entomotóxica de *B. thuringiensis* (56). El estudio de este grupo de cepas nos puede ayudar a comprender el papel real de dicha bacteria en la naturaleza.

De todo lo anterior, y viendo en perspectiva, los resultados concernientes a la selección y caracterización de la cepa de trabajo se puede concluir que la metodología y estrategias empleadas pueden ser útiles para obtener buenos candidatos de *B. thuringiensis* para producir, por una parte, una gran diversidad de enzimas, de acuerdo a los materiales de desecho utilizados. Al respecto, el medio de carapacho de camarón en agua de la llave puede ser una buena alternativa para producir industrialmente a esta bacteria, con la idea de obtener no solo biomasa, sino también enzimas proteo-quitino hidrolíticas. Al respecto la cepa de trabajo Bt-112 secreta importantes niveles de proteasa, y produce cristales proteicos intracelulares con una moderada actividad insecticida. En posteriores selecciones pudieran encontrarse nuevas cepas con una elevada actividad proteolítica, quitinolítica y bioinsecticida.

Por otra parte, y antes de pasar a los estudios a escala de matraz para favorecer la producción de la proteasa, puede comentarse que uno de los aspectos fundamentales de esta investigación, fue hacer un análisis de la materia prima, del cual se pudo concluir que el contenido de proteína del sustrato es un factor muy importante para favorecer el crecimiento microbiano y la síntesis de proteasa, y que por el contrario la síntesis de la enzima es afectada por la presencia de sal y de lípidos. Estudios más recientes no consignados en este trabajo, muestran también que el contenido de amonio en el sustrato, es crítico para propiciar o no la síntesis de enzima. Esto demuestra la importancia de estandarizar la materia prima a utilizar, para definir las características y variables que deben vigilarse para la puesta a punto del bioproceso que se está proponiendo.

A este respecto es importante destacar que no se ha hecho en México, una investigación que describa con detalle, cuanto desperdicio de camarón se genera, en qué sitios, cual es su costo y cuales sus usos. Es obvio de acuerdo a lo que pudo comprobarse, que su valor en la Ciudad de México es superior al que tiene en las zonas costeras, y es claro también que los mayores volúmenes se arrojan al mar, pues el descabezado de camarón ocurre en las propias embarcaciones. Por tanto el aprovechamiento de tales desechos puede ser particularmente atractivo en los sitios donde hay una acuicultura desarrollada del crustáceo, como pueden ser Sinaloa y Sonora. Sin embargo no existen (hasta donde pudo indagarse) estudios sobre estos sitios, su productividad y el manejo de sus desechos.

Con respecto a los estudios a escala de matraz, para la producción de proteasas y cristales proteicos intracelulares, se pudo concluir que Bt-112 crece rápida y eficientemente en estos medios, y que las condiciones óptimas a este nivel para la producción de proteasas fueron: concentración de sustrato al 2%, 180 rpm, 31°C y 32 h de incubación, además de que

la formulación del carapacho molido de camarón con un medio basal completo, no mejoró en nada los niveles de actividad. Cabe destacar que la simple extrapolación de estas condiciones a una escala de fermentador con un volumen de trabajo de 4 l, y con ajuste de la agitación (375 rpm) y aireación (0.5 vvm), mostraron que si bien la concentración de la enzima se mantiene en un máximo de 350 UP/ml, el tiempo para alcanzar esta cifra de producción se acorta de 32 a 22 h, lo cual, para fines industriales, significa una disminución importante de los costos del proceso.

Por otro lado, resultados preliminares muestran que mediante una centrifugación a baja velocidad, se puede separar el carapacho residual, y después centrifugando a mayor velocidad pueden recuperarse los cristales, quedando en el sobrenadante el extracto enzimático crudo. Esto permite ver con cierto optimismo, el que se pudiera desarrollar un bioproceso para aprovechar los desechos de camarón para la producción de proteasas, quitinasas y cristales insecticidas. Cabe añadir que se tienen datos previos que sugieren además, el empleo del residuo sólido remanente al final de la fermentación, como materia prima para obtener quitina/quitosana (50).

En este contexto es importante destacar, que el proceso de producción de *B. thuringiensis* a nivel industrial para la obtención de cristales bioinsecticidas, es relativamente sencillo, y no requiere de equipo complejo y costoso. Sin embargo, es importante mencionar que las materias primas representan el 50 % de los costos de producción de las toxinas (6). Al respecto se menciona que un medio de cultivo típico para obtener altos rendimientos de *B. thuringiensis* es el que se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 15. COMPOSICIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO TÍPICO Y CONDICIONES EXPERIMENTALES RECOMENDADAS PARA OBTENER ALTOS RENDIMIENTOS DE *Bacillus thuringiensis*.

VARIEDAD	COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO (g/l).	CONDICIONES EXPERIMENTALES
Berliner	Glucosa (30) Licor de cocimiento de maíz (5) Peptona de soya (2) Extracto de levadura (4.5) KCl (3) (NH ₄) ₂ SO ₄ (3) MgSO ₄ (2) CaCl ₂ .H ₂ O (0.036) FeSO ₄ .7H ₂ O (0.135) H ₃ PO ₄ (7 ml) CuSO ₄ .5H ₂ O (0.0075) ZnSO ₄ .7H ₂ O (0.0075) MnSO ₄ .4H ₂ O (0.04)	Fermentador de 500 L Temperatura 32°C pH 6.2-7.4 Aireación 3 vvm Agitación 120-160 rpm Tiempo de cultivo 60 h Rendimiento 4 X 10 ⁹ UFC/ml

Fuente: Bravo y col. (9).

De estos componentes, los únicos que se varían dependiendo del productor, son los que corresponden a la fuente de carbono, la cual puede cambiar por melaza, jugo de agave, cerelesa, agua de coco y cáscara de naranja, y la fuente de nitrógeno que puede cambiarse por harina de soya, harina de pescado, agua de cocimiento de levadura, harina de sangre deshidratada y harina de semilla de algodón. Sin embargo, es importante destacar que los requerimientos nutricionales y fisicoquímicos precisos para la obtención de cristales, con un nivel máximo de calidad y actividad no están bien definidos, y siguen siendo motivo de estudios (30).

Por otro lado se ha visto también, que de un medio a otro los rendimientos pueden variar, e incluso el tiempo de esporulación y el tamaño de los cristales producidos por una misma cepa puede diferir, dependiendo del medio donde se siembre. Congruente con esto, se probaron diferentes medios, y en el caso del medio de carapacho de camarón, se pudo

comprobar que el microorganismo esporula y produce cristales de muy buen tamaño, en tiempos que van de las 51 a las 72 h. Resultados similares se obtuvieron con la cepa patrón internacional HD-1. Esto es relevante, si se compara la formulación sencilla del medio de carapacho, comparado con algunos de los medios que anteriormente se mencionaron. La diferencia radica en que el medio contiene sólo carapacho seco y molido de camarón, suspendido al 2% en agua de la llave, lo cual implica mayor sencillez en su preparación, y un menor costo. Otra ventaja sería -aunque parezca reiterativo-, que además de los cristales, pudieran aprovecharse la proteasa, la quitinasa y el residuo sólido remanente.

No se soslaya sin embargo que a pesar de que los datos de esta tesis son de carácter básico, y se requieren investigaciones acerca de un escalamiento y un análisis de costos del proceso, sientan un precedente para continuar con este estudio, que además involucraría la forma de separar los productos de la fermentación, en sus tiempos óptimos respectivos. Además serían necesarias otras investigaciones en torno de la formulación que pudiera darse tanto a las enzimas como a los cristales, pensando en su utilización práctica.

Cabe destacar que los trabajos realizados hasta ahora a nivel internacional, indican que existe dificultad si se pretende establecer un modelo que relacione la formulación de un medio de cultivo, el tiempo de esporulación, el tamaño del cristal y el nivel toxicológico del bioinsecticida, debido a las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno que se utilizan, así como a las influencia de las condiciones de operación en los reactores, que conducen a fenómenos de transferencia de masa y calor que afectan aspectos de productividad y rendimiento en el proceso de producción del bioinsecticida, por lo que todavía existe mucho por investigar (6, 11, 30). El campo de la tecnología en esta área es amplio y nuevo en nuestro país, a pesar de que específicamente los cristales se producen ya a escala industrial en

otros países como: Francia, Estados Unidos, Rusia, China, Checoslovaquia, Bulgaria y Rumania. Los antecedentes indican sin embargo, que todavía es bastante lo que se puede mejorar, más aún si se establece este concepto pensando en el desarrollo tecnológico de nuestro país, debido principalmente a :

- i. La diversidad de tipos de cultivos agrícolas que producimos
- ii. Los insectos plaga de importancia nacional.
- iii. Los diferentes tipos de materias primas con que contamos (desechos proteín-quitinosos, queratinosos, amiláceos, pectinosos, celulósicos, proteicos, etc). Tales desechos pudieran ser aprovechados para la obtención de productos útiles como las enzimas y cristales insecticidas.
- iv. En México, existe un déficit en la producción de cierto tipo de enzimas, las cuales normalmente se importan, sobre todo aquellas relacionadas con el área médico-farmacéutica y agroindustrial.

Con respecto a la tercera y última parte de esta investigación, concerniente a la caracterización parcial de la proteasa extracelular de la cepa Bt-112, podemos decir que sus características indican que es una proteasa alcalina, con un pH óptimo de 8 y una temperatura óptima de 45°C; que muy probablemente requiere la presencia de iones metálicos divalentes en su molécula, y por eso es sensible a la acción de agentes quelantes. Además es una tiol-proteasa, que se inhibe con sustancias mercuriales como el HgCl₂ y el PCMB. También se inhibe con detergentes aniónicos, pero soporta bien los detergentes neutros. Con tales

características podría proponerse, *a priori*, su uso en la industria de los detergentes. Sin embargo esta área es un nicho muy competido. Otra posibilidad está en el depilado de pieles en curtiduría en la fabricación de hidrolizados proteicos. Sin embargo, también aquí se precisa hacer nuevas investigaciones específicas, orientadas a la búsqueda de posibles usos prácticos, preferentemente a nivel de extracto crudo para abatir costos. Al respecto puede mencionarse que estudios previos llevados a cabo en el LEM-ENCB-IPN, indican que la proteasa de *B. thuringiensis* a nivel de extracto crudo, es capaz de hidrolizar sustratos de pescados modelo como sardina (pescado graso), y guachinango (pescado magro), con solubilizaciones de un 85% para ambos, obteniéndose péptidos con pesos moleculares de 5000, 2500, 1250, 630 y 170. La misma proteasa pudo solubilizar también muy eficientemente, harinas de tipo proteico provenientes de anchoveta y fauna de acompañamiento, así como harinas comerciales producidas a base de materiales de desechos, tales como desperdicios de carnicerías, de tenería, de plumas y de sangre, encontrando que la enzima puede actuar sobre cualquiera de estos sustratos, obteniendo solubilizaciones de 60 a 70%, comparables a las reportadas en la literatura al usar enzimas de tipo comercial (62). Tales hidrolizados, luego de un consecuente estudio de sus propiedades organolépticas, funcionales y nutricionales, podrían ser utilizados en la formulación de alimentos para animales o incluso para consumo humano.

Por otra parte, a pesar de que las quitinasas no fueron un objetivo relevante de esta tesis, pero considerando la importancia que pudieran tener, y que representan otro de los posibles productos de la fermentación, se hicieron también estudios de la optimización de su producción a nivel de matraz, encontrando que las condiciones óptimas para su producción fueron: concentración de sustrato 3 %, 34°C, 300 rpm y 32 h de incubación. Los niveles de

actividad de las quitinasas de Bt-112 fueron muy bajos en comparación a los que se han encontrado con *S. marcescens* WF. Sin embargo, estudios previos de nuestro grupo de trabajo han mostrado que es posible mejorar significativamente los rendimientos, produciendo mutantes con luz UV y con nitrosoguanidina; aunque dichas mutantes son inestables y revierten con gran facilidad (26). Es oportuno mencionar al respecto, que las quitinasas pueden tener usos biotecnológicos interesantes, por ejemplo, en la producción de N-acetil-quito-oligosacáridos, algunos de los cuales pueden ser usados en alimentos o en medicina. Las quitinasas podrían ser útiles también en la formulación de bioinsecticidas (72), en el control de hongos fitopatógenos, en la producción de protoplastos fúngicos, etc. Empero cabe enfatizar por último, que no necesariamente es malo que la cepa Bt-112 produzca bajos niveles de quitinasas, ya que de este modo durante la fermentación de los desechos quitino-proteicos, la proteasa de Bt-112 solubiliza una proporción de la parte proteica del sustrato, dejando casi sin afectar la porción quitinosa. De este modo el residuo remanente que queda al final, puede servir para recuperar quitina de buena calidad, por métodos químicos convencionales (50).

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5. Conclusiones y perspectivas.

Más que un listado de los principales datos obtenidos en la presente investigación; en este capítulo se desea destacar algunos aspectos que se consideran relevantes, y que derivan del trabajo realizado. En algunos casos se comentan también algunas perspectivas a futuro.

En este contexto, la presente tesis estuvo encaminada a establecer las bases de un bioproceso utilizando a *B. thuringiensis* para aprovechar los desperdicios de camarón en la producción principalmente de proteasa extracelular y cristales con actividad insecticida; aunque también podrían ser aprovechables la quitinasa extracelular que se forma en proporción modesta, y el residuo sólido que queda al final de la fermentación, para obtener quitina y quitosana. Para optimar las condiciones de fermentación, se escogió a la proteasa como el producto más fácil de evaluar, y que se produce en mayor proporción. Dentro de esta óptica conviene resaltar que fueron trece las metas abordadas y concluídas, y dentro de ellas, algunos aspectos dignos de ser resaltados son los siguientes:

- ◆ Para escoger la cepa de trabajo se partió de una colección de 152 cepas de *B. thuringiensis*, sometiénolas a un proceso evaluatorio en tres fases. En la primera se sembraron las cepas en medios sólidos y líquidos específicos, para propiciar la producción de caseinasa, quitinasa y queratinasa. En cada caso hubo que poner a punto las técnicas a utilizar, siendo digna de señalarse por su originalidad, la referente a la queratinasa, en la que se empleó lana teñida con azul brillante de remazol, con un doble propósito; i) como ingrediente de un medio de cultivo para propiciar la síntesis de queratinasa, la cual digiere el sustrato sólido teñido y libera el colorante, el cual se puede evaluar por su absorción a 585 nm. Este principio pudo aplicarse a la selección de cepas queratinolíticas de *B.*

thuringiensis. ii) En la evaluación de la queratinasa; en este caso la enzima se induce al cultivar el microorganismo en un medio con sustratos queratinosos como lana o plumas, y después el sobrenadante se pone en presencia del sustrato teñido, y la actividad enzimática se evalúa por la liberación del colorante al cabo de unos minutos, bajo condiciones de reacción controladas.

Aún cuando las queratinasas no son una parte central del presente estudio, se ha querido destacar esta técnica por tres razones: i) las queratinasas son enzimas poco estudiadas y podrían tener usos prácticos, ii) la técnica del sustrato teñido mencionado es superior a las descritas en la literatura por su economía, sencillez y reproducibilidad. iii) Se están realizando estudios paralelos por nuestro grupo de trabajo para aprovechar desechos avícolas como plumas, para la producción de queratinasa y cristales proteicos bioinsecticidas.

- ◆ En la segunda fase de la selección, las ocho cepas mas promisorias se sembraron en un medio líquido conteniendo desechos molidos de camarón suspendidos en agua de la llave, para hacer estudios cinéticos sobre la producción de proteasa a lo largo de 42 h. Como testigos se incorporaron cepas particularmente proteolíticas como Bt-149 y *S. marcescens* WF, así como cepas productoras de cristales altamente bioinsecticidas (Bt-HD-1 y Bt-HD-73). Como resultado se escogieron las cepas más proteolíticas Bt-103 y Bt-112. Conviene agregar que las cepas altamente entomotóxicas fueron muy poco proteolíticas. En relación con estos resultados, son oportunos los siguientes comentarios: i) *B. thuringiensis* es una especie proteolítica, es decir casi el cien por ciento de las 152 cepas

estudiadas presentó la capacidad de producir proteasa. Más aún, cerca del 70 % pueden considerarse altamente proteolíticas, de modo que las cepas Bt-103 y Bt-112 son excepcionalmente proteolíticas, superiores por ejemplo a *S. marcescens* WF y similares a la cepa Bt-149, estudiada en trabajos previos, pero que no es cristalífera. ii) El hecho de que las cepas altamente entomotóxicas HD-1 y HD-73 sean poco proteolíticas puede ser sólo coincidente. Sería interesante averiguar si hay algún tipo de relación entre la capacidad bioinsecticida y la proteolítica. Hasta ahora se ha especulado que la presencia de altas cantidades de proteasa extracelular puede ser poco conveniente para la conservación de los cristales que son liberados al medio después que las células se autolisan. Sin embargo esta desventaja sería general, tanto para los cristales altamente tóxicos como para aquellos que no lo son, dado que en ambos casos su naturaleza es proteica. iii) En relación con esto, en este trabajo se evaluó de la producción de proteasa y cristales, encontrando que la enzima alcanza su mayor concentración a las 32 h, en tanto que los cristales se acumulan en mayor cantidad hasta las 72 h. Es decir, para cuando los cristales alcanzan su mayor concentración, el nivel de proteasa es apenas regular, pero sería suficiente para solubilizar los cristales. iv) Lo anterior puede tener implicaciones más profundas para el propósito del presente trabajo, pues habría que hacer nuevas investigaciones para establecer la conveniencia de un bioproceso en dos etapas; en la primera se cosecharía la proteasa y en la segunda los cristales. Otra opción sería decidirse por un solo producto, tomando en cuenta la rentabilidad del bioproceso. En cualquier caso sería necesario poner a punto un método sencillo para la cuantificación de los cristales. Los métodos disponibles basados en la evaluación inmuno-electroforética de las proteínas

Cry es tardada, complicada y costosa. También habría que desarrollar procesos para separar los cristales en forma sencilla rápida y a bajo costo.

- ◆ La tercera parte de la selección consistió en hacer bioensayos con las cepas Bt-103 y Bt-112, para conocer la acción tóxica de sus cristales hacia insectos plaga modelo, resultando que sólo Bt-112 es moderadamente tóxica hacia el lepidóptero *Manduca sexta*, el gusano de cuerno del tabaco, y en consecuencia fue escogida como cepa de trabajo. Los cristales bipiramidales de Bt-112 mostraron una composición de proteínas muy semejante a la de Bt-HD-1, sin embargo otros aspectos la hacen totalmente diferente, por ejemplo su perfil de plásmidos y su serotipificación, que la clasifica como *B. thuringiensis* serovar. *tolworthi*, en tanto que HD-1 es serovar. *kurstaki*. El comentario que se antoja oportuno es que se tuvo suerte de encontrar una cepa entomotóxica al estudiar sólo dos cepas. De haber encontrado que ni Bt-103 ni Bt-112 eran bioinsecticidas, hubiera sido necesario haber hecho bioensayos con otras cepas, probablemente no tan proteolíticas, hasta encontrar una con cristales más tóxicos. Otro comentario puede ir en el sentido de que vale la pena seguir buscando nuevas cepas, hasta encontrar alguna con toxicidades tan altas como las encontradas con HD-1 y HD-73, pero que produzcan altos niveles de proteasa o de alguna enzima de interés práctico. Otra acción sería trabajar con cepas ya conocidas como HD-1 y HD-73, para transformarlas por las técnicas que convengan en productoras de metabolitos de interés biotecnológico, por ejemplo, enzimas de diversos tipos.

- ◆ Otro hecho interesante en relación con la cepa de trabajo Bt-112 es que no produce β -exotoxina, la cual es un compuesto extracelular, soluble, termoestable y de bajo peso molecular (aproximadamente 700), cuya estructura es la un nucleótido de adenina unido a glucosa y ácido fosfolárico. Por su semejanza a un nucleótido, algunos autores han considerado a la β -exotoxina, potencialmente mutagénica, y se ha demostrado además que inhibe a la RNA polimerasa dependiente de DNA. Por estas razones, y aún cuando tiene un gran poder bioinsecticida, la EPA no autoriza aún su uso con fines de biocontrol.

- ◆ Los cristales de la cepa Bt-112 fueron estudiados mediante microscopía electrónica, estableciendo claramente su forma bipiramidal y dimensiones, así como su asociación a otras ultraestructuras de diferentes formas y tamaños, predominando las esferoidales y las cúbicas. En cuanto a Bt-103, sus cristales presentaban diferentes formas, aunque todos se encontraban fuertemente unidos a las esporas.

- ◆ Los estudios de materia prima entre desperdicios secos y molidos de camarón de diferentes procedencias, y una harina comercial de desechos de camarón, tanto desde el punto de vista de su análisis bromatológico como de su eficacia para favorecer la síntesis de proteasa, mostraron que la enzima se sintetizaba a mayores niveles cuanto más alto fuera el contenido de proteína en el sustrato. Por el contrario, su síntesis era afectada por la presencia de lípidos, de sal y de amonio. En este contexto, el sustrato más adecuado para implementar el proceso resultaron ser los desperdicios de camarón procedentes del pelado de camarón en Alvarado, Ver.

Cabe recalcar que uno de los aspectos fundamentales que podrían abordarse en el futuro, sería un estudio amplio sobre la materia prima a utilizar. No existe en México una investigación que describa con detalle cuanto desperdicio de camarón se genera, a qué se dedica y cuales son sus costos. Es obvio que su valor en la Ciudad de México puede ser muy superior al que tiene en zonas costeras. También es claro que los mayores volúmenes se arrojan al mar, pues el descabezado del camarón ocurre en las propias embarcaciones. Por tanto el aprovechamiento de tales desechos puede ser atractivo en los sitios donde hay una acuicultura desarrollada del crustáceo, como Sinaloa y Sonora. Sin embargo no existen estudios sobre estos sitios, su productividad y el manejo de sus desechos. Esta etapa será indispensable para realizar una evaluación de costos del bioproceso y de su factibilidad económica.

- ◆ Para establecer las condiciones más favorables para la producción de proteasa, cristales y enzima quitinolítica. Se hizo una larga serie de experimentos a escala de matraz en cultivo sumergido, cuyos resultados en forma resumida fueron los siguientes:
 - Bt-112 crece rápida y eficientemente en medios a base de desperdicios de camarón en agua de la llave, produciendo altos niveles de proteasa y cristales proteicos intracelulares. Las condiciones óptimas a nivel de matraz para la producción de proteasa fueron: concentración de sustrato 2 %, 180 rpm, 31°C y 32 h de incubación. No se requiere ajustar el pH inicial del medio, ni controlar el pH durante la fermentación. Los resultados obtenidos mediante técnicas electroforéticas, sugieren que sólo se secreta una proteasa,

con peso molecular de 36 kDa. Estudios posteriores realizados por investigadores de nuestro grupo de trabajo, parecen apoyar esta conclusión.

- ◆ También se hicieron experimentos a nivel de fermentador, evaluando la producción de proteasa, cristales y quitinasa, adoptando de entrada las condiciones óptimas establecidas a nivel de matraz. Los resultados no mostraron mayores rendimientos, pero sí una reducción notable del tiempo de fermentación de 32 a 22 h para obtener los mayores niveles de proteasa.

- ◆ La caracterización parcial de la proteasa de Bt-112 a nivel de extracto crudo, indicó que tiene su máxima actividad a pH 8 y 45°C; requiere de la presencia de iones metálicos divalentes y por eso es sensible a la acción de agentes quelantes. Es una tiol-proteasa, que se inhibe con reactivos para grupos SH, como el HgCl₂ y el PCMB, y también se inhibe con detergentes aniónicos. Su vida media en congelación es de 2.7 meses y de 1.9 meses en refrigeración. De momento un uso razonable que podría proponerse para esta enzima, sería en la elaboración de hidrolizados proteicos a partir de harinas elaboradas con materiales proteicos de desecho, tema en el que ya se obtuvieron resultados previos alentadores (62).

6. BIBLIOGRAFIA

6. Bibliografía

1. Allan, G., Atman, L.C., Besinger, R.E., Gosh, D.K. & Neogi, S. 1984. Biomedical Applications of chitin and chitosan. En chitin, chitosan and related enzymes. J.P. Zikakis (Ed). Academic Press, Inc. Orlando, San Diego, New York, p. 19.
2. Anuarios Estadísticos de la Secretaría de Pesca. 1983-1994. Dirección General de Informática, Estadística y Documentación de la Secretaria de Pesca. México.
3. Arredondo Martínez, M.D. 1989. Nuevos aportes a la purificación de la quitinasa y quitobiasa de *Serratia marcescens* Wf. Tesis Profesional, LEM-ENCB-IPN..
4. Arreola Mendoza, J. 1995. Estudio microfotográfico y bioquímico de la acción antifúngica de preparaciones crudas de la quitinasas de *Serratia marcescens* sobre el micelio de *Aspergillus niger*. Tesis Profesional, LEM-ENCB-IPN.
5. Austin, P.R., Brine, C.J., Castle, J.E. & Zikakis, J.P. 1981. Chitin: new facets of research. Science. 212: 749-753.
6. Bravo, A., Lorence, A. & Quintero, R. 1992. Perspectivas en la utilización de *Bacillus thuringiensis* como bioinsecticida. Biotecnología 2: 139-154.
7. Brine, Ch. J., 1984. Chitin: accomplishment and perspectives. En chitin, chitosan and related enzymes, J.P. Zikakis (Ed). Academic Press, Inc. Orlando, San Diego, New York, pp. 7 - 24.
8. Brown, L. R., Brown, S.K. & Jadner, C.M. 1981. Biological treated shrimp waste as a seet treatment control of pathogenic fungi. En Development of Industrial Microbiology, Vol. 23. Proceedings of the 38th General Meeting of the Society for Industrial Microbiology. Pag. 513-519. Richmond, Va., U.S.A.
9. Bulla, Jr., L.A., Bechtel, D.B., Kramer K.J. & Shethna, Y.I. 1980. Ultrastructure, Physiology and Biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. CRC. Critical Reviews in Microbiology. 8: 147-203.
10. Camacho Velázquez, M. 1992. Separación de la N-acetil-D-glucosamina proveniente de a sacarificación enzimática *in vitro* de subproductos proteín-quitinosos. Tesis Profesional, LEM-ENCB-IPN.
11. Capalbo, D.M.F. 1995. *Bacillus thuringiensis*: Fermentation process and risk assesment. A short review. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. Río de Janeiro, Brasil. 90 (1): 135-138.

12. Castañeda-Agulló, M. 1956. Studies on the biosynthesis of extracellular proteases by bacteria. *J. Gen. Physiol.* 89: 369-375.
13. Cody, R.M. 1989. Distribution of chitinase and chitinase in *Bacillus*. *Current Microbiology.* 19: 201-205.
14. Cruz Camarillo, R. y García Ramos, M.C. 1968. Aislamiento y purificación de la proteasa extracelular de *Serratia marcescens*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol. Parasitol* 10: 115-125.
15. Cruz Camarillo, R. & Albores Medina, A. 1972. Obtención con posibles fines prácticos de una proteasa alcalina extracelular de *Serratia marcescens*. *Rev. Lat. amer. Microbiol.* 14: 211-219.
16. Chávez Camarillo, G.M. y Cruz Camarillo, R. 1984. El sistema quitinolítico de *Serratia marcescens*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 26: 203-215.
17. Chen, J. & Weng, H. 1983. The performance of immobilized glucose-isomerase supported by shrimp chitin in various types of reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 725-733.
18. Chestukhina, G.G., Kotova, T.S., Zalunin, I.A. & Stepanov, V.M. 1979. Proteinases during growth and spore formation of *Bacillus thuringiensis*. *Biokhimiya.* 44 (5): 796-802.
19. Chigaleichik, A.G. 1976. Chitinase of *Bacillus thuringiensis*. *Mikrobiologiya.* 45(6): 966-972.
20. Chilcott, C.N., Kalmakoff, J. & Pillai, P.J. 1981. Biological significance of protease activity in *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystals. World Health Organization. WHO/VBC/81.835.
21. De Barjac, H.V. Cosmao. 1975. Repartition des pouvoirs chitinolytiques et lipolytiques chez les divers serotypes de *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga.* 20 (1): 43-48.
22. Dementer, A.A. et al. 1992. Extracellular alkaline ribonuclease of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Biol.* 26 (part 2): 883-889.
23. De Urquijo, N.E. 1987. Producción de *Bacillus thuringiensis* para el control de ciertas plagas agrícolas y médicas de importancia en México. Tesis de Maestría. CINVESTAV-IPN.
24. Egorov, N.S., Yudina, T.G., Loria K. & Krier, V.G. 1978. Extracellular protease isolated of *Bacillus thuringiensis*. *Biol. Nauk.* 9:99.

25. Epremyan, A.S., G.G. Chestukhina, R.R. Azizbekyan, E.M. Neyksa, G.N. Rudenskaya & V.M. Stepanov. 1981. Extracellular serine proteinase of *Bacillus thuringiensis*. *Biokhimiya* 46: 920-929.
26. Esquivel-Esquivel, I.E. 1993. Perfil enzimático extracelular de *Bacillus thuringiensis*, y búsqueda de una cepa con niveles de quitinasa semejantes a los de *Serratia marcescens* Wf. Tesis Profesional. UNAM. Realizada en el LEM-ENCB-IPN.
27. Federici, B.A. 1993. Insecticidal bacterial proteins identify the midgut epithelium as a source of novel target sites for insect control. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 22: 357-371.
28. Franco Gómez, M.J., Díaz Cervantes, M.D. & Ruíz Carrera, V. 1990. Métodos de análisis utilizados para evaluación de proteínas. CINVESTAV-Zacatenco.
29. Gagné, N. & Simpson, B.K. 1993. Use of proteolytic enzymes to facilitate the recovery of chitin from shrimp wastes. *Food Biotechnol.* 7 (3): 253-263.
30. Medrano Roldán, H. & Galán Wong, L.J. 1996. Bioingeniería y Biotecnología en la producción de bioinsecticidas. En: Avances recientes en la Biotecnología en *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de nuevo León. P. 113-137.
31. Gill, S.S., Cowles, E.A., & Pietrantonio, P.V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
32. Gutiérrez-García, A. 1989. Producción de la proteasa extracelular de *Serratia marcescens* mediante la fermentación de desechos quitinosos, su posible uso en la obtención de hidrolizados de carne de pescados de especies no grasosas. Tesis Profesional, LEM-ENCB-IPN..
33. Hernández Carmona, L.A. 1990. Producción de N-acetil-D-glucosamina por sacarificación enzimática de residuos quitinosos. Tesis Profesional, LEM-ENCB-IPN.
34. Hirano, S., Senda, H., Yamamoto, Y. & Watanabe, A. 1984. Several novel attempts for use of potential functions of chitin and chitosan. En: Chitin, chitosan and related enzymes. J.R. Zikakis (Ed). Academic Press, Inc., Orlando, San Diego, New York. p. 77.
35. Höfte, H., & Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
36. Hsu, S.C. & J.C. Lockwood. 1975. Powdered chitin-agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol.* 29: 422-426.

37. Ibarra, J.E. & Federici, B.A. 1986. Isolation of a non relatively nontoxic 65 kilodalton protein inclusion from parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. Bacteriol. 165: 527-533.
38. Ibarra, J.E. & de León, T. 1990. Cuantificación toxicológica de *Bacillus thuringiensis* bajo condiciones de laboratorio. I Simposio sobre *Bacillus thuringiensis*. XIII Reunión Nacional de Control Biológico. 1-5 de Octubre de 1990. Colima, Col.
39. Kucera, M. & Barbashova, N.M. 1979. Partial purification and properties of proteinases of Bitoksybacillin. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 15: 707.
40. Kunitz, M. 1947. Soybean trypsin inhibitors. II General Properties. J. Gen. Physiol. 30: 290-310.
41. Laemmli, J.K. & Favre, M. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T₄ I. DNA packing agents. J. Mol. Biol. 80: 575-599.
42. Lecadet, M.M., Frachon, E., Dumanoir, V.C. & Barjac, H. 1994. An update version of the *Bacillus thuringiensis* strains classification according to H-serotypes. In: Abstracts of the I Ind. International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Society for invertebrate pathology. Montpellier, France.
43. Li, E. & Yousten, A. 1975. Metalloprotease from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Microbiol. 30: 354-361.
44. Lorence Quiñones, A. & Quintero, R. Mecanismo molecular de acción de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. 1996. En Avances recientes en la biotecnología en *Bacillus thuringiensis*. Editado por: Galán-Wong, L., Rodríguez Padilla, C. & Luna Olvera, H.A. Universidad Autónoma Metropolitana, p. 63-112.
45. López Meza, J.E., Federici, B.A., Phoener, W.J., Martínez Castillo, A.M. & J.E. Ibarra. 1995. Highly mosquitocidal isolates of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kenyae* and entomocidous from México. Biochem. Syst Ecol. 23: 461-468.
46. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.L., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
47. Maciel Rosas, A.M., Juárez-Pérez, V.M. Henonin-Aguilar, L. & Ibarra, J. 1994. Aislamiento y caracterización de una cepa nueva de *Bacillus thuringiensis*, esencialmente inmóvil y altamente tóxica a *Manduca sexta* (Lepidóptera: Sphingidae). Vedalia 1:3-12.
48. Martin, P.A.W. 1994. An iconosclatic view of *Bacillus thuringiensis* ecology. American Entomologist. 40: 85-90.

49. Meadow, M.P. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the environment: Ecology and Risk assesment. In: Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J., Higgs, S. (eds). *Bacillus thuringiensis*, and environmental bipestices: Theory and practice. John Willey & Sons Ltd. P. 193-220.
50. Mejia-López, A. 1990. Fermentación del carapacho de camarón suspendido en agua de a llave dirigida a la producción de quitinasas y al estudio del sólido remanente. Tesis Profesional, LEM- ENCB - IPN.
51. Morales, J. 1995. Estudio bioquímico y microfotográfico de la acción lítica y la producción de protoplastos de *Aspergillus niger* por la acción de las quitinasas de *Serratia marcescens*. Tesis profesional de la ENEP-Iztacala-UNAM. Realizada en el LEM-ENCB-IPN.
52. Morris, O.N. 1976. A 2-year study of the efficacy of *Bacillus thuringiensis*-chitinase combinations in spruce budworm (*Choristonema fumiferana*) control. The Canadian Entomologist. 18 (3): 225-233.
53. Muzarelli, R.A.A. 1977. Chitin: Industrial production and applications. Pergamon Press, New York, p. 207-213.
54. Muzarelli, R.A.A., Jeuniaux, C. y Gooday, G.W. (1986). Chitin in Nature and technology. Pergamon Press, New York. pp. 39-50.
55. Ohba, M., & K. Aizawa. 1986. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil of Japan. J. Invertebr. Pathol. 47: 12-20.
56. Ohba, M. Yu, Y. M. & Aizawa, K. 1987. Non toxic isolates of *Bacillus thuringiensis* producing parasporal inclusions with inusual protein componen. Lett. Appl. Microbiol. 5: 29-32.
57. Oke, O.L., S. O. Talai & I.B. Umoch. 1978. The possible use of chitin and chitosan as animal feed. En proceedings of the First International Conference on chitin/chitosan. Pág. 327-332. R.A. Muzzarelli & E.R. Pariser (Eds). MIT Cambridge, Mass. U.S.A.
58. Pérez-Martínez, M.E. 1986. Selección de una levadura capaz de crecer en un hidrolizado enzimático de subproductos protein-quitinosos (caparazón de camarón). Tesis Profesional LEM-ENCB-IPN.
59. Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriol. Rev. 41: 711-753.
60. Rabadán López, A. 1991. Producción de proteasas por la fermentación de desechos quitinosos. Su posible uso en la obtención de hidrolizados de carne de pescados grasosos. Tesis Profesional, LEM- ENCB-IPN.

61. Regev, A., Keller, M., Strizhov, N. & Zilberstein, A. 1996. Synergistic activity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxina and a bacterial endoquitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3581-3568.
62. Rojas-Avelizapa, L.I. 1994. Producción de proteasas por *B. thuringiensis* crecido en medios a base de materiales proteín-quitinosos. Posible uso de estas enzimas en la obtención de hidrolizados de carne y harinas de pescado. Tesis de Maestría (Biotecnología en Fermentaciones). Instituto Tecnológico de Veracruz. Realizada en el LEM-ENCB-IPN.
63. Rojas-Avelizapa, L. I., Cruz Camarillo, R., Guerrero, M.I., Rodríguez Vázquez, R. & Ibarra, J.E. 1999. Selection and Characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. *World Journal of Microbiol. and Biotechnology*. En prensa.
64. Rojas Avelizapa, N.G., Rodríguez-Vázquez, R.E. & Martínez-Cruz, J. 1999. Transformer oil degradation by indigenous microflora isolated from a polychlorinated biphenyls contaminated soil. *Resource Conservation and Recycling*. En prensa.
65. Ruiz Romero, A.M. 1977. Purificación y Caracterización parcial de la quitinasa extracelular de *Serratia marcescens*. Tesis Profesional, LEM-ENCB-IPN.
66. Santillán Flores, M. 1996. Búsqueda de una cepa silvestre o mutante del genero *Bacillus* para sustituir a *Serratia marcescens* WF en el aprovechamiento integral de subproductos proteín-quitinosos por via fermentativa. Tesis Profesional. Universidad Femenina de México, realizada en el LEM-ENCB-IPN.
67. Santos Segura, A. 1993. Síntesis y caracterización de las proteasas de *Bacillus thuringiensis* (extracto crudo). Tesis Profesional, LEM-ENCB-IPN.
68. Shirai K., Guerrero, I., Saucedo, G., Huerta, S. & Hall, G.M. 1997. Aspects of protein breakdown during y the lactic acid fermentation on prawn wastes. In: *Advances in Chitin Science*. Eds. Domard, A., Roberts, G.A.F. & Varum, K.M. Jaques Andre Publiher. 2: 56-63.
69. Sneh, B., Schuster, S. & Gross, S. 1983. Improvement of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *Entomocidous* on larvae of *Spodoptera littoralis* by addition of chitinolytic bacteria, a phagostimulant and a UV-protectant. *Z. Angew. Entomol.* 96: 77-83.
70. Smirnoff, W.A. 1971. Effect of chitinase on the action of *Bacillus thuringiensis*. *Can. Entomol.* 103: 1829-1831.

71. Smirnoff, W.A. & Valero, J. 1977. Determination of the chitinolytic activity of nine subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of invertebrate pathology*. 30: 265-266.
72. Smirnoff, W.A. 1977. Confirmations experimentales du potentiel du complexe *Bacillus thuringiensis* et chitinase pour la repression de la tordeuse des Bourgeons de l'épinette choristonema fumiferana (Lepidoptera: tortricidae). *Can. Entomol.* 109: 351-358.
73. Spreen, K.A., Zikakis, J.P. & Austin, P.R. 1984. The effect of chitinous materials on the intestinal microflora and the utilization of whey in monogastric animals. En chitin and chitosan an related enzymes. J.P. Zikakis (Ed). Pág. 57-73. Academic Press. London LTP.
74. Stephens, N.L., Bough, W.A., Beuchat, L.R. & Haton, E.K. 1976. Preparation and evaluation of two microbial media from shrimp heads and hulls. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 1-16.
75. Tenorio-Sanchez, S.A. 1999. Estudio de una cepa de *Bacillus thuringiensis* aislada de suelos contaminados con bifenilos clorados. Tesis de Maestría en Ciencias Químico Biológicas, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. Realizada en el LEM-ENCB-IPN.
76. Tobey, J.F. & Yousten, A.A. 1977. Factors affecting the production of amylase by *Bacillus thuringiensis*. In *Developments in industrial microbiology*. 18: 419-510. Proceedings of the 33th General Meeting of the Society for Industrial Microbiology. Jekyll Island, Georgia, U.S.A.
77. Tsuru, D. & T. Yoshimoto. 1990. Microbial proteases. *CRC. Handbook of Microbiology* 8: 239-278.
78. Uchida, Y., Izume, M. A. & Ohtakara, A. 1989. Preparation of chitin oligomers with purified chitosanase and its applications. En: chitin and chitosan. G. Skjak-Braek, T. Anthonsen y P. Sandford (Eds). Elsevier Applied Science Ltd., London y New York. Pág. 373-382.
79. Venegas Gúzman, R.M. 1978. Un enfoque sobre la obtención con fines comerciales de la proteasa de *Serratia marcescens*. Tesis Profesional, LEM-ENCB-IPN.
80. Wiwat, C., Lertnawanichakul, M., Siwayapram, P., Pantuwatana, S. & Bhumiratana, A. 1996. Expression of chitinase encoding genes from *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas maltophilia* in *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Gene*. 179: 119-126.

81. Yalpani, M. & D. Pantaleone. 1994. An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis. *Carb. Res.* 256: 159-175.
82. Yongmei, Z. & Zongsheng, Ch. 1981. Analysis of esterase patterns of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Microbiol. Sinica.* 21: 197-203.
83. Yu, V.L. 1979. *Serratia marcescens*. Historical perspective and clinical review. *The New England J. Med.* 300: 887-892.