



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Estudio del efecto de la proteinasa K sobre la disociación de la proteína Cry1Ac en *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

Crisanto Roldan Sabino

Director de Tesis

Dra. Ana Karin Navarro Martinez

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, 2017.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 27 de Junio del 2017 a las 12:00 hr, se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de la carrera de **Ingeniería en Biotecnología** de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **Estudio del efecto de la proteinasa K sobre la disociación de la proteína Cry1Ac en *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73** presentado por el alumno **Crisanto Roldan Sabino**, con número de matrícula 11090022, aspirante al grado de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron QUE LA TESIS **SATISFACE** LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES, OTORGANDO SU **APROBACIÓN** PARA QUE EL ASPIRANTE PUEDA PROCEDER CON EL PROCESO DE TITULACIÓN.

Tuxtepec, Oax., a 27 de Junio del 2017.

ATENTAMENTE.
LA COMISIÓN REVISORA

Director de Tesis

Dra. Ana Karin Navarro Martinez
Profesor- Investigador

Presidente

Secretario

Vocal

Dra. María de Jesús García Gómez
Profesor- Investigador

Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre
Profesor-Investigador

Dr. Enrique Vallalobos Amador
Profesor- Investigador

*A mis padres y hermanas, con afecto
y gratitud*

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a la Universidad del Papaloapan por todos los apoyos y facilidades brindadas para la realización de este proyecto.

A los integrantes del comité tutorial que evaluaron esta tesis: Dra. María de Jesús García Gómez, Dr. Enrique Villalobos Amador y el Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre de la Universidad del Papaloapan.

A la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, por las facilidades otorgadas para el uso de equipos a su cargo.

A la QFB. Leticia Saldaña por las facilidades otorgadas para el uso de materiales a su cargo.

A la Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño por su apoyo y valiosos consejos en el trabajo de laboratorio.

A Michell, Alán, Erick y Luis por su amistad, compañerismo y apoyo.

Finalmente, a la Dra. Ana Karin Navarro Martinez por su dirección en el presente trabajo, sus consejos para el desarrollo de mi formación profesional y personal.

Con sincera gratitud

Crisanto Roldan Sabino

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

1. ANTECEDENTES.....	5
1.1 <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	5
1.2 PROTEÍNAS CRY.....	6
1.2.1 Clasificación de las δ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
1.2.2 Mecanismos de acción de la proteína Cry.....	8
1.2 QUORUM SENSING.....	11
1.2.1 Regulación del sistema de Quorum sensing <i>nprR-nprX</i> sobre la producción de la proteasa neutra (NprA).....	12
1.3 PROTEINASA K.....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. HIPÓTESIS.....	15
4. OBJETIVOS.....	15
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	15
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1 MODELO DE ESTUDIO	16
5.2 MEDIOS DE CULTIVO.....	16
5.2.1 Medios de cultivo para el inóculo	16
5.2.2 MEDIO PARA LA OBTENCIÓN DE CRISTALES CRY EN CULTIVO SÓLIDO	17
5.2.3 MEDIO PARA LA OBTENCIÓN DE CRISTALES CRY EN CULTIVO LÍQUIDO.....	17
5.3 TRATAMIENTOS DE CRISTALES CRY CON PROTEINASA K	17
5.4 FERMENTACIÓN LÍQUIDA	18
5.4.1 Fermentación líquida con adición de PK	18
5.5 LAVADO DE PROTEÍNA CRY.....	19
5.6 TÉCNICAS CUALITATIVAS	19
5.6.1 Detección de proteína Cry con geles SDS-PAGE	19
5.6.2 Teñido y desteñido del gel	20
5.7 TÉCNICAS CUANTITATIVAS.....	20
5.7.1 Cuantificación de bacilos y esporas	20
5.7.2 Cuantificación de glucosa.....	20

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	22
6.1 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE SUSTRATO DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> VAR. KURSTAKI HD-73	22
6.2 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE SUSTRATO DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> VAR. KURSTAKI HD-73 CON ADICIÓN DE LA PK	24
6.3 ANÁLISIS DE GELES SDS-PAGE	26
6.3.1 Disociación con Laemmli y carbonato de sodio	26
6.3.2 Disociación del cristal Cry empleando la PK en extractos de medio sólido y líquido ...	31
6.3.3 Detección de proteína Cry en fermentaciones líquida con tratamientos de adición de la PK	34
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	44
7.1 CONCLUSIONES	44
7.2 PERSPECTIVAS	44
8. REFERENCIAS	45

Anexo I

Anexo II

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Clasificación de las toxinas de <i>B. thuringiensis</i> .	8
Figura 2 Proceso de activación de las inclusiones cristalinas producidas por <i>B. thuringiensis</i> ..	9
Figura 3 Representación esquemática de una hidrólisis enzimática mediada por la PK.	14
Figura 4 Cinéticas control de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD-73.	23
Figura 5 Cinéticas con adición de la PK de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD-73.	25
Figura 6 Gel SDS-PAGE al 7% que muestra los tratamientos de disociación A, A1, A3, B1, C y D.	28
Figura 7 Gel SDS-PAGE al 7% que muestra los tratamientos de disociación A, E, F, H y L.	29
Figura 8 Gel SDS-PAGE al 7% que muestra los tratamientos de disociación A3, J, K, N y O	30
Figura 9 Gel SDS-PAGE al 7% que muestra los tratamientos de disociación A, G, I, M y D.	32
Figura 10 Gel SDS-PAGE al 7% que muestra los tratamientos de disociación N, C, O, D. y A.	33
Figura 11 Gel SDS-PAGE al 7% que muestra los tratamientos de disociación A3, B, P, Q y R	34
Figura 12 A Geles SDS-PAGE al 7% de una fermentación líquida de 24 h.	35
Figura 12 B Geles SDS-PAGE al 7% de una fermentación líquida de 24 h.	35
Figura 13 A Geles SDS-PAGE al 7% de una fermentación líquida de 56 h.	37
Figura 13 B Geles SDS-PAGE al 7% de una fermentación líquida de 56 h.	37
Figura 14 A Gel SDS-PAGE al 7% de una fermentación de 80 h	39
Figura 14 B Gel SDS-PAGE al 7% de una fermentación de 80 h	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Formulación del medio Gerry-Rowe.	16
Tabla 2 Tratamientos de disociación para cristales K-73 y bandas detectadas en SDS-PAGE.	27
Tabla 3 Banda detectadas en SDS-PAGE de fermentaciones líquidas con tratamientos T1 y T2.	40
Tabla 4 Posibles escisiones de la proteasa neutra A provocadas por la proteinasa K	403

LISTA DE ABREVIATURAS

BG	Solución compuesta por bromofenol, glicerol y agua destilada
CL	Cosecha de cristal insoluble del medio líquido
CS	Cosecha de cristal insoluble del medio sólido
L	Muestra lavada
LMM	Buffer Laemmli
LMMDM	Buffer Laemmli con doble concentración de 2-mercaptoetanol
MSDST	Buffer Laemmli modificado, sin glicerol ni azul de bromofenol
Na₂CO₃	Carbonato de Sodio
NL	Muestra no lavada
nM	Nanomolar
PK	Proteínasa K
PK T1	Adición de proteínasa K (10 µg/mL) a una temperatura de 37 °C 30 min
PK T2	Adición de proteínasa K (100 nM) a una temperatura de 30 °C 2 h
PM	Marcador de peso molecular
PMA	Pellet de fermentación líquida del matraz A
PMB	Pellet de fermentación líquida del matraz B
SMA	Sobrenadante de fermentación líquida del matraz A
SMB	Sobrenadante de fermentación líquida del matraz B
S24 h	Sobrenadante obtenido de 24 h fermentación con adición de la PK (100 nM) a las 16 h
TN	Control negativo

RESUMEN

Bacillus thuringiensis (*B. thuringiensis*) es una bacteria cosmopolita que pertenece a un conjunto de microorganismos llamado “Grupo de *Bacillus cereus*”. *B. thuringiensis* se diferencia de los integrantes de este grupo por tener la capacidad de sintetizar un cristal insoluble de naturaleza proteica. Esta proteína caracteriza a *B. thuringiensis* como un entomopatógeno de alto interés agronómico, ya que es el principio activo de formulaciones bioinsecticidas contra larvas de insectos de diversos órdenes. Así mismo, se han aislado genes de *Bacillus thuringiensis* para la producción de plantas transgénicas con la capacidad de producir dicha proteína. Por otro lado, a inicios del año 2000 se reportó que los cristales insolubles son proteínas con actividad citotóxica hacia células de cáncer. Para que los cristales proteicos presenten actividad insecticida o anticancerígena *in vitro* deben ser disociados e hidrolizados. Es decir, separar las proteínas que forman el cristal proteico y generar las protoxinas *in vitro* mediante el uso de agentes reductores y un medio alcalino. Posteriormente, se hidrolizan las cadenas polipeptídicas con endopeptidasas del tipo de tripsina o quimotripsina para producir polipéptidos tóxicos.

La formación de los cristales en *B. thuringiensis* ocurre durante la fase de esporulación junto con la formación de la espora, y se han reportado como procesos dependientes en algunas cepas de *B. thuringiensis*. En un estudio previo se midió la expresión de genes (*nprR-nprX*, *nprA*) relacionados a la comunicación célula-célula y a la regulación de la esporulación, para lo cual se empleó la proteinasa K (PK) para interrumpir la señal que inician los péptidos NprR-NprX que desencadenan la comunicación celular. Se observó que, aunque hubo expresión del gen *cry* no hubo presencia de las proteínas insolubles en el medio al final de la fermentación. Esto parece indicar que la adición de PK al medio durante la fermentación de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 disoció el cristal. Por lo tanto, en el presente trabajo se buscó determinar la posible disociación *in vitro* de los cristales de proteína Cry de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73, que tiene la capacidad de producir un solo cristal (k-73). Además, se adicionó PK a cultivos en medio líquido de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 durante las etapas de crecimiento exponencial y de

esporulación para verificar si la PK impedía la formación o disociaba el cristal presente en el medio. La detección de la proteína Cry se realizó con geles SDS-PAGE al 7%.

Se observó que la PK no tuvo efecto de disociación, sin embargo; se sugiere que la adición de la PK en una fermentación de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 produce alteraciones en funciones intracelulares que no permiten la formación del cristal K-73. Por otro lado, al adicionar la PK después de disociar el cristal con agentes reductores a altos valores de pH, se observó la presencia de toxinas Cry de aproximada 60 kDa y varias fracciones peptídicas de menor tamaño. Utilizando una concentración de 100 nM de PK después de disociar el cristal se observaron fracciones polipeptídicas menores a 48 kDa.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis, a cosmopolitan bacterium, belongs to a set of microorganisms called “*Bacillus cereus* Group”. *B. thuringiensis* synthesizes insoluble crystal proteins, that make them different from another group members. Crystal formation in *B. thuringiensis* occurs during sporulation phase in growing of this bacterium, together spore formation. The characterized crystal protein of high agronomic interest serves as an entomopathogen and principle bio-insecticide against larvae of various insect order. Also, genes of these bacteria have been isolated and expressed to produce transgenic plants with the capacity of crystal protein production. For decades, the insoluble crystal proteins were reported to show toxic activity against different cancer cell lines. To exhibit insecticidal and anticancerogenic activity, the crystal proteins are dissociated and hydrolyzed (trypsin or chemotrypsin endopeptidases type) in an alkaline environment to generate protoxins.

Previously in our workgroup, gene expression (*nprR-nprX*, and *nprA*) was measured and understood the cell-cell communication and the sporulation regulation. For this study, proteinase K (PK) was employed to interrupt signals that initiated the peptides NprR-NprX to trigger cells communication. It was found that although there was expression of the *cry* genes, no crystal Cry protein was present in the medium at the end of fermentation. These results indicated that the addition of PK in the culture media during the fermentation of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 don't allow the crystallization of proteins.

Therefore, in the present work, we studied the possible *in vitro* dissociation of the crystal protein Cry of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 which produces an only crystal protein (K-73). Also, PK (100nM concentration) is added in the media liquid culture of *B. thuringiensis* during its exponential growing step to determine if the PK affect the *cry* genes expression and crystal dissociation. The Cry protein detection was realized with SDS-PAGE gels. It was observed that the addition of PK has produced intracellular functional changes that do not allow the formation of K-73 crystals in the fermentation of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73. In the other hand, Cry toxin obtained through PK treated cells showed a molecular weight of less than 60 kDa after

dissociating them with reducing agents in high pH values. In addition, many bands of small molecular weights were also found.

1. ANTECEDENTES

1.1 *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis es una bacteria gram positiva, en forma de bastón, aisladas de diversos medios como lo son: las montañas, los suelos cultivados, restos de hojas en descomposición, los depósitos de agua, etc. (González *et al.*, 1981). Es esporogénea; es decir, que produce una espora durante su ciclo de vida, es aerobia y se reproduce por fisión binaria. Pertenece a la familia *Bacillaceae* y forma parte de los bacilos nombrados 'Grupo de *Bacillus cereus*' integrado por *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomyoides* y *Bacillus. weihenstephanensi* (Whiteley y Schnepf, 1986; Ibrahim *et al.*, 2010).

B. thuringiensis presenta 3 fases secuenciales durante su cultivo; crecimiento vegetativo, transición y esporulación (Rowe, 1990). A lo largo de la etapa vegetativa la bacteria libera elementos con potencial tóxico-virulento como: proteasas, quitinasas, exotoxinas y endotoxinas. Estas pueden ser secretadas al medio como proteínas VIP y SIP (por sus siglas en inglés vegetative insecticidal protein y secreted insecticidal protein, respectivamente). Durante la etapa de transición *B. thuringiensis* produce diversos compuestos como la acetoína, polihidroxialcanoatos (PHAs), entre otros. La bacteria también produce cuerpos o inclusiones paraesporales durante la esporulación, adyacente a la espora conocidas como proteínas Cry (del inglés Crystal), PSs (parasporinas) y las proteínas Cyt (del inglés Cytolytic). Estas proteínas exotoxinas acopladas en configuración de cristal insoluble son conocidas como δ -endotoxina y la producción de dichos cristales de proteínas es lo que distingue a *B. thuringiensis* de su estrecha relación con *B. anthracis* y *B. cereus* (Sanahuja *et al.*, 2011). Las proteínas Cry y Cyt son el principio bioinsecticida hacia el estado larvario de diversos órdenes de insectos como lo son: lepidópteros, dípteros, coleópteros, ortópteros, hemípteros, homópteros, malóphagos, nemátodos, ácaros y protozoos (Bravo *et al.*, 2011; González *et al.*, 1981; Sauka y Benintende, 2008; Yamamoto, 1983; Yu *et al.*, 2007). A las PSs por otra parte, se les reconoce como proteínas con potencial citotóxico hacia diversas líneas celulares cancerígenas (Ibrahim *et al.*, 2010; Yamashita *et al.*, 2000).

1.2 Proteínas Cry

Los cristales Cry están formados por proteínas tóxicas llamadas δ -endotoxinas. Estos se definen como cuerpos o inclusiones paraesporales de naturaleza proteica (ICPs), que muestran un efecto tóxico hacia algún organismo que puede ser corroborado experimentalmente o que muestre similitud hacia secuencias de proteína Cry ya conocida (Bravo *et al.*, 2007). Existe un gran número de proteínas Cry, debido a la amplia variedad de especies y sub especies de *B. thuringiensis* identificadas hasta la actualidad. Las proteínas Cry resultan de la unión de varias unidades polipeptídicas de diferentes pesos moleculares que oscilan entre 60 y 70 kDa llamadas toxinas. Estas a su vez forman moléculas de mayor tamaño sin actividad tóxica denominadas protoxinas. Por ejemplo, las proteínas Cry activas contra lepidópteros (Cry1), forman protoxinas de entre 130 y 135 kDa y toxinas de 60 y 70 kDa (Höfte y Whiteley, 1989; López y Cerón, 2010). Durante las distintas fases de la esporulación las protoxinas se van uniendo a través de enlaces por puentes de hidrógenos, puentes disulfuros e interacciones hidrofóbicas hasta acoplar el cristal insoluble (Carrol *et al.*, 1989).

La mayoría de las cepas de *Bacillus thuringiensis* contienen varios genes de protoxina codificados en plásmidos (Höfte *et al.*, 1989). Se ha descrito que la secuencia aminoacídica de las protoxinas influye en las formas de los cristales paraesporales. Por ejemplo; formas bipiramidales (Cry1), cuboides (Cry2), rectangulares planos (Cry3A), irregulares (Cry3B), esféricos (Cry4A y Cry4B), y romboidales (Cry11A). Esta capacidad de las protoxinas a cristalizar disminuye su susceptibilidad a la degradación proteolítica prematura. Sin embargo, los cristales tienden a disociarse en el intestino de las larvas de insectos blancos. Donde dependiendo de factores como la estructura secundaria de la protoxina, la energía de los enlaces disulfuros que lo conforman, entre otros, será la actividad específica de las toxinas (Schnepf *et al.*, 1998; Aronson *et al.*, 1991).

Para la expresión de las proteínas Cry actualmente se han identificado más de 700 genes *cry* (Palma *et al.*, 2014; Schünemann *et al.*, 2014). Por lo general dichos genes forman parte del plásmido (o plásmidos) o el material genético cromosomal de *B. thuringiensis* (González *et al.*, 1981). En consecuencia, las bacterias entomocidas tienen la capacidad de formar un solo cristal

proteico (Cry1Ac) como es el caso de la cepa HD-73 de *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki*, o 5 cuerpos paraesporales (Cry4A, Cry4B, Cry11A, Cry1A y Cry2B) como es el caso de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* (Palma *et al.*, 2014).

Aunque las proteínas Cry tienen secuencias distintas y espectros antagónicos diferentes, se caracterizan por tener 3 dominios proteicos en común. El dominio I consiste de 7 α -hélices antiparalelas (hidrofóbicas y anfipáticas) y se le ha asociado con la formación del poro en la membrana de la célula del tubo digestivo de la larva blanco. El dominio II tiene tres láminas antiparalelas β distribuidos en una tipología tipo 'llave griega' y se le relaciona en la interacción con receptores celulares sobre la membrana (Bravo *et al.*, 2007; Evdokimov *et al.*, 2014). Este dominio es parecido a los sitios de unión antígeno-anticuerpo y a las moléculas tipo lectina. El dominio III consiste de dos laminas β antiparalelas formando un dominio característico de β sándwich y se le relaciona con la unión al receptor y la especificidad (Evdokimov *et al.*, 2014).

1.2.1 Clasificación de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*

El comité para la clasificación de las δ -endotoxinas producidas por *B. thuringiensis* actualizó la nomenclatura creada por Höfte and Whiteley (1989) para nombrar estas proteínas (<http://www.btnomenclature.info/>). Esta clasificación se basa en la identidad de aminoácidos que presentan entre si las proteínas. En la Figura 1 se muestra un esquema que permite identificar los elementos que constituyen el nombre de la proteína Cry1Ac. Primero se escribe el tipo de δ -endotoxina (Cry, Cyt o PS), después hay una jerarquía de identidad; el primero es un número arábigo que representa una similitud menor al 45% entre las proteínas, sigue una letra mayúscula latina que agrupa a las proteínas con un porcentaje de identidad menor o igual al 78%, la tercera jerarquía agrupa a los holotipos (con una identidad menor o igual al 95%) y finalmente la última clasificación agrupa a las toxinas cuya identidad es mayor al 95%. Actualmente se reconocen 73 subgrupos de proteína Cry (Cry1 a Cry73).

Por otra parte, se han descrito características estructurales permiten a las proteínas Cry ser subagrupadas; en las proteínas Cry de 3 dominios (Cry 3-D), las proteínas Cry no relacionadas a 3-D y las toxinas activas contra diversas especies de mosquitos (ETX-MTX2) (Crickmore *et al.*, 2016).

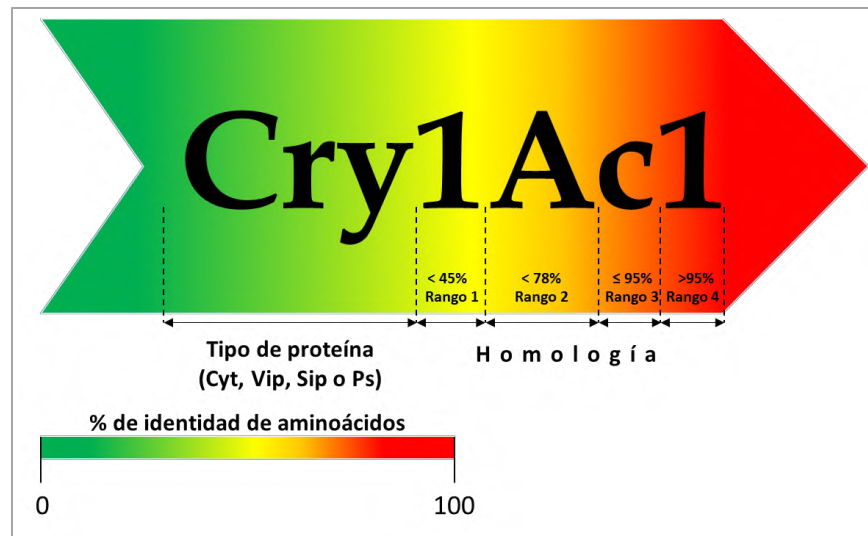


Figura 1 Representación esquemática del sistema de nomenclatura actual utilizada para la clasificación de las toxinas de *B. thuringiensis*, desarrollada por el Comité de Nomenclatura para las δ -endotoxinas (Cry y Cyt) y toxinas segregables (SIP) y Vip. Modificado de Palma *et al.*, 2014.

1.2.2 Mecanismos de acción de la proteína Cry

El modo de acción de las proteínas Cry en el intestino de la larva puede describirse en varias etapas: 1) disociación del cristal, 2) hidrólisis de la protoxina para generar el fragmento tóxico, 3) unión a receptores específicos, 4) inserción a la membrana, 5) agregación de las toxinas, 6) formación del poro y 7) citólisis (lisis celular) (Bravo *et al.*, 2007; Schünemann *et al.*, 2014).

La disociación del cristal paraesporal es un fenómeno que ha sido ampliamente descrito como el hecho de romper el cristal insoluble para obtener fragmentos de proteínas, sin embargo; no es el adjetivo más usado, los términos disolución y solubilización son los más empleados para describir la separación de fragmentos polipeptídicos.

La disociación sugiere que las moléculas o partículas separadas de un sólido, líquido o gas quedaran incorporadas como parte de la solución que las contengan. Por otra parte, la

solubilización se refiere al efecto de disociar un soluto por su capacidad intrínseca de ser soluble. En el presente trabajo se ha decidido utilizar el término *disociación* para definir la transformación del cristal en cadenas polipeptídicas de protoxina, pues se relaciona con este mecanismo (Aronson *et al.*, 1991; Mizuki *et al.*, 1999). Por su definición disociación consiste en separar los componentes de una sustancia mediante alguna acción física o química.

Como efecto de disociación se producen grandes cantidades de protoxinas. Para que estas protoxinas sean activas deben pasar por un procesamiento proteolítico mediado por proteasas homólogas a la tripsina o quimotripsina, de tal manera que se generen fragmentos tóxicos de cierto tamaño (Figura 2) (Bravo *et al.*, 2005; Palma *et al.*, 2014; Schünemann *et al.*, 2014). Posteriormente estos fragmentos se unirán a receptores específicos localizados en las vellosidades de las membranas del intestino de las larvas de insectos blanco para efectuar la citólisis (Bravo *et al.*, 2007).

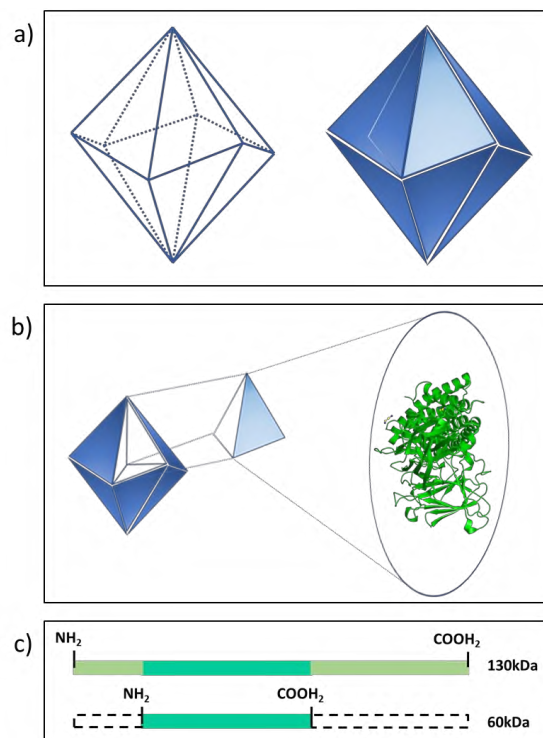


Figura 2 Proceso de activación de las inclusiones cristalinas producidas por *B. thuringiensis*, donde: a) Cristal (Cry, Cyt o PS), b) Protoxina (en verde), se esquematiza la unidad fundamental que forma el cristal; y c) Toxina, producida mediante hidrólisis enzimática mediada por proteasas (serin proteasas), a partir de los extremos N y C-terminal (Bravo *et al.*, 2007).

El procesamiento de las toxinas no es necesariamente el mismo en todas las especies de *B. thuringiensis*, por lo que puede considerarse el paso crítico en la activación y especificidad de la proteína. También se ha reportado que el procesamiento de las δ -endotoxinas se puede llevar a cabo por proteasas endógenas de la bacteria (Rukmini *et al.*, 2000; Schünemann *et al.*, 2014).

Akihiko *et al.*, (1932) disociaron los cristales insolubles con una solución de carbonato-NaOH y una preparación proteolítica para estudiar la producción de fragmentos tóxicos de los cristales proteicos. Los autores propusieron que, en pH alcalino el cristal insoluble expone los elementos aminocídicos que serían atacados por las proteasas similares a la quimiotripsina y así disociar el cristal de proteína Cry. Por otro lado, Faust *et al.*, (1967) reportaron que después de disociar cristales en una solución alcalina de carbonato de potasio (K_2CO_3) con pH de entre 11 y 11.5 los elementos enzimáticos presentes en su ensayo incrementaron los fragmentos de proteínas y los considero como agentes de disociación secundarios. Bulla *et al.*, (1981) describieron el mismo fenómeno, solo que empleando NaOH para disociar el cristal y determinaron que el efecto de las enzimas consiste en fragmentar el cristal en polipéptidos. Por su parte, Aronson *et al.*, (1991) reportaron que el empleo de carbonato de sodio (Na_2CO_3 0.3 M), β -mercaptoetanol (0.5% β ME como agente reductor que rompe los puentes disulfuros) y un pH de 9.2, disociaron hasta un 83% los cristales Cry de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1. En estudios con proteinasa K Ishii y Ohba, (1993) la emplearon como una enzima específica para hidrolizar protoxinas Cry, previamente obtenidas por disociación empleando carbonato de sodio (50 mM con pH=10) y DTT como agente reductor. Así mismo, se ha establecido que en el tracto intestinal de larvas de insectos blanco la disociación está sujeta a la alcalinidad del medio (pH> 9.5 en caso de *Lepidopteros*) y en ocasiones, en un ambiente reductor para romper los puentes disulfuros en proteínas Cry de 130 kDa (Sauka y Benintende, 2008).

De esta forma, se describió un mecanismo *in vitro* para la disociación del cristal proteico. Un homólogo del β -mercaptoetanol, el ditioneitol (DTT) se usa también como agente que disocia cristales Cry debido a su capacidad reductora y especificidad hacia los enlaces disulfuros. De

manera general, se emplean condiciones alcalinas y calor para liberar las protoxinas de su conformación cristalina.

Carroll *et al.*, (1989) reportaron que la adición de inhibidores de proteinasas durante la etapa VI de la esporulación afecta negativamente la producción de polipéptidos de 46 kDa o menor peso molecular. Aunque si se producen dichos polipéptidos al disociar los cristales obtenidos de fermentaciones sin tratamiento de inhibición de proteinasas. Donovan *et al.*, (1997) reportaron que mediante la eliminación por ingeniería genética del gen de la proteasa neutral A (*nprA*) de *B. thuringiensis* se incrementó la concentración de las protoxinas en el medio de cultivo. Kumar y Venkateswerlu (1997), reportaron que los cristales de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, incubados en condiciones desnaturalizantes y reductoras son fácilmente hidrolizados por Metaloproteasas (una clase de proteinasas). Oppert (1999) describió que hay un aumento de las proteasas internas (endoproteasas) y las toxinas insecticidas al inicio de la esporulación de *B. thuringiensis* y señala que podrían estar involucradas en la hidrólisis de las protoxinas. Reportó que las condiciones del medio en el intestino del insecto (ambiente reductor y alcalino) disocian el cristal, liberando las protoxinas seguido de una actividad de hidrólisis por parte de las proteasas para formar péptidos activos (toxinas). Mizuki *et al.*, (2000) reportaron que las parasporinas exhibieron actividad citotóxica luego de ser hidrolizadas por proteasas a polipéptidos más pequeños, de entre 40 y 60 kDa.

1.2 Quorum sensing

Las bacterias se han considerado como microorganismos no diferenciados y no cooperativos, sin posibilidad de generar comunicación, sin embargo; a partir de los 90's se describieron mecanismos de comunicación denominados en conjunto "Quorum Sensing" (QS) o percepción de quorum. El QS describe un proceso de comunicación celular que se genera por la producción, liberación y reconocimiento de señales a partir de moléculas bioquímicas llamadas autoinductoras (Rocha *et al.*, 2010). La concentración de estas moléculas en el medio será determinada por la densidad poblacional específica; llamada también concentración estimulante mínima de células o umbral poblacional. Esto permite el proceso de señalización por

autoinducción y aunado a esto, la expresión génica. Es decir; el QS les permite detectar y responder ante los cambios de condiciones ambientales, estímulos de cambios o la disponibilidad de nutrientes. En consecuencia, el comportamiento poblacional de las células se refleja como una respuesta de comportamiento multicelular (Beckmann y Mckinley, 2009; Diggle *et al.*, 2007; Rumbaugh *et al.*, 2009; Waters y Bassler, 2005).

Existe una amplia diversidad de moléculas involucradas en la señalización célula-célula. En las bacterias gram negativas el QS es regulado por proteínas receptoras en el citoplasma que interactúan con las moléculas de AHLs (N-acilhomoserinas lactonas). Esta comunicación se refleja a partir de una inducción de unión al ADN de factores de expresión secretados a partir del proceso de señalización, lo cual modula la expresión de genes de respuesta (Rocha-Estrada *et al.*, 2010). En bacterias gram positivas las señalizaciones ocurren de manera externa. Las moléculas no atraviesan la membrana plasmática, por lo que necesitan de receptores que se localizan en la pared celular. Las moléculas autoinductoras en bacterias gram positivas son pequeñas fracciones de oligopéptidos modificados. Éstas, al igual que las AHLs son muy específicas y confieren a la cepa bacteriana que las posee, la capacidad de comunicarse de forma intraespecífica. Dichos oligopéptidos no se difunden a través de la membrana plasmática, necesitan un transportador específico que generalmente modifica la estructura del autoinductor. También necesita de dos receptores; una histidín-quinasa de membrana y una proteína (reguladora) que interacciona con el ADN y activa la transcripción (Diggle *et al.*, 2007; Waters y Bassler, 2005).

1.2.1 Regulación del sistema de Quorum sensing *nprR-nprX* sobre la producción de la proteasa neutra (NprA)

De forma general los sistemas de regulación de QS se definen como; diversos complejos proteína-péptido que se une a una secuencia específica de ADN para influenciar su expresión. Se han reportado diversos complejos de detección de quorum perteneciente a genomas de especies bacterianas del grupo de *B. cereus*, por ejemplo; la interacción Rap-Phr (expresados por los genes *rap-phr*) (Perchat *et al.*, 2011). El sistema PlcR-PapR (*plcR-papR*) y también PrgX. Todos estos complejos junto con la proteína NprR forman un conjunto de elementos nombrado familia de

reguladores transcripcionales RNPP (nombrada así por sus miembros: Rap/NprR/PlcR/PrgX) (Dubois *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2012; Rocha-Estrada *et al.*, 2010).

Las proteínas RNPP se caracterizan por compartir una arquitectura similar, un dominio efector N-terminal que interactúa con el blanco y un dominio regulador C-terminal que reconoce el oligopéptido (Gallego del Sol y Marina, 2013). La proteína NprR, forma parte del sistema de detección de quorum *nprR-nprX* junto con el péptido elicitor NprX (SKPDIVG) (Perchat *et al.*, 2011). Originalmente se consideró a este complejo como activador de la expresión del gen *nprA* de la proteasa neutra (NprA) en *B. subtilis*, pero recientemente se describió la estrecha relación que existe entre el péptido de señalización NprRX y la expresión del gen *Cry1Ac* en una cepa mutante de *B. thuringiensis* HD-73 (Rocha *et al.*, 2012). Además, se reportó que el sistema de quorum *nprR-nprX*, puede ser uno de los múltiples factores involucrados en la regulación de la esporulación en *B. thuringiensis* a través de la modulación del sistema de relevo de fosfatos (Verplaetse *et al.*, 2015; Cabrera *et al.*, 2014; Dubois *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2012).

Nuestro grupo de investigación en la Universidad del Papaloapan reportó la secuencia del cassette ensamblado *nprR-nprX* en *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD73 y la secuencia del péptido señal NprX identificado como SKPDIVG (Bravo-Delgado *et al.*, 2015). Perchat *et al.*, (2011) reportaron con esta misma secuencia de aminoácidos un péptido homólogo en *B. thuringiensis* 407 y lo clasificaron en el grupo I de la familia de oligopéptidos NprX. Por otro lado, se utilizó la proteinasa K (PK) para interrumpir el flujo de detección de quorum. Esto debido a que por análisis *in silico* se determinó que la proteinasa K podía hidrolizar los péptidos señal necesarios que activan la maquinaria de QS en *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73. Sin embargo, se observó que en fermentaciones con adición de PK se retrasó el comienzo de la esporulación, hubo prolongación en la fase exponencial y no se produjo proteína Cry1Ac. Aunque si hay una expresión relativa anticipada en tiempo del gen correspondiente (*cry1Ac*) en comparación con la fermentación control. También se observó, un aumento en la expresión del gen *spo0A* y *nprA* que alcanzan su máxima expresión al mismo tiempo y una reducción de la expresión del gen *nprX*.

1.3 Proteínasa K

Las proteasas son las enzimas responsables de la hidrólisis de los enlaces peptídicos. En cuanto a las proteinasas, estas son una clase específica de proteasas y son sinónimos del término endopeptidasas, que hidrolizan los enlaces peptídicos internos. La PK es la principal enzima proteolítica producida por el hongo *Tritirachium album Limber* (Ebeling *et al.*, 1974). De acuerdo con la comisión de enzima (EC) en función de su acción catalítica específica, la PK pertenece a la clasificación: EC 3 - Hidrolasas, por su actividad sobre un enlace específico, EC 3.4 - Sobre enlaces peptídicos (peptidasas), de acuerdo con el mecanismo catalítico; EC 3.4.21 - Serin *endopeptidasas* y finalmente por pertenecer a una familia de serin proteasas específicos: EC 3.4.21.14 – Subtilisina (Tomar *et al.*, 2009). Esta endoproteasa tiene una especificidad preferente hacia la ruptura de enlaces peptídicos C-terminales de los aminoácidos alifáticos y aromáticos (Figura 3), especialmente alanina (Ebeling *et al.*, 1974). Debido a su amplia especificidad por su sustrato, actividad alta, y su capacidad para digerir las proteínas nativas, la PK se ha utilizado ampliamente en los procedimientos donde se requiere la inactivación y degradación de proteínas. En particular durante la purificación de ácidos nucleicos. Al emplear la PK para degradar los polipéptidos se produce una mezcla de péptidos de menor tamaño (de 2 a 6 aminoácidos), (Krutzschnig, 1986). La curva de actividad de pH de la PK determina el uso de la enzima en el rango de pH de 7.5 a 9.0 (Ebeling *et al.*, 1974; Bajorath *et al.*, 1988). Se ha reportado que muestra actividad ante un amplio perfil de temperatura de entre 20 y 60 °C con un porcentaje de hasta 80% de su actividad máxima.

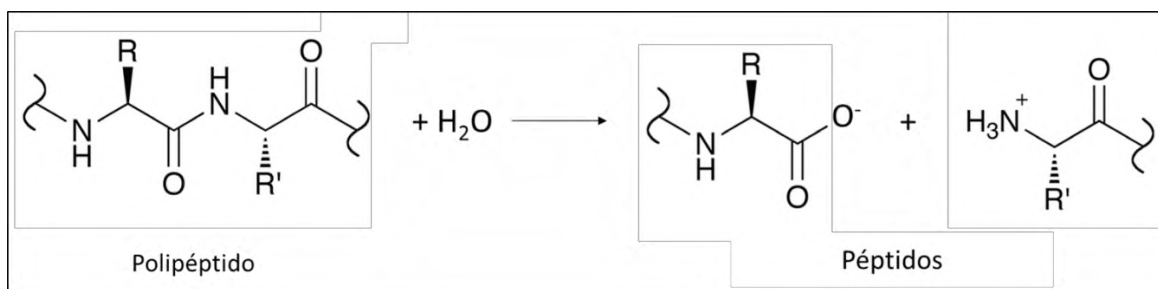


Figura 3 Representación esquemática de una hidrólisis enzimática mediada por la PK donde el grupo o radical R es preferentemente un aminoácido alifático o aromático.

2. JUSTIFICACIÓN

En estudios previos de la expresión relativa del gen *cry1Ac* a través de qPCR se describió la presencia de transcritos que codifican para la proteína Cry1Ac. Sin embargo, al evaluar mediante geles SDS-PAGE no se detectó la presencia de cristales insolubles de la proteína Cry1Ac al final de la fermentación, por lo que es necesario un análisis más puntual sobre la interacción de la proteína Cry1Ac y la proteínasa K. Es decir, el posible efecto que puede tener la PK sobre la disociación del cristal e hidrólisis de la proteína Cry1Ac durante la fermentación de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73.

3. HIPÓTESIS

La adición de proteínasa K durante el cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 disociará el cristal de la proteína Cry1Ac.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la adición de la proteínasa K durante el cultivo sobre la disociación de los cristales de proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73.

4.2 Objetivos particulares

- Determinar la disociación *in vitro* del cristal de la proteína Cry1Ac con proteínasa K a partir de extractos proteicos de cultivo en medio sólido y líquido.
- Determinar la disociación del cristal de la proteína Cry1Ac con proteínasa K durante la fermentación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Modelo de estudio

Se utilizó *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* cepa HD-73 (ATCC-35866) como microorganismo modelo, el cual tiene la capacidad de producir solo un cristal de proteína Cry1Ac (cristal K-73). Esta cepa fue donada por el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Estudios Avanzados del IPN, que a su vez fue adquirida del Insect Pathology Research Unit de United States Department of Agriculture, Brownsville, Texas.

5.2 Medios de cultivo

5.2.1 Medios de cultivo para el inóculo

Los cultivos inóculos fueron preparados con medio Gerry-Rowe (Tabla 1) y caldo nutritivo. Se preparó 125 mL de cada medio en matraces de 250 mL con un pH de 7.4 y se inoculó con 1 disco de esporas (donado por el laboratorio de bioprocesos de la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec) en condiciones de esterilidad. Posteriormente se incubaron a 30 °C durante 8 horas a 180 rpm en una incubadora con agitación orbital (New Brunswick Scientific, modelo EXCELLA E24R).

Tabla 1 Formulación del medio Gerry-Rowe (Rowe, 1990).

Componente	Cantidad para 1 L (g)
Glucosa	10
Peptona de caseína	3.2
Extracto de levadura	3.2
Cloruro de calcio dihidratado	0.106
Cloruro de potasio	0.5
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.3
Sulfato manganoso	0.05
Sulfato de zinc heptahidratado	0.0075
Sulfato de cobre pentahidratado	0.0045

5.2.2 Medio para la obtención de cristales Cry en cultivo sólido

Como medio sólido se utilizó agar nutritivo con pH de 7.4, en cajas petri de 60 x 15 mm. Éstas se inocularon con 1 mL del cultivo inóculo de 8 horas. Las cajas se incubaron a 30 °C durante 80 h en una estufa (Felisa, modelo FE-132AD). Posteriormente se cosechó el producto del cultivo (CS) retirando la biomasa o de la superficie del agar. El producto recuperado se resuspendió en 20 mL de agua destilada estéril (dH₂O) en tubos falcon de 50 mL para su uso posterior.

5.2.3 Medio para la obtención de cristales Cry en cultivo líquido

Se preparó 250 mL de medio de cultivo Gerry-Rowe (Tabla 1) con pH de 7.4 en un matraz de 1 L. Se adicionó 5 % (v/v) del cultivo inóculo y se incubaron durante 80 h hasta alcanzar un aproximado de 95% de esporulación relativa al crecimiento máximo de bacterias, con una agitación continua de 180 rpm. A continuación, el medio se centrifugó a 5500 rpm, a 4 °C durante 20 min (centrífuga Thermo Scientific modelo MEGAPUGE). Se recuperó el sedimento y se resuspendió en 20 mL de dH₂O y se almacenó a 4 °C para su posterior uso.

5.3 Tratamientos de cristales Cry con proteinasa K

Los tratamientos realizados para disociar la proteína Cry adicionando la PK a las muestras obtenidas de los medios líquido y sólido, se realizaron por duplicado utilizando resuspensiones lavadas (sección 5.5) y sin lavar. El modo de preparación y la concentración de las soluciones empleados en el presente trabajo se encuentran en el Anexo 1. Los tratamientos fueron:

El tratamiento 1 (T1), consistió en agregar una concentración de 10 µg /mL (248.1 nM) de la PK en 1 mL de resuspensión de cristales Cry (lavada y no lavada), se dejaron reaccionar a 37 °C durante 30 min. En el tratamiento 2 (T2), se incubó a 30 °C durante 2 h 1 mL de la resuspensión de cristales Cry con adición de una concentración de 100 nM de la PK. Como control negativo no se agregó PK a las reacciones de T1 y T2. Se utilizaron tres controles positivos para disociar los cristales, a 1 mL de resuspensión de cristales Cry (lavada y no lavada) se le agregó 1) 0.6 mL de buffer Laemmli (LMM); 2) 0.6 mL de buffer Laemmli con doble concentración de 2-

mercaptoetanol (LMMDM); y 3) 600 μ L de buffer de carbonato de sodio (Na_2CO_3) calentando en baño maría a ebullición durante 10 minutos. Además, se realizaron pruebas utilizando primero el buffer de Na_2CO_3 y después adicionando buffer LMM para determinar si se generaban otros polipéptidos. Ya que se ha reportado que a altos valores de pH se disocian los cristales Cry con una rápida degradación de las cadenas polipeptídicas (Bulla *et al.*, 1981)

Los tratamientos de disociación empleando solo la PK fueron mezclados con una solución compuesta por bromofenol, glicerol y agua destilada (BG) para su análisis en SDS-PAGE.

5.4 Fermentación líquida

Se realizó una fermentación para establecer los cambios en las cinéticas de crecimiento celular y esporulación de *B. thuringiensis* adicionando la PK. Se realizaron en matraces de 1 L con 300 mL de medio Gerry-Rowe y se adicionó una concentración final de 100 nM de la PK. Para la fermentación a los matraces se inocularon con 5% v/v de medio de cultivo inóculo. Las condiciones de incubación fueron de 30 °C y agitación de 180 rpm. Cada tratamiento se realizó por duplicado (Matraz A y Matraz B). Se recolectó 1 mL de medio de fermentación cada 4 h (por duplicado de cada matraz) y la fermentación finalizó cuando el microorganismo alcanzó el 95% de esporulación relativa al crecimiento.

5.4.1 Fermentación líquida con adición de PK

La adición de la PK se realizó a dos tiempos (tiempo 1 y tiempo 2) durante la cinética de crecimiento de *B. thuringiensis*.

Para el tiempo 1 se agregó la PK (100 nM) a las 16 h de cultivo y se tomaron muestras a las 24, 32, 40, 48 y 56 h de fermentación; correspondientes a las 8, 16, 24, 32 y 48 h después de adicionar la PK. Al concluir la fermentación de 24 del tiempo 1 de adición de la PK se recolectó 5mL de sobrenadante (S 24 h) para un ensayo de disociación empleando extracto de cristales Cry de cultivo líquido lavado y una mezcla de mercaptoetanol, dodecil sulfato de sodio y tris (solución MSDST). Este análisis permitió inferir la presencia de la PK en el sobrenadante.

En cuanto a la adición de la PK en el tiempo 2, éste se realizó a las 64 h y se tomaron muestras a las 72 y 80 h de fermentación, correspondientes a las 8 y 16 h después de adicionar la PK.

La fermentación control consistió en la ausencia de la PK en el medio de cultivo, se registró el crecimiento bacteriano durante las 80 h que duró la cinética.

Todas las muestras se centrifugaron a 5500 rpm, a 4 °C y durante 20 min. Se recuperó el sedimentado y el sobrenadante para verificar la presencia de proteína Cry en forma de cristal (insoluble) y protoxinas o toxinas (soluble), empleando geles SDS-PAGE.

5.5 Lavado de proteína Cry

A las resuspensiones obtenidas en medio líquido y sólido, así como a las muestras de la fermentación líquida se les realizaron varios lavados para desactivar las proteasas que produce *B. thuringiensis* (3 lavados con solución acidulada, uno con agua destilada, 3 con solución isotónica y finalmente uno de agua destilada). Cada lavado consiste en la resuspensión del sedimento y posterior centrifugación a 5500 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Finalmente, el sedimento se resuspendió en agua destilada y se guardó en refrigeración a 4 °C para su posterior uso en las pruebas de disociación del cristal. Las composiciones de las soluciones empleadas se muestran en el anexo 1.

5.6 Técnicas cualitativas

5.6.1 Detección de proteína Cry con geles SDS-PAGE

La detección de proteína Cry1AC de 133.3 kDa se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE), cada tratamiento por duplicado. Para el control positivo se tomaron 500 µl de la resuspensión de pastilla no lavada (NL), lavada (L) y de muestras de fermentación sólida y líquida (CS NL, CS L, CML NL y CL L). Cada muestra se mezcló con 300 µl de buffer de disociación de Laemmli (LMM) y se calentaron en baño maría a temperatura de ebullición durante 5 minutos. Los tratamientos con

adición de la PK, control negativo (TN) y muestras de sobrenadante; fueron mezclados con una solución de bromofenol-glicerol-agua (solución BG) en una relación 2:1. Esto para evitar que la muestra se saliera del pozo del gel de acrilamida.

La electroforesis se realizó en una cámara electroforesis (Mini-PROTEAN 4 Cell, marca Biorad), a una concentración del 7%. Se utilizó albumina de suero bovino (BSA) como estándar y PAGE RULER PRESTAINED LEADDER (Fermentas con un rango de detección de 5 kDa a 200 kDa y Prestained SDS-PAGE Standards high range con rango de detección de 47 a 202 kDa) como marcador de peso molecular (PM).

5.6.2 Teñido y desteñido del gel

El teñido y desteñido de los geles se llevó a cabo como reportó Farrera-Rebollo (1998). 1) Los geles se sumergieron en una solución de Ácido tricloroacético (TCA) al 12% w/v para fijar las proteínas, 2) se hicieron tres lavados sucesivos con agua destilada para retirar el resto de TCA que quedo en los geles, 3) se sumergieron en una solución de azul de Comasie al 1% durante 1 h y a continuación se lavaron con las soluciones descritas en el Anexo 1, apartado 6.

5.7 Técnicas cuantitativas

5.7.1 Cuantificación de bacilos y esporas

Se realizó con cámara de Neubauer en un microscopio BIOLÓGICO DIGITAL motic (modelo DM45C-F) con aumento de 400X (40X en el objetivo por 10X en el ocular). Se realizaron diluciones seriales por duplicado hasta 10^{-3} . La concentración de biomasa se calculó considerando el número de células contadas, la dilución correspondiente y que el peso de una célula de *B. thuringiensis* es de 2.3 pg. (Rodríguez y de la Torre, 1996).

5.7.2 Cuantificación de glucosa

La cuantificación de la glucosa se realizó con la técnica de azúcares reductores (DNS, Anexo 1) (Miller, 1959). Se centrifugó 1 ml del medio fermentado a 10,000 rpm durante 10 min, a 4 °C (en

una centrifuga marca Thermo Scientific modelo MEGAPUGE). Se recuperó el sobrenadante y se diluyó con agua destilada en una relación 1:2 y 1:10 para los tiempos 0-32 y 36-72 horas de fermentación, respectivamente. La lectura se realizó a 535 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (JENWAY modelo 6700 Vis) y se utilizó glucosa como estándar.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73

En la Figura 4 se pueden observar las etapas típicas del crecimiento bacteriano: la fase lag de aproximadamente 4 h, la fase crecimiento exponencial que va de las 4 h a las 28 h y la fase de esporulación que inició a las 28 h y continuó hasta las 72 h. Se alcanzó la máxima cantidad de células a las 28 h, de 52 mg/L, y al mismo tiempo se registró el inicio de la esporulación. La máxima cantidad de esporas producidas en esta fermentación líquida, sin adición de la PK, fue de 1.9×10^7 esporas/mL, contadas a las 72 h. En cuanto a la curva de consumo de sustrato, se observa que durante la fase lag la concentración de glucosa disminuye lentamente. Mientras que, durante el crecimiento exponencial, la concentración de azúcares reductores disminuye rápidamente hasta las 40 h, manteniéndose casi constante hasta el final de la fermentación. Éstas observaciones concuerdan con lo reportado por Monroy y de la Torre (1995), donde observaron que cuando incrementó la tasa de biomasa disminuyó drásticamente la concentración de glucosa, pues es la principal fuente de carbono que usa *B. thuringiensis*, que en el caso del medio Gerry-Rowe es la mayor fuente de carbono.

El comienzo de la fermentación se caracterizó por una rápida adaptación de las células al medio de cultivo, debido al uso de un inóculo, sólo con células vegetativas, con el fin de sincronizar el ciclo celular individual. Los bacilos largos eran predominantes en las primeras horas de cinética, al paso de las 4 h éstos empezaron a segmentarse lo que indicó la división de células, al concluir la etapa exponencial se apreciaron células con un extremo abultado, indicando la formación de esporas (observaciones en el microscopio). Estas características coinciden con lo reportado por Molina *et al.*, (2008).

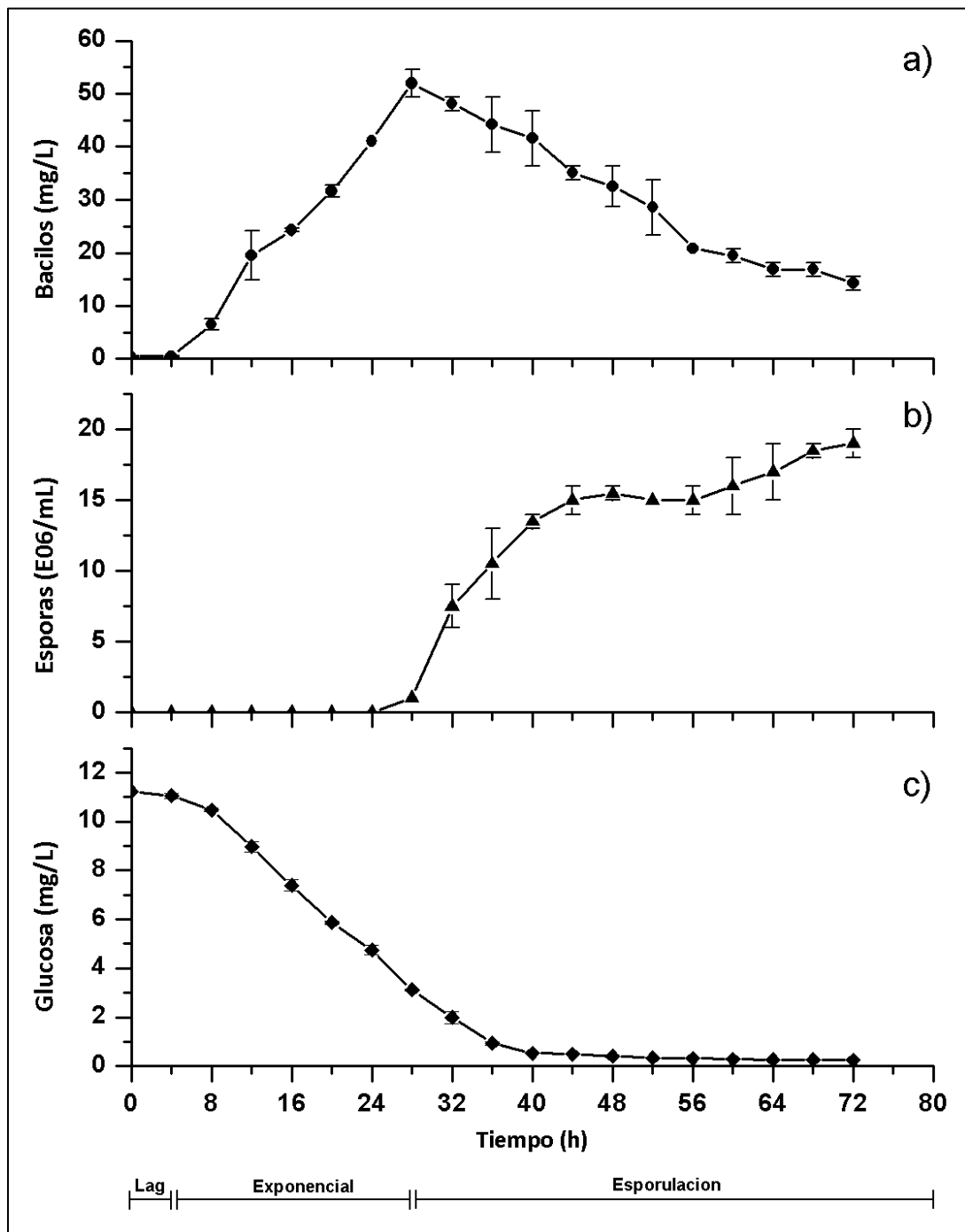


Figura 4 Cinética de crecimiento (a y b) y de consumo de sustrato (c) de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73.

6.2 Cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 con adición de la PK

La Figura 5 muestra los resultados de crecimiento al adicionar la PK al cultivo. Se observa que al menos durante las primeras 12 h de fermentación las tres curvas de crecimiento celular presentan una tendencia semejante, esto puede deberse a que se inocularon con el mismo cultivo semilla. En la curva de concentración de células que corresponde a la adición de la PK a las 16 h, se observa un desfase de 4 h del punto máximo de crecimiento con respecto a la cinética control, prolongándose así la fase exponencial. Además, puede observarse un incremento de aproximadamente el 27% en la concentración máxima de bacilos al adicionar la PK al medio de cultivo. Por otro lado, la cinética a la que se adicionó PK a las 64 h presenta mayores concentraciones de bacilos y esporas que la cinética control. Aunque, ambas cinéticas no presentan diferencias con respecto a la duración de las fases de crecimiento.

La prolongación de la fase exponencial posiblemente se deba a que la hidrólisis de proteínas en el medio haya provocado un aumento en fuentes de carbono a partir de aminoácidos que posteriormente la célula pudiera ingresar a su interior y continuar reproduciéndose. Prestidge *et al.*, (1971) sugirieron que la intensa actividad de proteasas intracelulares pudiera deberse a los requerimientos de proteínas para formar las capas de las esporas, esto relacionado con la secreción de las mismas proteasas (proteasa neutra y proteasa ácida) al medio para actividad extracelular. Según lo anterior, es posible que, detectando un incremento en la concentración de proteasas en el medio se refleje en la prolongación de la fase exponencial del cultivo. En cuanto a las cinéticas de esporulación observamos que en las fermentaciones con adición de la PK se adelantó 12 h con respecto a la esporulación control, lo cual puede deberse a posibles errores en el conteo de esporas y el equipo empleado. Para la cuenta directa de espora Navarro *et al.*, (2008) sugieren el uso de un microscopio de iluminación de campo oscuro con movimientos continuos del tornillo micrométrico para observar las características de la espora y no confundirlas con los sólidos del medio durante su conteo, además recomiendan un tiempo de agitación prolongado en vortex para una homogeneización de las diluciones.

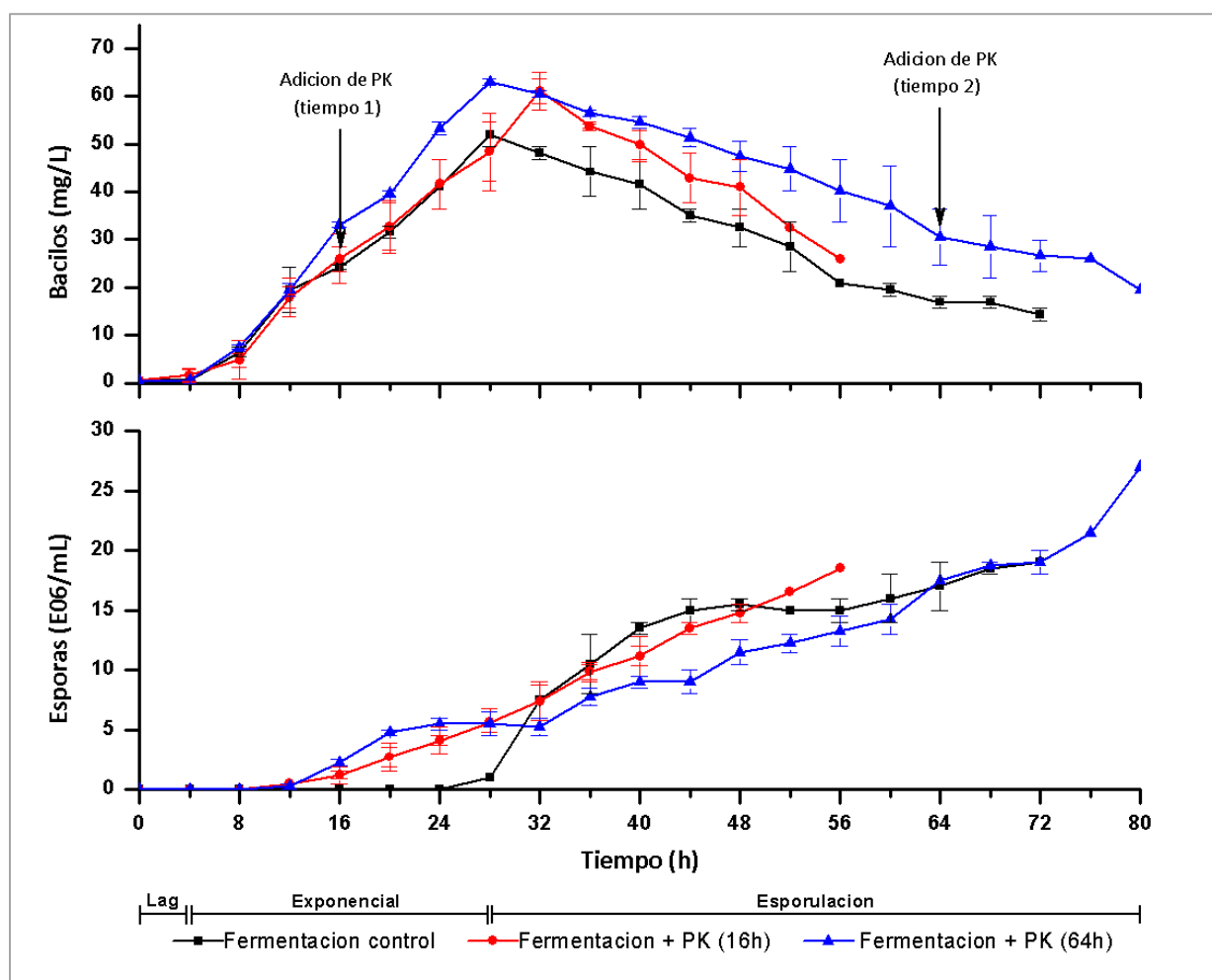


Figura 5 Cinética de crecimiento y de consumo de sustrato de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73. ■ Cinética control, ● Cinética con adición de la PK a las 16 h y ▲ Cinética con adición de la PK a las 64.

Los resultados de conteo de bacilos y esporas son semejantes a lo observado por Bravo-Delgado (comunicación personal, 2017), donde señala que la fase exponencial se prolonga de 2 hasta 4 h para tratamientos de adición de la PK a las 8 y 10 h y 12 h, respectivamente.

6.3 Análisis de geles SDS-PAGE

6.3.1 Disociación con Laemmli y carbonato de sodio

Los resultados sobre la disociación de los cristales de proteína Cry se resumen en la Tabla 2, así como en las Figuras 6 a 11.

Se observaron 5 bandas (Figura 6, carril A) de proteínas al realizar el tratamiento de disociación CS NL + LMM (control positivo 1). Una de las bandas observadas presentó un peso molecular aproximado de 130 kDa que corresponde a la protoxina del cristal Cry y otra banda que corresponde a un peso molecular cercano a los 60 kDa (Figura 6 y 7). Lightwood *et al.*, (2000) observaron estos mismos pesos moleculares en geles SDS-PAGE y además reportaron que el polipéptido de 60 kDa era la proteína activada Cry1Ac (toxina). No se observó ninguna diferencia entre el número de bandas que se presentaron cuando los cristales fueron lavados o no lavados en muestras provenientes de fermentación sólida.

Tabla 2 Resultados de disociación empleando diversos tratamientos para los cristales K-73 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73. Se reportan el número de bandas detectadas.

TRATAMIENTOS DE DISOCIACIÓN	PESO MOLECULAR (kDa)					
	150 - 203	100 - 150	075 - 100	050 - 075	037 - 050	< 037
CS NL + LMM	-	2	2	1	-	-
CS L + LMM	-	2	2	1	-	-
CS NL + BG	-	-	-	-	-	-
CS L + BG	-	-	-	-	-	-
CS NL + PKT1 + BG	-	-	-	-	-	-
CS NL + PKT2 + BG	-	-	-	-	-	-
CS NL + Na ₂ CO ₃	-	1	3	2	1	-
CS NL + Na ₂ CO ₃ + PKT1	-	-	-	-	1	-
CS NL + Na ₂ CO ₃ + PKT2	-	-	-	-	1	-
CS NL + Na ₂ CO ₃ + PKT1 + LMM	-	-	-	-	1	-
CS NL + Na ₂ CO ₃ + PKT2 + LMM	-	-	-	-	-	-
CS NL + Na ₂ CO ₃ + LMM	-	1	2	2	-	-
CS NL + Na ₂ CO ₃ + LMMDM	-	1	2	2	-	-
CS NL + PKT1 + LMM	-	-	-	-	1	-
CS NL + PKT2 + LMM	-	-	-	-	1	-
CS NL + PKT1 + BG + MSDST	-	-	-	1	-	-
CS NL + PKT2 + BG + MSDST	1	-	-	1	1	-
CS NL + LMMDM	-	2	1	1	-	-
CS NL + S24 H + LMM	-	-	-	1	-	-
CS NL + S24 H + LMMDM	-	-	-	1	-	-
CL L + LMM	-	1	-	-	-	-
CL L + Na ₂ CO ₃	-	1	-	-	-	-
CL L + PKT2 + BG	-	-	-	-	-	-
CL L + PKT2 + BG + MSDST	-	1	-	-	-	-
CL L + PKT1 + BG	-	-	-	-	-	-
CL L + PKT1 + BG + MSDST	1	-	-	2	2	-
CL L + PKT1 + LMM	-	-	-	2	2	-
CL L + S24 h 30°C + BG	-	-	-	-	-	-
CL L + S24 h 30°C + BG + MSDST	-	-	-	1	-	-
CL L + S24 h 37°C + BG	-	-	-	-	-	-
CL L + S24 h 37°C + BG + MSDST	-	-	-	1	-	-

Donde: **CS**-Cosecha del cristal insoluble en medio sólido, **CL**-Cosecha del cristal insoluble en medio líquido, **LMM**-Buffer Laemmli, **BG**-Solución compuesta por bromofenol, glicerol y agua destilada, **PKT1**-Adición de proteinasa K (10 µg/MI -248.1 nM-) a una temperatura de 37 °C 30 min, **PKT2**-Adición de proteinasa K (100 nM) a una temperatura de 30 °C 2 h, **Na₂CO₃**-Carbonato de sodio, **LMMDM**-Buffer Laemmli con doble concentración de mercaptoetanol, **MSDST**-Buffer Laemmli modificado, sin azul de bromofenol y glicerol y **S24 h**-Sobrenadante obtenido de una fermentación de 24 h con previa adición de la PK a las 16 h.

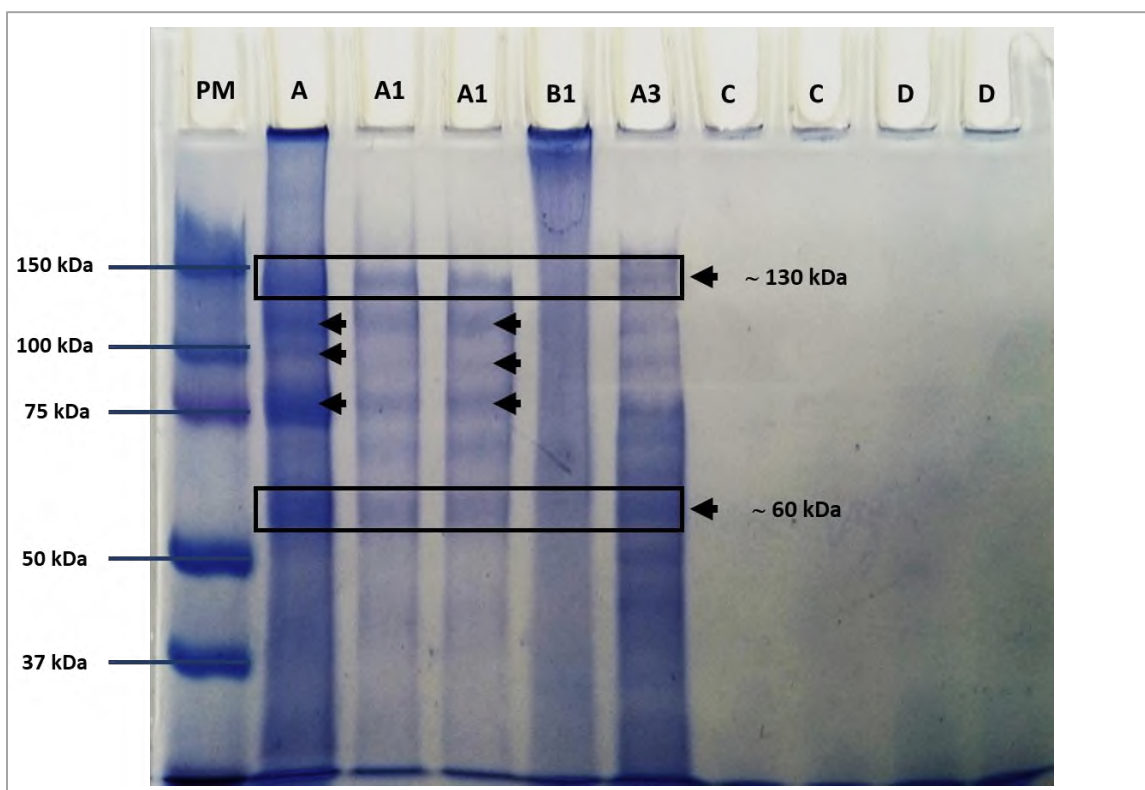


Figura 6 Gel SDS-PAGE al 7% que muestra las bandas de proteínas obtenidas al someter a los cristales K-73 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 a los siguientes tratamientos de disociación: **A)** CS NL + LMM, **A1)** CS L + LMM, **B1)** CS L + BG, **A3)** CL L + LMM, **C)** CS NL + PKT1 + BG; (T1), y **D)** CS NL + PKT2 + BG; (T2). Las bandas de aproximadamente 130 y 60 kDa resultan de interés, son los tamaños reportados para la protoxina y toxina respectivamente. La nomenclatura empleada para describir cada tratamiento se refiere a: **CS**-Cosecha del cristal insoluble del medio sólido, **CL**-Cosecha del cristal insoluble del medio líquido, **NL**-No lavado, **L**-Lavado, **LMM**-Buffer Laemmli, **BG**-Solución compuesta por bromofenol, glicerol y agua, **PKT1**-Adición de proteinasa K (10 µg/MI -248.1 nM-) a una temperatura de 37 °C 30 min y **PKT2**-Adición de proteinasa K (100 nM) a una temperatura de 30 °C 2 h.

Se visualizaron 7 bandas de proteínas empleando el buffer disociación de Na_2CO_3 (Figura 7, carriles E), para muestras de cultivo sólido. Mientras que alternarlo con el buffer de Laemmli permite observar solo cinco bandas (Figura 8, carriles J) al igual que usando LMMDM (Figura 8, carriles K). Es decir, la protoxina de alrededor de 130 kDa, una banda ~60 kDa (toxina activada), una banda de ~ 115 kDa y una ligeramente superior a 82 kDa. Esto se debe posiblemente a que el Na_2CO_3 disocia el cristal, mientras que el LMM al igual que el LMMDM desnaturalizan los polipéptidos, ya que la banda menor a 37 kDa ya no es visible al someter los extractos proteicos de cristales 2 veces consecutivas a las estrategias de disociación ya mencionados. Para el tratamiento control empleando solución de Laemmli, para disociar los cristales del cultivo líquido

lavado, se aprecia una banda de proteína definida de ~130 kDa (Figura 8, carril A3) en contraste con la muestra obtenida del medio sólido sin lavar. Probablemente por la presencia de diferentes proteínas intracelulares de la bacteria y a las proteasas adheridas a la superficie del cristal, como reportan Carroll *et al.*, (1989) y Satinder *et al.*, (2007).

Cabe resaltar que entre los tratamientos controles de disociación CS NL + LMM (Figura 7, carril A) y CS NL + Na₂CO₃ (Figura 7, carriles E) la diferencia es el pH de las soluciones, que corresponde a 6.8 y 12 respectivamente y como señala Bulla *et al.*, (1981) esto influye en el número bandas de proteínas que presentara la disociación del cristal Cry.

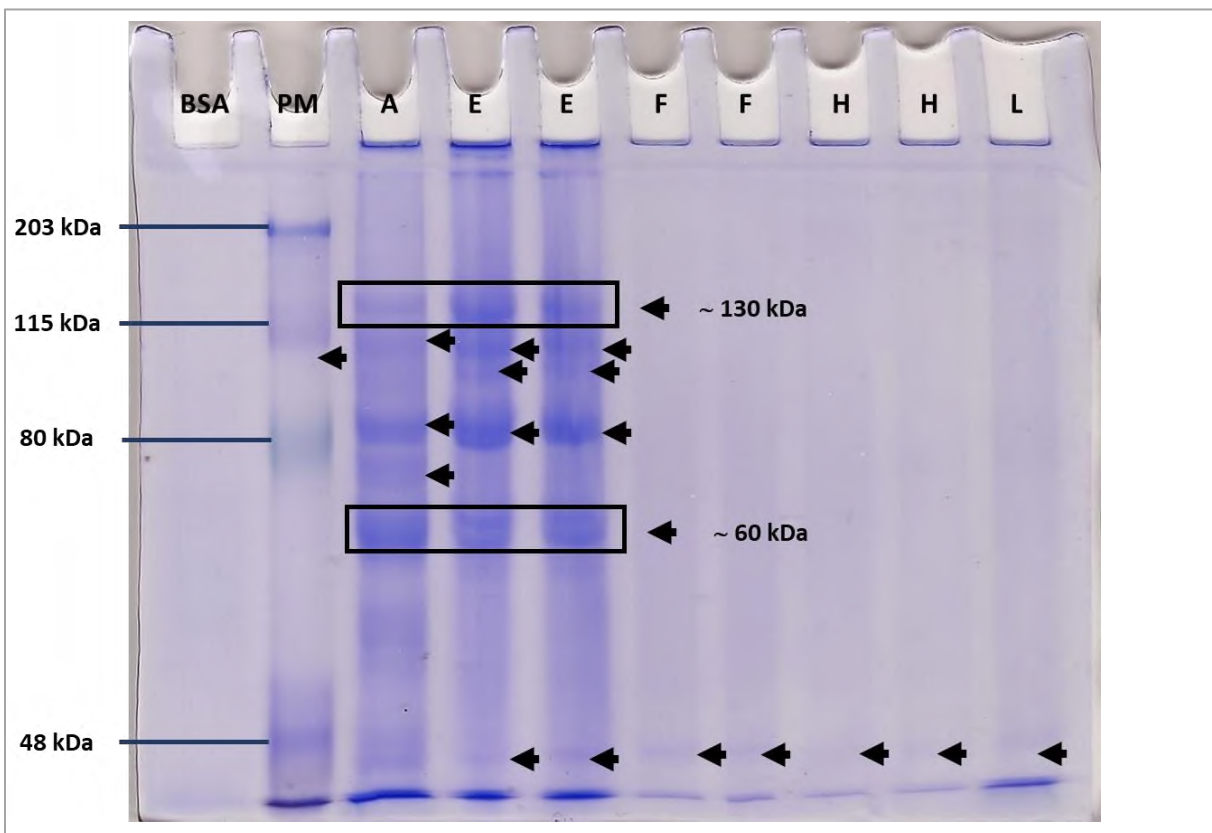


Figura 7 Gel SDS-PAGE al 7% que muestra las bandas de proteínas obtenidas al someter a los cristales K-73 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 a los siguientes tratamientos de disociación: **A)** CS NL + LMM, **E)** CS NL + Na₂CO₃, **F)** CS NL + Na₂CO₃ + PKT1, **H)** CS NL + Na₂CO₃ + PKT1 + LMM y **L)** CS NL + PKT1 + LMM. Las bandas resultantes para cada tratamiento se señalan con flechas negras, cada flecha corresponde a una banda. Las bandas de aproximadamente 130 y 60 kDa resultan de interés, son los tamaños reportados para la protoxina y toxina respectivamente. La nomenclatura empleada para describir cada tratamiento se refiere a: **CS**-Cosecha del cristal insoluble del medio sólido, **CL**-Cosecha del cristal insoluble del medio líquido, **NL**-No lavado, **L**-Lavado, **LMM**-Buffer Laemmli, **Na₂CO₃**-Solución de carbonato de sodio y **PKT1**-Adición de proteinasa K (10 µg/mL) a una temperatura de 37 °C 30.

Se ha reportado ampliamente que agentes reductores y pH's alcalinos provocaban la disociación del cristal proteico producido por *Bacillus thuringiensis*. Basándose en al menos una de estas características, se desarrollaron métodos estandarizados para llevar a cabo la disociación del cristal Cry. Laemmli en (1970) reportó un método con β -mercaptoetanol (2-mercaptoetanol) como agente reductor para romper los enlaces disulfuros y asegurarse de que la proteína estuviera completamente desnaturalizada antes de ser cargada en el gel. Bulla *et al.*, (1981) observaron que a medida que incrementaban el pH de la solución éste aumentaba la disociación de los cristales generando un mayor número de bandas en los geles. Los autores concluyeron que la disociación de la conformación nativa del cristal va generando fragmentos más y más pequeños en función del tiempo de exposición al álcali (solución de NaOH).

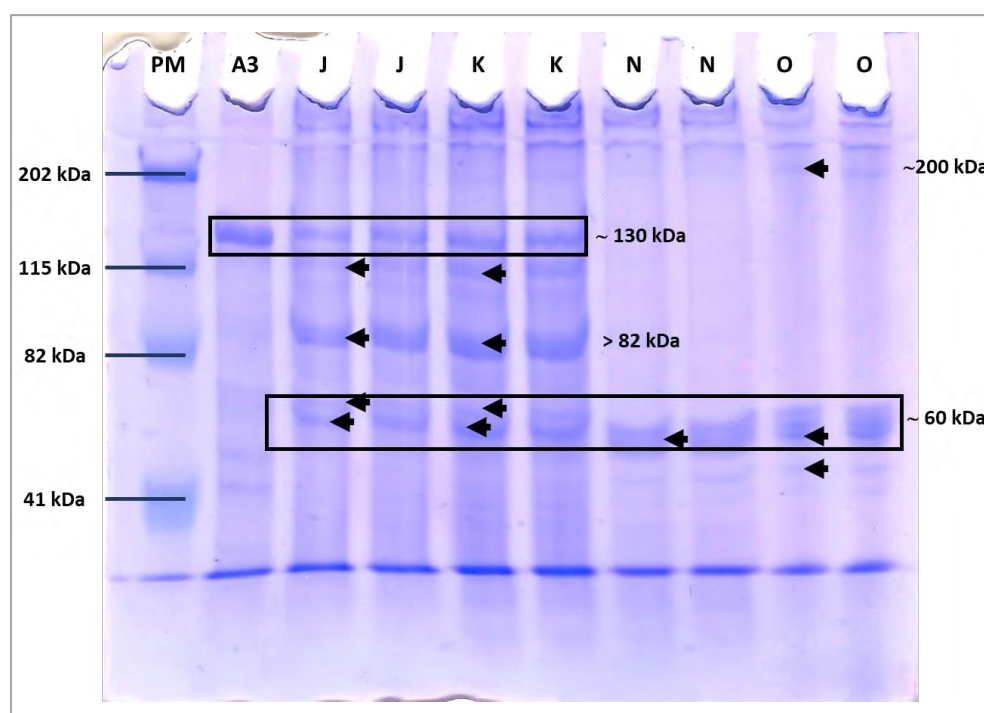


Figura 8 Gel SDS-PAGE al 7% que muestra las bandas de proteínas obtenidas al someter a los cristales K-73 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 a los siguientes tratamientos de disociación: **A3)** CL L + LMM, **J)** CS NL + Na₂CO₃ + LMM, **K)** CS NL + Na₂CO₃ + LMMDM, **N)** CS NL + PKT1 + BG + MSDST y **O)** CS NL + PKT2 + BG + MSDST. Las bandas de aproximadamente 130 y 60 kDa resultan de interés, son los tamaños reportados para la protoxina y toxina respectivamente. La nomenclatura empleada para describir cada tratamiento se refiere a: **CL**-Cosecha del cristal insoluble del medio líquido, **CS**-Cosecha del cristal insoluble del medio sólido, **L**-Lavado, **NL**-No lavado, **Na₂CO₃**-Solución de carbonato de sodio, **LMM**-Buffer Laemmli, **LMMDM**-Buffer Laemmli con doble concentración de β -mercaptoetanol, **BG**-Solución compuesta por bromofenol, glicerol y agua, **PKT1**-Adición de proteinasa K (10 μ g/MI - 248.1 nM-) a una temperatura de 37 °C 30 min, **PKT2**-Adición de proteinasa K (100 nM) a una temperatura de 30 °C 2 h y **MSDTS**-Buffer Laemmli modificado, sin glicerol y azul de bromofenol.

6.3.2 Disociación del cristal Cry empleando la PK en extractos de medio sólido y líquido

Como se muestra en la Figura 6 (carriles C y D, que corresponde a los tratamientos T1 y T2 respectivamente) agregar PK a un extracto de cristales proteicos obtenidos de medio sólido no produjo un patrón de bandas de proteínas, lo cual implica que la PK no afectó la disociación del cristal (el ensayo con PK se realizó también en extracto de cosecha de medio líquido). Se verificó que los tratamientos anteriores tuvieran cristales, por lo cual se realizaron los tratamientos de las Figuras 8 y 10 (carriles N y O) a los cuales, después de ser tratados por T1 y T2 a continuación se les adicionó MSDST y en geles SDS-PAGE presentaron bandas de proteínas de aproximadamente 60 kDa con una alta resolución. Como se ha explicado con anterioridad, la fracción de proteína que ejerce actividad antagónica hacia larvas de insectos corresponde a las proteínas de PM aproximado a 60 kDa, las cuales se consideran toxinas activadas de *B. thuringiensis* Var. *kurstaki* HD-73. Se observaron bandas de ~ 60 kDa y de ~ 200, 60 y 48 kDa a partir de los tratamientos N y O, respectivamente (Figura 10), la diferencia entre el número de bandas se puede relacionar al tiempo de incubación de la muestra y la proteínasa K y no a la concentración que tuvo cada tratamiento (T1 de 30 min y T2 de 2 h).

Al adicionar la PK después de disociar el cristal con Na_2CO_3 (CS NL + Na_2CO_3 + **PK**) se observaron bandas de aproximadamente 48 kDa (Figura 7 y 9). Lo mismo sucede al agregar la PK antes del buffer Laemmli (Figuras 7 y 9, carriles L y M). esto posiblemente se deba a la acción de hidrólisis de la PK debido al almacenamiento prolongado de la muestra antes de realizar la electroforesis.

De aquellos tratamientos en donde se sustituyó la PK con el sobrenadante de 24 h, de la fermentación a la que se le adicionó la PK a las 16 h, no mostro ninguna banda. Es decir, no disoció el cristal ni disoció las proteínas. En la Figura 11, en los carriles Q y R, se observa un patrón de bandas de proteínas, a los cuales se les agregó LMM y LMMDM después del sobrenadante de 24 h, a 30 y 37 °C. Dichos tratamientos presentan una banda ~60 kDa que aparece también en las propuestas de disociación N y O que pueden corresponder a las toxinas del cristal K-73. Esta

banda representa la hidrólisis de las protoxinas ya que estas no aparecen en la disociación con buffer Laemmli (Carril A3, Figura 11) o solución LMMDM (Carril P, Figura 11).

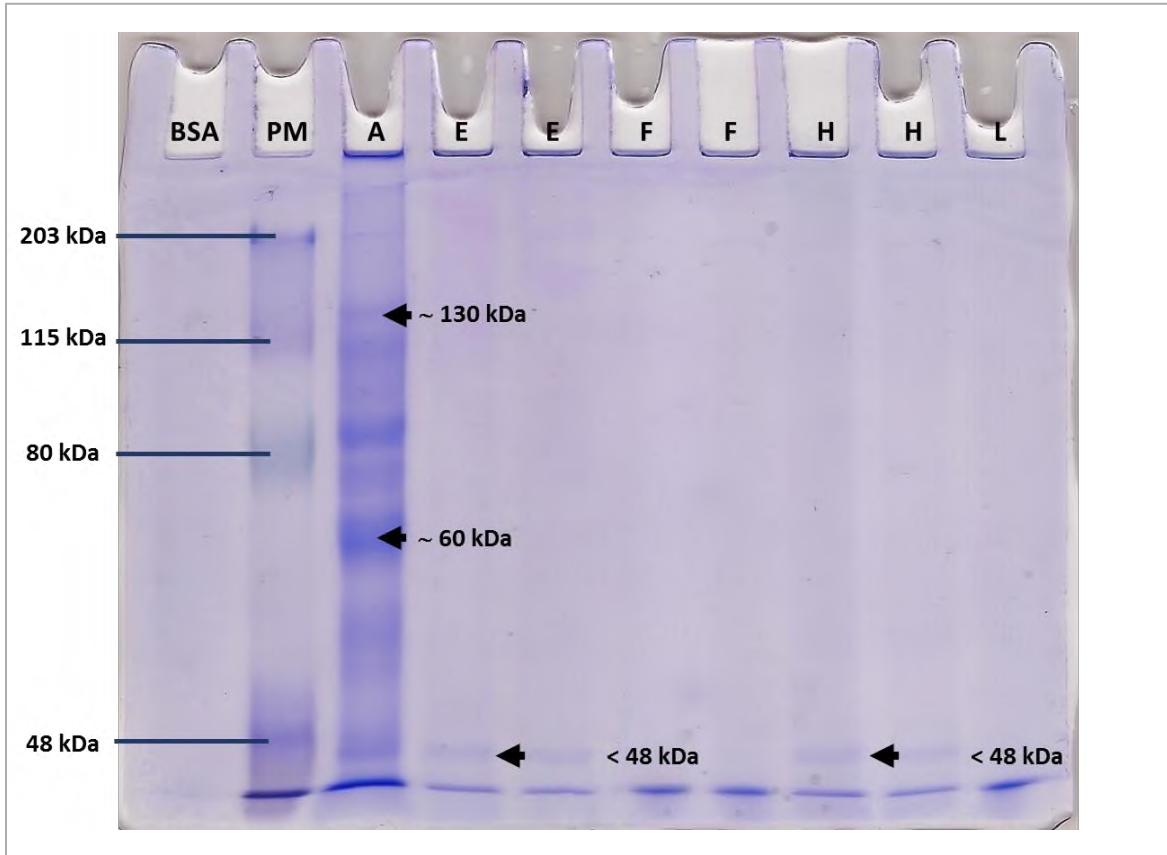


Figura 9 Gel SDS-PAGE al 7% que muestra las bandas de proteínas obtenidas al someter a los cristales K-73 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 a los siguientes tratamientos de disociación: **A)** CS NL + LMM, **E)** CS NL + Na₂CO₃, **F)** CS NL + Na₂CO₃ + PKT1, **H)** CS NL + Na₂CO₃ + PKT1 + LMM y **L)** CS NL + PKT1 + LMM. Las bandas de aproximadamente 130 y 60 kDa resultan de interés, son los tamaños reportados para la protoxina y toxina respectivamente. La nomenclatura empleada para describir cada tratamiento se refiere a: **CS**-Cosecha del cristal insoluble del medio sólido, **NL**-No lavado, **Na₂CO₃**-Solución de carbonato de sodio, **LMM**-Buffer Laemmli y **PKT1**-Adición de proteinasa K (10 µg/mL) a una temperatura de 37 °C 2 h.

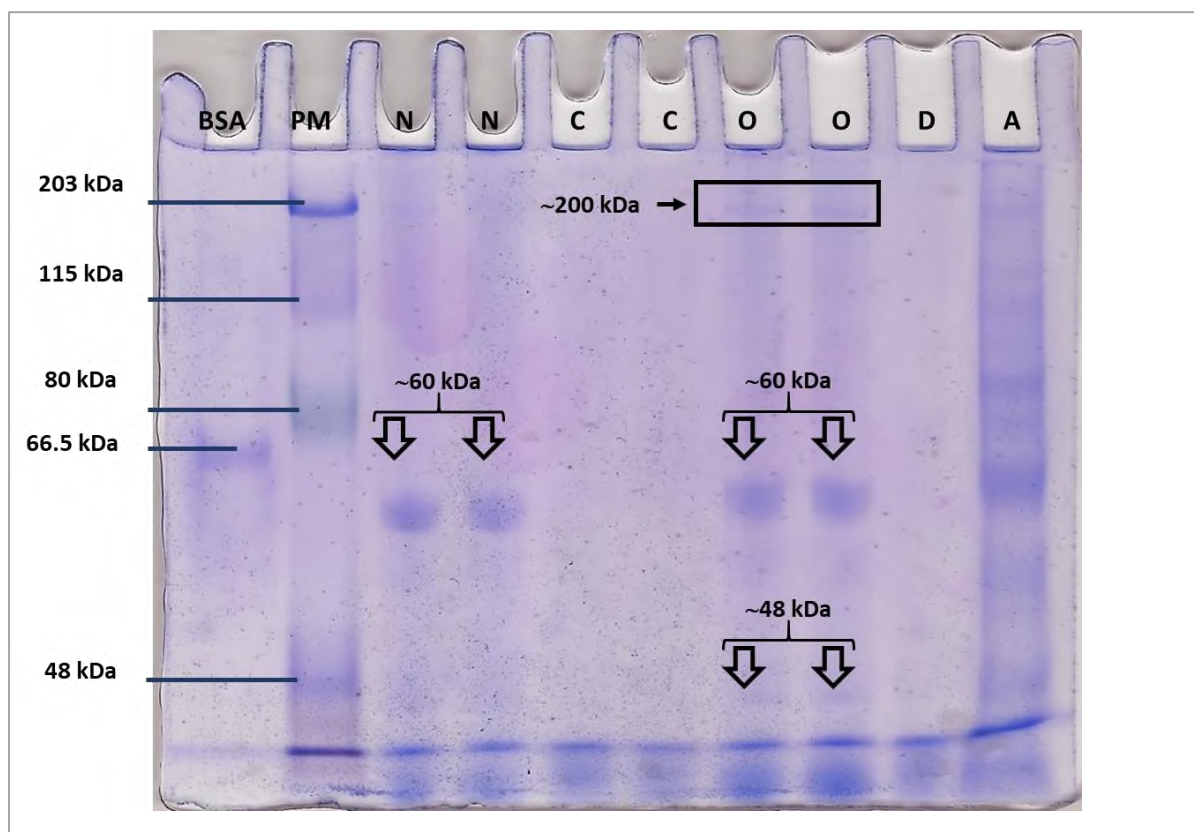


Figura 10 Gel SDS-PAGE al 7% que muestra las bandas de proteínas obtenidas al someter a los cristales K-73 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 a los siguientes tratamientos de disociación: **N)** CS NL + PKT1 + BG + MSDST, **C)** CS NL + PKT1 + BG, **O)** CS NL + PKT2 + BG + MSDST, **D)** CS NL + PKT2 + BG y **A)** CS NL + LMM. Las bandas de aproximadamente 130 y 60 kDa resultan de interés, son los tamaños reportados para la protoxina y toxina respectivamente. La nomenclatura empleada para describir cada tratamiento se refiere a: **CS**-Cosecha del cristal insoluble del medio sólido, **NL**-No lavado, **LMM**-Buffer Laemmli, **BG**-Solución compuesta por bromofenol, glicerol y agua, **PKT2**-Adición de proteinasa K (100 nM) a una temperatura de 30 °C 2 h y **MSDTS**-Buffer Laemmli modificado, sin glicerol y azul de bromofenol.

Akihiko *et al.*, (1986) reportaron que el empleo de proteasas similares a la quimiotripsina provoca actividad de hidrólisis hacia los cristales producidos por *B. thuringiensis*, semejante a lo generado por la PK en el presente trabajo después de la disociación del cristal. Ishii y Ohba (1993) disociaron con un buffer de Na_2CO_3 empleando DDT en lugar de β -mercaptoetanol, alternaron la disociación del cristal con una hidrólisis con la PK a una concentración de 10 mg/mL a 37 °C y detuvieron la reacción con inhibidor a los 30 minutos. Observaron que éste tratamiento produjo los fragmentos de proteínas con actividad hemolitica contra glóbulos rojos humanos, lo que sugirió una activación de la protoxina. Mizuki *et al.*, (2000) desarrollaron un experimento similar, extendiendo por una hora el tiempo de reacción con la PK y obtuvieron fragmentos proteicos que

presentaban actividad hacia diferentes líneas celulares de cáncer (66, 58, 56 y 44 kDa). En ambos reportes se buscaba la activación de la protoxina a toxinas para proteínas Cry insecticidas y para Parasporinas respectivamente.

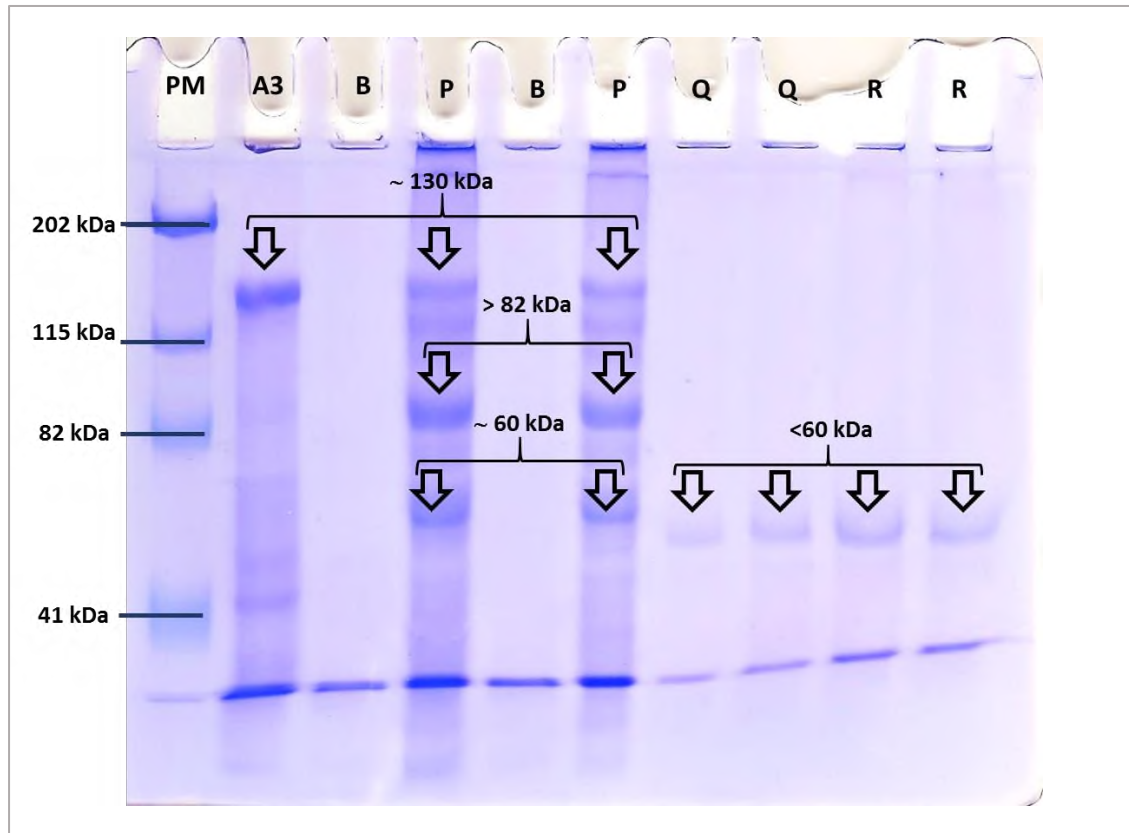


Figura 11 Gel SDS-PAGE al 7% que muestra las bandas de proteínas obtenidas al someter a los cristales K-73 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 a los siguientes tratamientos de disociación: **A3)** CL L + LMM, **B)** CS NL + BG, **P)** CS NL + LMMDM, **Q)** CS NL + S24h + LMM y **R)** CS NL + S24h + LMMDM. Las bandas de aproximadamente 130 y 60 kDa resultan de interés, son los tamaños reportados para la protoxina y toxina respectivamente. La nomenclatura empleada para describir cada tratamiento se refiere a: **CL**-Cosecha del cristal insoluble del medio líquido, **CS**-Cosecha del cristal insoluble del medio sólido, **L**-Lavado, **NL**-No lavado, **LMM**-Buffer Laemmli, **LMMDM**-Buffer Laemmli con doble concentración de β -mercaptoetanol, **BG**-Solución compuesta por bromofenol, glicerol y agua y **S24h**-Sobrenadante obtenido de 24 h de fermentación con adición de la PK (100 nM) a las 16 h.

6.3.3 Detección de proteína Cry en fermentaciones líquida con tratamientos de adición de la PK

Para la fermentación a la que se le adicionó la PK a las 16h (durante el crecimiento exponencial) no se observaron bandas de proteína Cry ni en el sobrenadante ni en el mosto (Tabla 3, Figuras

12 A y 12 B, Figuras 13 A y 13 B). Deng *et al.*, (2014), reportaron que la máxima formación del cristal debería de concluir durante la fase de esporulación, y que hay una co-expresión de la espora y de la proteína Cry en *B. thuringiensis* (Agaisse y Lereclus, 1995; Dervyn *et al.*, 1995). Sin embargo, la adición de la PK a la fermentación no permitió la detección de proteína Cry en muestras obtenidas durante la fermentación; como señaló Bravo-Delgado (Comunicación personal, 2017).

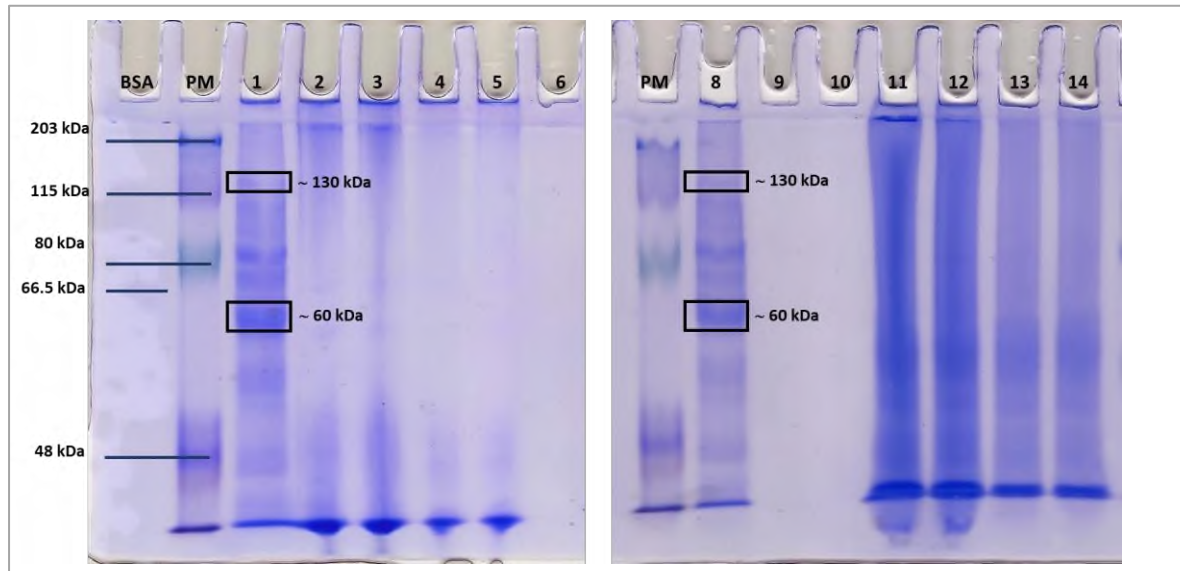


Figura 12 A Análisis de proteínas Cry1Ac en el extracto proteico de una fermentación líquida de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 de 24 h con adición de la PK a las 16 h. Carriles: **1 y 8)** CS NL + LMM, **2 y 3)** PMA 24h + BG, **4 y 5)** PMB 24h + BG, **6)** Carril vacío, **9 y 10)** SMB + BG, **11 y 12)** PMA 24 h + LMM y **13 y 14)** PMB 24 h + LMM. Las bandas de aproximadamente 130 y 60 kDa resultan de interés, son los tamaños reportados para la protoxina y toxina respectivamente. La nomenclatura empleada para describir cada tratamiento se refiere a: **CS-Cosecha del cristal insoluble del medio sólido**, **NL-No lavado**, **LMM-Buffer Laemmli**, **BG-Solución compuesta por bromofenol, glicerol y agua**, **PMA 24h-Pellet de fermentación líquida de 24 h del matraz A**, **PMB 24h-Pellet de fermentación líquida de 24 h del matraz B** y **SMB 24h-Sobrenadante de fermentación líquida de 24 h del matraz B**.

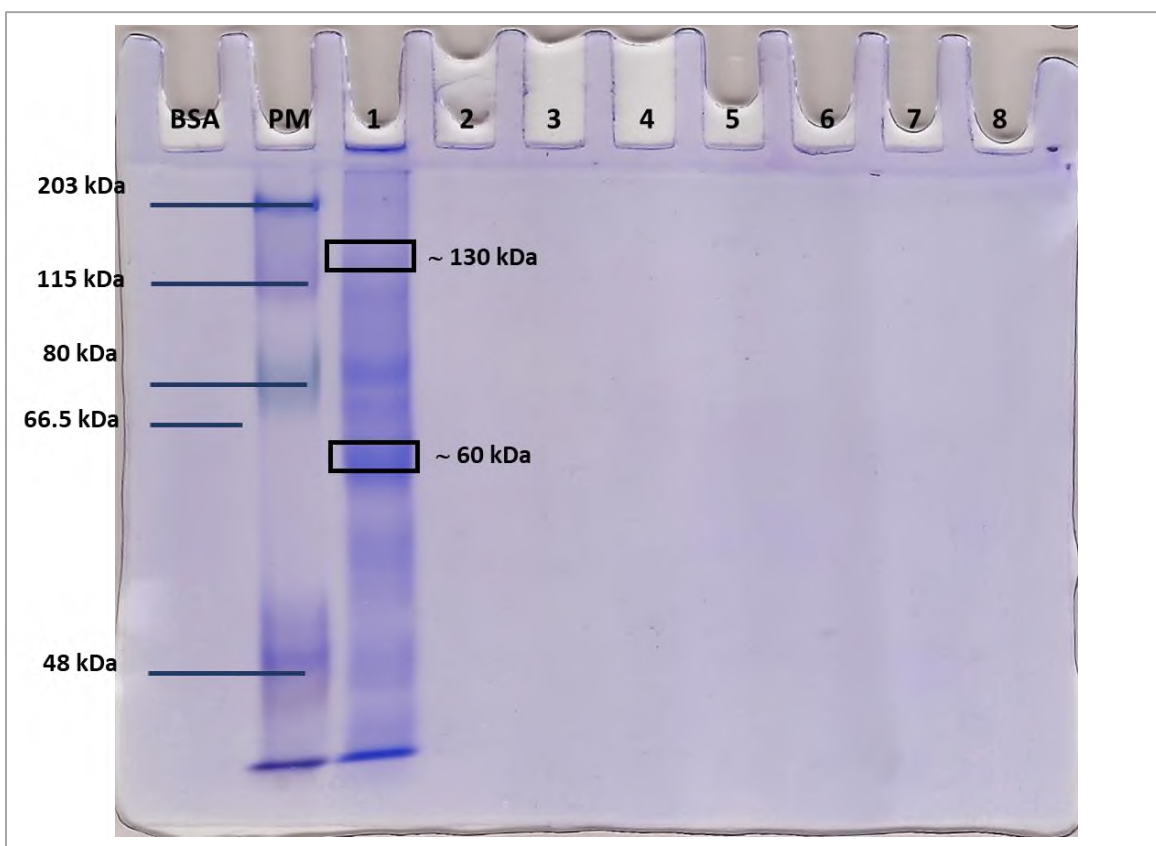


Figura 12 B Análisis de proteínas Cry1Ac en el sobrenadante en una fermentación líquida de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 de 24 h con adición de la PK a las 16 h. Los carriles muestran: **1)** CS NL + LMM, **2 y 3)** SMA 24h + LMM, **4 y 5)** SMB 24h + LMM, **6 y 7)** SMA 24h + BG y **8)** Vacío. Las bandas de aproximadamente 130 y 60 kDa resultan de interés, son los tamaños reportados para la protoxina y toxina respectivamente. La nomenclatura empleada para describir cada tratamiento se refiere a: **CS**-Cosecha del cristal insoluble del medio sólido, **NL**-No lavado, **LMM**-Buffer Laemmli, **BG**-Solución compuesta por bromofenol, glicerol y agua, **SMA 24h**-Sobrenadante de fermentación líquida de 24 h del matraz A, **SMB 24h**-Sobrenadante de fermentación líquida de 24 h del matraz B.

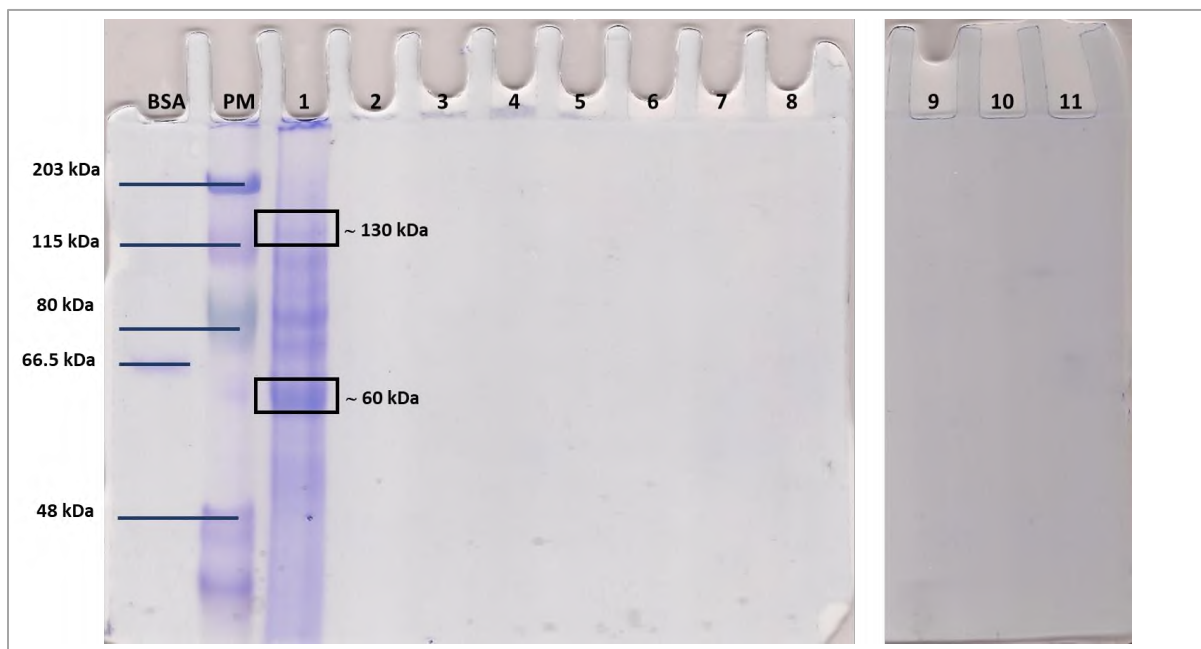


Figura 13 A Análisis de proteínas Cry1Ac en el sobrenadante en una fermentación líquida de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 de 56 h con adición de la PK a las 16 h. Carriles: **1)** CS NL + LMM, **2 y 3)** SMA 56 h + LMM, **4 y 5)** SMB 56 h + LMM, **6 y 7)** SMB 56 h + BG, **8 y 11)** Carriles vacíos, **9 y 10)** SMA 56 h + BG. Las bandas de aproximadamente 130 y 60 kDa resultan de interés, son los tamaños reportados para la protoxina y toxina respectivamente. La nomenclatura empleada para describir cada tratamiento se refiere a: **CS**-Cosecha del cristal insoluble del medio sólido, **NL**-No lavado, **LMM**-Buffer Laemmli, **BG**-Solución compuesta por bromofenol, glicerol y agua, **SMA 56h**-Sobrenadante de fermentación líquida de 56 h del matraz A y **SMB 56h**-Sobrenadante de fermentación líquida de 56 h del matraz B.

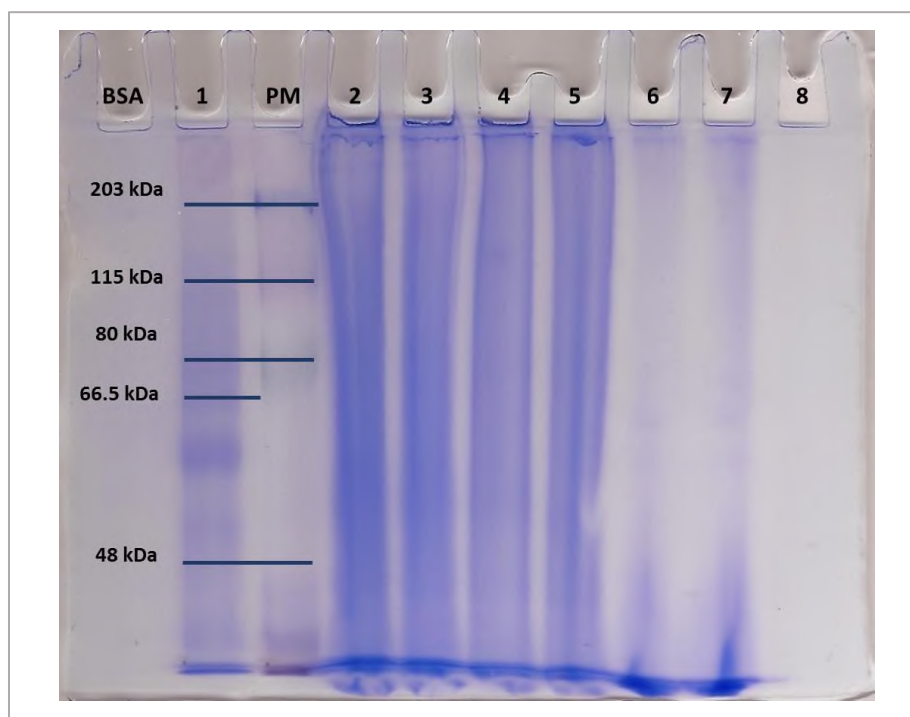


Figura 13 B Análisis de proteínas Cry1Ac en el mosto de una fermentación líquida de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 de 56 h con adición de la PK a las 16 h. Carriles: **1)** CS NL + LMM, **2 y 3)** PMA 56h + LMM, **4 y 5)** PMB 56h + LMM, **6)** PMA 56h + BG, **7)** PMB 56h + BG y **8)** Carril vacío. La nomenclatura empleada para describir cada tratamiento se refiere a: **CS**-Cosecha del cristal insoluble del medio sólido, **NL**-No lavado, **LMM**-Buffer Laemmli, **BG**-Solución compuesta por bromofenol, glicerol y agua, **PMA 56h**-Pellet de fermentación líquida de 56 h del matraz A, **PMB 56h**-Pellet de fermentación líquida de 56 h del matraz B y **SMB 24h**-Sobrenadante de fermentación líquida de 24 h del matraz B.

Por otro parte, para la fermentación a la que se adicionó PK a las 64 h (durante la fase de esporulación) se detectaron bandas de proteína con peso molecular de aproximadamente 130 kDa (Figura 14), que corresponde a la protoxina del cristal K-73. Este resultado indica que la PK adicionada al medio durante la esporulación no disocia el cristal proteico. Es decir, la PK no tiene la capacidad de disociar el cristal Cry por si sola. Por otra parte, es posible considerar que la PK tiene efecto de hidrólisis sobre el extracto con cristal si se somete a altas temperaturas, a valores de pH básicos, se le adicione un agente reductor o una combinación de las tres condiciones. Para ambas fermentaciones (con adición de la PK a las 16 y 64 h) se verificó que la proteína no estuviera soluble en el mosto mediante los tratamientos S+BG y S+LMM. Es decir, agregando una solución para cargar la muestra en el gel (S+BG) y agregando el buffer LMM para disociar el cristal (S+LMM). En los cuales no se observó ninguna banda (Tabla 3, Figuras 12, 13 y 14).

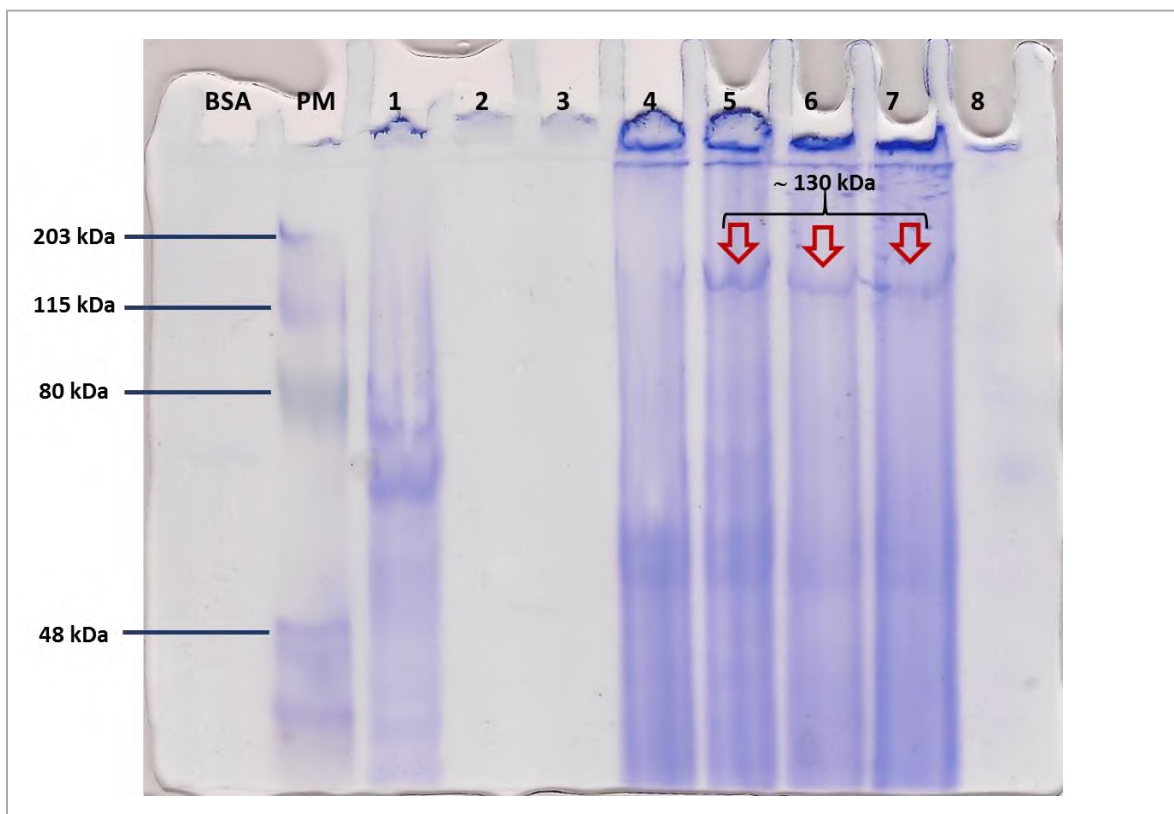


Figura 14 A Análisis de proteínas Cry1Ac en el mosto y sobrenadante de una fermentación líquida de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 de 80 h con adición de la PK a las 64 h. las bandas de aproximadamente 130 kDa corresponden a la protoxina. Carriles: 1) CS NL + LMM, 2 y 3) SMB 80h + BG, 4 y 5) PMA 80h + LMM, 6 Y 7) PMB 80h + LMM y 8) Carril vacío. **CS**-Cosecha del cristal insoluble del medio sólido, **NL**-No lavado, **LMM**-Buffer Laemmli, **BG**-Solución compuesta por bromofenol, glicerol y agua, **PMA 80h**-Pellet de fermentación líquida de 80 h del matraz A, **PMB 80h**-Pellet de fermentación líquida de 80 h del matraz B y **SMB 80h**-Sobrenadante de fermentación líquida de 80 h del matraz B.

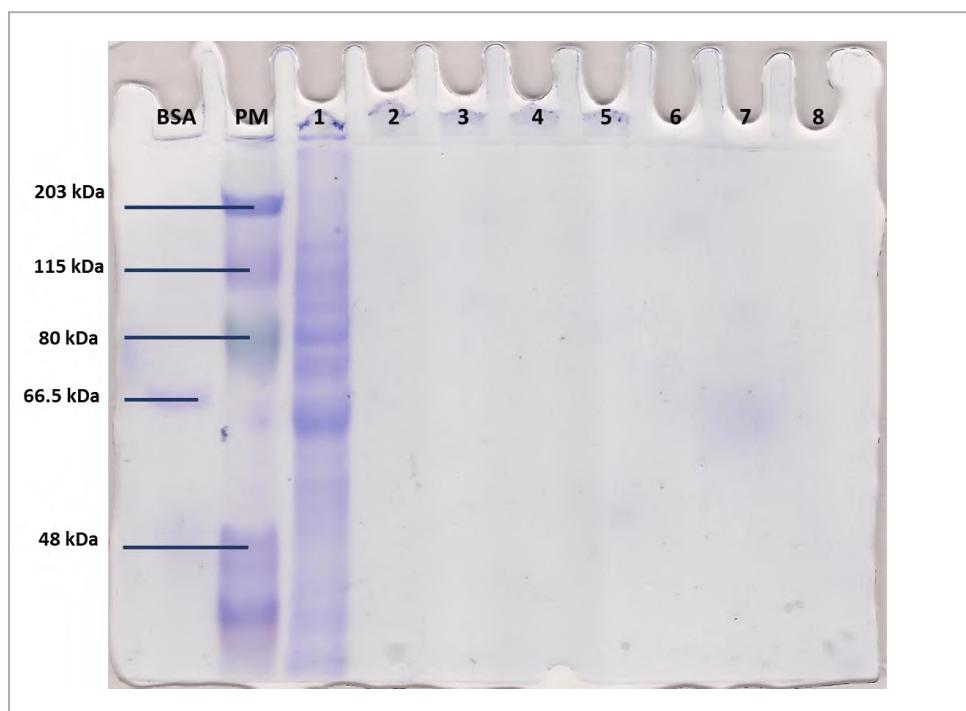


Figura 14 B Análisis de proteínas Cry1Ac en el sobrenadante en una fermentación líquida de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 de 80 h con adición de la PK a las 64 h. Carriles: **1)** CS NL + LMM, **2 y 3)** SMA 80h + LMM, **4 y 5)** SMB 80h + LMM, **6 y 7)** SMA 80h + BG y **8)** Carril vacío. La nomenclatura empleada para describir cada tratamiento se refiere a: **CS**-Cosecha del cristal insoluble del medio sólido, **NL**-No lavado, **LMM**-Buffer Laemmli, **BG**-Solución compuesta por bromofenol, glicerol y agua, **SMA 80h**-Sobrenadante de fermentación líquida de 80 h del matraz A y **SMB 80h**-Sobrenadante de fermentación líquida de 80 h del matraz B.

Tabla 3 Detección de bandas de proteínas Cry1Ac en geles SDS-PAGE de fermentaciones líquidas con tratamientos tiempo 1 y tiempo 2 de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73.

Tratamiento: Matraz A/B	Tiempo de cosecha de cinética PK						
	16 h*					64 h*	
	24 ♦	32 ♦	40 ♦	48 ♦	56 ♦	72 ♦	80 ♦
S + LMM	-	-	-	-	-	-	-
S + LMM	-	-	-	-	-	-	-
S + BG	-	-	-	-	-	-	-
S + BG	-	-	-	-	-	-	-
P + LMM	-	-	-	-	-	-	100 –195 KDa
P + LMM	-	-	-	-	-	-	100 –195 KDa
P + BG	-	-	-	-	-	-	-
P + BG	-	-	-	-	-	-	-

* Tiempo de adición de PK

♦ Tiempo de cosecha del cultivo

Donde tiempo 1 y tiempo 2 denotan: tratamiento que consistió en agregar 100 nM de la PK a las 16 de cultivo y tratamiento que consistió en agregar 100 nM de la PK a las 64 de cultivo, respectivamente.

Diversos autores han reportado tres funciones importantes de las proteasas intracelulares y extracelulares en *Bacillus thuringiensis*; 1) se le relacionan con la síntesis de oligopéptidos y aminoácidos a través de proteólisis de proteínas extracelulares, que ya no son necesarias para las células en crecimiento vegetal, cuando se empieza a formar la espora, 2) las serinas proteasas realizan modificación postraducciona de los precursores de proteínas cristalinas y esporas y 3) hidrolizan estructuras superficiales de las células para promover la liberación de las esporas (Carroll *et al.*, 1989; Donovan *et al.*, 1997; Sharipova *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003 y Satinder *et al.*, 2007).

Carroll *et al.*, (1989) reportaron que al agregar un inhibidor de proteasas al medio no se detectaba un polipéptido intracelular que formaba parte del cristal proteico en *B. thuringiensis* var. *tenebriosis*. Satinder *et al.*, (2007) menciona que la producción de proteasas intracelulares es alta cuando inicia la formación de las esporas, debido a que se requiere grandes cantidades de proteínas para la corteza de la espora. De la misma manera al iniciar la formación del cristal Cry hay un tratamiento postraducciona de las protoxinas que la cristalizan (Carroll *et al.*, 1989; Satinder *et al.*, 2007). Sin embargo, si los aminoácidos intracelulares durante la esporulación no son suficientes entonces *B. thuringiensis* expulsa proteasas para hidrolizar las proteínas remanentes en el medio de cultivo (Satinder *et al.*, 2007). La baja concentración de proteasas intracelulares en el interior de la bacteria predispuso la producción de un polipéptido de 46 kDa que forma parte de Cry *B. thuringiensis* var. *tenebriosis* y de esta manera se comprobó que un cambio en el medio extracelular compromete funciones intracelulares (Carroll *et al.*, 1989).

Debido a que la PK no disocia al cristal, pero sí se tiene transcripción del gen *cry1Ac* (Rafael Bravo, comunicación personal) entonces la adición de PK durante la etapa de crecimiento exponencial podría estar afectando el proceso de acoplamiento o cristalización de la proteína en interior de la célula.

Se ha reportado que los genes *cry* se transcriben a la par de que se activan ciertos genes de la esporulación dependientes del factor sigma K, Chen *et al.*, (2003) reportaron que en una mutante

carente *ispA* se retrasó la fase de esporulación de *B. thuringiensis* por falta de la serina proteasa intracelular A (ISPA). De la misma manera la transcripción de genes *cry* puedan verse comprometidos por la ausencia de una proteasa (Donovan *et al.*, 1997; Satinder *et al.*, 2007). Por lo tanto, si las proteasas pueden afectar el proceso de la esporulación y la cristalización de la proteína en función de la concentración interna o la expresión de las mismas (Carroll *et al.*, 1989 y Chen *et al.*, 2003), la adición de la proteinasa K al medio de cultivo Gerry-Rowe de una fermentación de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 y la sobreexpresión del gen *nprA* están involucrados en el retraso de la esporulación de HD-73 (Bravo-Delgado, comunicación personal 2017) y en la no producción de cristales insolubles (Cry) como se demostró en este trabajo y señalara Bravo-Delgado (comunicación personal, 2017).

Entonces se considera que hay una posibilidad de que el aumento de la expresión de *nprA* se debe a la necesidad de la bacteria por sustituir aquellas que posiblemente han sido degradadas por la proteinasa K en el medio de cultivo. En este contexto se analizó *in silico* la secuencia de la proteasa neutra NprA, que fue tomada de la base de datos UniProt con número de acceso "O32309_BACTU" (<http://www.uniprot.org/uniprot/O32309>). Esta secuencia fue sometida a un análisis teórico de hidrólisis, donde la proteasa empleada fue PK, mediante el software peptide cutter de la ExPASy Bioinformatic Resource Portal (http://web.expasy.org/peptide_cutter/), y se determinó con un 99% de probabilidad de escisión 283 posibles cortes a la proteasa neutra A (Anexo II) causada por la proteinasa K. En la tabla 4 se reúnen las posiciones de los cortes. Por lo que a través de este análisis se sugiere el potencial de la proteinasa K para hidrolizar los péptidos de NprA expulsados al medio.

Tabla 4 Posibles escisiones de la proteasa neutra A (NprA) provocadas por la proteinasa K (http://web.expasy.org/cgi-bin/peptide_cutter/peptidecutter.pl).

Nombre de la enzima	Número de cortes	Posición de cortes
Proteinasa K	283	6 7 8 9 10 11 12 15 16 17 18 19 22 25 26 27 32 33 35 38 40 41 42 46 47 48 52 53 54 55 56 60 61 63 64 65 67 68 70 71 75 77 79 82 86 88 91 95 96 97 100 101 102 107 108 109 111 113 114 117 119 120 122 128 130 131 134 135 136 139 143 145 151 152 154 156 157 158 159 160 164 166 167 170 171 172 173 176 178 179 180 181 185 186 187 188 189 190 191 192 193 195 197 198 205 206 207 208 209 210 211 216 217 220 222 223 226 227 234 237 238 243 245 246 247 250 251 253 256 258 262 263 266 269 271 272 273 278 279 280 284 287 288 289 290 291 292 294 299 300 303 304 305 306 308 311 312 314 315 316 318 319 320 321 323 325 326 327 329 330 331 333 334 337 338 343 346 348 350 353 354 356 360 363 364 365 371 372 378 379 380 381 383 387 389 390 393 394 395 397 398 399 400 405 406 407 410 413 414 416 417 418 421 422 424 425 426 427 428 429 436 437 438 440 442 443 444 448 451 452 459 461 467 471 472 480 482 486 487 491 492 493 494 495 499 501 503 504 505 508 513 515 516 517 518 520 522 524 525 526 529 530 531 534 536 538 539 541 542 543 545 546 548 551 552 553 554 555 556 560 562 563 565

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7.1 Conclusiones

La proteinasa K no tiene efecto de disociación *in vitro* sobre los cristales K-73 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73, contenidos en extracto de proteínas obtenidas del medio sólido. En extractos proteicos con cristales Cry, la adición de la PK seguida de la adición de solución BG, MSDST y un calentamiento en baño maría a punto de ebullición produce un efecto de disociación sobre el cristal K-73, con una alta producción de fragmentos proteicos aproximados a 60 kDa (toxinas activadas). Utilizando una concentración de 100 Nm de PK después de disociar el cristal con Na₂CO₃ se observaron fracciones polipeptídicas menores a 48 kDa.

La adición de la PK durante el tiempo crítico de crecimiento de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 evita la detección del cristal Cry K-73 al concluir 560 h de fermentación en medio Gerry-Rowe. Los cristales de la protoxina Cry1Ac de aproximadamente 130 kDa en fermentaciones de 80 h con adición de la PK a las 64 h no se ven afectados por efectos de hidrólisis o disociación. La formación del cristal K-74 no fue posible después de agregar una concentración de 100 nM en el medio de cultivo de una fermentación de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73.

7.2 Perspectivas

Medir la presencia de la proteasa neutra A en el medio Gerry-Rowe de una fermentación con *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 y la expresión del gen *nprA*.

Medir la actividad proteolítica de la proteinasa K sobre la proteasa neutra A.

Cuantificar la producción de la protoxina Cry1Ac durante las etapas de esporulación de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 en medios con y sin adición de la proteinasa K para verificar la traducción de la proteína.

8. REFERENCIAS

- Abee, T., Kovács, Á. T., Kuipers, O. P. y van der Veen, S. (2011). Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 172–179.
- Acevez D, Á. E. y De la Torre, M. (2004). Comunicación célula-célula en *Bacillus Subtilis* y sus implicaciones en bioprocesos. *Revista BioTecnología*, 9(1), 18-25.
- Agaisse, H. y Lereclus, D. (1995). How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *Journal of Bacteriology*, 177(21), 6027–6032.
- Akihiko, T. O. J. O., Samasanti, W., Yoshida, N. y Aizawa, K. (1986). Effects of the three proteases from gut juice of the silkworm, *Bombyx mori*, on the two morphologically different inclusions of δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 strain. *Agricultural and biological chemistry*, 50(3), 575-580.
- Aronson, A. I., Han, E. S., McGaughey, W. y Johnson, D. (1991). The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 981–986.
- Bajorath, J., Hinrichs, W. y Saenger, W. (1988). The enzymatic activity of proteinase K is controlled by calcium. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 176 (2), 441–447.
- Beckmann, B. E. y McKinley, P. K. (2009). Evolving Quorum Sensing in Digital Organisms. GECCO '09 Proceedings of the 11th Annual Conference on Genetic and Evolutionary Computation, 97–104.
- Bravo, A., Gill, S. S., y Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 49(4), 423–435.
- Bravo, A., Gill, S.S. y Soberón, M. (2005). *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier BV, ISBN 0-44-451516-X, pp. 175-206.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S. y Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7), 423–431.
- Bravo-Delgado, H. R., Cruz-Nolasco, A., Gutiérrez-Lucas, L. R. y Navarro-Martinez, A. K. (2015). Bioinformatics Analysis of NprR-NprX Quorum-Sensing System of *Bacillus thuringiensis* Isolates from the Papaloapan Region. *Advances in Biological Chemistry*, 5(7), 293-304.

- Bulla, L. A., Kramer, K. J. y Davidson, L. I. (1981). Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 130(1), 375–383.
- Cabrera, R., Rocha, J., Flores, V., Vázquez-Moreno, L., Guarneros, G., Olmedo, G. y De la Torre, M. (2014). Regulation of sporulation initiation by *NprR* and its signaling peptide *NprRB*: molecular recognition and conformational changes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(22), 9399–9412.
- Carroll, J., Li, J. y Ellar, D. J. (1989). Proteolytic processing of a coleopteran-specific delta-endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biochemical Journal*, 261(1), 99–105.
- Chen, F. C., Shen, L. F., Tsai, M. C., y Chak, K. F. (2003). The *IspA* protease's involvement in the regulation of the sporulation process of *Bacillus thuringiensis* is revealed by proteomic analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(3), 708–715.
- Deng, C., Peng, Q., Song, F. y Lereclus, D. (2014). Regulation of *cry* Gene Expression in *Bacillus thuringiensis*. *Toxins*, 6(7), 2194–2209.
- Dervyn, E., Poncet, S., Klier, A. y Rapoport, G. (1995). Transcriptional regulation of the *cry/IVD* gene operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Journal of Bacteriology*, 177(9), 2283–2291.
- Diggle, S. P., Crusz, S. A. y Cámara, M. (2007). Quorum sensing. *Current Biology*, 17(21), 907–910.
- Donovan, W. P., Tan, Y. y Slaney, A. C. (1997). Cloning of the *nprA* gene for neutral protease A of *Bacillus thuringiensis* and effect of in vivo deletion of *nprA* on insecticidal crystal protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2311–2317.
- Dubois, T., Perchat, S., Verplaetse, E., Gominet, M., Lemy, C., Aumont-nicaise, M. y Lereclus, D. (2013). Activity of the *Bacillus thuringiensis* *NprR*–*NprX* cell–cell communication system is co-ordinated to the physiological stage through a complex transcriptional regulation. *Molecular Microbiology*, 88(1), 48–63.
- Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D. y Lang, H. (1974). Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *European Journal of Biochemistry*, 47(1), 91–97.
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Review Microbiology*, 1(2), 117–126.
- Evdokimov, A. G., Moshiri, F., Sturman, E. J., Rydel, T. J., Zheng, M., Seale, J. W. y Franklin, S. (2014). Structure of the full-length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing details of toxin packaging into in vivo formed crystals. *Protein Science*, 23(11), 1491–7.

- Faust, R. M., Adams, J. R. y Heimpel A. M. (1967). Dissolution of the toxin parasporal crystal from *Bacillus thuringiensis* var. *pacificus* by the gut secretions of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology* 9, 488-488.
- Gallego del Sol, F. y Marina, A. (2013). Structural Basis of Rap Phosphatase Inhibition by Phr Peptides. *PLoS Biology*, 11(3), 1–14.
- Geske, G. D., Geske, G. D., Wezeman, R. J., Wezeman, R. J., Siegel, A. P., Siegel, A. P. y Blackwell, H. E. (2005). Small molecule inhibitors of bacterial quorum sensing and biofilm formation. *Journal of the American Chemical Society*, 127(37), 12762–3.
- Gominet, M., Slamti, L., Gilois, N., Rose, M. y Lereclus, D. (2001). Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* *plcR* regulon and for virulence. *Molecular Microbiology*, 40(4), 963–975.
- González Jr., J., Dulmage, H. T. y Carlton, B. C. (1981). Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, 5(3), 351–365.
- Grossman, A. D. y Losick, R. (1988). Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(12), 4369–4373.
- Whiteley, H. R. y Schnepf, H. E. (1986). The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Microbiology*, 40(1), 549–576.
- Höfte, H. y Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 53(2), 242–255.
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M. y Bulla, L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis*. A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1(1), 31–50.
- Ireton, K., Rudner, D. Z., Siranosian, K. J. y Grossman, A. D. (1993). Integration of multiple developmental signals in *Bacillus subtilis* through the Spo0A transcription factor. *Genes and Development*, 7(2), 283–294.
- Ishii, T. y Ohba, M. (1993). Diversity of *Bacillus thuringiensis* environmental isolates showing larvicidal activity specific for mosquitoes. *Journal of General Microbiology*, 139 (11), 2849-2854.
- Jiang, M., Shao, W., Perego, M. y Hoch, J. A. (2000). Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 38(3), 535–542.
- Jisha, V. N., Smitha, R. B. y Benjamin, S. (2013). An Overview on the crystal toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Microbiology*, 03(05), 462–472.

- Kleerebezem, M. (2004). Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides*, 25(9), 1405–1414.
- Kraemer-Schafhalter, A. y Moser, A. (1996). Kinetic study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in lab-scale batch process. *Bioprocess Engineering*, 14(3), 139–144.
- Krutzsch, H. C. (1986) Polypeptide sequence analysis using gas chromatography-mass spectrometry, in *Methods of Protein Microcharacterization: A Practical Handbook* (Shively, J. E., ed.), Humana, Clifton, NJ, 381-401.
- Kuipers, O. P., De Ruyter, P. G. G, Kleerebezem, M. y De Vos, W. M. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 64(1), 15–21.
- Kumar, N. S. y Venkateswerlu, G. (1997). Involvement of an endogenous metalloprotease in the activation of protoxin in *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *IUBMB Life*, 42(5), 901-908.
- La Sarre, B. y Federle, M. J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 73–111.
- Lecadet, M. M. y Dedonder, R. (1967). Enzymatic hydrolysis of the crystals of *Bacillus thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae* I. Preparation and fractionation of the lysates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9(3), 310–321.
- Lecadet, M. M. y Martouret, D. (1967). Enzymatic hydrolysis of the crystals of *Bacillus thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae* II. Toxicity of the different fractions of the hydrolysate for larvae of *Pieris brassicae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9(3), 322–330.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Grandvalet, C., Salameitou, S. y Gominet, M. (2000). Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 290(4-5), 295–9.
- Lightwood, D. J., Ellar, D. J. y Jarrett, P. (2000). Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5174–5181.
- López, S. y Cerón, J. (2010). Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con *Coleópteros*. *Revista Nova Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, 8(14), 183–194.
- Lyon, G. y Muir, T. (2003). Chemical signaling among bacteria and its inhibition. *Chemistry and Biology*, 10(2), 1007–1021.
- Mizuki, E., Park, Y. S., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K. y Ohba, M. (2000). Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 7(4), 625-634.

- Oppert, B. (1999). Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 42, 1-12.
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J. y Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*, 6(12), 3296–3325.
- Perchat, S., Dubois, T., Zouhir, S., Gominet, M., Poncet, S., Lemy, C. y Lereclus, D. (2011). A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Molecular Microbiology*, 82(3), 619–633.
- Perego, U., Hanstein, C., Welsh, K. M., Djavakhishvili, T., Glaser, P. y Hocht, J. A. (1994). Multiple protein-Aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signal the control of development in *B. subtilis*. *Cell*, 79, 1047–1055.
- Piggot, P. J. y Coote, J. G. (1976). Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriological Reviews*, 40(4), 908–962.
- Pottathil, M. y Lazazzera, B. A. (2003). The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Front Biosci*, 8(11), d32-d45.
- Prestidge, L., Gage, V., & Spizizen, J. (1971). Protease activities during the course of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 107(3), 815-823.
- Redfield, R. J. (2002). Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends in Microbiology*, 10(8), 365–370.
- Rocha, J., Flores, V., Cabrera, R., Soto-Guzmán, A., Granados, G., Juaristi, E. y De La Torre, M. (2012). Evolution and some functions of the NprR-NprRB quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(4), 1069–1078.
- Rocha-Estrada, J., Aceves-Diez, A. E., Guarneros, G. y De La Torre, M. (2010). The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 913–923.
- Rodríguez Monroy, M., y Torre, M. (1996). Effect of the dilution rate on the biomass yield of *Bacillus thuringiensis* and determination of its rate coefficients under steady-state conditions. *Applied microbiology and biotechnology*, 45(4), 546-550.
- Rowe, G. E. (1990). Central Metabolism of *Bacillus thuringiensis* during growth and sporulation. *Digitized Theses*. Paper 1987.

- Rowe, G. E. y Margaritis, A. (2004). Bioprocess design and economic analysis for the commercial production of environmentally friendly bioinsecticides from *Bacillus thuringiensis* HD-1 *kurstaki*. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(4), 377–388.
- Rukmini, V., Reddy, C. Y. y Venkateswerlu, G. (2000). *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie*, 82(2), 109-116.
- Rumbaugh, K. P., Diggle, S. P., Watters, C. M., Ross-Gillespie, A., Griffin, A. S. y West, S. A. (2009). Quorum sensing and the social evolution of bacterial virulence. *Current Biology*, 19(4), 341–345.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T. y Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 9(3), 283–300.
- Sauka, D. H. y Benintende, G. B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: Generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos *lepidópteros* que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*, 40(2), 124–140.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J. y Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and Its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 775–806.
- Schünemann, R., Knaak, N. y Fiuza, L. M. (2014). Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. *ISRN Microbiology*, 2014, 135675.
- Sharipova, M. R., Balaban, N. P., Gabdrakhmanova, L. A., Shilova, M. A., Kadyrova, Y. M., Rudenskaya, G. N., y Leshchinskaya, I. B. (2002). Hydrolytic enzymes and sporulation in *Bacillus intermedius*. *Microbiology*, 71(4), 420-424.
- Slamti, L., Perchat, S., Huillet, E. y Lereclus, D. (2014). Quorum sensing in *Bacillus thuringiensis* is required for completion of a full infectious cycle in the insect. *Toxins*, 6(8), 2239–55.
- Tojo, A., & Aizawa, K. (1983). Dissolution and Degradation of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin by Gut Juice Protease of the Silkworm *Bombyx mori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(2), 576–580.
- Tomar, R., Dubey, V. K. y Jagannadham, M. V. (2009). Effect of alkyl alcohols on partially unfolded state of Proteinase K: Differential stability of α -helix and β -sheet rich regions of the enzyme. *Biochimie*, 91(8), 951–960.

- Verplaetse, E., Slamti, L., Gohar, M. y Lereclus, D. (2015). Cell differentiation in a *Bacillus thuringiensis* population during planktonic growth, biofilm formation, and host infection. *mBio*, 6(3), e00138-15.
- Waters, C. M. y Bassler, B. L. (2005). Quorum Sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 319–346.
- Wolska, K. I., Grudniak, A. M. y Kraczkiewicz-Dowjat, A. (2007). Genetic and physiological regulation of bacterial endospore development. *Polish Journal of Microbiology*, 56(1), 11–7.
- Yamamoto, T. (1983). Identification of Entomocidal Toxins of *Bacillus thuringiensis* by High Performance Liquid Chromatography. *Microbiology*, 129(8), 2595–2603.
- Yamashita, S., Akao, T., Mizuki, E., Saitoh, H., Higuchi, K., Park, Y. S. y Ohba, M. (2000). Characterization of the anti-cancer-cell parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate. *Canadian Journal of Microbiology* 46(10), 913-91.

Anexo I

1. Soluciones para preparar geles SDS-PAGE al 7%

- Solución para 4 geles

Gel Separador	Reactivo	Gel concentrador
10.22 mL	dH ₂ O	3.6 mL
	Buffer 6.8	3.0 mL
4.60 mL	Buffer 8.8	
5.40 mL	Acrilamida	2.0 mL
100 µL	TEMED	40 µL
180 µL	Persulfato de amonio (P.A.)	80 µL

2. Soluciones para solubilizar cristales Cry

2.1 Buffer Laemmli 2X

Compuesto	Volumen (mL)
Tris-HCl 0.5 M pH=6.8	2
Glicerol	0.8
SDS 10% w/v	0.8
2-Mercaptoetanol	0.4
Azul de Bromofenol 1% w/v	0.4

2.2 Buffer de Carbonato de Sodio (Na₂CO₂)

- Preparar una solución de Na₂CO₂ 50 mM, ajustar hasta un pH igual a 12 (solución 1).
- A continuación, preparar el buffer con los siguientes compuestos.

Compuesto	Volumen (mL)
Na ₂ CO ₂ (50 mM) pH=12	35.4
2-Mercaptoetanol	00.5
SDS 10% w/v	5
Glicerol	9

3. Solución para cargar las muestras en geles

- Preparar una solución Bromofenol-Glicerol-dH₂O (BG) con las siguientes cantidades:

Compuesto	Volumen (mL)
dH ₂ O	8
Glicerol	2
Azul de Bromofenol 1% w/v	2

4. Solución para disolver cristales geles

4.1 Solución MSDST

Se sustituye en el buffer Laemmli el volumen correspondiente a los siguientes compuestos: glicerol y azul de Bromofenol por dH₂O.

Compuesto	Volumen (mL)
Tris-HCl 0.5 M pH=6.8	2
dH ₂ O	0.8
SDS 10% w/v	0.8
2-Mercaptoetanol	0.4
dH ₂ O	0.4

4.2 Solución LMMDM

Se considera la misma composición del buffer Laemmli con la variación del mercaptoetanol, se agrega 2 veces más el volumen.

Compuesto	Volumen (mL)
Tris-HCl 0.5 M pH=6.8	2
Glicerol	0.8
SDS 10% w/v	0.8
2-Mercaptoetanol	0.8 (0.4x2)
Azul de Bromofenol 1% w/v	0.4

5. Soluciones para Teñir-Desteñir Geles SDS-PAGE

5.1 Soluciones para teñir

- **Ácido Tricloroacético (TCA), 12.5% w/v**

Pesar 12.5 g de TCA y solubilizar en 50 mL de dH₂O en un matraz aforado. A continuación, aforar hasta un volumen de 100 mL.

- **Azul de Comassie**

Pesar 0.1 g de azul de Comassie y disolver en la siguiente solución:

Compuesto	Volumen (mL)
dH ₂ O	106
Metanol (Mt)	80
Ácido Acético (Ac)	14

5.2 Soluciones para desteñir

- **Etanol al 50% v/v**

Agregar en un matraz aforado 50 mL de metanol al 98% y aforar con dH₂O.

- **Etanol / Ácido Acético / Agua destilada, (Et/Ac/dH₂O)**

Para preparar 300 mL de la solución, mezclar los siguientes volúmenes:

Compuesto	Volumen (mL)
dH ₂ O	189
Etanol (Mt)	90
Ácido Acético (Ac)	21

- **Metanol / Ácido Acético / Agua destilada, (Mt/Ac/dH₂O)**

Para preparar 300 mL de la solución, mezclar las siguientes cantidades:

Compuesto	Volumen (mL)
dH ₂ O	195
Metanol (Mt)	75
Ácido Acético (Ac)	30

6. Procedimiento para el teñido y desteñido de geles

En un recipiente adecuado para colocar un gel, agregar el volumen suficiente de cada una de las soluciones y seguir la secuencia de acciones para el teñido-desteñido, que a continuación se resume en la siguiente tabla:

Paso	Sustancia	Actividad
1	TCA 12.5%	Agitar por media hora
2	dH ₂ O	Lavar 3 veces
3	Azul de Comassie	Agitar por una hora
4	Etanol 50%	Agitar por 10 min
5	Et/Ac/dH ₂ O	Agitar por 30 min
6	Mt/Ac/dH ₂ O	Agitar por 10 min

7. Reactivo DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico)

El reactivo se prepara en un matraz aforado ámbar. Se recomienda disolver los sólidos en un volumen de 50 mL antes de aforar, la mezcla consiste de los siguientes compuestos:

Compuesto	Peso (g)
Hidróxido de Sodio	1.6
Tartrato de sodio y potasio	30
DNS	1

Aforar a 100 mL

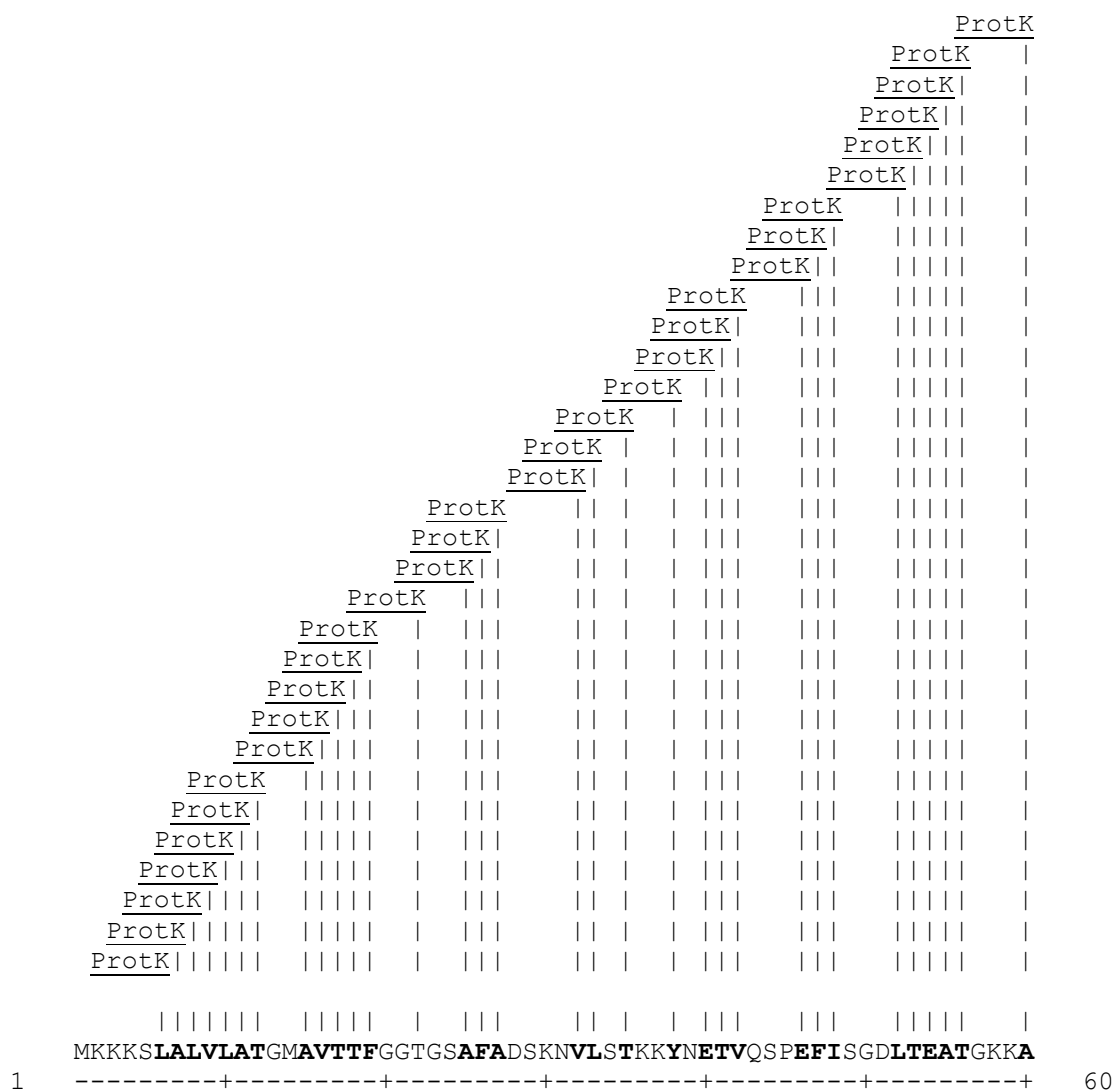
- Estándar de glucosa

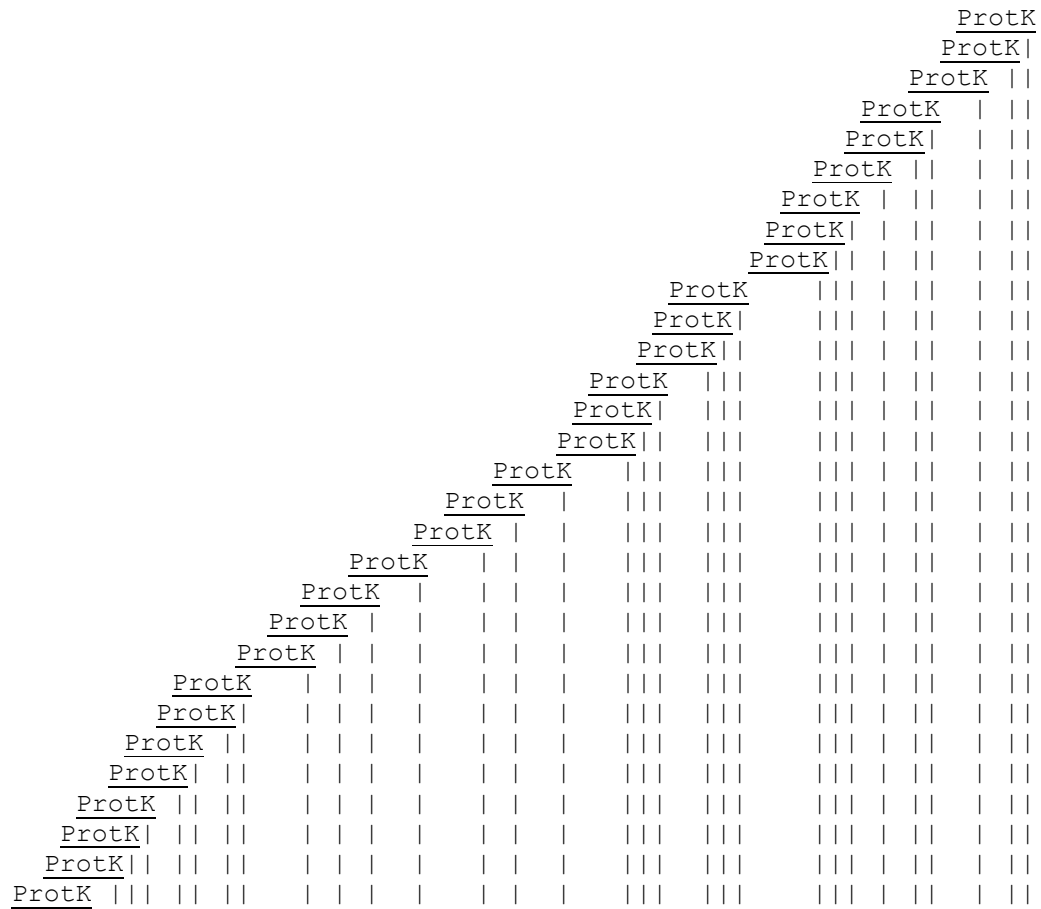
Preparar una curva patrón bajo las siguientes condiciones.

Mezcla	Concentración (PPM)	Concentración (g/L)	Solución
0.1 g de glucosa/100 mL de dH ₂ O (sol. 1)	1000	1	1
4 mL de sol. 1 + 1 mL de dH ₂ O	800	0.8	2
3 mL de sol. 1 + 2 mL de dH ₂ O	600	0.6	3
2 mL de sol. 1 + 3 mL de dH ₂ O	400	0.4	4
1 mL de sol. 1 + 4 mL de dH ₂ O	200	0.2	5

Anexo II

Posibles sitios de hidrólisis de la proteinasa K sobre la proteasa neutra A (NprA).



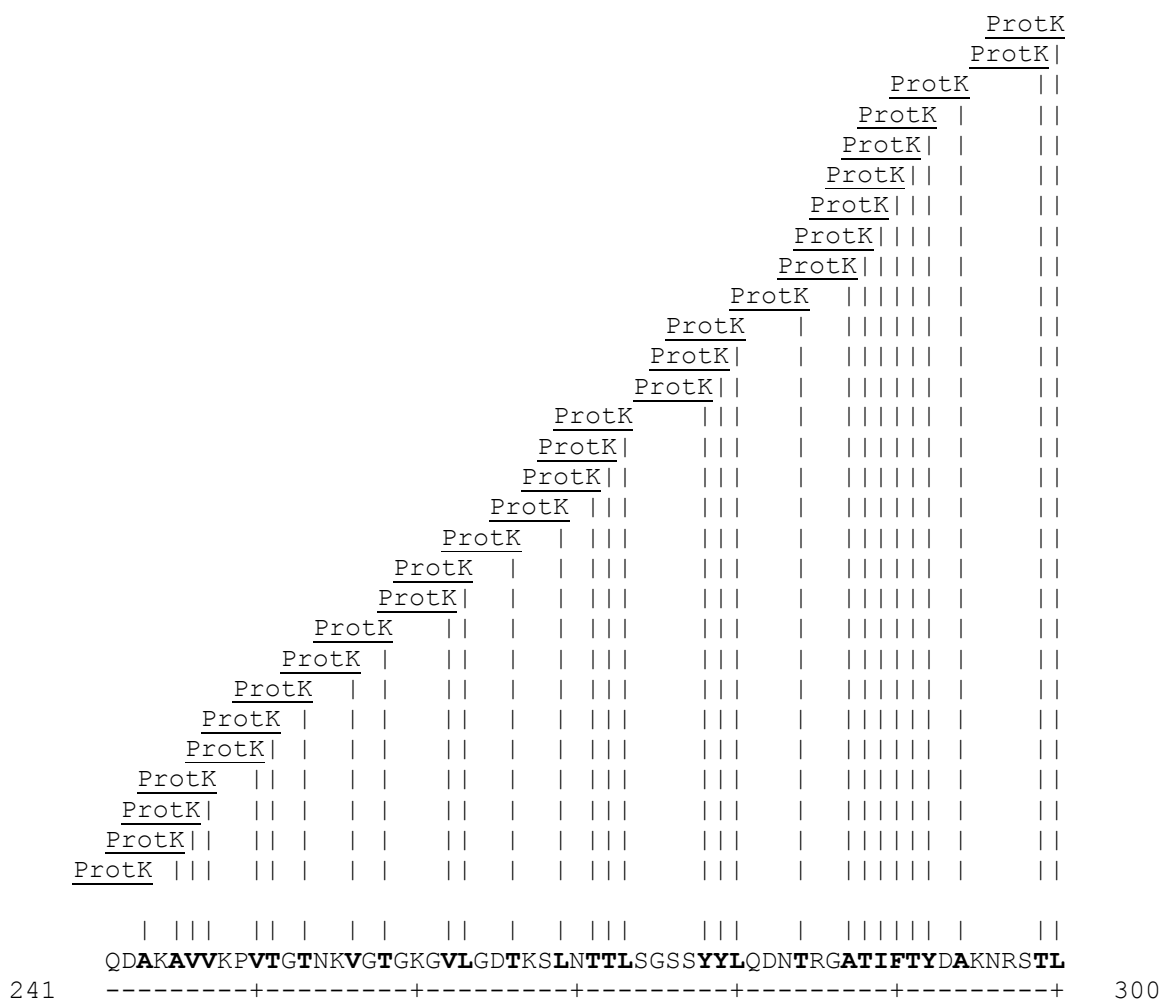


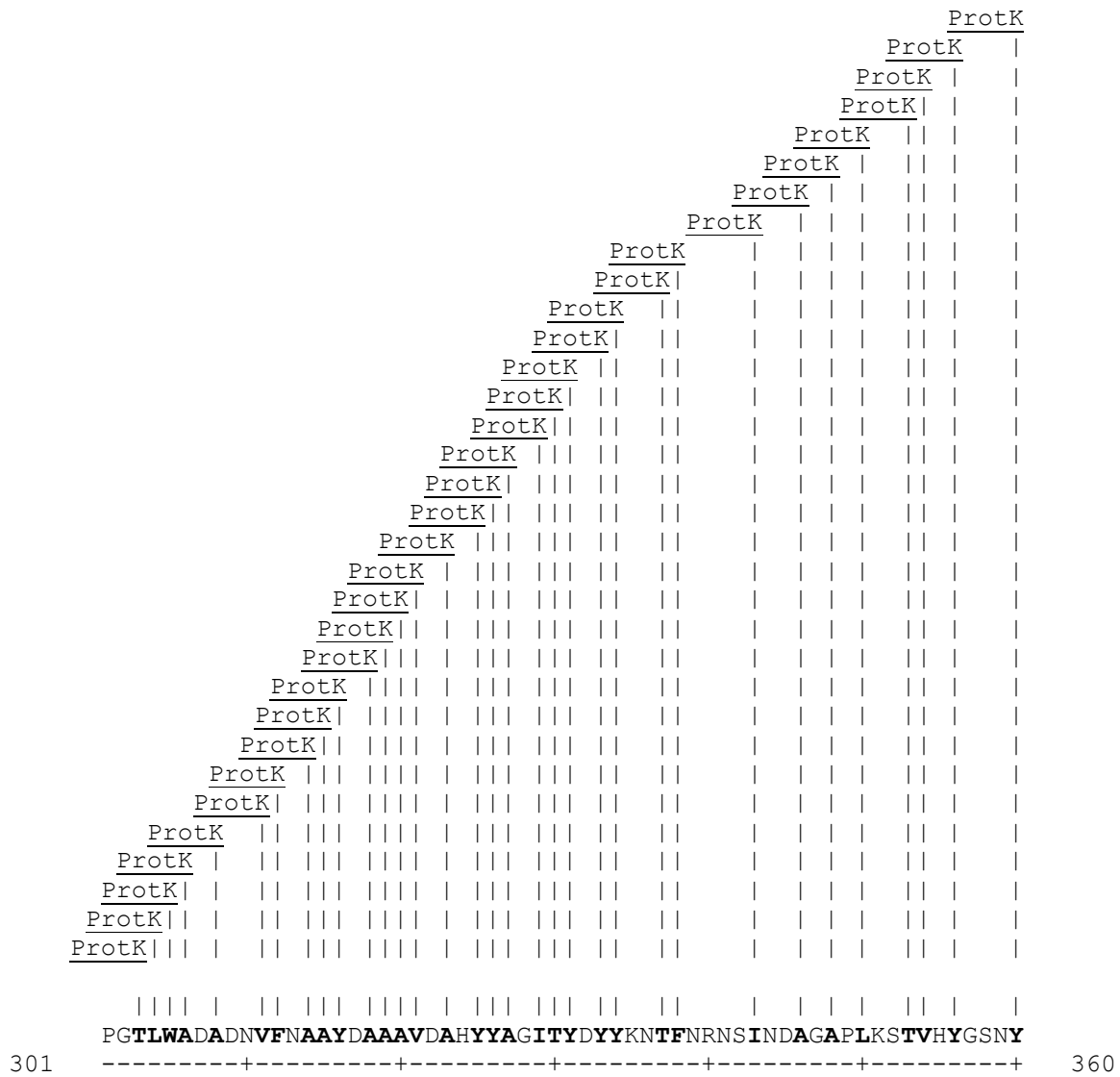
|
ESVVFDYLN**AA**KG**DY**KL**GE**KS**AQ**DS**FK**V**KQ**V**KKD**AV**TD**ST**TV**RM**QQ**V**YEG**VP**VWG**ST**QVA**
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

61

120

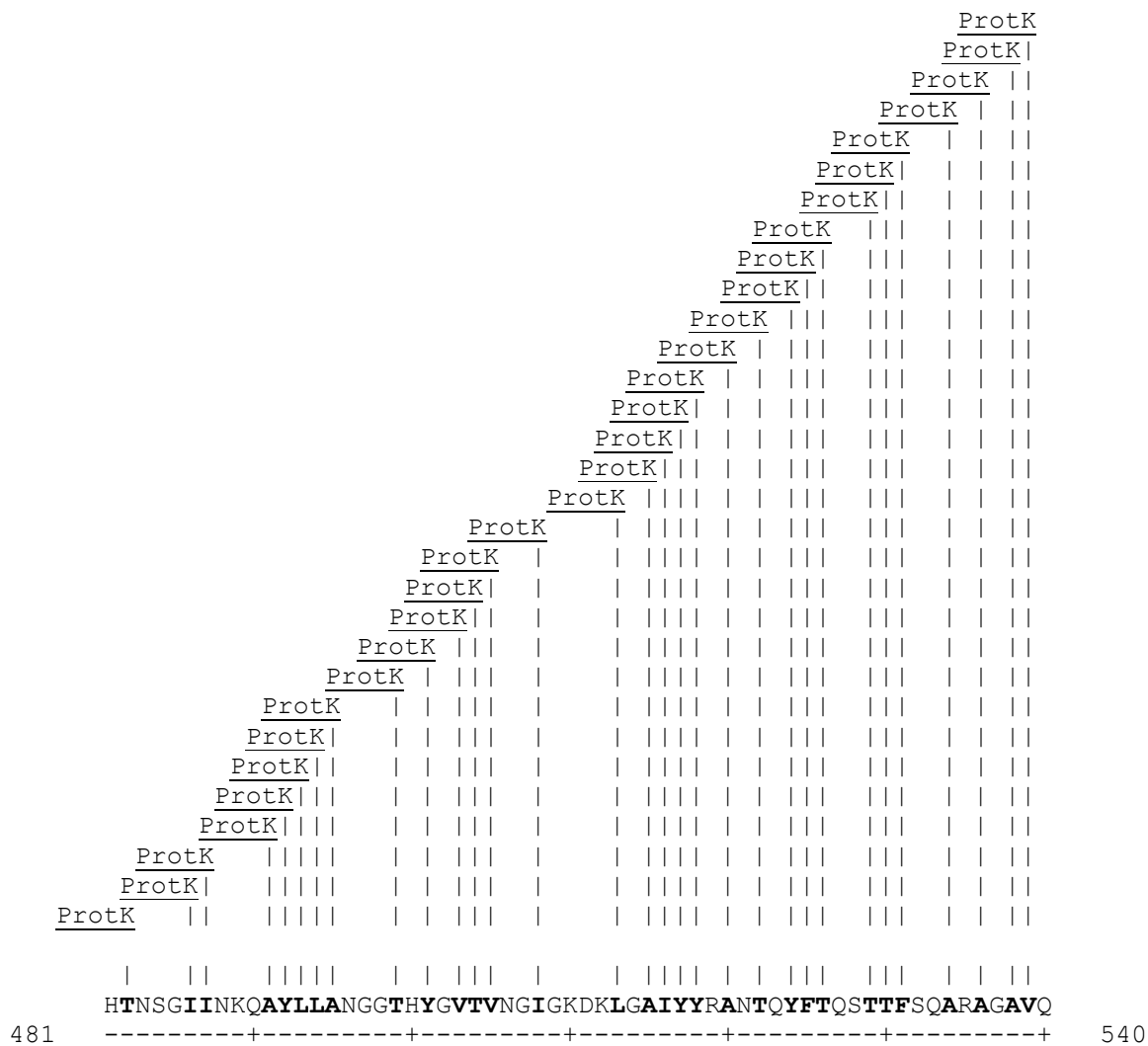
[illegible]





361

X



xii