



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Campus Tuxtepec

División de estudios de posgrado

Estudio filogenético de la familia Chitinase-Like Proteins en *Beuaveria bassiana* y determinación de la actividad quitinolítica en medio líquido.

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestro en Biotecnología

Presenta:

Elías Abad Rodríguez

Directora de tesis:

Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño

Codirector:

Dr. Julián Mario Peña Castro

Tuxtepec, Oaxaca. 2018



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2018/MB/045
ASUNTO	Jurado asignado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 14 de febrero de 2018

C. ELIAS ABAD RODRÍGUEZ

ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dra. María de Jesús García Gómez	UNPA	Presidente
Dr. Edgar García López	Cátedras CONACyT-UNPA	Vocal
Dra. Laura P. Ramírez Coutiño	UNPA	Secretario
Dr. Enrique Villalobos Amador	UNPA	1er Suplente
Dra. Alma Xochitl Ávila Alejandré	UNPA	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.



Dra. Sandra del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico

C.c.p. Dra. Laura P. Ramírez Coutiño – Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/016
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 20 de marzo de 2018

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología de la C. **Elías Abad Rodríguez**, matrícula 14140001, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Estudio filogenético de la familia Chitinase-Like proteins en *Beauveria bassiana* y determinación de la actividad quitinolítica en medio líquido**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular, me despido quedando atento ante cualquier duda y deseándole suerte en todas sus actividades.

Atentamente

terra uherrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú

Dra. Sandra J. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. Elías Abad Rodríguez
C.c.p. Archivo

El posgrado en Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, UNPA, forma parte del padrón nacional de posgrado del CONACYT.

Esta tesis se realizó en los laboratorios de Bioprocesos y Químico Biológico de la UNPA bajo la dirección de la Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño y la codirección del Dr. Julián Mario Peña Castro. Adicionalmente, se contó con el apoyo económico de la beca otorgada por CONACYT con número de registro 637838.

Agradecimientos

A la UNPA, por haberme brindado los recursos académicos necesarios para mi formación.

A la Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño, por sus enseñanzas y todo su apoyo brindado, por su paciencia y comprensión a lo largo de la realización de este trabajo. Pero sobre todo, por la confianza que depositó en mí, muchas gracias.

Al Dr. Julián Mario Peña Castro, por haber aceptado la codirección de este trabajo, por sus acertados consejos y su siempre atenta disposición de ayudar con mis dudas. Agradezco también su paciencia y tolerancia durante mis tropiezos.

A mis sinodales, la Dra. María de Jesús García Gómez, el Dr. Edgar García López, el Dr. Enrique Villalobos Amador y la Dra Alma Xóchil Ávila Alejandre, por sus valiosas correcciones y su disponibilidad para concluir este proceso.

A la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa y al Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo, sus aportaciones, consejos y sugerencias fueron de mucha ayuda para la realización de este trabajo.

A la Dra. Jacqueline Capataz Tafur, por su amabilidad al prestarme material necesario para la realización de mis experimentos, y por su constante interés en el seguimiento del avance de mi trabajo.

A la química Lety y a Fany, por su disponibilidad y por todas las facilidades prestadas a lo largo de mi trabajo de tesis en el laboratorio.

A mis veteranos compañeros de laboratorio: Xóchilt, Adolfo e Ivonne, por su disposición de compartir conmigo sus conocimientos y experiencias dentro del laboratorio. Asimismo a mis compañeros en el laboratorio de Bioprocesos: Osiris, Demetrio, Daniel, Alán, Rosa, Daniel Arnulfo, Crisanto, Celenia y Liria. Por su compañía y gratos momentos compartidos, así como por la ayuda brindada cuando la requerí.

A mis compañeros Gustavo y Lupita, por ser siempre amigos incondicionales.

Y finalmente, a Zaire, Nayeli y Brenda, por escucharme y apoyarme cuando más lo necesité.

A todos ¡muchísimas gracias!

Dedicatoria

A mi familia, pues nada de lo que he alcanzado en la vida lo hubiese logrado sin su apoyo y confianza. Sé que esperan mucho de mí, y espero sinceramente poder cumplir con sus expectativas. Aunque no lo exprese mucho con palabras, siempre están presentes en mis pensamientos, este logro es para ustedes. Gracias por todo.

«Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado».

(Albert Szent-Györgyi)

Índice

1. Introducción	1
1.1. Generalidades de las quitinasas.....	2
1.1.1. Clasificación según su mecanismo quitinolítico.....	3
1.2. Lectinas y CLPs.....	4
1.2.1. Lectinas	4
1.2.2. Proteínas similares a quitinasas (CLPs).....	5
1.3. Importancia del estudio de las CLPs	9
1.4. <i>Beauveria bassiana</i>	10
1.4.1. Morfología	11
2. Antecedentes	12
3. Justificación	15
4. Hipótesis.....	16
5. Objetivos	16
5.1. Objetivo general	16
5.1.2. Objetivos específicos	16
6. Estrategia experimental.....	17
7. Metodología.....	18
7.1. Escrutinio de los genes de CLPs en <i>B. bassiana</i>	18
7.2.1. Búsqueda de secuencias.....	18
7.2.2. Multialineamientos y detección de dominios conservados	18
7.2.3. Construcción de árboles filogenéticos	18
7.3. Diseño de primers.....	19
7.4. Pretratamiento con Tetraborato de potasio.....	19
7.5. Inóculo	20
7.6. Fermentación líquida	20
7.7. Determinación de proteína soluble	21
7.8. Determinación de actividad NHasa	22
7.9. Determinación de actividad EQasa	22
7.9.1. Preparación de quitina coloidal	23
7.10. Determinación de azúcares reductores	23
8. Resultados y discusiones.....	24

8.2. Escrutinio de los genes de CLPs en <i>Beauveria bassiana</i>	24
8.1.1. Cálculo de peso molecular y punto isoeléctrico.....	26
8.1.2. Análisis de dominios estructurales conservados.....	26
8.1.3. Construcción de árboles filogenéticos	28
8.2. Diseño de primers	35
8.3. Fermentación líquida.....	36
8.3.1. Determinación de proteína soluble	37
8.3.2. Determinación de actividad N-acetilhexosaminidasa	38
8.3.3. Determinación de actividad endoquitinasa	40
8.3.4. Determinación azúcares reductores	42
8.4 Monitoreo de la cutícula de camarón en medio Czapeck.....	45
8.5. Fermentación en Czapeck Glucosa (4%).....	49
8.5.1. Determinación de proteína soluble.....	49
8.5.2. Determinación de actividad N-acetilhexosaminidasa.....	50
8.5.3. Determinación de actividad EQasa	51
8.5.4. Cuantificación de biomasa.....	52
9. Conclusiones	53
10. Perspectivas	54
11. Referencias	55
Anexos	60
Anexo 1	60
Anexo 2	68
Anexo 3	70

Índice de Figuras

Figura 1. Secuencia de aminoácidos en YKL-40 humana.....	8
Figura 2. Secuencia de aminoácidos en YKL-39 humana	8
Figura 3. Secuencia de aminoácidos en SI-CLP humana.....	9
Figura 4. Estructuras morfológicas en <i>Beauveria bassiana</i>	11
Figura 5. Estrategia experimental empleada en el trabajo	17
Figura 6. Hit en BLAST correspondiente a BbCLP1	23
Figura 7. Vista superior de la estructura 3D TIM Barrel.....	26
Figura 8. Resumen de la búsqueda de dominios estructurales.....	27
Figura 9. Árbol filogenético de CLPs en <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i> empleando alineamiento ClustalW	29
Figura 10. Árbol filogenético de CLPs en <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i> empleando alineamiento MUSCLE.....	30
Figura 11. Árbol filogenético de CLPs en <i>Beauveria bassiana</i> (BbCLP), así como en <i>Metarhizium robertsii</i> (MrCLP1), <i>Metarhizium majus</i> (MmCLP1), <i>Agaricus bisporus</i> (ABL AGABI), <i>Penicillium sp</i> (PcCLP) y <i>Schizosaccharomyces</i> (YKT4) empleando multialineamiento ClustalW	31
Figura 12. Árbol filogenético de CLPs en <i>Beauveria bassiana</i> , así como en <i>Metarhizium robertsii</i> (MrCLP1), <i>Metarhizium majus</i> (MmCLP1), <i>Agaricus bisporus</i> (ABL AGABI), <i>Penicillium sp</i> (PcCLP) y <i>Schizosaccharomyces</i> (YKT4) empleando multialineamiento MUSCLE	32
Figura 13. Árbol filogenético de CLPs en múltiples organismos empleando multialineamiento ClustalW	33
Figura 14. Árbol filogenético de CLPs en múltiples organismos empleando multialineamiento MUSCLE	34
Figura 15. Proteína soluble total en fermentación líquida con <i>Beauveria bassiana</i> empleando medio Czapeck con diferentes sustratos	37
Figura 16. N-acetilhexosaminidasas producidas por <i>Beauveria bassiana</i> empleando medio Czapeck con diferentes sustratos	38
Figura 17. Productividad máxima para Nhasas producidas por <i>B. bassiana</i> empleando diferentes sustratos.....	40
Figura 18. Actividad EQasa detectada para <i>Beauveria bassiana</i> empleando medio Czapeck con diferentes sustratos	41

Figura 19. Productividad máxima para EQasas producidas por <i>B. bassiana</i> empleando diferentes sustratos.....	42
Figura 20. Resultados de las determinaciones de azúcares reductores con la técnica DNS	44
Figura 21. Valores de pH obtenidos para el medio Czapeck con cutícula de camarón sin inóculo	46
Figura 22. Resultados de la prueba de Bradford, en el sobrenadante del medio Czapeck sin inóculo	47
Figura 23. Valores de la concentración de NAG presente en el medio Czapeck con cutícula de camarón	48
Figura 24. Proteína soluble (µg/ml) presente en medio Czapeck con glucosa al 4%.....	49
Figura 25. Producción de NHasas por <i>B. bassiana</i> en medio Czapeck glucosa al 4% .	50
Figura 26. Producción de EQasas por <i>B. bassiana</i> en medio Czapeck con glucosa 4%	51
Figura 27. Producción de biomasa por <i>B. bassiana</i> en medio Czapeck con glucosa 4%	52

Índice de Tablas

Tabla 1. Miembros representativos de la familia GH18 en humanos y ratones	6
Tabla 2. Composición del medio Czapeck empleado para la producción de CLPs en <i>Beauveria bassiana</i>	20
Tabla 3. Preparación de muestras y blanco para la determinación de proteína soluble (Bradford).....	21
Tabla 4. Preparación de muestras y blanco para determinación de actividad NHasa ...	21
Tabla 5. Listado y descripción de CLPs en <i>Beauveria bassiana</i>	26
Tabla 6. Primers diseñados para los genes de CLPs en <i>Beauveria bassiana</i>	36

ABREVIATURAS	
CLP	Chitinase-like Protein
CDD	Conserved Domain Database
NHase	Actividad enzimática N-acetilhexosaminidasa
EQase	Actividad enzimática endoquitinasa
GH18	Familia Glucosil Hidrolasa 18
NAG	N-acetilglucosamina
p-NAG	p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida
SDA	Agar Dextrosa Sabouraud
kDa	Kilo Dalton
Mw	Peso molecular (por sus siglas en inglés “Molecular Weight”)
PI	Punto isoeléctrico
dH₂O	Agua destilada
MUSCLE	Multiple Sequence alignment by Log-Expectation
Tm	Temperatura de melting

Resumen

CLPs (Chitinase-Like Proteins) son proteínas estructuralmente similares a las quitinasas, enzimas responsables de la degradación del biopolímero quitina. Pese a su carencia de actividad hidrolítica, las CLPs son agrupadas junto a las quitinasas en la familia 18 de las Glucosil Hidrolasas (GH18). Una característica de estas proteínas es que poseen la capacidad de reconocer sustratos quitinosos y enlazarse a ellos, razón por la que suelen ser denominadas quito-lectinas. Al igual que las quitinasas, las CLPs son producidas por una amplia variedad de organismos desde bacterias, hasta mamíferos.

Su función biológica exacta es desconocida, sin embargo ha surgido un gran interés en su estudio en los últimos años, debido a sus altos niveles de expresión detectados en mamíferos durante padecimientos inflamatorios como asma y enfermedad de Crohn.

Beauveria bassiana es un **HEP** (Hongo Entomopatógeno) de gran valor comercial, dado su extenso uso en el control biológico de plagas. Las quitinasas producidas por este hongo juegan un papel importante en el proceso de infección en el insecto. Montgomery y Kirchman (1993) reportaron que la expresión de quitinasas y CLPs es paralela, por lo que podría existir producción de estas últimas por parte de *Beauveria bassiana* de manera simultánea con las quitinasas durante la fermentación. Debido a las implicaciones patológicas de sus homólogas en mamíferos, estudiar las CLPs fúngicas podrá permitir tener una mayor certeza de la bioseguridad en el uso de **HEP** en formulados comerciales.

En el presente trabajo se realizó un análisis bioinformático sobre los posibles genes codificantes para CLPs en *Beauveria bassiana* reportados por Xiao et al, 2012. Este análisis fue realizado empleando como referencia la **CDD** (Conserved Domains Database) de **NCBI**.

Se construyeron árboles filogenéticos involucrando los genes reportados para *Beauveria bassiana* así como genes reportados en múltiples organismos incluyendo aquellos hallados en mamíferos, las CLPs en estos últimos muestran mayor similitud unas con otras que las presentes en organismos más antiguos como lo son los hongos.

Fueron hallados 8 genes codificantes para CLPs en *Beauveria bassiana*, tras el análisis informático se concluyó que el 75% de ellos poseía las características distintivas de las proteínas de la familia GH18, los genes sin esta característica fueron descartados.

Se realizaron fermentaciones empleando este mismo hongo en medio líquido Czapeck usando como sustrato cutícula de camarón, quitina comercial y glucosa (10%). Además se realizó una cuantificación espectrofotométrica para las enzimas NHasas, EQasas al igual que para azúcares reductores.

La mayor actividad NHasa fue detectada para cutícula de camarón (9.98 mU/mL) a las 72h, seguido por glucosa (6 mU/mL) a las 120 h y quitina comercial SIGMA con 4.03 mU/mL a las 72 h. La actividad EQasa alcanzó su mayor actividad a las 144 h para Czapeck glucosa (24.4 U/mL) seguido por cutícula de camarón (13.91 U/mL) a las 120 h. La determinación de actividad quitinasa se realizó con la finalidad de evaluar la expresión de estas enzimas por parte de *B. bassiana* bajo condiciones específicas, considerando la similitud estructural entre dichas enzimas y las lectinas, estos resultados serán de utilidad para investigaciones futuras.

Se detectó que la cutícula de camarón libera compuestos al medio (sales y proteínas) por efecto del tratamiento de esterilización y el pH ácido del mismo, estos compuestos interaccionan con el medio incrementando su pH durante las primeras horas de la cinética.

Abstract

CLPs (Chitinase-Like Proteins) are proteins structurally similar to chitinases, enzymes responsible for the degradation of the biopolymer chitin. Despite its lack of hydrolytic activity, CLPs are grouped together with chitinases in Glycoside Hydrolases family 18 (GH18). A characteristic of these proteins is that they possess the ability to recognize chitinous substrates and bind to them, which is why they are usually called chito-lectins. Like chitinases, CLPs are produced by a wide variety of organisms, from bacteria to mammals.

Its exact biological function is unknown, however there has been great interest in its study in recent years, since high levels of expression in mammals have been detected during inflammatory conditions such as asthma and Crohn's disease.

Beauveria bassiana is an **EF** (Entomopathogenic Fungus) of great commercial value, given its extensive use in the biological control of pests. The chitinases produced by this fungus play an important role in the infection process in the insect. Montgomery and Kirchman (1993) reported that the expression of chitinases and CLPs is parallel, so that there could be production of the latter by *Beauveria bassiana* simultaneously with chitinases during fermentation. Due to the pathological implications of their homologous in mammals, studying fungal CLPs may allow greater certainty of biosecurity in the use of **EF** in commercial formulations.

In the present work a bioinformatic analysis was carried out on the possible genes coding for CLPs in *Beauveria bassiana* reported by Xiao *et al*, 2012. This analysis was conducted using the **NCBI's CDD** as reference.

Phylogenetics trees were built involving the reported genes in *Beauveria bassiana*, as well as the reported genes in multiple organisms including those reported in mammals,

CLPs in mammals show a greater similarity with each other than those present in more ancient organism like fungi.

8 genes coding for CLPs were found in *Beauveria bassiana*, after the computer analysis it was concluded that 75% of them have the distinctive characteristics of the proteins of the GH18 family, the genes without this characteristic were discarded.

CLPs production by this same fungus was evaluated in Czapeck liquid culture medium using as substrate: shrimp cuticle, comercial chitin and glucose (10%). Also a spectrophotometric quantification for exochitinases, endochitinases and reducing sugars was performed.

The highest NHase activity was detected for shrimp cuticle (9.98 mU /mL) at 72 h, followed by glucose (6 mU/mL) at 120 h and commercial SIGMA chitin with 4.03 mU /mL at 72 h. The EQase activity reached its highest activity level at 144 h for Czapeck glucose (24.4 U/mL) followed by shrimp cuticle (13.91 U/mL) at 120 h. The determination of chitinase activity was performed in order to evaluate the expression of these enzymes by *B. bassiana* under specific conditions, considering the structural similarity between these enzymes and the lectins, these results will be useful for future research.

It was also detected that the shrimp cuticle releases compounds to the medium (Salts and proteins) by effect of the sterilization treatment and the acidic pH of the same, these compounds interact with the medium increasing its pH during the first hours of the kinetics.

1. Introducción

El atractivo comercial e industrial de los derivados de quitina (debido a sus características biocompatibles), como son los quitín-oligosacáridos, el dímero acetilquitobiosa y monómeros de N-acetilglucosamina, ha dado origen a un interés en las enzimas quitinolíticas como una alternativa viable en los procesos de conversión de quitina. Las quitinasas han sido objeto de diversos estudios debido a su gran diversidad de funciones biológicas en los diferentes organismos que las producen como bacterias, plantas, hongos e incluso el ser humano; muchas de estas funciones ni siquiera están relacionadas con su actividad hidrolítica sobre sustratos quitinosos, por ejemplo, la presencia de actividad anticongelante en plantas monocotiledóneas (Xu *et al*, 2007). Adicionalmente, en los últimos años han comenzado a surgir estudios sobre las denominadas Chitinase Like Proteins (**CLP**), una extensa familia de proteínas estructuralmente homólogas a las quitinasas pero con la diferencia de no poseer actividad hidrolítica sobre quitina, pero que poseen aún la capacidad de reconocer y unirse a ella, razón por la que muchos autores las catalogan como lectinas, atribuyéndoles el nombre de quitolectinas. Al igual que las quitinasas, las CLPs han sido detectadas en diferentes especies de organismos, incluyendo al ser humano. Su papel biológico no ha quedado bien esclarecido, pese a los estudios que han surgido en la última década. Se les atribuye la participación en la respuesta inmunológica innata contra organismos con constitución de quitina, sin embargo se ha encontrado también una relación entre la elevada expresión de éstas y la patogenia de padecimientos inflamatorios en diversos tejidos; lo que sugiere la existencia de un delicado equilibrio entre la expresión de estas proteínas en el organismo y sus efectos en él. En lo que respecta a las CLPs fúngicas el conocimiento es aún más limitado, se sabe que al ser miembros de la misma familia que las reportadas en mamíferos y otros organismos, poseen similitudes estructurales. ¿Podría esta similitud implicar que las CLPs fúngicas tuvieran el mismo efecto inflamatorio en mamíferos? Sin embargo para poder llegar a responder este cuestionamiento a futuro, es necesario conocer primero otros aspectos más básicos, como podría ser el conocer los factores y circunstancias que conllevan a su expresión. Este trabajo está enfocado en el análisis bioinformático y filogenético de

los posibles genes codificantes de CLPs en un hongo de importancia comercial, como lo es *Beauveria bassiana* dado su extensivo uso en el control biológico. Además de la evaluación de actividad quitinasa (NHasa y EQasa) detectada en medio líquido para el mismo hongo, considerando la similitud estructural entre dichas enzimas y las lectinas, se espera que los resultados obtenidos en la realización de esta tesis sirvan como referencia para trabajos futuros.

1.1. Generalidades de las quitinasas

Según la Comisión de Enzimas (**EC**) de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (**IUPAC**), las quitinasas (EC 3.2.1.14) pertenecen a las enzimas clase 3, hidrolasas. Las quitinasas son glucosil hidrolasas que catalizan la ruptura hidrolítica de los enlaces glucosídicos β -1,4 presentes en biopolímeros de N-acetilglucosamina (Goñi, 2010). Éstas se encuentran en un heterogéneo grupo de organismos como: bacterias, hongos, invertebrados, ciertos virus, plantas y mamíferos incluido el ser humano (Loc *et al*, 2011). Basándose en la secuencia de aminoácidos y homología estructural, las glucosil hidrolasas se dividen en familias, hasta la fecha, las quitinasas son principalmente descritas en las familias 18 (**GH18**) y 19 (**GH19**) (Hartl *et al*, 2012).

La GH18 es un conjunto de quitinasas ancestrales presentes tanto en procariotas como eucariotas (Lee *et al*, 2011), prácticamente todas las quitinasas en insectos y hongos están clasificadas dentro de esta familia. La GH19 está constituida principalmente por quitinasas de plantas, aunque recientemente se han encontrado en algunas bacterias y nematodos. De manera genérica la actividad enzimática de las quitinasas es hidrolizar a la quitina. Dependiendo del organismo, juegan un papel muy importante en un amplio conjunto de funciones a nivel desarrollo, morfología y fisiología del organismo; participando en la muda y digestión en los insectos, la renovación de pared celular en hongos, la defensa en plantas contra organismos fitopatógenos, entre otras funciones (Rao *et al*, 2005; Arakane y Muthukrishnan, 2010; Hartl *et al*, 2012).

Las quitinasas de las familias 18 y 19, no comparten similitud en su secuencia de aminoácidos, poseen diferentes estructuras tridimensionales y diferentes mecanismos catalíticos (Davies y Henrissat, 1995), formando productos β -anoméricos por las quitinasas GH18 (mecanismo de retención) mientras que los α -anómeros son formados por las quitinasas GH19 (mecanismo inversor; Seidl, 2008). Algunas de estas enzimas, pueden actuar como lisozimas (Muramidases), son capaces de hidrolizar los polisacáridos de las paredes celulares constituidos alternamente por N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico (Arakane y Muthukrishnan, 2010). Las quitinasas de la GH18 también son capaces de catalizar reacciones de transglucosilación, es decir, pueden catalizar la transferencia de un grupo glucosilo desde un glucósido activo hasta un aceptor alcohol para crear un nuevo glucósido.

1.1.1. Clasificación según su mecanismo quitinolítico

Por recomendación del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (**IUBMB**), las quitinasas pueden clasificarse según la reacción de hidrólisis catalizada por dichas enzimas. Se define como enzima quitinolítica a toda enzima capaz de hidrolizar los enlaces 1,4- β -glucosídicos entre monómeros de N-acetilglucosamina presentes ya sea en quitina o quitodextrinas. Pueden clasificarse según el lugar donde ocurra la hidrólisis en endoquitinasas y exoquitinasas.

Las endoquitinasas son enzimas que les corresponde la definición tradicional de quitinasas según la nomenclatura clásica. Hidrolizan aleatoriamente enlaces internos de la cadena de quitina y quitín-oligosacáridos generando multímeros de N-acetilglucosamina con bajo peso molecular como quitotriosa, quitotetraosa o el dímero diacetilquitobiosa (Ramírez-Coutiño, 2009; Goñi, 2010; Gonzalo, 2012).

Las exoquitinasas son enzimas que actúan de manera progresiva por el extremo no reductor de la quitina, liberando quitobiosa (Castañeda, 2011). Varios autores consideran una subdivisión para las exoquitinasas, en las quitobiosidasas (EC 3.2.1.29), que catalizan la liberación progresiva de diacetilquitobiosa, comenzando en el extremo

no reductor de la cadena de quitina, sus productos son exclusivamente diacetilquitobiosas siendo inexistente la formación de monosacáridos u oligosacáridos; y la segunda categoría son las 1-4- β -N acetilglucosaminidasas (EC 3.2.1.30), también conocidas como quitobiasas que fragmentan la diacetilquitobiosa y polímeros mayores de quitina, incluyendo a la quitotriosa y la quitotetraosa, en monómeros de N-acetilglucosamina (Duo-Chuang, 2006).

1.2. Lectinas y CLPs

1.2.1. Lectinas

Una lectina se define como una proteína que posee secuencias de aminoácidos que le permiten reconocer y unirse a carbohidratos (Fredd, 1999) con una elevada especificidad. Estas proteínas pueden hallarse en diferentes organismos y han sido estudiadas por más de 100 años; variando de diferentes orígenes, desde plantas y hasta animales, en términos de características bioquímicas, fisiológicas, inmunológicas y anti patogénicas (Ang *et al*, 2013). Son usadas como medio para identificación de una población celular reconociendo grupos específicos de carbohidratos expresados por tipos individuales de células, inclusive algunas lectinas son potentes mitógenos, es decir, son factores que actúan en el ciclo celular estimulando la división celular.

Hay una gran cantidad de evidencia de que las regiones de carbohidratos actúan como sitios receptores para iniciar actividades funcionales por parte de células y las propiedades enlazantes de las lectinas (Stewart *et al*, 2000). Las lectinas ejercen un amplio espectro de importantes actividades biológicas para el funcionamiento de las células y el organismo en su totalidad. Son esencialmente partícipes en los procesos de enlazamiento intercelular y la transducción de señales en sistemas biológicos, desempeñando además varias funciones dependiendo del tipo de célula, de la etapa de desarrollo del organismo y de las condiciones ambientales en las que se encuentran (Vetchinkina *et al*, 2008). Las lectinas de una gran variedad de especies muestran una enorme diversidad en estructura y propiedades biológicas en adición a la aglutinación de eritrocitos. Pueden ser clasificadas en base a su especificidad de enlazamiento con

carbohidratos mostrando mono- o multi- especificidad de enlazamiento. También pueden ser clasificadas de acuerdo a su estructura general o a sus actividades biológicas (Ang *et al*, 2013).

Las halladas en plantas son las primeras y más ampliamente estudiadas debido a su extensa distribución aunque muchos hongos contienen lectinas (Vetchinkina *et al*, 2008). Pese a que no todas las que han sido reportadas previamente han logrado ser purificadas y caracterizadas, la información bioquímica, estructural y de secuencia disponible permite evidenciar que los hongos expresan una heterogénea y extensa variedad de lectinas (Ang *et al*, 2013). En contraste con las halladas en plantas y animales, las relaciones evolutivas entre las diferentes lectinas fúngicas sólo han sido parcialmente estudiadas. Conforme a esto, no ha sido elaborado aún un sistema comprensivo para clasificar las lectinas fúngicas en familias de proteínas estructural y evolutivamente relacionadas. Por esta misma razón, es difícil analizar la posible relación con lectinas de bacterias, animales y plantas (Van Damme *et al*, 2007). Aunque la información disponible sobre lectinas fúngicas es escasa, su detección data ya desde hace más de 100 años, en 1891 fue reportada por Kobert la primera lectina fúngica procedente de *Amanita phalloides*, que posteriormente fue caracterizada como agente hemolítico. Recientemente las lectinas fúngicas se han vuelto de gran interés dadas sus actividades antitumorales, antiproliferativas e inmunomodificadoras (Gallegos *et al*, 2014).

1.2.2. Proteínas similares a quitinasas (CLPs)

Dentro de la familiaGH18, existen proteínas similares a quitinasas o **CLPs** por sus siglas en inglés, que a pesar de su alta similitud en secuencia y estructura con las enzimas de esta familia, carecen de actividad quitinolítica (Qureshi *et al*, 2012; Ohno *et al*, 2014). La pérdida de actividad enzimática es atribuida a la sustitución de los residuos catalíticos del motivo **DxxDxDxE** que caracteriza al sitio activo de las quitinasas GH18 (Houston *et al*, 2003; Kawada *et al*, 2007; Schimpl, 2012; Ohno *et al*, 2014). Sin embargo, conservan la capacidad de reconocer y unirse a cadenas de quitina, razón por la que son denominadas “quitolectinas”. A través de la evolución natural, las CLPs pertenecientes a

la familia 18 han perdido su potencial hidrolítico porque el ácido glutámico en el sitio activo catalítico, ha sido reemplazado por algún aminoácido no activo, como por ejemplo leucina (Houston *et al*, 2003; Dalal *et al*, 2007; Kawada *et al*, 2007). Estas proteínas se encuentran presentes en diferentes organismos, se han encontrado en todas las especies de insectos estudiados hasta la fecha (Arakane y Muthukrishnan, 2009) e incluso en mamíferos como murinos y humanos (Eurich *et al*, 2009; Bucolo *et al*, 2011; Lee *et al*, 2014; Wu *et al*, 2010). En la Tabla 1 puede observarse los miembros más representativos hallados en estos organismos.

El papel fisiológico de estas proteínas no enzimáticas, no se conoce con certeza. Se asume su participación en la respuesta inmunológica o como factor de crecimiento, debido a que se han hallado incrementos en los niveles de expresión de ARNm y/o de proteínas en diversas condiciones inflamatorias (Ohno *et al*, 2014). En el caso particular del humano, sólo se conocen unas pocas **CLPs**: YKL-40, YKL-39, SI-CLP (Stabilin-1 Interacting Chitinase-Like Protein), OVGP (Oviductina); destacando las primeras 2 por su presunta participación en patologías inflamatorias (Lee *et al*, 2014).

Tabla 1. Miembros representativos de la familia GH18 en humanos y ratones, modificado de Lee *et al* (2014).

NOMBRE MÁS COMÚN	OTROS NOMBRES	PATOLOGIAS ASOCIADAS	HUMANOS	RATONES
AMCasa (Quitinasa ácida mamífera)	CHIA, Citocina quimiotáctica de eosinófilos	Asma, Enfermedad inflamatoria intestinal, conjuntivitis alérgica	+	+
Quitotriosidasa	CHI1, Quitinasa 1	Asma, Osteoartritis, Sarcoidosis, Enfermedad de Gaucher	+	+
YKL-40/BRP-39	CHI3L1, GP-39, HcGP-39	Artritis, Asma crónica, Enfermedad inflamatoria intestinal, Alzheimer	+	+
YKL-39	CHI3L2, Proteína 39 de condrocitos	Artritis, Alzheimer	+	+
Oviductina	Glucoproteína oviductal 1, OVGP1	Osteoporosis	+	
SI-CLP			+	+
Ym1	Chi313	Enfermedad granulomatosa crónica, enfermedades alérgicas de vías respiratorias		+
Ym2	Chi314			+

YKL-40 es la proteína más estudiada dentro de las **CLPs** humanas (Lershov *et al*, 2009), también conocida como CHI3L1 (Chitinase 3-Like protein-1) o HC-gp39 (Glucoproteína 39 del cartílago humano) y es una glucoproteína mamífera que fue identificada por primera vez por Rejman y Hurley en 1988 como una proteína del suero de leche en secreciones mamarias bovinas colectadas durante el periodo de no lactancia (Bigg *et al*, 2006). Subsecuentemente se mostró que también era producida por humanos (Hakala *et al*, 1993) y que es secretada por diferentes tipos de células como macrófagos, condrocitos, células sinoviales, células del músculo liso, neutrófilos (Bigg *et al*, 2006) y algunas células cancerígenas (Schultz y Johansen, 2010; Ohno *et al*, 2014). Debe su nombre a los 3 aminoácidos N-terminal presentes en su forma secretada (Tirosina, Y; Lisina, K; Leucina, L) y a su peso molecular de 40 KDa (Lershov *et al*, 2009).

Los aminoácidos esenciales para la actividad catalítica en las quitinasas son 3 residuos: Asp, Glu, Asp. Pero los residuos correspondientes en YKL-40 son: Asp, Leu, Asp (Eurich *et al*, 2009; Gupta *et al*, 2012), razón por la que no posee actividad quitinolítica aunque sí es capaz de reconocer y unirse a cadenas de quitina y quitin-oligosacáridos con una afinidad muy elevada debido a la presencia de un sustrato hidrofóbico en la hendidura de unión.

Se han sugerido como ligandos para la YKL-40 el ácido hialurónico y el sulfato de heparán, polisacáridos conformados por NAG y que están presentes en tejido animal (Dreyfuss *et al*, 2009) pero no ha sido corroborado, sin embargo se sabe que sí tiene la habilidad de unirse al colágeno tipo 1, 2 y 3 (Bigg *et al*, 2006), así como a la heparina (Gupta *et al*, 2012) lo que sugiere que puede interactuar con proteoglucanos de sulfato de heparán (HSPG) *in vivo* (Bigg *et al*, 2006). La YKL-40 posee una única cadena polipéptica de 383 aminoácidos (secuencia mostrada en la Figura 1), con un peso molecular total de 40.476 KDa y con un punto isoelectrico de 7.6, la estructura cristalográfica de la YKL-40 presenta el pliegue característico de las quitinasas **GH18**, el llamado TIM-Barrel (Schultz y Johansen, 2010). Su función biológica exacta es desconocida, pero ha sido implicada en el desarrollo de padecimientos inflamatorios tales

como asma y ha sido reportada una gran expresión en pacientes con diversos tipos de tumores sólidos (Eurich *et al*, 2009).

```
MGVKASQTGFVVLVLLQCCSAYKLVCIYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFAN
ISNDHIDTWEWNDVTLYGMLNTLKNRNP NLKTLLSVGGWNFGSQRFSKIASNTQSRRTFI
KSVPPFLRTHGFDGLDLAWLYPGRDKQHFTTLIKEMKAEFIKEAQP GKQ LLLSAALSA
GKVTIDSSYDIAKISQHLDFISIMTYDFHGAWRGTTGHHSPLFRGQEDASPDRFSNTDYA
VGMYMLRLGAPASKLVMGIPTFGRSFTLASSETGVGAPISGPGIPGRFTKEAGTLAYYEIC
DFLRGATVHRILGQQVPYATKGNQWVGYYDDQESVSKSVQY LKDRQLAGAMVWALDLDDFQ
GSFCGQDLRFPLTNAIKDALAAT
```

Figura 1. Secuencia de aminoácidos en YKL-40 humana.

YKL-39 es también conocida como CHI3L2 (Chitinase 3-Like protein 2), es una glucoproteína mamífera secretada por condrocitos detectada por vez primera en 1996 (Hu *et al*, 1996), es muy parecida en tamaño y secuencia a YKL-40, por lo que se supone debe existir similitud en sus funciones (Dmitrenko *et al*, 2013); al igual que YKL40, su nombre deriva de sus 3 aminoácidos N-terminales y su peso molecular de 39 KDa. Posee la estructura característica de las glucosil hidrolasas de la GH18, pero de la misma forma que YKL-40, carece de actividad quitinolítica debido a la ausencia en su sitio activo de los residuos clave para la catálisis. El motivo DxxDxDxE en el sitio activo, esencial para la actividad enzimática de las quitinasas GH18 no se encuentra conservado en YKL-39. La catálisis involucra la participación del grupo acetamido de la N-acetilglucosamina, con el último residuo aspartato del motivo DxxDxDxE el grupo acetamido se posiciona para un ataque nucleofílico, y el residuo glutamato del mismo motivo realiza una catálisis general ácido/base. En YKL-39, estos residuos catalíticos son sustituidos por serina e isoleucina (Schimpl *et al*, 2012). Aunque YKL-39 aparenta tener un sitio activo incompatible para la hidrólisis de quitina, ha retenido la habilidad de unirse con moléculas de quitina, aunque la identidad de su ligando fisiológico, es desconocida. YKL-39 tiene una longitud de secuencia de 364 aminoácidos (Hu *et al*, 1996) en su forma secretada, sin embargo su secuencia en el genoma es de 390 aminoácidos (Figura 2), posee además un punto isoelectrico calculado de 7.11.

MGATTMDQKSLWAGVVVLLLLQGGSAYKLVCFYFTNWSQDRQEPGKFTPENIDPFLCSHLI
 YSFASIENNKVVIKDKSEVMLYQTINSLKTKNPKLKILLSIGGYLFGSKGFHPMVDSSTS
 RLEFINSIIILFLRNHNFDGLDVSWIYPDQKENTHFTVLIHELAEAFQKDFTKSTKERLLL
 TAGVSAGRQ MIDNSYQVEKLAKDLDFINLLSFDFHGSWEKPLITGHNSPLSKGWQDRGPS
 SYYNVEYAVGYWIHKGMPSKVMGIPTYGHSFTLASAETTVGAPASGPGAAGPITESSG
 FLAYYEICQFLKGAKITRLQDQVPYAVKGNQWVGYYDDVKSMETKVQFLKNLNLGGAMIW
 SIDMDDFTGKSCNQGPYPLVQAVKRSLGSL

Figura 2. Secuencia de aminoácidos en YKL-39 humana.

SI-CLP también conocida como CHID1 (Chitinase domain-containing protein 1) es una proteína humana perteneciente a la familia de las **CLPs**, según las anotaciones de la **NCBI**. SI-CLP fue detectada en abundancia en lavados bronquioalveolares de pacientes con desórdenes inflamatorios crónicos del tracto respiratorio, leucocitos de sangre humana periférica, y pacientes bajo terapia con glucocorticoides, la eficiencia de su secreción está mediada por su interacción con el receptor endocítico estabilina-1 y es activada por las citoquinas de las Th2 (Células T helpers). SI-CLP cuenta con una longitud de secuencia de 393 aminoácidos, mostrada en la Figura 3, y posee una señal peptídica en su extremo N terminal, también posee un dominio **GH18**; sin embargo, la identidad de secuencia entre SI-CLP y cualquier otra proteína con este dominio se encuentra por debajo del 20%. Como miembro de la familia **CLP**, ésta no posee actividad hidrolítica sobre quitina, pero no existe evidencia que tenga propiedades de lectina además de que su función biológica sigue siendo desconocida (Meng *et al*, 2010).

MRTLFNLLWLALACSPVHTTSLKSDAKKAASKTLLLEKSQFSDKPVQDRGLVVTDLKAESV
 VLEHRSYCSAKARDRH FAGDVLGYVTPWNSHGVDVTKVFGSKFTQISPVLQLKRRGREGM
 FEVTGLHDVDQGMRAVRKHAKGLHIVPRLLFEDWTYDDFRNVLDSEDEIEELSKTVVQV
 AKNQHFDGFFVEVWNQLLSQKRVGLIHMLTHLAEALHQARLLALLVIPPAITPGTDQLGM
 FTHKEFEQLAPVLDGFSMLTYDYSTAHPGP NAPLSWVRACVQVLDPKSKWRSKILLGLN
 FYGMDYATSKDAREPVVGARYIQTLKDHRPMVWDSQASEHFF EYKKSRSRGRHVVFYPTL
 KSLQVRLELARELGVGVSIIWELGQGLDYFYDLL

Figura 3. Secuencia de aminoácidos en SI-CLP humana.

1.3. Importancia del estudio de las CLPs

Pese a los cada vez más numerosos estudios que se han realizado sobre las CLPs en mamíferos, no se tiene una idea clara de su función biológica, y algo que resulta muy interesante es el hecho que generalmente, su expresión es significativa sólo en condiciones de algún padecimiento inflamatorio. Se ha reportado su posible implicación

en enfermedades como asma, artritis (Schimpl *et al*, 2012), sarcoidosis (Lee *et al*, 2013), inflamaciones oculares (Bucolo *et al*, 2011), inflamación intestinal (Lee *et al*, 2014), entre otros. Sin embargo, es escaso lo que se sabe sobre los efectos que pueden llegar a tener las **CLPs** exógenas al estar expuesto un mamífero con el organismo que las expresa.

De manera cotidiana, el ser humano está expuesto a la interacción con múltiples microorganismos como los hongos; ya sea en los sistemas de ventilación del aire acondicionado, en las hojas de libros viejos, en alimentos contaminados, entre otras situaciones. Por estas razones resulta de interés el estudio de **CLPs**, pues al comprender mejor su naturaleza podría ser posible a futuro, el desarrollo de aplicaciones que permitan combatir las enfermedades con las que están relacionadas las **CLPs** mamíferas.

1.4. *Beauveria bassiana*

Dado que las especies de *Beauveria* se reproducen por producción de conidios (mitosporas), han sido presuntamente clasificados de manera tradicional como hongos hifomicetes asexuales (Deuteromycetes), pero las herramientas moleculares permiten colocar a tales hongos entre sus congéneres teleomorfo. A pesar de varios análisis taxonómicos exhaustivos de *Beauveria* durante el último siglo, aún subsisten problemas importantes en la identificación, taxonomía, y nomenclatura de las especies de este género. Los análisis moleculares filogenéticos recientes han evidenciado que *Beauveria* está relacionado de manera directa con el género teleomorfo *Cordyceps* (Ascomycota: Hypocreales: Clavicipitaceae; Montesinos-Matías, 2012). *Beauveria bassiana* ha sido estudiada durante más de 100 años y no se conoce de ningún efecto tóxico sobre animales domésticos ni silvestres, aves y peces, con la excepción de su acción patogénica contra los insectos (Hernández, 2016). Vuillemin describió formalmente el género *Beauveria* a comienzos del siglo XX, designando a *Botrytis bassiana* como la especie tipo. Posteriormente recibió el nombre de *Beauveria bassiana* en reconocimiento a J. Beauverie, quien realizó trabajos de estudio relacionados a la enfermedad muscardina blanca, así como a Agostino Bassi quien la describió por primera vez (Montesinos-Matías, 2012). Esta familia de hongos también es conocida por la producción de metabolitos secundarios con propiedades tóxicas. *Beauveria bassiana*

tiene alrededor de 707 especies de insectos hospederos en 521 géneros de 149 familias que comprenden 15 órdenes. Es un hongo cosmopolita (Peteira *et al*, 2011; Azamar-Jiménez, 2016), es de fácil reconocimiento, y de aparición frecuente en la naturaleza, rango amplio de hospederos con una variación amplia de virulencia hacia ellos; es además un organismo fácilmente manejable aislándose fácilmente de cadáveres de insectos o muestras de suelo. Tiene una alta variabilidad genética, lo que permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales y así atacar a distintas poblaciones de insectos (López *et al.*, 2015). Además, *B. bassiana* tiene la capacidad de vivir de manera parasítica o saprofita, lo que le permite subsistir en presencia de un insecto hospedero o no y posee también la propiedad de entablar relaciones endofíticas con diversas plantas, potenciando diversas propiedades que les permiten a ambos resistir efectos del medio ambiente y de otros hospederos (Ballesteros-Torres, 2013).

1.4.1. Morfología

Beauveria bassiana es un hongo heterótrofo constituido de células quitinizadas. Morfológicamente se compone de hifas septadas que poseen una longitud de 2.5 a 25 µm de diámetro, en ellas se generan conidióforos simples, raramente agrupados, con apariencia de jarrón (más angosto en uno de los extremos), que sostienen a los conidios. Éstos, se originan de forma simpodial o acropeta, dando una forma de zigzag al raquis bajo un proceso de reproducción asexual (Figura 4). En el suelo, su forma de crecimiento es micelial, desarrollada en conjunto con la materia orgánica del suelo (Ballesteros-Torres, 2013), no obstante, en el proceso de infección en insectos, el conidio germina produciendo micelio y estructuras semejantes a levaduras conocidas como blastosporas (Azamar-Jiménez, 2016).

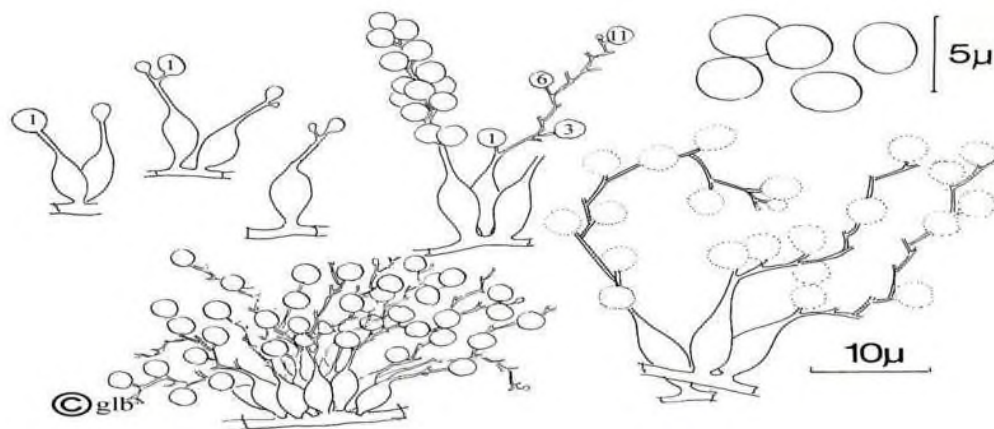


Figura 4. Estructuras morfológicas de *Beauveria bassiana* (Tomada de Ballesteros-Torres, 2013).

2. Antecedentes

El estudio de las **CLPs** es relativamente reciente, remontándose principalmente a comienzos de la década de los 90's. En los últimos 20 años han surgido diversos trabajos enfocados en estas proteínas, encontradas en gran variedad de organismos.

Montgomery y Kirchman (1993) estudiaron los mecanismos de adhesión de la bacteria marina *Vibrio harveyi* a la quitina. Encontraron la expresión de 2 proteínas, de 53 kDa y 150 kDa respectivamente, presuntamente implicadas en el proceso de fijación a la quitina. Las membranas celulares extraídas con el uso de detergentes, mostraron capacidad de adhesión a quitina, teniendo una alta expresión de la proteína de 53 kDa. Durante la determinación de fijación a quitina, observaron que la adición de quitinasas disminuía considerablemente la capacidad de *V. harveyi* para adherirse a la quitina, mientras que aumentaba con la adición de las proteínas encontradas, por ello, concluyeron que estas 2 proteínas identificadas jugaban un papel importante en la fijación de dicha bacteria a superficies quitinosas.

Hakala *et al* (1993), lograron purificar e identificar por primera vez la glucoproteína humana HC gp-39 (YKL-40) en un cultivo de condrocitos, empleando cromatografía por afinidad heparina-sefarsa. En dicho estudio se ensayó la actividad quitinolítica de HC gp-39 en presencia de condrocitos frescos y en medio de cultivo, reportando una ausencia de actividad hidrolítica sobre la quitina por parte de HC gp-39.

Hu *et al* (1996), aislaron e identificaron la CLP humana YKL-39, producidas por cultivos de condrocitos y senoviocitos, empleando DMEM (Medio Eagle modificado de Dulbecco) como medio de cultivo. Para su purificación se realizó una cromatografía por afinidad empleando una columna Heparina-Sefarosa. Al igual que con YKL-40, no se detectó actividad quitinolítica por parte de YKL-39.

Suzuki *et al* (1998), realizaron un estudio genético sobre la degradación de quitina, habiendo seleccionado la bacteria quitinolítica *Serratia marcescens* 2170 como organismo modelo, dada su activa producción de quitinasas. Se conocía la existencia de 4 quitinasas en *S. marcescens* 2170: A, B, C1 y C2; sin embargo, reportan haber hallado en el sobrenadante del cultivo de *S. marcescens* 2170; usando cromatografía por afinidad con quitina, una quinta proteína de 21 kDa con capacidad de enlazarse selectivamente a la quitina, pero sin actividad hidrolítica, denominada CBP21. Para su purificación, el extracto enzimático se sometió a una precipitación con sulfato de amonio (80%). CBP21 y las demás quitinasas fueron separadas en una columna de cromatografía por afinidad a quitina, las fracciones con CBP21 fueron recolectadas, dializadas y liofilizadas. El liofilizado fue posteriormente purificado empleando cromatografía por filtración en gel Sephadex G-75.

Lam y Ng (2010), reportan haber purificado una CLP con propiedades antifúngicas, de las semillas de *Acacia confusa*, a la que denominaron Acaconina. Ésta proteína demostró tener una secuencia N-terminal con alta similitud a las quitinasas, y un peso molecular de 32 kDa.

Kitajima *et al* (2010), efectuaron un estudio del látex de moreras (*Morus spp*), en el que identificaron 2 CLPs denominadas LA-a y LA-b, con un peso molecular de 50 y 46 kDa respectivamente. Encontraron que estas proteínas poseen una muy baja, pero significativa, actividad quitinasa y quitosanasa, y a diferencia de las típicas quitinasas en plantas, LA-a y LA-b se encuentran glucosiladas. Se realizó una cromatografía de intercambio iónico (CM-celulofina C-200), seguido de una cromatografía por interacción hidrofóbica (Fenil Sefarosa), dando una única banda de LA-a en SDS-PAGE. Para la purificación de LA-b fue necesario una posterior cromatografía de intercambio iónico

(UNOS). De 3 ml de látex, se obtuvieron 5.8 y 1.1 mg de LA-a y LA-b purificadas, respectivamente.

Xiao *et al* (2012), secuenciaron el genoma de *Beauveria bassiana*, realizaron análisis filogenéticos, confirmando que la entomopatogenicidad del ascomiceto es polifilética. Reportan haber hallado varios genes virulentos especie-específicos; encontraron que *B. bassiana* posee muchas toxinas muy similares a las bacterianas (sugiriendo un inesperado potencial de toxicidad oral) y varias proteínas de tipo efector. El análisis de la secuenciación del transcriptoma ARN-seq, reveló que *B. bassiana* puede percibir y adaptarse a diferentes nichos ambientales activando conjuntos bien definidos de genes. En lo que respecta a las quitinasas, hallaron la presencia de 20 genes codificantes para estas enzimas. Referente a CLPs, se identificó la existencia de 8 genes que codifican este tipo de proteínas, con longitud de secuencia muy variada, desde 132 hasta 1459 aminoácidos. Se comparó la secuencia del genoma de otros 3 patógenos de insectos, y se determinó que *B. bassiana* y *C. militaris* están estrechamente relacionados, y evolucionaron en entomopatógenos independientemente del linaje de *Metarhizium*. Los autores asumieron que existe una expansión similar para ciertas familias de genes, tales como que proteasas y quitinasas, están asociadas con funciones necesarias para la patogénesis en insectos, reflejando una evolución convergente.

3. Justificación

El hongo ascomiceto *Beauveria bassiana*, es un patógeno para más de 200 especies de insectos plaga, por lo que es ampliamente usado como agente de control biológico. Dada su naturaleza entomopatógena, es empleado para la producción comercial de micoinsecticidas aparentemente de bajo riesgo. Sólo hasta hace unas 2 décadas, fue detectada la presencia de proteínas **GH18** en los seres humanos. De este reducido grupo de proteínas encontradas en humanos hasta la fecha, sólo 2 presentan actividad quitinolítica mientras que las demás son catalogadas como **CLPs**. Aunque la función biológica de estas proteínas no se ha elucidado, estudios de la última década relacionan la expresión de éstas en diversos tipos de tejidos con padecimientos inflamatorios tales como asma, osteoartritis, enfermedad de Crohn, conjuntivitis alérgica, entre otras. Las lectinas son de gran interés para la farmacéutica y biomedicina; en los últimos años lectinas de origen fúngico han atraído mucha la atención debido a sus actividades antitumorales, antiproliferativas e inmunomoduladoras. Con la reciente secuenciación del genoma de *B. bassiana*, se encontró la existencia de genes que codifican diversas CLPs, pero no hay estudios posteriores. Resulta de interés estudiar más a fondo estas proteínas, dadas las implicaciones patológicas de sus homólogas en humanos y para aumentar la bioseguridad de los productos derivados de *Beauveria bassiana* y otros HEP. Al construir árboles filogenéticos involucrando las secuencias de **CLPs** fúngicas y mamíferas podrá observarse qué tan distantes o cercanas son, evolutivamente hablando. El método de Neighbor-Joining tiene la facilidad de ser muy rápido en comparación con métodos de construcción basados en caracteres, por lo que resulta idóneo para obtener resultados preliminares. Reportes previos indican que las CLPs y las quitinasas presentan una expresión paralela (Montgomery y Kirchman, 1993), por lo que la evaluación de la expresión de estas enzimas puede servir como una referencia para estudios futuros sobre la expresión de CLPs en *Beauveria bassiana*.

4. Hipótesis

Los genes codificantes para CLPs en el genoma de *Beauveria bassiana* forman parte de una familia génica.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Caracterizar la familia de CLPs en *Beauveria bassiana* y evaluar la actividad quitinolítica empleando diferentes sustratos como inductores.

5.1.2. Objetivos específicos

- I. Determinar el número y la diversidad genética de los miembros de la familia génica CLP en *Beauveria bassiana*.
- II. Implementar el cultivo de *Beauveria bassiana* en medio líquido usando como sustrato cutícula de camarón, quitina comercial y glucosa.
- III. Determinar la actividad NHasa y EQasa secretada al medio en los diferentes tratamientos.

6. Estrategia experimental

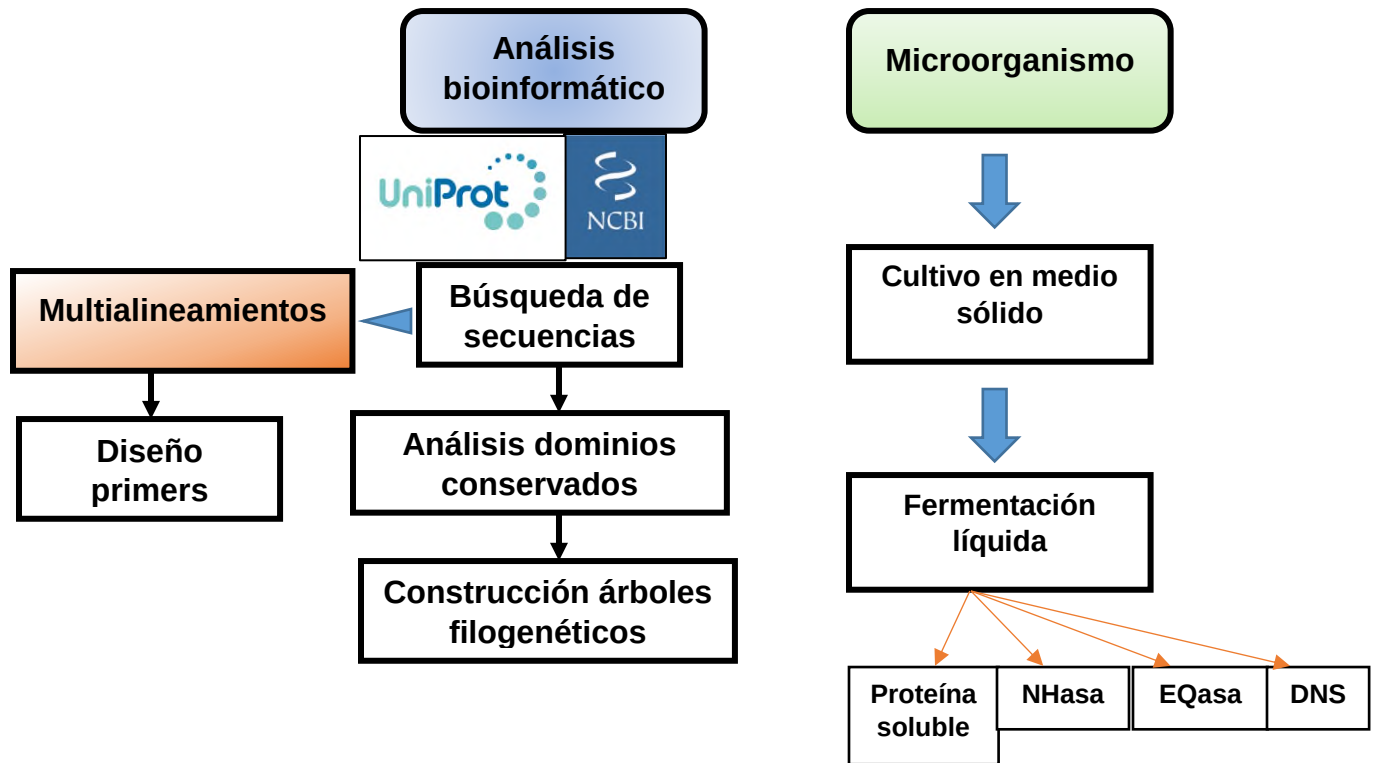


Figura 5. Estrategia experimental empleada en la realización de este trabajo.

El escrutinio bioinformático comenzó con la búsqueda de secuencias en la base de datos, teniendo las posibles secuencias de los genes de **CLPs** en *Beauveria bassiana* se realizaron multialineamientos que permitieron hallar regiones objetivo para el diseño de primers, así mismo se analizaron los dominios conservados empleando la base de datos **CDD** y finalmente la elaboración de árboles filogenéticos empleando el software **MEGA7**. Por otra parte, el bioprocesamiento comenzó con el establecimiento del cultivo, la obtención del inóculo y finalmente la fermentación, realizando la determinación de actividad NHasa, EQasa, proteína soluble y azúcares reductores por el método de DNS.

7. Metodología

7.1 Análisis bioinformático de los genes de CLPs en *B. bassiana*.

7.2.1. Búsqueda de secuencias

Se realizó una búsqueda con apoyo de las bases de datos **UNIPROT**, **NCBI** y **GenBank**, para hallar la secuencia de CLPs y sus respectivos genes en *Beauveria bassiana* (taxid:176275) usando las palabras clave: Chitinase like protein y Chitin Binding Protein. Los genes reportados para *Beauveria bassiana* corresponden al genoma de la cepa ARSEF 2860 (Xao *et al*, 2012). La herramienta bioinformática Compute IP/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/) fue utilizada para calcular los pesos moleculares y puntos isoelectricos de cada una de las CLPs

7.2.2. Multialineamientos y análisis de dominios conservados

Se usó como apoyo adicional, las herramientas informáticas **BLAST** y **CLUSTAL** (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para analizar y comparar estas secuencias tanto en el nivel de aminoácidos como en el nivel de nucleótidos (multialineamientos). Los resultados fueron empleados para el diseño de los primers y construcción de árboles filogenéticos.

Para detectar la presencia de dominios estructurales conservados, se empleó la base de datos **CDD** de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>).

7.2.3. Construcción de árboles filogenéticos

Incluyendo las secuencias de las CLPs en *Beauveria bassiana* y múltiples CLPs reportadas en diferentes organismos representativos de mayor diversidad se construyeron árboles filogenéticos en el software **MEGA 7** para Windows empleando el método Neighbor-Joining (Tamura, 2007) por el modelo de Poisson con *Pairwise Deletion*.

7.3. Diseño de primers

Se realizó una búsqueda en las bases de datos de **NCBI** y **UNIPROT** para hallar las probables CLPs codificadas en el genoma de *B. bassiana*, se consultaron las entradas que se encuentren disponibles para diseñar sus respectivos primers. Se procedió a realizar un **BLAST** (amino ácidos y nucleótidos) para cada CLP hallada en este organismo, contra todas las proteínas existentes en su genoma, se analizó la similitud entre la CLP de estudio con las demás proteínas. Se sometió a un multialineamiento en **CLUSTAL** a cada CLP contra las más similares a ella, que en este caso fueron otras CLPs y quitinasas activas. Se analizaron estos resultados de multialineamientos para poder hallar una región particular que diferenciara cada CLP del resto de las proteínas en *B. bassiana* lo que permitió enfocar el diseño de los primers a esa zona concreta, confiriendo así una mayor especificidad para éstos. Determinada esa región específica para cada CLP, se realizó el diseño de los primers con el software en línea **PrimerQuest** (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>), alimentando la secuencia de la región objetivo para la amplificación, el programa determinó un conjunto de sets de posibles cebadores. Las condiciones de diseño fueron las siguientes: primer T_m (62 °C), primer %GC (50), primer size (22 nt), amplicon size (200 – 1000 pb)

7.4. Pretratamiento de la cutícula con Tetraborato de potasio

La cutícula de camarón se sometió a un tratamiento de desproteínización con tetraborato, primero las cutículas fueron molidas en un procesador de alimentos (Hamilton Beach) para disminuir el tamaño de partícula (3-5 mm) y aumentar el área de contacto con la sal. Se realizaron suspensiones de tetraborato de potasio (K₂B₄O₇) con las cutículas molidas y secas a una concentración de 7.1% (p/v) y se mantuvieron a una agitación de 180 rpm. Las muestras tratadas con la sal, se lavaron con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro, se filtraron al vacío con filtros de rayón-poliéster (50 %) puestos previamente a peso constante y finalmente se dejaron secar en horno (Felisa Modelo análogo tipo pT-100) durante 12 horas a una temperatura de 50°C. Las cutículas tratadas y secas se

molieron en una licuadora (Oster) y se homogeneizaron a 149 μm empleando un tamiz número 100, para ser empleadas en las fermentaciones.

7.5. Inóculo

Se empleó la cepa mutante 88_{5.2} de *Beauveria bassiana*, aportada por el Dr. Octavio Loera (UAM campus Iztapalapa) y establecida en esta universidad por el Dr. Óscar Nuñez Gaona. Esta cepa mutante resistente al compuesto tóxico 2-desoxi-D-glucosa (2DG) es derivada de la cepa silvestre de *Beauveria bassiana* (88) por un proceso de mutagénesis con luz ultravioleta (Robledo-Monterrubio *et al*, 2009). Se cultivó en matraces de 250 ml empleando 50 ml de SDA y se incubaron a 25 °C durante una semana permitiendo así su esporulación. Las esporas se extrajeron empleando 50 ml de una solución estéril de Tween 80 (0.02%), y dicha suspensión se conservó a 4 °C (Jiménez-Alejandro, 2016). Las concentraciones de estas suspensiones fueron determinadas mediante el uso de la cámara de Neubauer, visualizando en un microscopio óptico.

7.6. Fermentación líquida

Se empleó el medio Czapeck utilizando como fuentes de carbono quitina comercial (SIGMA) cutícula de camarón tratada con tetraborato (Tlacotalpan, Veracruz) y glucosa, la composición del medio puede apreciarse en la Tabla 2. El medio se esterilizó durante 15 min a 121 °C. Se ajustó el pH a 3 y se inoculó con una suspensión de esporas hasta una concentración inicial de 1×10^7 esporas/mL bajo condiciones asépticas. Los medios se mantuvieron con una agitación constante a 180 rpm en una incubadora orbital (Prendo, modelo INO 650V-7) a 25 °C por 3 días; debido a que en este tiempo se reportó la mayor producción. (Jiménez-Alejandro, 2016). Como control se utilizó medio czapeck con el sustrato (Quitina comercial y cutícula de camarón) y sin inóculo.

Tabla 2. Composición del medio Czapeck empleado para la producción de CLPs en *Beauveria bassiana*.

Reactivos	Cantidad (g/L)
Cutícula/Quitina/Glucosa	10
NaNO ₃	1
KCl	0.5
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5
K ₂ HPO ₄ •3H ₂ O	0.5
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.01

7.7. Determinación de proteína soluble

Las muestras obtenidas de la fermentación se centrifugaron a 5500 rpm a 4°C. A cada sobrenadante se le determinó el contenido de proteína soluble mediante el microensayo de Bradford. Las muestras y los blancos fueron elaborados como se indica en la Tabla 3. Los tubos se agitaron ligeramente en vortex y se dejaron reposar por 5 minutos. Se leyó absorbancia a $\lambda=595$ nm empleando un lector de microplacas (Bio-Rad, iMark, Japón)

Tabla 3. Preparación de muestras y blanco para la determinación de proteína soluble (Bradford).

Reactivos	Muestras (μL)	Blancos (μL)
dH ₂ O	600	800
Sobrenadante	200	0
Reactivo de Bradford	200	200

7.8. Determinación de actividad NHasa

La actividad NHasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de ρ -nitrofenol por mL de enzima por minuto bajo las condiciones especificadas (Tronsmo y Harman 1993). Las muestras y los blancos se prepararon como se indica en la tabla 4. La reacción se llevó a cabo en incubación a 37°C con agitación 180 rpm durante 60 min (New Brunswick Scientific, Excella E24-R Incubator Shaker Series, USA), concluido el tiempo se detuvo la reacción adicionando 1mL NaOH 0.02M. Se midió la absorbancia a λ =415 nm empleando un lector de microplacas (Bio-Rad, iMark, Japón)

Tabla 4. Preparación de muestras y blanco para determinación de actividad NHasa.

Reactivos	Muestras (μ L)	Blancos (μ L)
dH ₂ O	0	200
Extracto enzimático	200	0
Buffer Citrato-Fosfato 0.2M (pH 5.6)	200	200
ρ -NAG (1.0mg/mL)	200	200

7.9. Determinación de actividad EQasa

Se determinó empleando como sustrato 100 μ L de una suspensión de quitina coloidal al 1% (p/V) en buffer de fosfatos 5mM a pH 6.7, a 100 μ L de sobrenadante. Se incubó la reacción a 30 °C con una agitación de 180 rpm durante 24 horas (New Brunswick Scientific, Excella E24-R Incubator Shaker Series). Finalizada la reacción se ajustó el volumen con dH₂O a 1 ml y se lee su absorbancia a λ =510 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Jenway, modelo: 6700 Single Cell Holdes). Los Testigos tienen como única diferencia que no se incuban, y como blanco se usó dH₂O. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para reducir la turbidez de una suspensión de quitina coloidal en un 5% a 30°C por 24 horas.

7.9.1. Preparación de quitina coloidal

Esta quitina fue preparada por modificación del método de Pegg (1988), que consiste en disolver quitina con HCl concentrado a 0°C bajo agitación continua. El líquido viscoso obtenido se centrifugó a 10000g durante 15 minutos (ThermoScientific, Heraeus Megafuge 16R, Alemania) y el precipitado se mezcló con agua helada. La pasta obtenida se neutralizó mediante lavados con agua destilada fría y centrifugación consecutivos y se conservó posteriormente bajo refrigeración (4°C) con 0.02% de azida de sodio como agente antimicrobiano hasta su utilización.

7.10. Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores en cada muestra se determinaron mediante ácido dinitrosalicílico según la técnica descrita por Miller, 1959 empleando una curva patrón de N-acetilglucosamina, a una longitud de onda de 540 nm (Espectrofotómetro Jenway modelo: 6700, US)

7.11. Monitoreo de la liberación de azúcares reductores y proteínas en cutícula de camarón

Se siguió la formulación ya descrita para la elaboración del medio Czapeck, se esterilizó a 121 °C y 15 PSI de presión durante 15 minutos. El medio fue ajustado a pH 3.0 empleando una solución de HCl 2 N, y finalmente, se incubó a 25°C con una agitación de 180 rpm (New Brunswick Scientific, Excella E24-R Incubator Shaker Series). Se prepararon en total 18 matraces de 250 mL, siendo descartados 3 matraces cada 24 horas para su análisis.

7.12. Fermentación líquida en Czapeck glucosa (4%)

Con la finalidad de evaluar el perfil de la fermentación y facilitar el crecimiento de biomasa se realizaron fermentaciones empleando un carbohidrato de fácil asimilación como

fuentes de carbono, glucosa, modificando la formulación de Czapeck descrita en el apartado 7.6. incrementando la concentración de la fuente de carbono de un 1% a un 4%

8. Resultados y discusiones

8.1. Escrutinio de los genes de CLPs en *Beauveria bassiana*

En la base de datos UNIPROT se realizó una búsqueda de CLPs para *Beauveria bassiana* usando las palabras clave: Chitinase like protein y Chitin Binding Protein, hallando 8 proteínas catalogadas como CLPs. Los genes reportados para *Beauveria bassiana* corresponden al genoma de la cepa ARSEF 2860.

Se utilizó la herramienta bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para comparar en el nivel de amino ácido, las secuencias halladas previamente con diversas proteínas expresadas en la especie *Beauveria bassiana* (Anexos 1); encontrando que tienen una elevada similitud con quitinasas activas, obteniendo identidades de hasta 99% para el caso de BbCLP1 (Figura 6), de 98% para BbCLP2, 96% para BbCLP3, 99% y 97% para BbCLP4 y BbCLP 5 respectivamente. Para BbCLP6, BbCLP7 y BbCLP8 las similitudes entre secuencias fue menor en comparación con los resultados obtenidos para las demás CLPs.

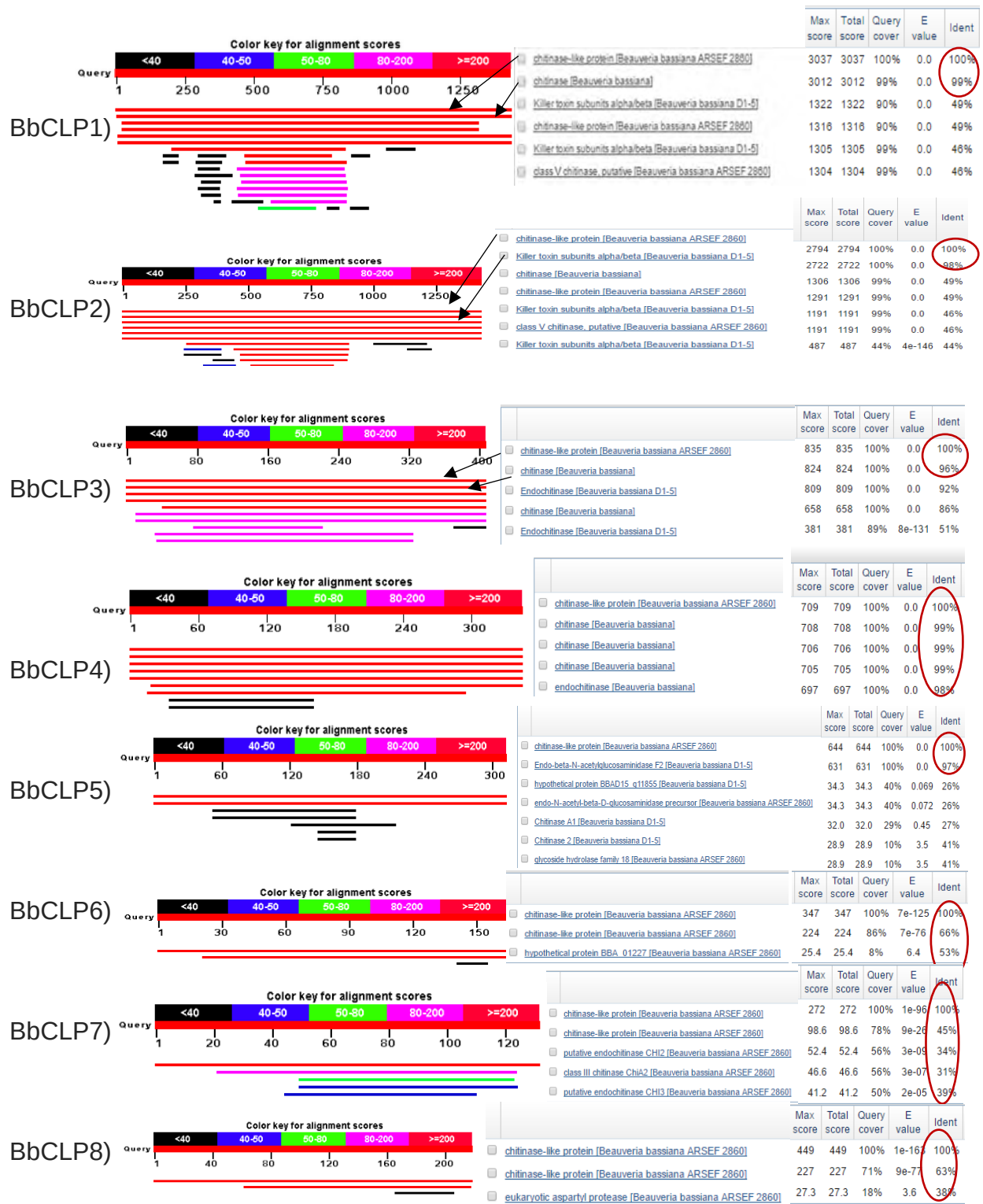


Figura 6. Hit en BLAST correspondiente a todas las CLPs halladas en el genoma de *B. bassiana* ARSEF 2860

8.1.1. Cálculo de peso molecular y punto isoeléctrico teórico

Los valores correspondientes al cálculo del Mw pueden verse en la Tabla 5. Los resultados señalan que la mayoría de estas proteínas tienen un PI dentro de la escala ácida con valores entre 4.6 y 6.54, únicamente una de estas proteínas muestra una tendencia alcalina (BbCLP5) con un PI de 8.67.

Tabla 5. Características de CLPs y sus genes encontrados para *Beauveria bassiana*.

NOMBRE	ID proteína (UNIPROT)	ID proteína (GENBANK)	Longitud	ID Gen (GenBank)	Longitud	Mw	PI
Bb-CLP1	J5J6A2	XP_008602301.1	1459 aa	19891994	4380 pb	156 kDa	5.20
Bb-CLP2	J4WH37	XP_008595549.1	1448 aa	19885242	4347 pb	158 kDa	5.38
Bb-CLP3	J5JG64	XP_008599616.1	409 aa	19889309	1230 pb	43 kDa	5.13
Bb-CLP4	J5JGB8	XP_008599636.1	348 aa	19889329	1047 pb	36 kDa	5.94
Bb-CLP5	J4WAU5	XP_008597133.1	315 aa	19886826	948 pb	34 kDa	8.67
Bb-CLP6	J4KL26	XP_008602924.1	168 aa	19892617	507 pb	18 kDa	4.89
Bb-CLP7	J4UGC9	XP_008602528.1	132 aa	19892221	458 pb	14 kDa	6.54
Bb-CLP8	J5JK93	XP_008598583.1	220 aa	19888276	663 pb	23 kDa	4.60

8.1.2. Análisis de dominios estructurales conservados.

Para poder fundamentar si existía una posibilidad de que dichas secuencias se trataran realmente de CLPs se realizó un análisis de dominios estructurales conservados, identificando los que estuviesen presentes en cada uno de los genes estudiados. Para esta tarea se consultó la **CDD** (Conserved Domains Database) de **NCBI** empleando las herramientas **CD-Search** y **DELTA-BLAST** (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST); se buscó la presencia del dominio estructural GH18_Chitinase-Like también considerado como Glyco_18 que consiste en una estructura conocida como TIM Barrel (Figura 7), una secuencia de 8 α hélices y 8 β láminas paralelas que se alternan en el esqueleto de la proteína, característica en los miembros de la familia GH18, tanto en quitinasas como CLPs (Arakane y Muthukrishnan, 2010; Huang *et al*, 2011; Schimpl *et al*, 2012). También se buscó la presencia de los dominios estructurales ChtBD1 (chitin binding domain) que son los sitios de reconocimiento y unión con quitina. El resumen de la búsqueda en DELTA-BLAST de dominios estructurales puede apreciarse en la Figura 8.

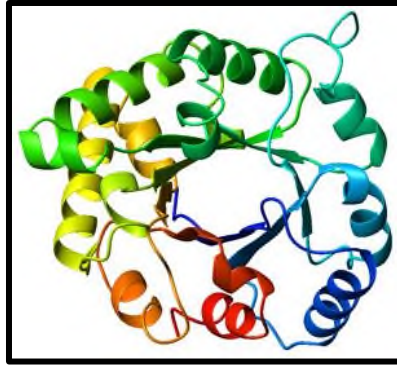


Figura 7 Vista superior de la estructura 3D del TIM Barrel, coloreado desde el azul (N-terminal) al rojo (C-terminal).

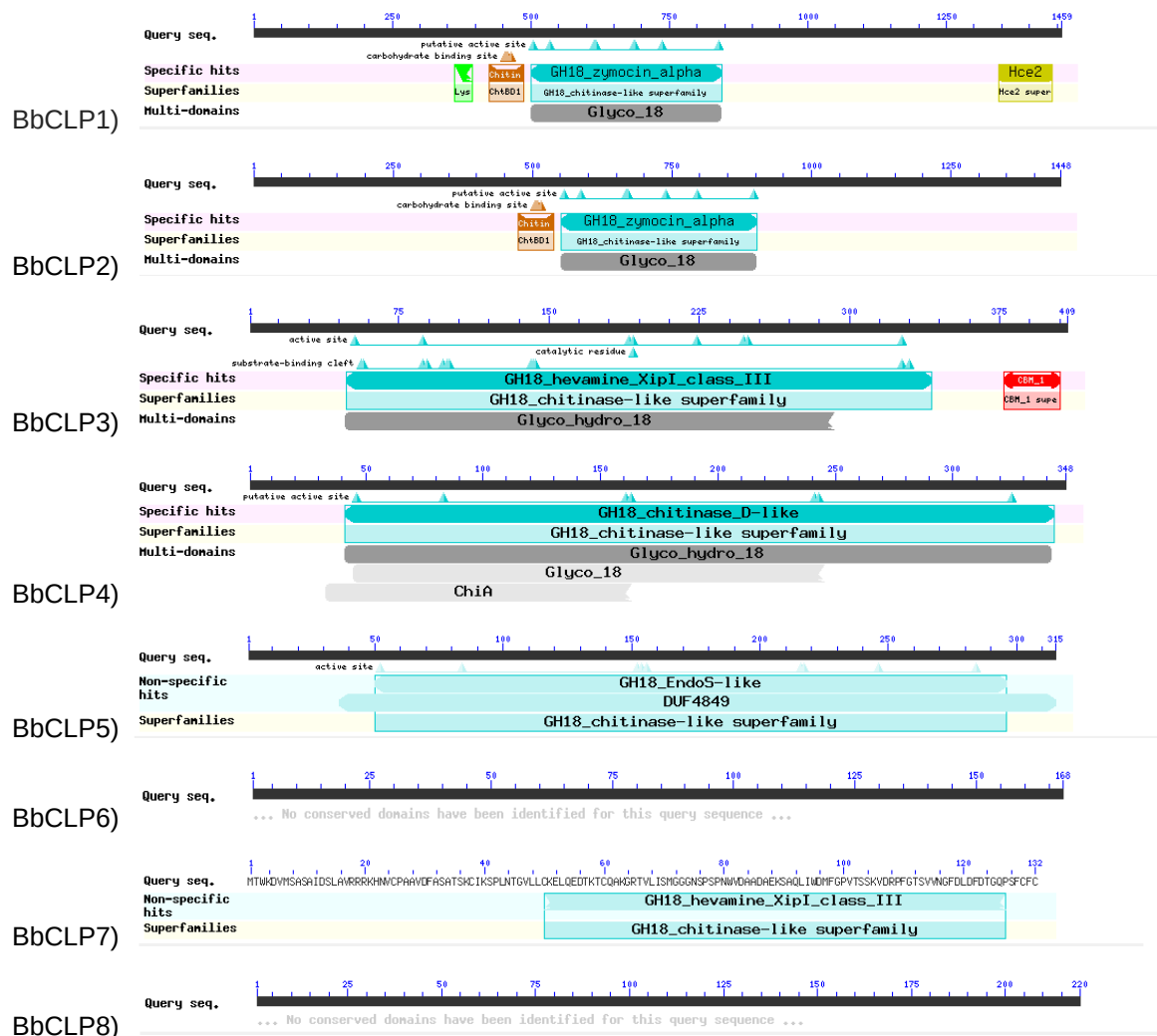


Figura 8. Resumen de la búsqueda de dominios estructurales por CD-Search para todos los posibles genes de CLPs reportados para *Beauveria bassiana*. a) BbCLP1 posee tanto el dominio GH18 como el ChtBD1, b) BbCLP2 ambos dominios objetivo hallados, c) BbCLP3 el dominio estructural GH18 fue detectado en este gen, d) BbCLP4 posee el dominio GH18, e) BbCLP5 tiene presente el dominio GH18, f) BbCL6 no fue posible identificar ningún dominio estructural conservado, g) BbCLP7 posee la estructura característica de las CLPs, h) BbCLP8 la detección de dominios conservados fue negativa.

Los resultados obtenidos del análisis de dominios conservados indican que 2 de las proteínas en estudio (BbCLP6 y BbCLP8), no poseen el motivo estructural característico de la familia GH18 ni los módulos de enlace con quitina que debiesen estar presentes en una quitolectina. Lo anterior aunado a los resultados de baja similitud de BLAST (Figura 8) sugiere que ambas proteínas no sean CLPs, e inclusive, que no sean siquiera miembros de la familia GH18. No obstante, podría suponerse una similitud existente entre ambas, reflejada no sólo por su longitud de secuencia sino también por sus PI relativamente próximos (4.89 y 4.60 respectivamente).

8.1.3. Construcción de árboles filogenéticos

Se empleó el software **MEGA7** (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) para la generación de árboles filogenéticos. Primeramente se realizaron multialineamientos con **ClustalW** y con **MUSCLE** (Multiple Sequence alignment by Log-Expectation); la diferencia entre ellos radica en que el primero es un método de alineamiento progresivo y la similitud que busca está en función de aminoácidos conservados, mientras que el segundo es un método iterativo que realiza multialineamientos por bloques, es decir, por motivos estructurales conservados (Gaucher *et al*, 2014).

Se realizaron diversas pruebas de alineamiento: comparando las CLPs del organismo en estudio; en diferentes hongos tanto macroscópicos como filamentosos; y contra una extensa variedad de organismos como plantas y mamíferos. A partir de estos alineamientos se construyeron árboles filogenéticos empleando el método de construcción *Neighborn-Joining*. Para la prueba de filogenia se eligió *Bootstrap method* con un *bootstrap replications* de 1000; para el modelo de sustitución se eligió el *Poisson model* con *Pairwise Deletion* (Gao *et al*, 2014).

El método de construcción Neighborn-Joining es un método basado en distancia que resume la información de un multialineamiento en una matriz de distancias entre secuencias. Las principales ventajas que ofrece; es sumamente rápido y sus resultados son buenos como aproximación preliminar.

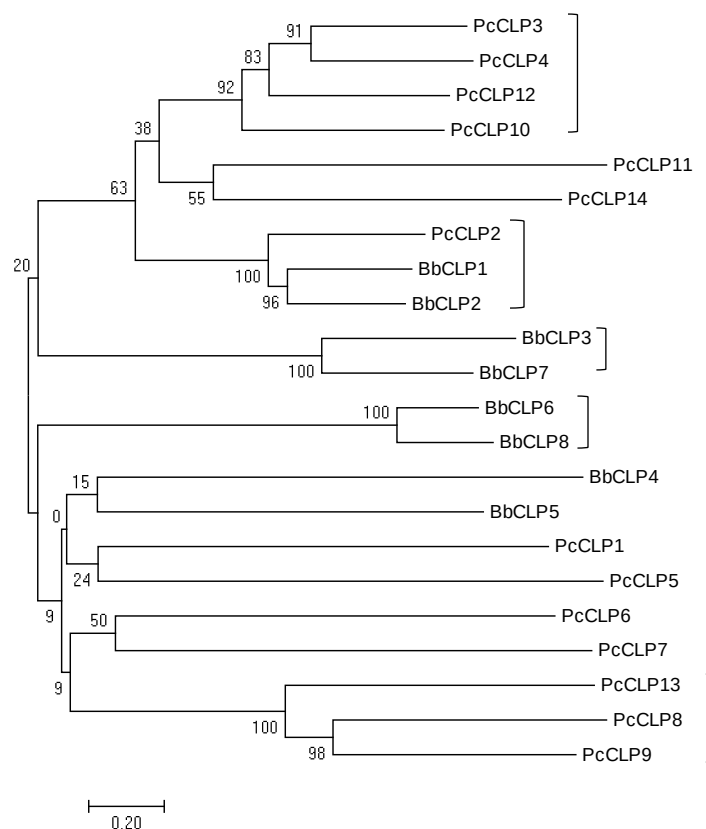


Figura 9. Árbol filogenético de CLPs en *Beauveria bassiana* y *Penicillium chrysogenum* empleando multialineamiento ClustalW

En la figura 9 se observa un árbol filogenético construido a partir de un multialineamiento ClustalW entre las CLPs de *B. bassiana* y otro hongo filamentoso, *Penicillium chrysogenum*. Aunque logran apreciarse clados definidos, algunos se encuentran muy distantes entre ellos, indicando que existe diversidad especie-específico. Respecto a los genes BbCLP6 y BbCLP8 mencionados en el apartado anterior, fueron agrupados en un mismo clado y manteniéndose totalmente apartados del resto de las CLPs incluidas en la construcción de este árbol, apoyando que se trate de proteínas externas al grupo.

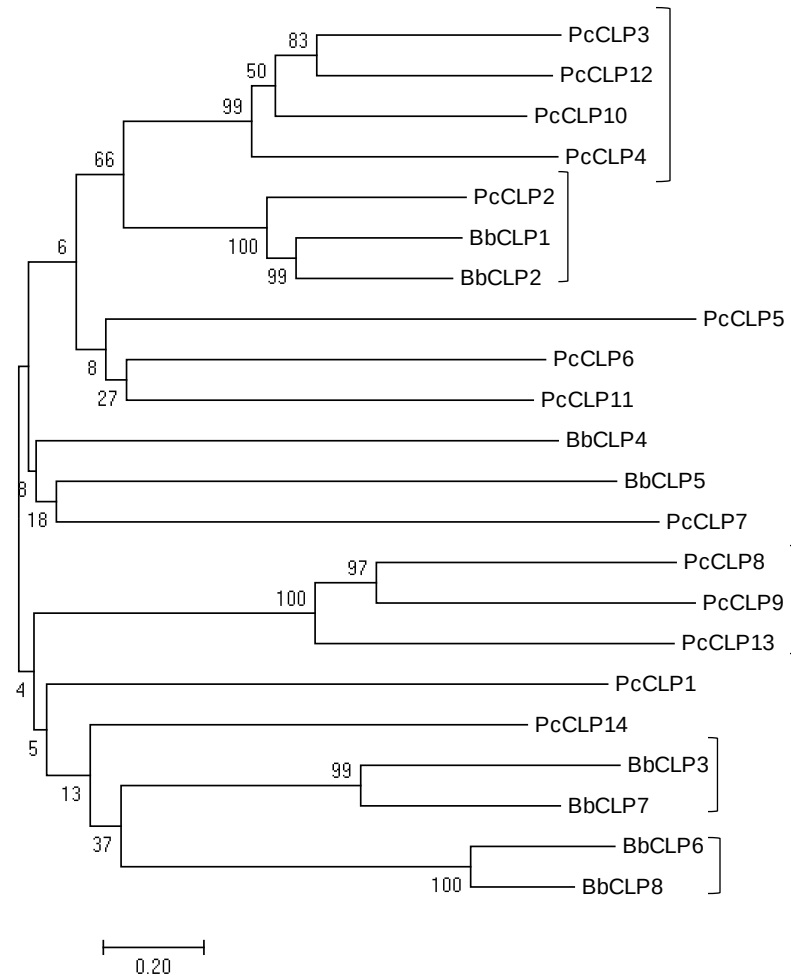


Figura 10. Árbol filogenético de CLPs en *Beauveria bassiana* y *Penicillium chrysogenum* empleando multialineamiento MUSCLE.

La figura 10 muestra el árbol resultante del multialineamiento MUSCLE de las secuencias de CLPs de los 2 organismos mencionados con anterioridad en general la distribución de los clados muestra pocas variaciones con respecto a la Figura 9.

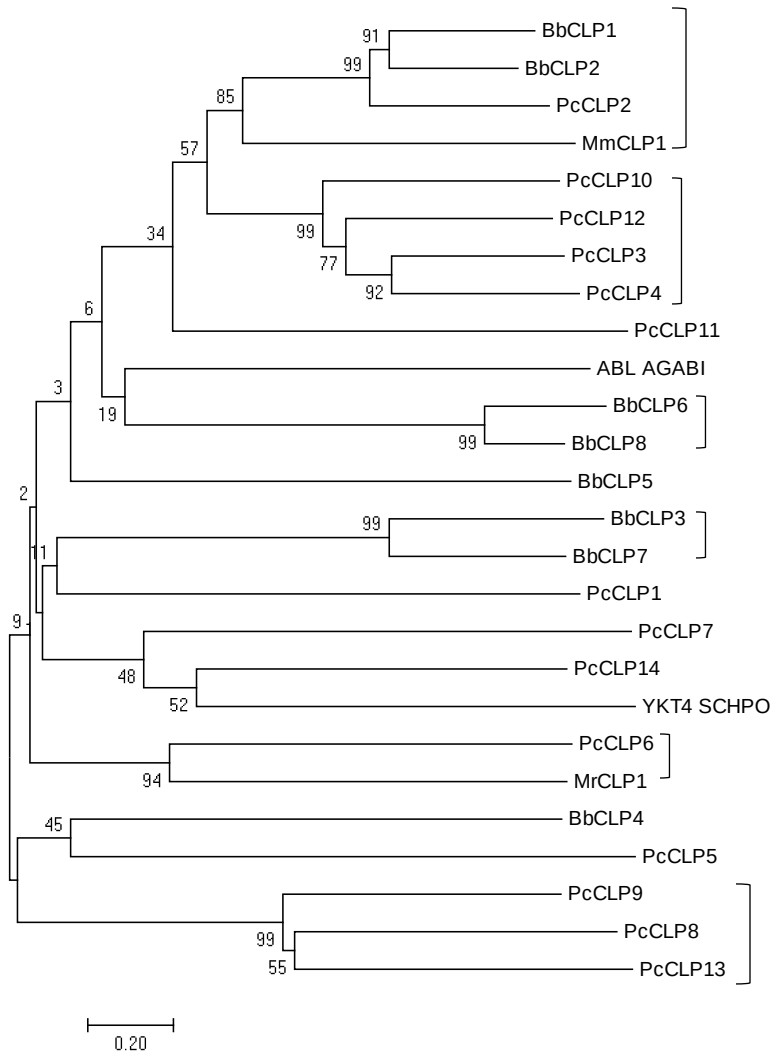


Figura 11. Árbol filogenético de CLPs en *Beauveria bassiana* (BbCLP), así como en *Metarhizium robertsii* (MrCLP1), *Metarhizium majus* (MmCLP1), *Agaricus bisporus* (ABL AGABI), *Penicillium sp* (PcCLP) y *Schizosaccharomyces* (YKT4) empleando multialineamiento ClustalW.

Se construyó otro árbol filogenético partiendo del multialineamiento ClustalW de las secuencias de CLPs en diversas especies de hongos (Figura 11) incluyendo la CLP de *Agaricus bisporus* que es una lectina fúngica comercial utilizada como control en pruebas de detección de actividad lectina, muestra un mejor ajuste en los agrupamientos de las diferentes secuencias. Nuevamente BbCLP6 y BbCLP8 fueron agrupadas juntas, sin embargo, mostrándose como un grupo diferente al resto, mismo caso para la lectina de *Agaricus bisporus*.

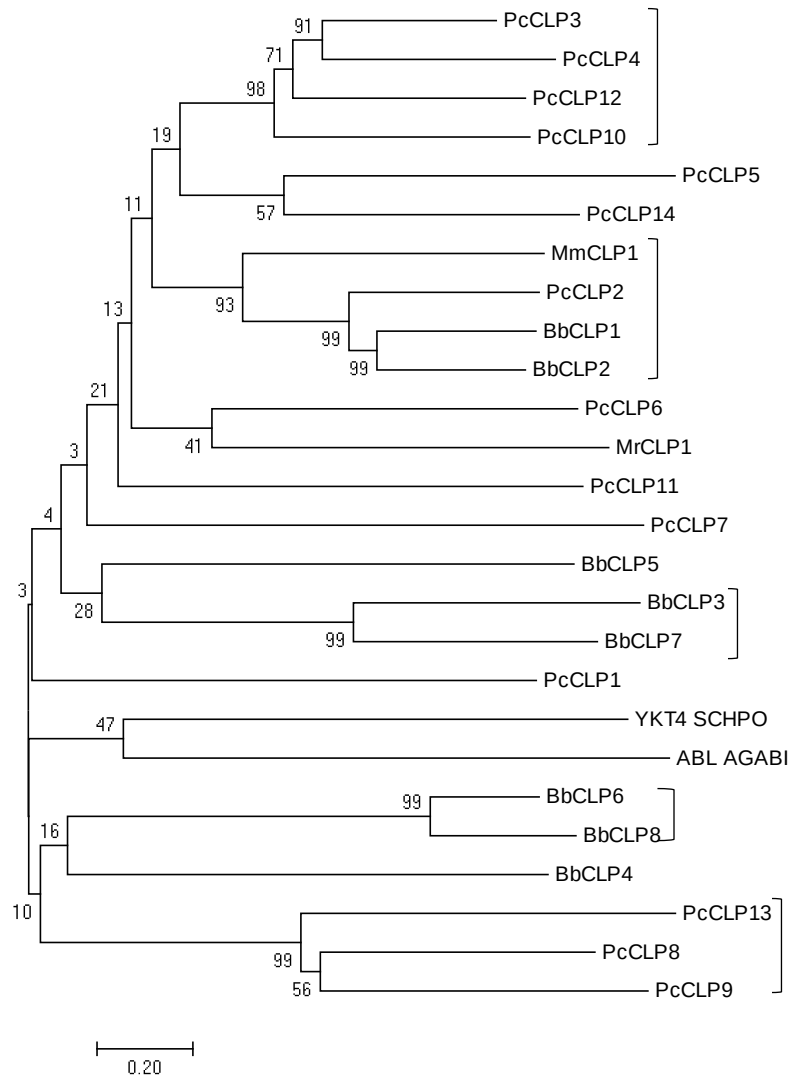


Figura 12. Árbol filogenético de CLPs en *Beauveria bassiana*, así como en *Metarhizium robertsii* (MrCLP1), *Metarhizium majus* (MmCLP1), *Agaricus bisporus* (ABL AGABI), *Penicillium sp* (PcCLP) y *Schizosaccharomyces* (YKT4) empleando multialineamiento MUSCLE.

En los casos mostrados en las Figuras 9, 10, 11 y 12 aunque pueden hallarse algunas pequeñas agrupaciones entre distintas CLPs, no son tan próximas las unas de las otras. Al realizar el análisis en diferentes organismos como plantas y mamíferos, fue necesario ir incrementando la cantidad de CLPs para ajustar los clados (Figura 13 y 14). Se eligieron estos organismos con la finalidad de diversificar además de ser los organismos en los que más se han estudiado las CLPs.

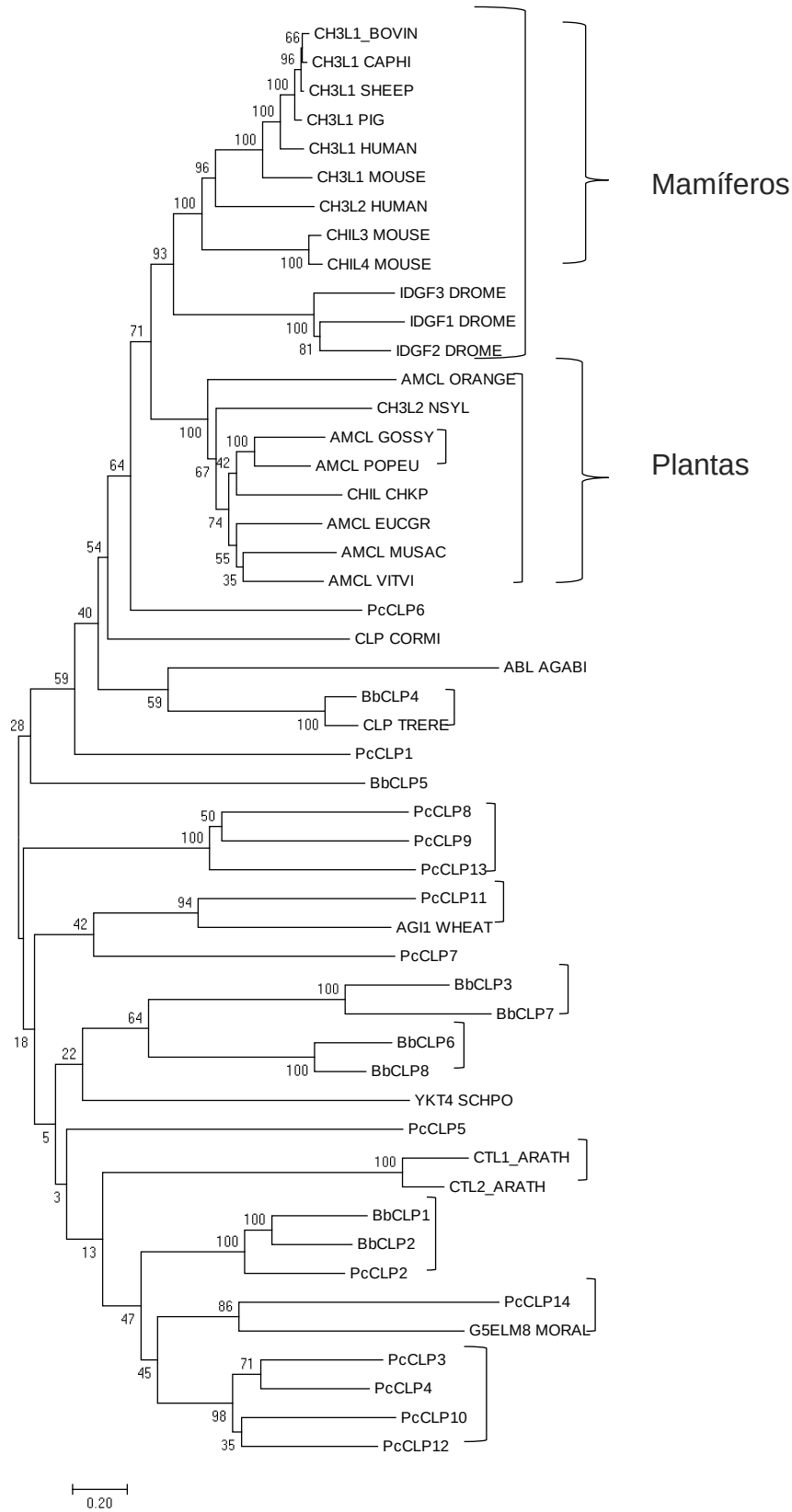


Figura 13. Árbol filogenético de CLPs en múltiples organismos empleando multialineamiento ClustalW.

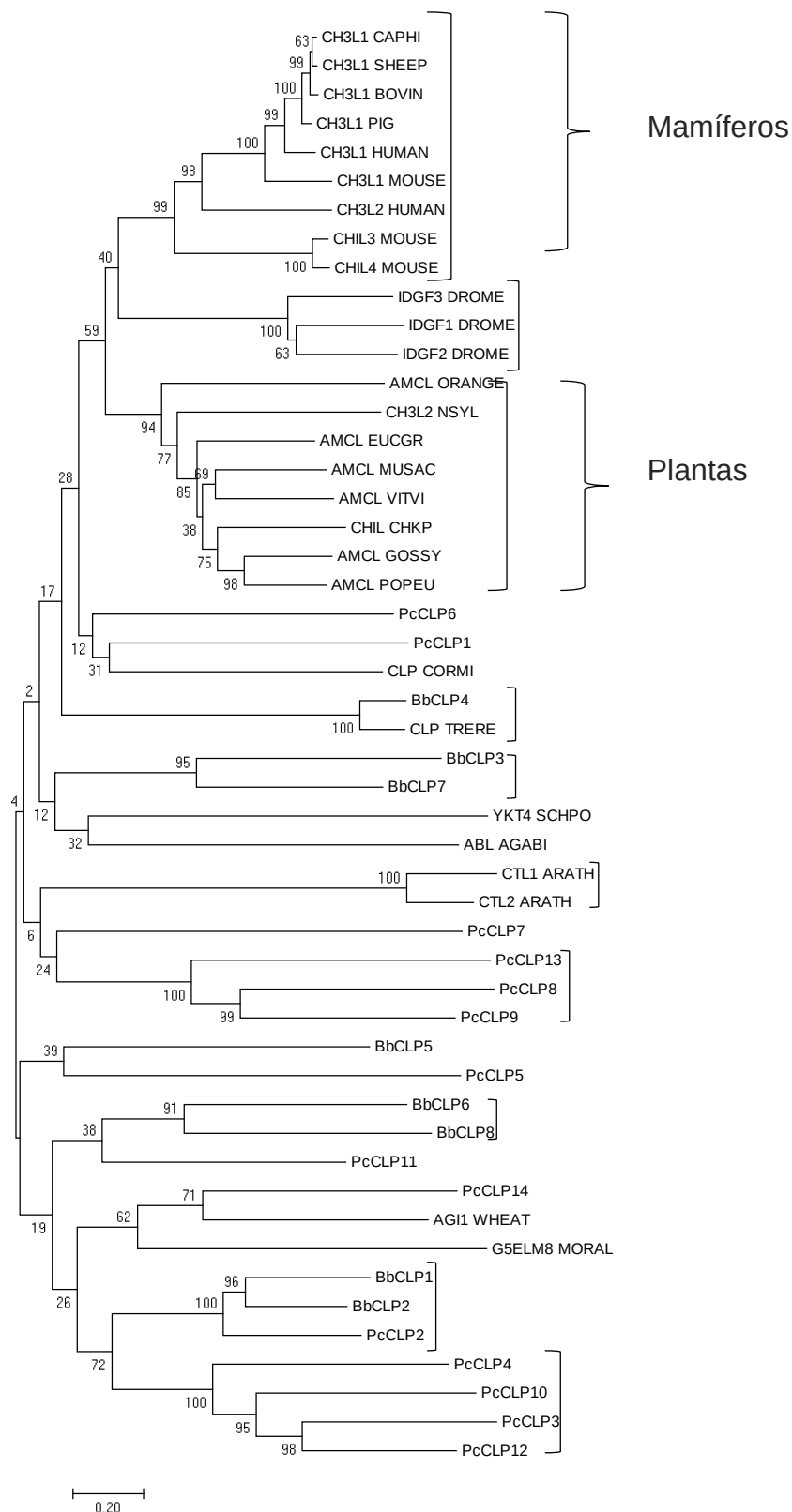


Figura 14. Árbol filogenético de CLPs en múltiples organismos empleando multialineamiento MUSCLE.

Al ajustarse los clados incrementando la cantidad de secuencias involucradas, se logra apreciar la cercanía evolutiva que existe dentro de las CLPs mamíferas. En el caso de las CLPs en plantas la mayoría quedaron agrupadas muy próximas unas con otras pero hubo casos como las CLPs de *Arabidopsis thaliana* (CTL1 y CTL2 ARATH) que fueron agrupadas en un bloque distante del resto. Las CLPs fúngicas muestran una mayor distancia unas con otras, podría deberse a que siendo organismos más antiguos, la distancia evolutiva resulta más notoria. Una vez más, BbCLP6 y BbCLP8 permanecen agrupadas en un mismo clado, y estando agrupadas prácticamente ajenas al resto de las secuencias, al menos en el árbol construido empleando alineamiento MUSCLE (Figura 14), ya que haciendo uso de un alineamiento en ClustalW, el árbol resultante indica una posible relación de éstas, con BbCLP3 y BbCLP7 lo que significa, que pese a no poseer similitud en función de la presencia de dominios estructurales conservados, sí existe a nivel secuencia de aminoácidos.

8.2. Diseño de primers

Los criterios que se consideraron para el diseño de primers de cada uno de los miembros de la familia de CLPs, difieren unos con otros; debido a las regiones conservadas que poseen así como por la elevada similitud de secuencia con quitinasas. De manera general se siguieron 2 estrategias para determinar las regiones objetivo en el diseño de primers para qPCR de estos genes: (1) enfoque en pequeñas regiones únicas dentro de la secuencia del gen y (2) enfoque del diseño de primers en regiones cercanas al 3' UTR para aquellos casos en que la identidad con uno o más genes era sumamente elevada (99%). Este último enfoque fue necesario para 5 CLPs de *B. bassiana* (BbCLP1, BbCLP2, BbCLP3, BbCLP4 y BbCLP5); el primer caso fue para cuando la identidad de las CLPs con otros genes, incluyendo quitinasas, resultó menos a 90% y permitió identificar regiones internas próximas al extremo 3'N terminal como objetivo para el diseño del set de primers. Para el diseño de los oligonucleótidos se empleó el software en línea PrimerQuest (www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index). Los resultados se muestran resumidos en la Tabla 6.

Tabla 6. Primers diseñados para los genes de CLPs en *Beauveria bassiana*.

Nombre	Oligonucleótido	Secuencia	Tm (°C)	Amplicón
BbCLP1	BbCLP1_F	GTCAGTCAGTCAGCACACAACA	62	132
	BbCLP1_R	GGGTAAACCTTGTTGATTCATTCTT	62	
BbCLP2	BbCLP2_F	AGAAGCAGGATGTTGAGTGG	62	107
	BbCLP2_R	GGACATCAAGTGACGTAACAAAG	62	
BbCLP3	BbCLP3_F	GTGTGGTGGAAATGGCTACA	62	123
	BbCLP3_R	ATCGTGGGTAGGTCCTCATT	62	
BbCLP4	BbCLP4_F	CATTTGGCGACAATGTCAAGG	62	116
	BbCLP4_R	GAGTCAGCCAAGTCCAGTTT	62	
BbCLP5	BbCLP5_F	TTGGCGACAATAGGCTTCAG	62	92
	BbCLP5_R	CGCAGGCCCTTGAAATGTA	63	
BbCLP6	BbCLP6_F	GCCTCTTTCATCGGACTCATT	62	77
	BbCLP6_R	AAGCCCTTTCACGAAAGAT	62	
BbCLP7	BbCLP7_F	ATGACCTGGAAGGATGTTATGTC	62	107
	BbCLP7_R	CTAGTGGCACTCGCAAAGT	62	
BbCLP8	BbCLP8_F	CACTCGCTCTCGCTGTTG	62	108
	BbCLP8_R	TGCTGATGCTGCTGGTG	62	

Estos primers podrán ser empleados en estudios futuros en los que se desee evaluar la expresión de estos genes.

8.3. Fermentación líquida

Se montaron fermentaciones siguiendo las condiciones especificadas en el apartado 7.6. El propósito fue evaluar la actividad quitinolítica por parte de *Beauveria bassiana*, tomando como base lo reportado por Montgomery y Kirchman en 1993, las CLPs presentan una expresión paralela con las quitinasas, por lo que estos datos servirán como referencia a estudios posteriores sobre la expresión de CLPs por *Beauveria bassiana* bajo las mismas condiciones empleando sustratos quitinosos como inductores.

8.3.1. Determinación de proteína soluble

Para determinar la concentración de proteína en las muestras, se empleó una curva patrón de seroalbúmina bovina como estándar (Anexos Figura A2.1). En la Figura 15 se muestran los resultados para proteína soluble, el medio Czapeck con cutícula de camarón alcanzó su mayor concentración a las 72 h (4.40 $\mu\text{g/mL}$) decayendo hasta 1.87 $\mu\text{g/mL}$ a las 168h. El mayor valor determinado corresponde a cutícula de camarón control a las 144 h (5.82 $\mu\text{g/mL}$) lo que resulta llamativo debido a que el control no fue inoculado y se esperaba mantuviese relativamente la misma concentración en cada punto.

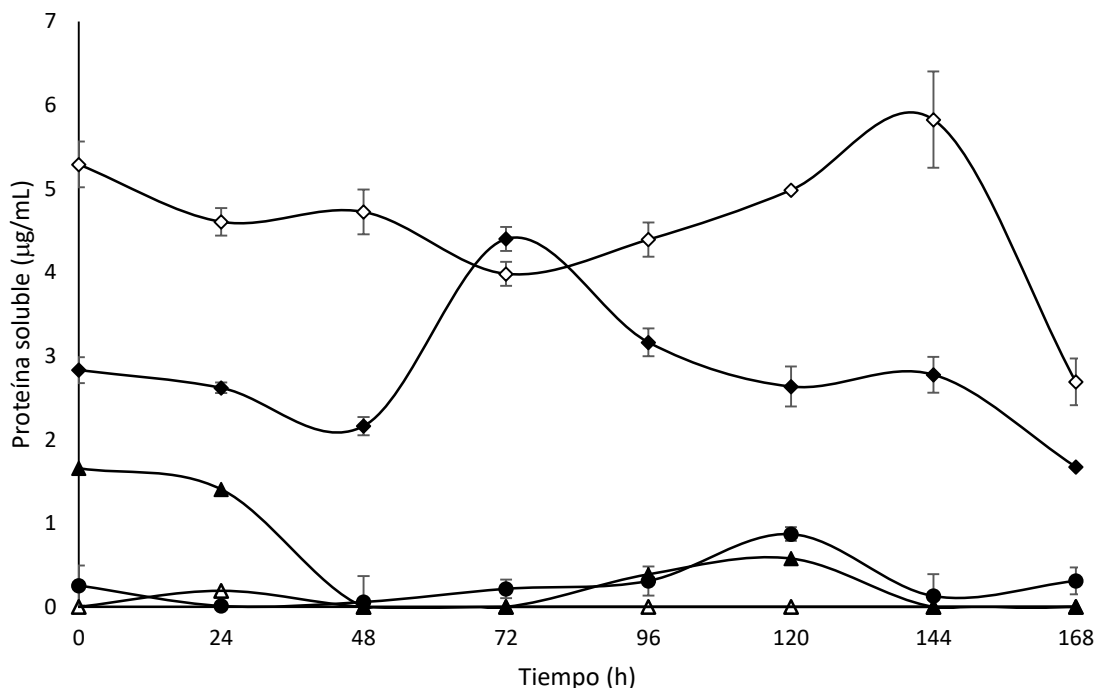


Figura 15. Proteína soluble total en fermentación líquida con *Beauveria bassiana* empleando medio Czapeck con diferentes sustratos: Czapeck glucosa (●); Czapeck cutícula camarón (◆); Czapeck cutícula control (◇); Czapeck quitina SIGMA (▲); Czapeck quitina SIGMA control (△).

La mayor concentración de proteínas en el control de Czapeck cutícula de camarón podría indicar que el sustrato se encuentra liberando cadenas proteicas al medio o bien, diferentes compuestos que puedan estar interfiriendo con la técnica de Bradford, como pueden ser Na^+ , K^+ o compuestos altamente alcalinos como el CaCO_3 presente en la composición de la cutícula de camarón. El medio Czapeck cutícula de camarón con inóculo presentó una concentración menor de proteína soluble en comparación con el

control, esto puede deberse a una falta de homogeneidad tanto en el inóculo como en las muestras obtenidas, para el inóculo porque no había la garantía que la solución empleada contuviera únicamente esporas pues también existía la presencia de micelio. En el caso de las muestras obtenidas, debido a la heterogeneidad en el inóculo, el organismo creció en el medio en forma de esporas y debido a las interacciones de las células con el medio, no se logró una agregación durante el ciclo de centrifugado (formación de pellet) lo que causaba su resuspensión en el sobrenadante. Adicionalmente es posible que exista una afinidad del inóculo por el sustrato (cutícula de camarón desproteinizada) por lo que durante las primeras horas de la fermentación puede existir un consumo de las proteínas de la cutícula liberadas al medio por parte de *Beauveria bassiana*. También debe mencionarse la posible evidencia de heterogeneidad en la cutícula ya que durante el tratamiento con tetraborato, la cutícula floculaba y el contacto que ésta tenía con la solución no era continua.

8.3.2. Determinación de actividad N-acetilhexosaminidasa

Se definió la actividad NHasa como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol por mL de enzima por minuto bajo las condiciones especificadas. Para determinar la cantidad de p-nitrofenol liberado se empleó una curva patrón (Anexos Figura A2.2). Los resultados se muestran en la Figura 16.

El mayor valor de actividad NHasa detectado corresponde a Czapeck con cutícula de camarón, alcanzando a las 48 h una actividad volumétrica de 9.98 mU/mL, teniendo casi el doble de los valores determinados para los otros sustratos, estos resultados coinciden con lo reportado por Jiménez-Alejandro (2016) quien evaluó la producción de quitinasas en medio líquido por parte de *Beauveria bassiana* empleando 3 fuentes diferentes de quitina.

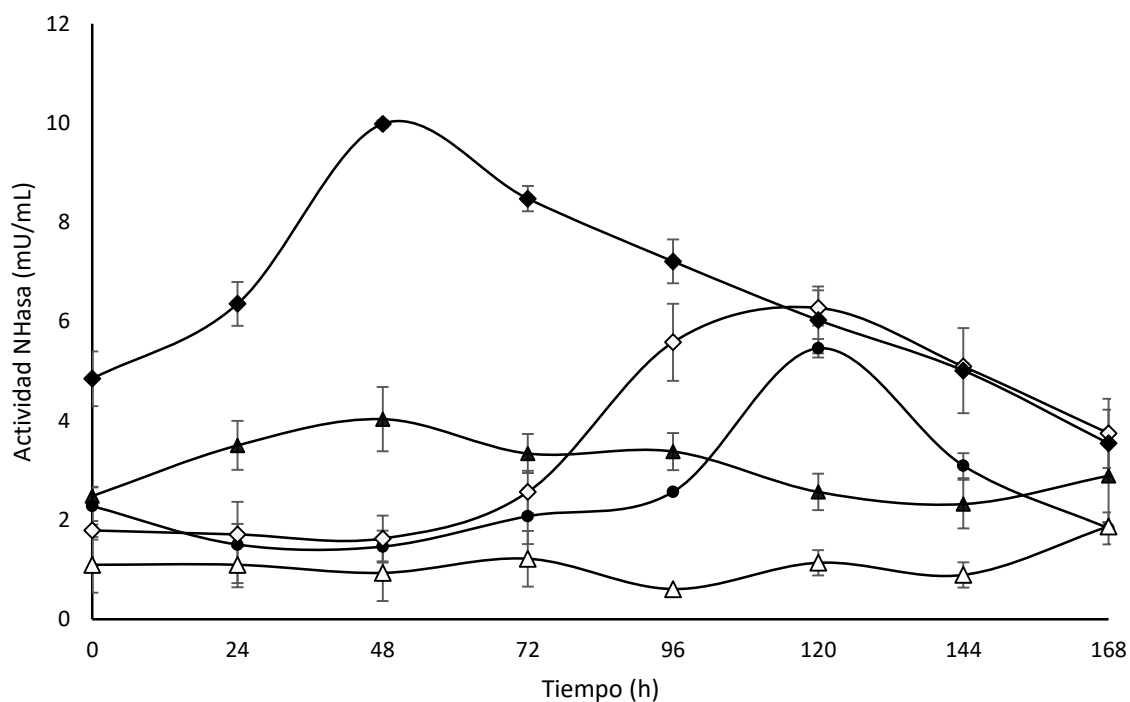


Figura 16. Actividad N-acetilhexosaminidasas en *Beauveria bassiana* empleando medio Czapeck con diferentes sustratos: Czapeck glucosa (●); Czapeck cutícula camarón (◆); Czapeck cutícula control (◇); Czapeck quitina SIGMA (▲); Czapeck quitina SIGMA control (△).

Escobar Chaparro en el 2017, caracterizó y determinó el mecanismo hidrolítico en extractos enzimáticos con actividad Nhasa de *Beauveria bassiana* usando como sustrato camarón, obteniendo una actividad volumétrica de 3.765 mU/mL correspondiente a las 24 h, valor por debajo al reportado en este trabajo. Czapeck con quitina comercial muestra una misma tendencia a Czapeck cutícula de camarón detectando la mayor actividad volumétrica a las 48 h, aunque apenas llegando a las 4 mU/ml. El punto máximo de actividad NHasa no coincidió con el de proteína soluble, lo que podría indicar que el hongo dio prioridad a otro tipo de proteínas como podrían ser las lectinas, o a otros tipos de hidrolasas como proteasas, celulasas, desacetilasas, etc.

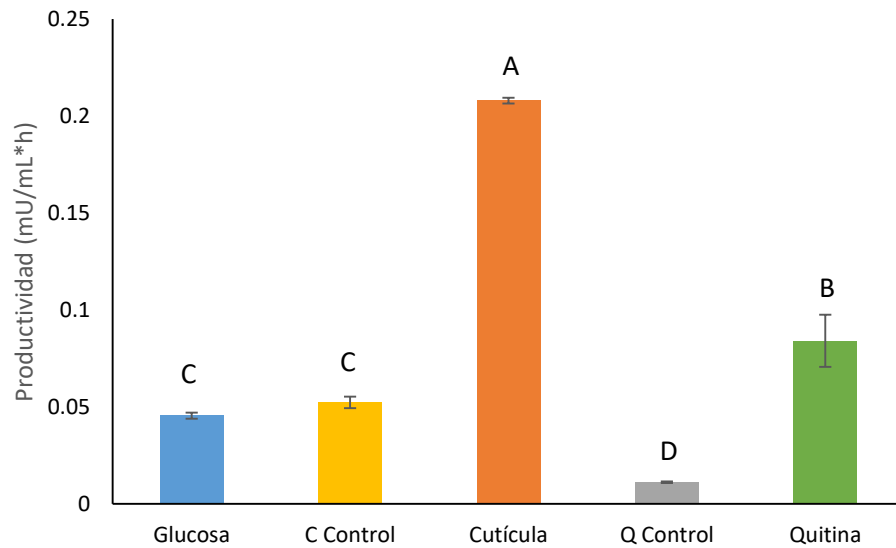


Figura 17. Productividad máxima para Nhasas producidas por *B. bassiana* empleando diferentes sustratos. Las letras indican grupos distintos de acuerdo a una prueba ANOVA un solo factor (agrupación por Método de Tukey, $\alpha=0.05$)

En la Figura 17 se muestran los resultados de productividad determinados para cada uno de los tratamientos y sus respectivos controles. La productividad se determinó con el valor máximo de actividad volumétrica detectado entre el tiempo correspondiente a dicho punto. El tratamiento que empleó cutícula de camarón obtuvo el mayor valor de productividad (0.21 mU/mL*h), seguido por quitina comercial (0.085 mU/mL*h) y finalmente glucosa con una productividad de 0.05 mU/mL*h. Los mejores resultados con cutícula podrían deberse a que el tratamiento con tetraborato permitió la separación de proteínas presentes en el sustrato, facilitando el reconocimiento de las cadenas quitinosas por parte del hongo, adicionalmente, el favorecimiento en la productividad podría explicarse por la relación C:N del sustrato empleado, siendo que a menor cantidad de N presente la expresión de Nhasas se incrementa, mientras no se llegue a la ausencia total como lo es en el caso de glucosa, donde el efecto es contrario. El contenido de proteína residual para cutícula de camarón tratada con tetraborato reportado por Jiménez-Alejandro en el 2016 fue de 11%, mientras que para cutícula comercial SIGMA, el valor fue de 22%. En el caso de glucosa, el sustrato no presenta N por lo tanto éste fue tomado por el hongo de las sales en el medio (NaNO_3).

8.3.3. Determinación de actividad endoquitinasa

Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para reducir la turbidez de una suspensión de quitina coloidal en un 5% a 30°C por 24 horas. Los resultados para todos los sustratos pueden apreciarse en la gráfica de la Figura 18. Con cutícula de camarón se alcanzaron 13.9 U/ml a las 96 h, mientras que con glucosa se registró una actividad de 24.4 U/ml hasta las 144 h. La menor actividad EQasa corresponde al medio Czapeck con quitina comercial, llegando a su mayor producción de 1.8 U/ml a las 24 h. Con base en la estadística, no hay diferencia significativa entre las 0h y 72h presentándose el primer cambio significativo a las 96 horas.

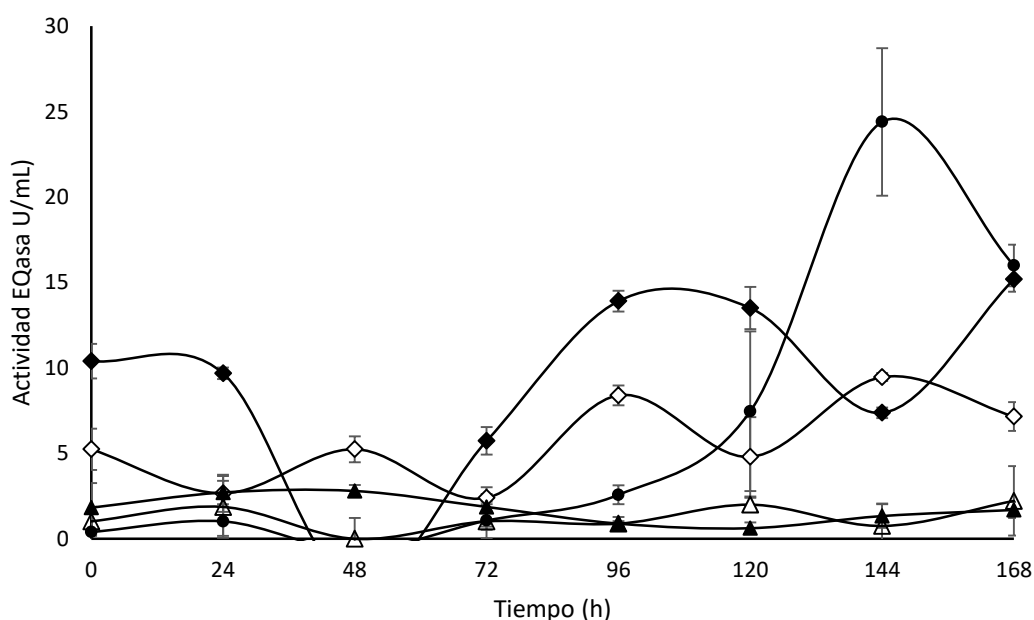


Figura 18. Actividad EQasa determinada para *Beauveria bassiana* empleando medio Czapeck con diferentes sustratos: Czapeck glucosa (●); Czapeck cutícula camarón (◆); Czapeck cutícula control (◇); Czapeck quitina SIGMA (▲); Czapeck quitina SIGMA control (△).

Se ha establecido como una generalidad que la acción de las EQasa debe preceder a la de las NHasas, debido a que los productos de reacción de las primeras sirven como sustrato de las segundas, pero bajo las condiciones empleadas en este trabajo, puede

apreciarse que ambas enzimas están presentes desde el comienzo de la fermentación. Tomando como referencia Czapeck con cutícula de camarón, la actividad EQasa fue de 10.48U/mL (Figura 18) mientras que las NHasas fueron detectadas a una concentración de 4.84mU/mL (Figura 16) desde el comienzo de la cinética, lo que confirmaría que este tipo de enzimas son constitutivas (Ramirez-Coutiño, 2009).

La menor actividad volumétrica detectada empleando quitina comercial podría deberse a que como resultado de un tratamiento de purificación más riguroso, las cadenas quitinosas en la superficie hayan presentado algunas modificaciones estructurales que dificultara el reconocimiento del sustrato por parte de *Beauveria bassiana*.

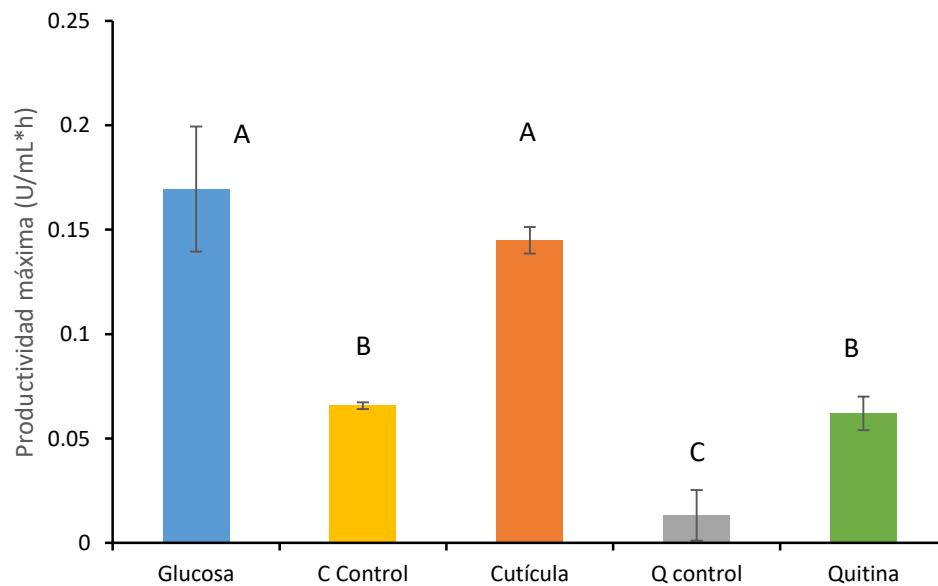


Figura 19. Productividad máxima de EQasas producidas por *B. bassiana* usando diferentes sustratos. Las letras indican grupos distintos de acuerdo a una prueba ANOVA un solo factor (agrupación por Método de Tukey, $\alpha=0.05$)

El mayor valor de productividad máxima obtenido corresponde a glucosa (0.17 U/mL*h), estadísticamente este tratamiento no tiene diferencia significativa con cutícula de camarón que obtuvo una productividad de 0.145 U/mL*h (Figura 19). Como se mencionó previamente, el carácter constitutivo de estas enzimas se refleja en el hecho de que aún en ausencia de sustratos quitinosos, como lo fue el en caso del uso de glucosa, su productividad fue elevada.

8.3.4. Determinación azúcares reductores

La determinación de azúcares reductores de cada muestra, se realizó mediante la técnica de DNS (Miller, 1959) empleando 2 curvas patrón; glucosa y N-acetilglucosamina (Anexos 2). La determinación se realizó para poder evaluar la concentración de NAG que se libera al medio para poder hacer una relación con la actividad NHasa, pues es uno de los productos resultantes tras hidrolizar los extremos no reductores de las cadenas de quitina. En el caso de Czapeck glucosa, la concentración de azúcares reductores se realizó para poder evaluar el consumo por parte de *Beauveria bassiana*.

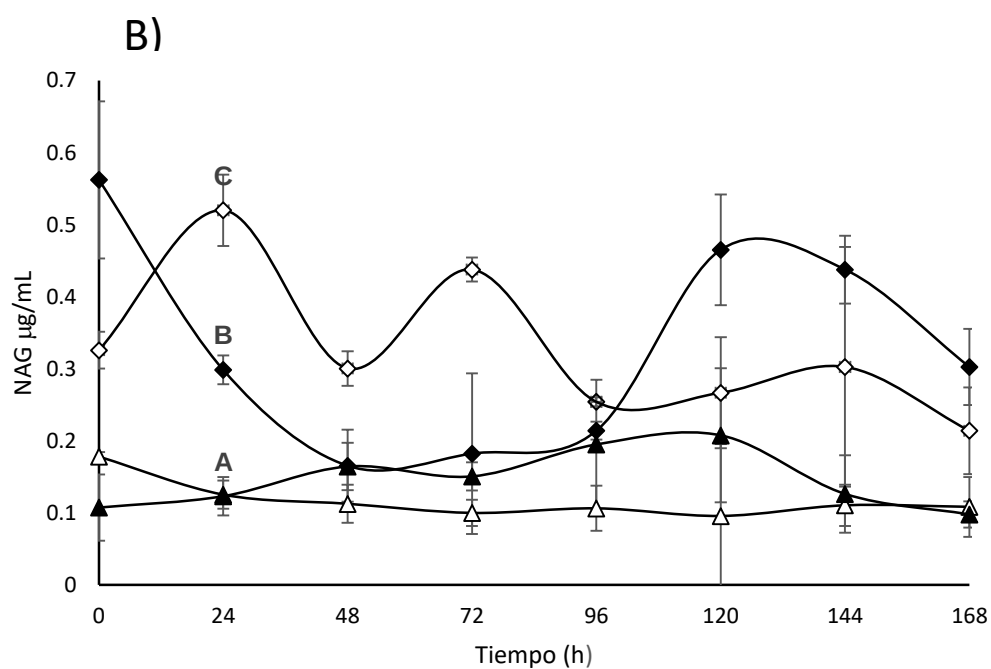
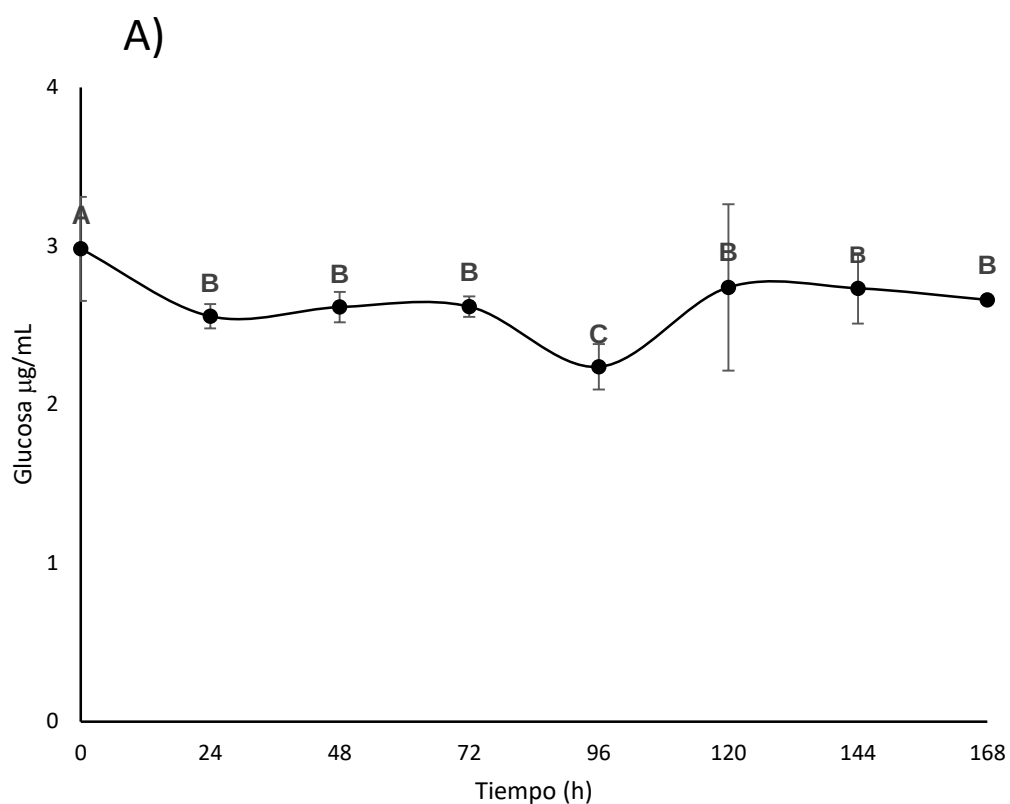


Figura 20. Resultados de las determinaciones de azúcares reductores con la técnica DNS A) Czapeck glucosa. B) Czapeck cutícula camarón ($\blacklozenge$); Czapeck cutícula control ($\diamond$); Czapeck quitina SIGMA ($\blacktriangle$); Czapeck quitina SIGMA control ($\triangle$). Las letras indican grupos distintos de acuerdo a una prueba ANOVA método lineal general (agrupación por Método de Tukey, $\alpha=0.05$)

En Czapeck glucosa, la concentración de este carbohidrato tuvo un descenso de 0.43 $\mu\text{g/mL}$ en las primeras 24 h (Figura 20), durante el resto de la cinética no presentó cambios significativos salvo por el punto correspondiente a las 96h donde la concentración bajó a 2.23 $\mu\text{g/mL}$, lo que indicaría que el consumo de glucosa por parte de *Beauveria bassiana* fue bajo. La concentración de NAG en czapeck cutícula mostró muchas variaciones a lo largo de la cinética, cutícula control tuvo su mayor punto a las 24h (0.51 $\mu\text{g/mL}$) mientras que cutícula camarón con inóculo alcanzó su valor máximo a las 120 h (0.46 $\mu\text{g/mL}$), este valor fue mayor al obtenido por Escobar Chaparro (2017), quien obtuvo 0.22 $\mu\text{g/mL}$ empleando cutícula de camarón como sustrato. Czapeck con quitina Sigma y su respectivo control mostraron menor variación en los valores de concentración de NAG alcanzando su máximo a las 120 h (0.20 $\mu\text{g/mL}$). La mayor concentración de NAG en el control con cutícula de camarón sugiere que el sustrato liberó NAG al medio, posiblemente inducido por factores físicos y químicos como la temperatura, agitación y pH del medio.

8.4 Monitoreo de la liberación de azúcares reductores y proteínas en cutícula de camarón

Los resultados de las determinaciones previas indican la elevada presencia de proteínas solubles (Figura 15) y NAG (Figura 19) desde el día cero en los medios que emplearon como sustrato cutícula de camarón desproteinizada parcialmente. Se planteó la posibilidad que el tratamiento térmico empleado para la esterilización del medio y la cutícula, así como el bajo pH empleado para la fermentación, pudiese tener alguna implicación directa con lo mencionado anteriormente.

El primer parámetro evaluado fue la variación de pH a lo largo de 7 días, los resultados se muestran a continuación en la Figura 21.

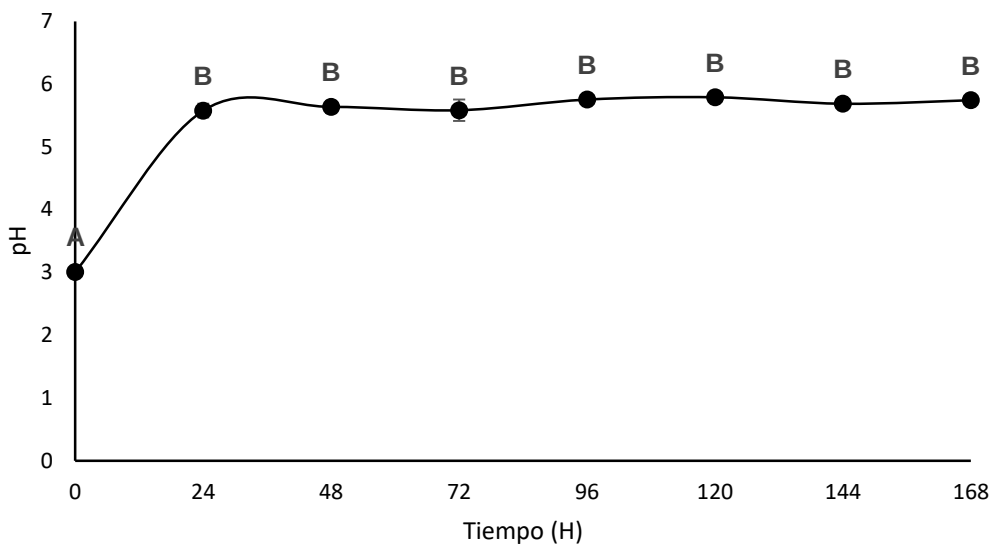


Figura 21. Valores de pH obtenidos para el medio Czapeck con cutícula de camarón sin inóculo. Las letras indican grupos distintos de acuerdo a una prueba ANOVA un solo factor (agrupación por Método de Tukey, $\alpha=0.05$)

En dicha gráfica se aprecia un incremento en el valor de pH a las 24 h, desde un pH de 3.0 hasta uno pH de 5.57, posteriormente la variación de pH entre cada punto no es significativa, lo que sugiere algún componente de la cutícula (sales por ejemplo) reacciona en solo cuestión de horas con el medio, produciendo un incremento de su pH que después se mantiene estable.

Se monitoreó durante este mismo lapso de tiempo, los valores de proteína soluble en el medio, empleando la técnica del microensayo de Bradford descrita con anterioridad.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 22:

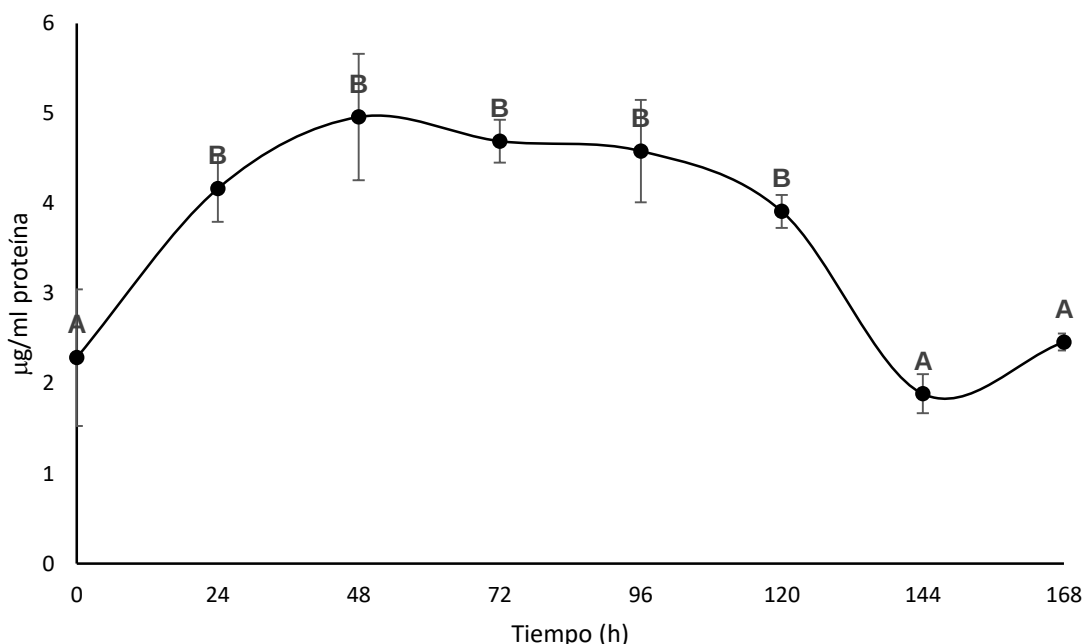


Figura 22. Resultados de la prueba de Bradford, en el sobrenadante del medio Czapeck sin inóculo. Las letras indican grupos distintos de acuerdo a una prueba ANOVA un solo factor (agrupación por Método de Tukey, $\alpha=0.05$)

La presencia de proteína soluble desde el punto cero podría implicar que el proceso al que se somete la cutícula desde el desproteínizado, esterilización y ajuste de pH; produzcan hidrólisis en las proteínas remanentes de la cutícula, que terminan por difundirse en el medio. Las concentraciones detectadas se encuentran en el rango de 3 a 5 $\mu\text{g/mL}$, mismos valores que se determinaron durante la fermentación para Czapeck cutícula control en el apartado 8.3.1. (Figura 15).

Por último se cuantificó la concentración de N-acetilglucosamina (mediante determinación de azúcares reductores) empleando el método de DNS. En la Figura 23 puede apreciarse los resultados de estas determinaciones.

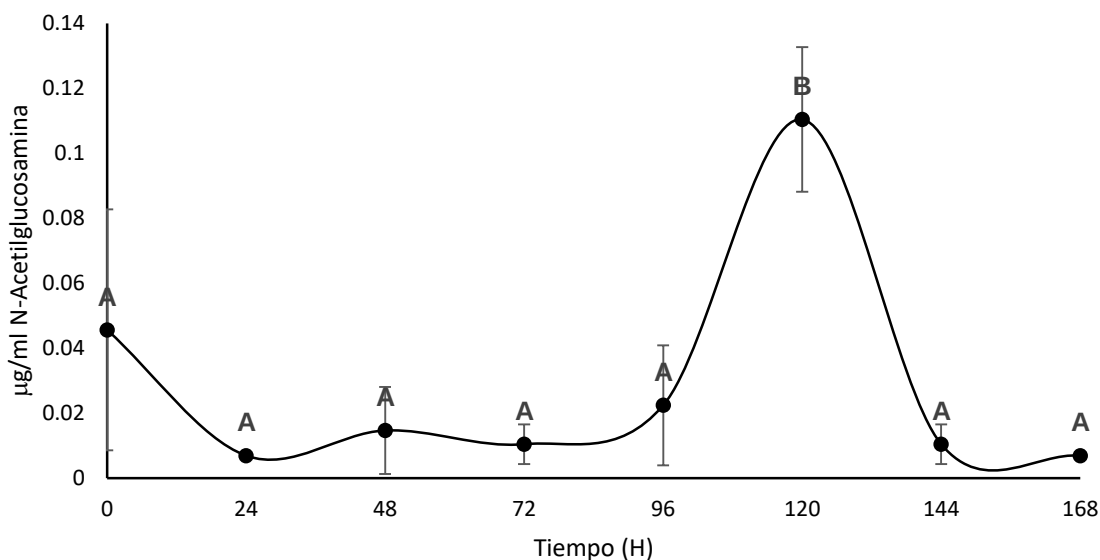


Figura 23. Valores de la concentración de NAG presente en el medio Czapeck con cutícula de camarón. Las letras indican grupos distintos de acuerdo a una prueba ANOVA un solo factor (agrupación por Método de Tukey, $\alpha=0.05$)

En este caso, se esperaba que el comportamiento de la concentración de NAG en el medio fuese lineal, con una mínima variación, aunque en el punto correspondiente a las 120 horas se detectó una mayor concentración ($0.11 \mu\text{g/mL}$), si se compara con la escala de los valores determinados para el medio inoculado (Figura 20), la diferencia es de dos órdenes de magnitud, por lo que estos podrían ser simplemente los valores permisibles por la técnica

En base a estos resultados, puede asumirse que factores físicos y químicos como temperatura y pH ácido, generan una hidrólisis parcial en la cutícula de camarón liberando diferentes compuestos como sales, que terminan incrementando el pH del medio durante las primeras horas de la fermentación. De la misma manera, proteínas estructurales de la cutícula son liberadas al medio, razón por la que se detecta una concentración de $2.28 \mu\text{g/mL}$ desde las 0 h.

8.5. Fermentación en Czapeck Glucosa (4%).

Se decidió montar una fermentación usando únicamente glucosa como sustrato teniendo como principal propósito evitar la heterogeneidad del sustrato y así facilitar la obtención de biomasa que se requerirá para futuros experimentos que permitan realizar caracterizaciones moleculares y de expresión de las proteínas, por ejemplo, SDS-PAGE, qPCR o secuenciación masiva de mRNA. El medio Czapeck se preparó conforme a lo descrito previamente en el apartado 7.6. El cambio de concentración del sustrato se realizó para evaluar el perfil y poder observar qué se mantuvo y qué mejoró respecto a la primera fermentación.

8.5.1. Determinación de proteína soluble.

Se evaluó la concentración de proteína soluble en el medio, por el método de micro ensayo de Bradford empleando una curva patrón de BSA como estándar (Anexos 2), los resultados se muestran en la Figura 24.

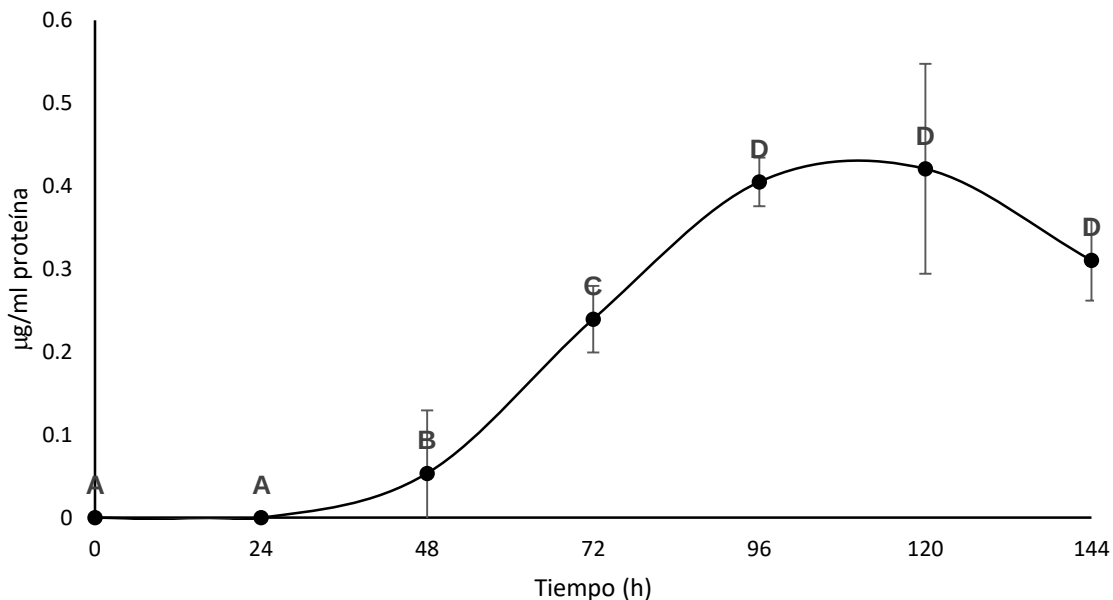


Figura 24. Proteína soluble ($\mu\text{g/ml}$) presente en medio Czapeck con glucosa al 4%. Las letras indican grupos distintos de acuerdo a una prueba ANOVA un solo factor (agrupación por Método de Tukey, $\alpha= 0.05$)

La mayor concentración de proteína en el medio fue detectada a las 120 h, alcanzando los 0.42 $\mu\text{g/ml}$, sólo un 50% de lo detectado en la fermentación anteriormente reportada en la que la concentración llegó a 0.85 $\mu\text{g/mL}$ en ese mismo punto.

8.5.2. Determinación de actividad N-acetilhexosaminidasa.

Se evaluó la producción de NHasas mediante la metodología descrita anteriormente, usando una curva patrón de p -nitrofenol como estándar (Anexos Figura A2.2). Los resultados pueden observarse en la Figura 25.

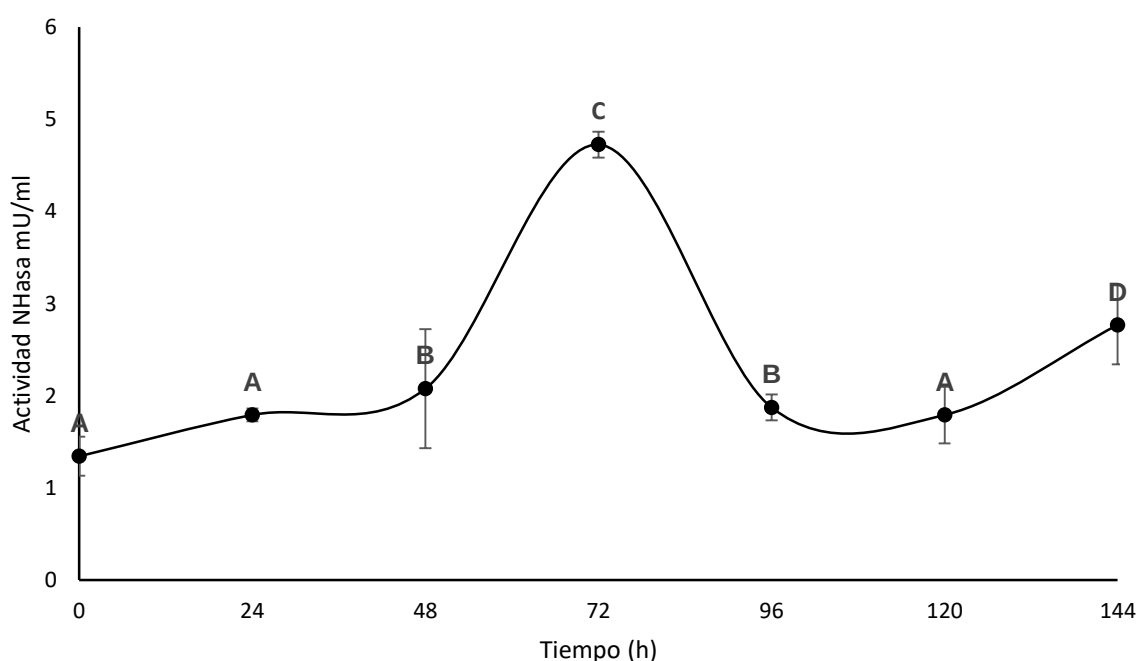


Figura 25. Actividad NHase detectada para *B. bassiana* en medio Czapeck glucosa al 4%. Las letras indican grupos distintos de acuerdo a una prueba ANOVA un solo factor (agrupación por Método de Tukey, $\alpha=0.05$)

La mayor actividad NHase se detectó a las 72 h, alcanzando 3.38 mU/mL, teniendo un súbito descenso de actividad entre las 72 y 96 h. Resulta interesante la presencia de actividad NHase siendo que no hay sustratos quitinosos en el medio, confirmando nuevamente la naturaleza constitutiva de estas enzimas. Probablemente parte de una respuesta natural de reconocimiento de sustrato, adquirida tras millones de años de

evolución. La mayor actividad detectada fue menor en un 11% en comparación con el mayor valor de actividad determinada en la primera fermentación, además que en esta ocasión el valor corresponde a las 72 h mientras que en la anterior determinación correspondió a las 120 h. Nuevamente el pico de actividad NHasa no coincide con el punto de mayor concentración de proteína soluble siendo posible que durante el punto con la mayor concentración de proteína se estén expresando lectinas.

8.5.3. Determinación de actividad EQasa

La Figura 26 muestra los resultados de la determinación de actividad EQasa. Estadísticamente, la única variación significativa ocurrió a las 72 h lográndose detectar la mayor actividad EQasa en este punto, alcanzando 1.88 U/mL con una caída a las 96 h y un nuevo incremento a las 120 h aunque no es significativo. Este comportamiento fue igualmente exhibido por las NHasas. Al igual que las NHasas, las EQasas denotan una naturaleza constitutiva en el ciclo de vida de *Beauveria bassiana*, pues son expresadas aún en ausencia de sustratos quitinosos.

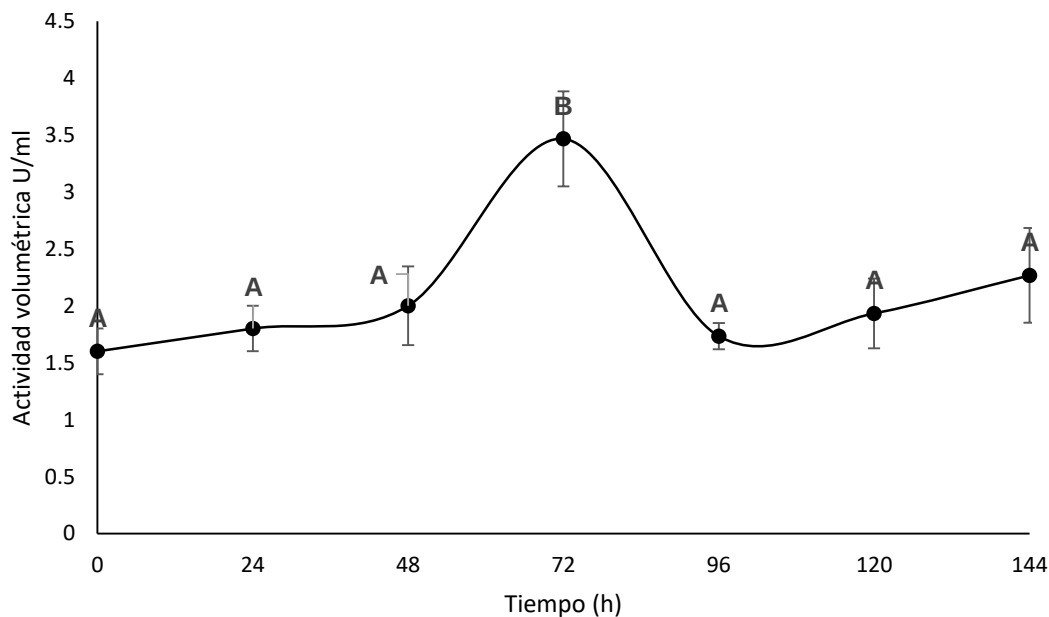


Figura 26. Actividad EQasa detectada para *B. bassiana* en medio Czapeck con glucosa 4%. Las letras indican grupos distintos de acuerdo a una prueba ANOVA un solo factor (agrupación por Método de Tukey, $\alpha=0.05$)

8.5.4. Cuantificación de biomasa.

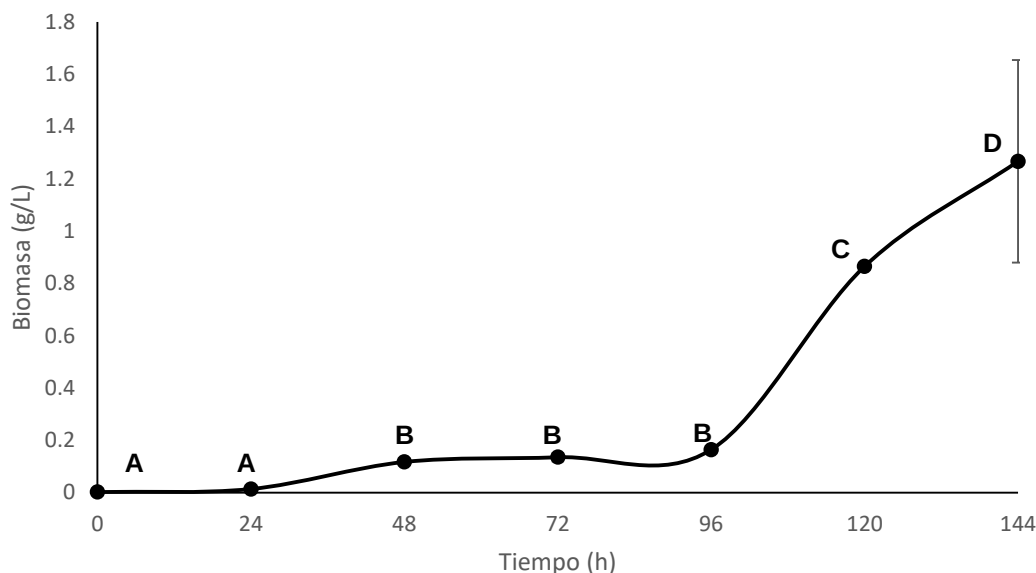


Figura 27. Producción de biomasa por *B. bassiana* en medio Czapeck con glucosa 4%. Las letras indican grupos distintos de acuerdo a una prueba ANOVA un solo factor (agrupación por Método de Tukey, $\alpha= 0.05$)

La biomasa producida en medio Czapeck glucosa es baja comparada con lo reportado por Azamar-Jimenez, (2016) quien obtuvo una producción de 120 g/L a las 72h empleando medio Sabouraud. No es sino hasta el período entre las 96 y 144 horas que comenzó a haber un incremento significativo en la producción de la misma llegando a un máximo de 1.267 g/L (Figura 27). La baja producción de biomasa y la reducida expresión de proteína puede estar relacionada a la relación C:N de los sustratos empleados y a la oxigenación en el medio. La similitud en el comportamiento de la expresión de las endoquitinasas y las NHasas indica que ambas mantuvieron una expresión paralela una con otra. Aunado a lo mencionado sobre la expresión de estas enzimas como respuesta natural del hongo en su búsqueda e identificación de sustratos en su entorno, es posible que las EQasas detectadas durante la fermentación, desempeñen un papel en el desarrollo fisiológico del hongo, degradando las hifas viejas, y las NHasas eran secretadas con el propósito de hidrolizar los quitinolíposacáridos resultantes de este proceso.

9. Conclusiones

Del análisis bioinformático realizado, se hallaron los 8 genes codificantes para CLPs reportados por Xao *et al* (2012) para *Beauveria bassiana*. Tras realizar multialineamientos y estudiar la presencia de dominios estructurales conservados característicos de la familia GH18, se determinó que los genes BbCLP6 y BbCLP8 no forman parte de la familia de CLPs en *Beauveria bassiana* debido a que no presentan las características propias de dichas proteínas, tales como la presencia del dominio estructural TIM-Barrel. Este hecho también se reflejó en la construcción de árboles filogenéticos, donde este par de genes siempre quedó agrupado en un mismo clado distante de las demás CLPs estudiadas. La búsqueda de sitios de reconocimiento de carbohidratos en estas 2 secuencias fue negativa, por lo que se considera tampoco podrían ser catalogadas como lectinas.

Los valores de actividad enzimática determinados para cutícula de camarón fueron dos veces mayores a los determinados para quitina comercial. Esta diferencia puede atribuirse a los diferentes tratamientos que ambos sustratos recibieron y las consecuencias de los mismos. El tratamiento al que se sometió la quitina comercial pudo ser más agresivo presentándose modificaciones estructurales en las cadenas quitinosas superficiales de la cutícula dificultando el reconocimiento del sustrato por parte del organismo. En base a los porcentajes de proteína residual reportados por Jiménez-Alejandro en el 2016, se asume una relación de la actividad volumétrica con la relación C:N, a menor valor para la relación C:N del sustrato, mayor la actividad detectada, mientras no se llegue a la ausencia total de N en el sustrato.

La comparación de los resultados de proteína soluble con los de actividad quitinasa indica que la expresión de esas enzimas no fue prioritaria aunque se reafirmó su carácter constitutivo.

10. Perspectivas

El estudio realizado en este trabajo permite tener un mayor conocimiento sobre las posibles CLPs halladas en *Beauveria bassiana*. Siendo éste un HEP de relevancia comercial dado su extenso uso dentro del control biológico de plagas, podría resultar interesante estudiar a futuro la expresión de esta familia de proteínas durante la fermentación líquida. Esto principalmente por las posibles implicaciones de sus homólogas en mamíferos en padecimientos inflamatorios como asma, enfermedad de Crohn, osteoartritis, etc.

Debido a la evidencia de heterogeneidad en la cutícula como consecuencia de un contacto discontinuo por parte de ésta con la solución de tetraborato se recomienda reconsiderar y replantear la metodología de la desproteínización.

Para complementar el conocimiento de las CLPs en *Beauveria bassiana* se recomienda considerar lo siguiente en trabajos futuros:

- Caracterizar la cutícula de camarón tratada y la quitina comercial.
- Verificar si existe adhesión del inóculo a las partículas quitinosas suspendidas en el medio durante la fermentación.
- Evaluar la expresión de los genes correspondientes a las CLPs estudiadas en este trabajo, empleando técnicas cuantitativas como qPCR.
- Detectar la actividad lectina presente en los extractos enzimáticos de *Beauveria bassiana* provenientes de fermentaciones líquidas empleando sustratos quitinosos como fuente de carbono y determinar la afinidad de las lectinas presentes a diversos carbohidratos incluyendo NAG, quitobiosa y quitin-oligosacáridos para identificar posibles CLPs. Se recomienda considerar los puntos correspondientes del tercer al quinto día para estas determinaciones.
- Purificar las posibles CLPs que logren detectarse; secuenciar y comparar con las proteínas codificadas en los genes ya estudiados.

11. Referencias

1. Ang, A.S.W., Cheung, R.C., Dan, X., Chan, Y.S., Pan, W., Ng, T., 2013. Purification and Characterization of a Glucosamine-Binding Antifungal Lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. Chinese Pinto Beans with Antiproliferative Activity Towards Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(2), 672-686.
2. Arakane, Y., Muthukrishnan, S. 2010. Insect chitinase and chitinase like proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(2), 201-216.
3. Azamar Jimenez I.J., 2016. Caracterización de los perfiles enzimáticos de *Beauveria bassiana* 885.2 en fermentación líquida utilizando chapulín como inductor, Tesis de licenciatura. Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, Oaxaca. Mexico.
4. Ballesteros-Torres J.M., 2013. Factores nutricionales que afectan la actividad insecticida de *Beauveria bassiana* (BALSAMO) *Vuillemin* contra *Periplaneta americana* L. y la respuesta inmune del insecto. Tesis de posgrado. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas.
5. Bigg, H., Wait, R., Rowan, A., Cawston, T., 2006. The Mammalian Chitinase-like Lectin, YKL-40, Binds Specifically to Type I Collagen and Modulates the Rate of Type I Collagen Fibril Formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 21082-21095.
6. Bucolo, C., Musumeci, M., Musumeci, S., & Drago, F., 2011. Acidic Mammalian Chitinase and the Eye: Implications for Ocular Inflammatory Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 2, 43.
7. Dalal, P., Aronson, N., Madura, J., 2007. Family 18 Chitolectins: Comparison of MGP40 and HUMGP39. *Biochem Biophys Res Commun*. 359(2): 221–226.
8. Davies, G., Henrissat, B., 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853-859.
9. Dmitrenko V.V., Avdieiev S.S., Areshkov P.O., Balysnka O.V., Bukreieva T.V., Stephanenco A.A., Chausovskii T.I., Kavsan V.M., 2013. From reverse transcription to brain tumors. *Biopolymers and Cells*. Vol. 29. N 3. P. 221–233
10. Dreyfuss, J.L., Regatieri, C.V., Jarrouge, T.R., Cavaleiro, R.P., Sampaio, L.O., Nader, H.B., 2009. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 81(3): 409-429
11. Duo-Chuang, L., 2006. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*, 161(6), Junio 345- 360.
12. Escobar-Chaparro X.B., 2017. Producción, purificación, caracterización y determinación del mecanismo hidrolítico de extractos enzimáticos con actividad N-acetilhexosaminidasa de *Beauveria bassiana* y *Penicillium sp.* utilizando

- chapulín y camarón como fuentes de carbono. Tesis de maestría. Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Oaxaca. México.
13. Eurich, K., Segawa, M., Toei-Shimizu, S., & Mizoguchi, E., 2009. Potential role of chitinase 3-like-1 in inflammation-associated carcinogenic changes of epithelial cells. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 15(42), 5249–5259.
 14. Freed, D. L. J., 1999. Do dietary lectins cause disease?: The evidence is suggestive—and raises interesting possibilities for treatment . *BMJ : British Medical Journal*, 318(7190), 1023–1024.
 15. Gallegos, B., Martínez, R., Pérez, R., Pina, M., Pérez, E., Hernández, P., 2014. Lectins in human pathogenic fungi. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31(1):72–75
 16. Gonzalo, M., 2012. Producción de quitinasas y proteasas de *Verticillium fungicola* y su evaluación en la hidrólisis de quitina para la producción de quitin-oligómeros. Tesis de maestría. Universidad Simón Bolívar.
 17. Goñi Ramos, O., 2010. Aislamiento, caracterización y funcionalidad de quitinasas y 1,3- β -glucanasas inducidas diferencialmente en frutos de “annona cherimola” mill. por bajas temperaturas y elevadas concentraciones de CO₂. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid.
 18. Gupta G.S., 2012. Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications. ISBN: 978-3-7091-1064-5 (Print) 978-3-7091-1065-2 (Online).
 19. Hakala, B.E., White, C., Recklies, A.D., 1993 Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(34), 25803-25810.
 20. Hartl, L., Zach, S., & Seidl-Seiboth, V., 2012. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(2), 533–543.
 21. Hernandez A.A., 2016. Evaluación de los hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*) para el control de hormigas cortadoras de hojas (*Atta* spp) en eucalipto; Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla. Universidad Rafael Landívar. Facultad de ciencias ambientales y agrícolas.
 22. Houston, D., Recklies, A., Krupa, J., van Aalten, D., 2003. Structure and Ligand-induced Conformational Change of the 39-kDa Glycoprotein from Human Articular Chondrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 30206-30212.
 23. Hu, B., Trinh, K., Figueira, W., Price, P., 1996. Isolation and Sequence of a Novel Human Chondrocyte Protein Related to Mammalian Members of the Chitinase Protein Family. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(32), 19415-19420.
 24. Jiménez-Alejandro, S.E., 2009. Producción de quitinasas en cultivo líquido con hongos entomo y fitopatógenos, utilizando tres fuentes de carbono como inductor. Tesis de maestría. Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Oaxaca. México.

25. Kawada, M., Hachiya, Y., Arihiro, A., Mizoguchi, E., 2007. Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions. *The Keio Journal of Medicine*, 56(1), 21-27.
26. Kitajima, S., Kamei, K., Taketani, S., Yamaguchi, M., Kawai, F., Komatsu, A., & Inukai, Y., 2010. Two chitinase-like proteins abundantly accumulated in latex of mulberry show insecticidal activity. *BMC Biochemistry*, 11, 6.
27. Lam, S.K., Ng, T.B., 2010. Acaconin, a chitinase-like antifungal protein with cytotoxic and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities from *Acacia confusa* sedes. *Acta Biochimica Polonica*, 57(3), 299-304.
28. Lee, C.G., Da Silva, C.A., Dela Cruz, C.S., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M., He, C., Takyar, S., Elias, J.A., 2013. Role of Chitin and Chitinase/Chitinase-Like Proteins in Inflammation, Tissue Remodeling, and Injury. *Annu Rev Physiol*. 2011 ; 73
29. Lee, I.-A., Kamba, A., Low, D., & Mizoguchi, E., 2014. Novel methylxanthine derivative-mediated anti-inflammatory effects in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(5), 1127–1138.
30. Lershov, A., Odynets, K., Kornelyuk, A., Kavsan, V., 2010. Homology modeling of 3D structure of human chitinase-like protein CHI3L2. *Central European Journal of Biology*, 5(4), 407-420.
31. Loc, N. H., Quang, H. T., Hung, N. B., Huy, N. D., Phuong, T. T. B., & Ha, T. T. T. 2011. *Trichoderma asperellum* Chi42 genes encode chitinase *Mycobiology*, 39(3), 182–186.
32. Meng, G., Zhao, Y., Bai, X., Liu, Y., Green, T. J., Luo, M., & Zheng, X., 2010. Structure of Human Stabilin-1 Interacting Chitinase-like Protein (SI-CLP) Reveals a Saccharide-binding Cleft with Lower Sugar-binding Selectivity. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(51), 39898–39904.
33. Montesinos-Matías R., 2012. Relación de la inducción/represión de enzimas hidrolíticas con la infectividad en cepas de *Beauveria bassiana* resistentes a 2-desoxi-D-glucosa. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de Salud, México, D.F.
34. Montgomery, M. T., & Kirchman, D. L., 1993. Role of Chitin-Binding Proteins in the Specific Attachment of the Marine Bacterium *Vibrio harveyi* to Chitin. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(2), 373–379.
35. Ohno, M., Kida, Y., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Oyama, F., 2014. Establishment of a quantitative PCR system for discriminating chitinase-like proteins: catalytically inactive breast regression protein-39 and Ym1 are constitutive genes in mouse lung. *BMC Molecular Biology*, <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/15/23>.
36. Qureshi, A.M., Hannigan, A., Campbell, D., Nixon, C., Wilson, J.B., 2011. Chitinase-like proteins are autoantigens in a model of inflammation-promoted incipient neoplasia. *Genes Cancer*, 2(1), 74-87

37. Ramírez, C.C., de la Fuente, N., Pacheco, R.D., Ortiz-Rodríguez, T., Barboza, J.E. 2011. Potencial de los quito-oligosacáridos generados de quitina y quitosana. *Acta Universitaria*, 21(3), Septiembre-Diciembre 14-23.
38. Ramírez-Coutiño, L.P., 2009. Producción de quitinasas y proteasas de *Verticillium fungicola* y su evaluación en la hidrólisis de quitina para la producción de quitin-oligómeros. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Itztapalapa.
39. Rao, F., Andersen, O., Vora, K.A., DeMartino, J.A., van Aalten, D.M.F., 2005. Methylxanthine Drugs Are Chitinase Inhibitors: Investigation of Inhibition and Binding Modes. *Chemistry & Biology*, 12(9), September 2005, Pages 973–980.
40. Rejman, J. J. and Hurley, W. L. (1988) Isolation and characterization of a novel 39 kilodalton whey protein from bovine mammary secretions collected during the nonlactating period. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 329–334 Schimpl, M., Rush, C. L., Betou, M., Eggleston, I. M., Recklies, A. D., & Van Aalten, D. M. F., 2012. Human YKL-39 is a pseudo-chitinase with retained chito oligosaccharide-binding properties. *The Biochemical Journal*, 446(1), 149–157.
41. Robledo-Monterrubio, M., Alatorre-Rosas R, Viniegra-González G., Loera O., 2009. Selection of improved *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. strains based on 2-deoxy-D-glucose resistance and physiological analysis. *Journal of Invertebrate Pathology* [20 May 2009, 101(3):222-227]
42. Schultz, N. A., & Johansen, J. S., 2010. YKL-40—A Protein in the Field of Translational Medicine: A Role as a Biomarker in Cancer Patients? *Cancers*, 2(3), 1453–1491.
43. Schumann, U., Smith, N. A., & Wang, M.-B., 2013. A fast and efficient method for preparation of high-quality RNA from fungal mycelia. *BMC Research Notes*, 6, 71.
44. Seidl, V., 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews*, 22(1), 36-42,
45. Stewart, I. J., Bebington, C. R., & Mukhtar, D. D. Y., 2000. Lectin binding characteristics of mouse placental cells. *Journal of Anatomy*, 196(Pt 3), 371–378.
46. Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Nikaidou, N., Watanabe, T., 1998. Chitin Binding Protein (CBP21) in the Culture Supernatant of *Serratia marcescens* 2170. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(1), 128-135.
47. Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
48. Van Damme, E.J.M., Nakamura, S., Hirabayashi, J., Rougé, P., Peumans, W. 2007. The *Sclerotinia sclerotiorum* agglutinin represents a novel family of fungal lectins remotely related to the *Clostridium botulinum* non-toxin haemagglutinin HA33/A. *Glycoconjugate Journal*, 24(2-3), 143-156.

49. Vetchinkina, E.P., Sokolov, O.I., Nikitina, V.E., 2008. Intracellular lectins of *Lentinus edodes* at various developmental stages of the fungus. *Mikrobiologiya*, 77(4), 496-501.
50. Wu, A. C., Lasky-Su, J., Rogers, C. A., Klanderman, B. J., & Litonjua, A. A., 2010. Fungal Exposure Modulates the Effect of Polymorphisms of Chitinases on Emergency Department Visits and Hospitalizations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(7), 884–889.
51. Xiao, G., Ying, S.-H., Zheng, P., Wang, Z.-L., Zhang, S., Xie, X.-Q., Feng, M.-G. 2012. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports*, 2, 483.

Anexos

Anexo 1

Secuencia de aminoácidos:

BbCLP1

MSAFRLWLQA AVAAIGILPVEGQTRQAASPGYIGRDSACPTRCSVSGPNPAKWPMYHHFEQFHCKET
LFYQFALYDAVDDPD TNHHIYACSSYGPDWENLAKFPNIQPLVSNANATYEIGWDSDEGGGVACELRSL
SQTHQYLSSGYATNNERAAFLYGQTGKALIGLRIGKGLSARVGALALTMLQEHLANTDVAASTLAIQLCQ
STYGRDHTFGLVVT SRGGFSSVQEKLRSWENGQCVQLSHSKRITGPAYFTTPLEQALNYTNTTGSWNQ
TTLRGVKVANRATGECRTVQVKYLEGCPELAVKCGVSGYDFERYNPGNDFCSTLVPQGHVCCSAGELP
DYRKPKNPDGSKSWPVHGGDTCASIAAENGITMEEIVVFNENTWGWNGCGSNMWEGTLICLTGKTPP
MPAPIANTVCGPQVPGTRPPTDGTDL SKLNPCPLNACCDWGWQC GTTAEFCIDTSTGAPGTAKKGTNG
CISNCGTDLARGDAPETFRKIGYFEGYNLARKCLNVDARLIDTSQYTHLHFGFGSISADYEIDMPDKLTEY
EFESFKRLTG VKRILSFGGWEFSTSPSTYNIFRQGVTPANRLK LATNIANYIKK HRLDGV DIDWEYPSAPDI
PNIPAGDKSEGYNYLAFLAVLKNLLPGRSVSIAAPASYWYLKGFPIAQMSKIIDYIVYMTYDLHGQNNQWSQ
PGCPSGMCLRS AVNLTETVEALVMITKAGVPSNKVVVGVT SYGRSFGMAKAGCYGPDCFYTG GPADSH
AKKGECTDTAGYISDAEIKAIINTPERVNHNF LDGTSNSNILVYDDTEWVSWMSPEVLNYRTKVYKAFNM
GGTSNWAIDLENYVD PPPGIGSWPAFVIKARQGNPDWDYGERHGNWTEIKCDDRSVADLRGLSPQSRW
NMMDASDAWNDAVQVYKSIDRKRN RIFSRISD TIHGPPQQSDCGVLLTWNNCETIQLCTDMVGSGTGPA
GYEIWNSFVLIREIYSSFYNALTAAGGTSITGEMAAFKTFAPVPPPKDDSLWLNILMDAVGLGSTLVAGPF
FNSANAATAANLKDTT MAMISGTTNIAKDLLAGKSPESNWTEDKQDLFAAYMAQTVDLWGASIEGSLYWL
FNGTDEAISALTEIISDGKLIAGANMNVPGPKDILQGSASDMKTNMARAFFSYAIPAVWTASGHHPFV VDS
GYACGTIDPLGIYMTVD TMSKTWGCYEDKYLVVPEGDAYKNVQNPTGPGTHKEKNKFSP PAGVQSLG
GDLFGGVTLSDLITGSVRTYKNNGNTNGAPPADPRHINAEDLMKQDVTT PGFIRLPVCSP EMAFRAWDG
PGGDSRLKTPNYPCVALKLPDRCGDSTFVDQTS GASPLVSDCEMIKLN LQNGDGHADHEVENAIGKQHQ
LDQYGSCKFQGVQGGKGN GNIDFHVGGQDIVDLIRDSIDRFGGSGRVGAKGRMKCDGT VKKQDVEWGLY

BbCLP2

MAPLWTRSTVLAASSLLLAAGASAEASRLAASPGYLN RDSCPERCAVVGHDP SDWYAYKGLEEFRTC
DRTMFYYFNLYDQVDDATQPHRVYACTSYGPDWGVDEVAEGEHQLVRRIGDGP FCHPRRSMMLAGRS
DGDDRAANGSMSASSSTSSHSSPSDVA AKYELGWWHNDGEPATVSIQSLSKQMRNYLANNQNLANNQ
NLANKTTMMFAQSGKATIGLYVGEDLNAKDIGTYALQGLESLHAGNIPSSSMALQNCQSHYDSEHIFGV
VATSNGTFSSIQKAMQ TWHSGSCLSF GDSLQSAGPAFFAKPLIVAGNDTASNSTASSASRRSTPVRLPA
RGECRAIKVQPNHGCPELAQDCGISPSDFTKYNPGKTFCSGLQPGMHVCCSSGTL PDYRPPKNSD GSC

ASVKVGGGDTCAGLAVANSLTQDELEGFNKNKTWGWSGCNPLFAETVICLSDGTPPMPATIANAVCGP
QVAGTKQPSDTKDIADLNPCPLNACCDIWGFCGVTKFCTDTNTGNPGTAKKGTNGCISNCGTDIKQDG
GPSEFRTIGYFEGYQFSSRQCLWQDARQIDGSKYTHLHFGFGDITPDFQISAGKPDSQYEFMNFKLVSG
GAKKIISFGGWDFSTSPSTYTIFREGVNPNNRDKLASNIAKFVEDNSLDGVDIDWEYPGAPDIPNIPPGSK
QDGINYLKFLVVLKSKLNGKSLSIAAPASFWYLGFPPIKRISQVVDYIVYMTYDLHGQWDSQNKNSQEGC
DDGMCLRSGVNLTTETKTALSMVTKAGVPSSKLAVGVTSYGRSFGMAQAGCYGPSCKYLGGPLDSQATK
GVCTNTGGYIADAEIYELMRDPKRVTKSYKDKSDSNILVYDNTQWVSYMDEDTLASRTKLYKGYNMGG
TTNWAIDLEEVSPPPPHSSSWSSFYEKMSTGGDPYQVGKRNGNWTNLKCSDPAVSGVRNLTAERWE
ALDCDDAWKDLINVWKTIDRPEGSLSFSELSATAHGPESKCGNLLDTSNCNSPLVCAQIEGPGTGPA
YEIWNSLVIVHEMYASYAHALTAAMAKSVNPALDDFLHKFAPVEPPPDNKWLLLLIDMVTLGASMVAGPF
FNSFLSKLPYFVVENALDNIKDTTMTVIGQSTTIAKDLLGSSGSDWTPDKQAEFSNYMGQTVTVWSKSL
ATGLSHLFRGQDGDIDTLWNIKGGKLIAGRRSKKSKRVIDAVDLLLSDSRDDGDLFDTRDLVDTRDLV
DTRDDGDAPKPGDDDYNTPELEASVSKAFFGYAIPALWSVSGAFPVVLDTGYACGKVDPKGYMTPDTM
HKTYACVDNKMYYLGSAGDAQYCYKPAVGCPCNCRDEKFTAPPGLDSLDKTSFGGVTLQDLVEGVS
TYKANGNSNKGKTPDATEGKTFDLFDQDIRTPGFISIPVCSPDMAYKAWRSWKNKPKDKQVGYPCIDP
K

BbCLP3

MASFISLATVASLLAVLPTSMAAFSPGSRNNAFSPGSLNNTFSPGSQKNIAIYWGQNSINQSGSPLAQKR
LGYYCENTDINVIPVAFMNGITPAITNFANAGDNCTAFADNKDVLNCPQIEEDIKTCQDKHSTIVLSLGG
TYSQGGWSSPSEAEAAAQTVWDMFGPVQSGNKVNRPFSGSAVVDGFDGDFESTTNNLPAFGAKLRSLM
DGAGGKKFYLAAPQCVFPDAAVGAALDAVAFDFVMIQFYNNWCGVSNFKENATTQDAFNFDVWDKW
AHGSKNPDKVLLLGIPAAPGAGGGYTEGSKLKAAINYSQKFSSFGGVMMWDMSQLYSNSGYLKEVLSDI
AGGPTTTVPPGTTTTSSPCTTSSPPPSGGLDKYAQCGGNGYNGPTVCKAPYTCVKLSDWWSSCK

BbCLP4

MAPFLQTSALLPLLASTMVSASPLAPRADTCATKGRPAGKVLQGYWENWDGAKNGVHPPFGWTPIQN
PDIRKHGYNVINAAPFPIIQPDGTALWEDGMDTGKVASPADMCEAKAAGATILMSIGGATAAIDLSSSAVA
DKFVSTIVPILKKYNFDGIDIDIESGLTSGSNINTLSTSQTNLIRIIDGVLAQMPANFGLTMAPETAYVTGGTIT
YGSIWGSYLPPIKKYLDNGLRWLNMQYYNGEMYGCSGDSHKAGTVEGFVAQTDCLNKGLTIQGVITIP
YDKQVPGLPAQPGAGGGHMSPSNVAQVLSHYKGALKGLMTWSLWWDGSKNWTFGDNVKGTLGTA

BbCLP5

MKLSILSFTTLGVASVMAGSASVCPSNNTHATGAALQNIIDYKKGDHQLMAGYFRSWRDKASSTANKVS
MLDLPDCLDIALVFPQGDEPAAFWTALKDTYVPALHTRGTVVRSVGIAQLINSTWANTPAGWQGLAADL
LKKVDDYGLDGLDIDVEQSLSAAQLQATGVFNALSKKLGPKSGTGKLLIFDTNGDGSQPLWRNVYSTVS
YVLIQSYGRSPSSLQNTYNSFKSYISSKQYLIGFSFYEEENGANWGDTSPTSSRAWQYAKWQPSGATKG
GIFSIAIDRDGVPIGDNRLQPTDFTWTRKLISAMNP

BbCLP6

MLASFIGLIATLTASAI AEDLIFRGKGF GTYYYDVRQHQT CGTDFSFQNQGGVMCNWNSVLSLNDINTN
NLVAMNNLLKKTQAGRTTYCGKR VIVTVNGVTSSTPFFIGDGCERCARGSDSVWNP GAAAGLDFSFTAL
DTLSPLACSNGHIDISFDIVNETLYHFDV

BbCLP7

MTWKDVMSASAI DSLAVRRRKHNVC PAAVDFASATSKCIKSPLNTGVLLCKELQEDTKTCQAKGRTVLIS
MGGGNSPSPNWVDAADA EKSAQLIWD MFGPVTSSKVDRPFGTSV VNGFDLDFDTGQPSFCFC

BbCLP8

MKINISILGALALAVGASAKCVHTRIPSRSTSTSTSSTTATSSISSTDDTTDDTTDDTTDDTTDSNNSTSNIL
YKKGFGFTYYYDVEQLQACGADFTTQNVGNVMCGWDSVKTLNDIDSNNLVAMNSLLLKTAEGRAKYCG
KRIIVTVDG VKSDIPFFVGDGCERCARGDETQWQSGGAAGLDFSSTLNKLSPLACQDGHVAVEYEIVDE
TLYHFDTN

Secuencia de nucleótidos:

BbCLP1

ATGGCACCTCTCTGGACAAGGTCTACCGTCTTGGCGGCTAGCAGTCTACTGCTTGCTGCTGGAGCA
TCTGCTCAGGAGGCCTCGAGACTCGCTGCCAGCCAGGCTATCTCAACAGAGACTCTTGCCCCGAA
CGTTGTGCCGTCGTGGGACACGACCCCTCGGACTGGTATGCGTACAAGGGCCTCGAGGAGTTTCG
CACTTGCGACAGGACCATGTTCTACTACTTCAATCTCTACGACCAAGTTGACGATGCAACTCAACCG
CATCGCGTATATGCCTGTACTTCGTACGGGCCTGACTGGGGCGTCGACGAGGTGGCTGAAGGCGA
GCATCAACTGGTTTCGACGTATCGGTGATGGGCCTTTCTGCCATCCTCGTAGGTCAATGATGTTGGCT
GGTCGATCGGATGGCGATGATCGCGCCGCTAATGGGTCGATGTCGGCATCTTCATCTACCTCCTCG
CACTCGTCCCCATCGGATGTGCGCCGCAAGTACGAATTGGGATGGTGGCACAATGATGGAGAACCC
GCTACCGTTTCCATCCAGAGTCTTTCCAAACAGATGCGCAACTACCTGGCCAACAACCAAAACCTGG
CCAACAACCAAAACCTGGCCAACAAGACAACCTATGATGTTTGCCCAAGTCTGGCAAAGCCACCATCGG
TCTCTACGTTGGCGAGGATCTCAACGCCAAGGACATTGGCACGTATGCTCTCCAAGGCCTGGAAAG
CGGCCTCCACGCCGGCAACATTCCCAGCAGCAGCATGGCACTGCAGAACTGCCAGTCGCACTATGA
CAGTGAGCACATTTTTGGTGTCGTTGCCACAAGCAATGGTACCTTTTCGTCAATTCAAAGGCCATGC
AGACGTGGCACAGCGGCAGCTGCCTGTCTTTGGCGACTCCCTCCAATCCGCTGGCCCGGCATTCT
TTGCCAAGCCTCTCATCGTGGCTGGCAACGACACTGCCTCCAATTCTACGGCTTCTTCGGCTAGCAG
GAGATCGACGCCAGTCCGGCTGCCCCGCCGCGGCGAGTGCCGGGCCATCAAGGTCCAGCCGAAC
CATGGATGCCCCGAGCTGGCCCAAGACTGCGGCATCTCCCCCTCCGACTTTACAAAGTACAACCCA
GGCAAGACCTTTTGCAGTGGACTCCAGCCGGGGATGCACGTTTGCTGTTCCCTCGGGAACGCTGCCC
GACTACCGACCCAAGAAGAACTCTGACGGATCATGCGCTTCTGTAAAGGTCGGAGGCGGCGACACC
TGCGCCGGCCTTGACGTCGCCAACAGCCTCACGCAAGATGAGCTGGAAGGTTTCAACAAGAACAAG
ACGTGGGGTTGGAGTGGCTGCAATCCTCTCTTTGCCGAGACGGTCATTTGCCTGAGTGACGGCAGC
CCGCCCATGCCAGCGACCATTGCCAACGCCGTGTGCGGCCCTCAGGTCGCGGGGCACTAAGCAGCC
GAGCGATACCAAGGACATTGCCGACCTCAACCCTTGCCCCCTCAATGCCTGCTGCGATATCTGGGG
TTTTTGTTGTTACCAAGGAATTCTGCACTGATACCAAACTGGCAATCCGGGCACGGCCAAAAAG
GGCACAATGGCTGCATTTCCAACGTGGAACCGATATTAACAGGATGGTGGCCCGTCCGAGTTCC

GCACCATTGGTTATTTTCGAGGGATATCAGTTCAGCAGTCGCCAGTGTCTCTGGCAAGATGCCAGGCA
GATTGACGGCTCCAAATATACGCATCTTCACTTTGGATTGGCGACATTACACCCGACTTTTCAGATTT
CAGCCGGCAAGCCTGACAGCCAATACGAGTTTATGAACTTTAAGCTTGTGTCGGGAGGCGCCAAGA
AGATTATCTCCTTTGGTGGCTGGGACTTTTTCGACAAGCCCCAGCACTTACACCATCTTCCGCGAAGG
TGTCATCCCAACAATCGCGACAAGCTGGCCTCCAATATCGCCAAATTCGTGGAGGATAATAGCCTG
GACGGTGTGACATTGACTGGGAGTACCCCGGCGCTCCTGATATTCCCAACATTCCTCCCGGGTCC
AAGCAGGATGGTATCAACTACCTCAAGTTTCTGGTAGTTCTCAAGTCCAAGCTCAATGGCAAATCGCT
TTCCATTGCCGCCCCGGCGTCATTCTGGTACCTTAAGGGTTTTCCAATCAAGCGGATTTCTCAGGTA
GTCGATTACATTGTCTATATGACATATGATCTGCACGGCCAATGGGATTCTCAGAACAAGAACTCGCA
GGAAGGCTGCGATGATGGCATGTGCCTACGTAGCGGCGTCAACCTGACGGAGACAAAGACTGCGC
TATCCATGGTTACTAAAGCCGGTGTGCCCTCGAGCAAGCTCGCCGTCGGCGTGACGAGCTATGGGC
GATCCTTTGGCATGGCCCAGGCTGGGTGCTACGGCCCTTCGTGCAAGTACCTGGGCGGTCTCTTG
ACTCTCAGGCCACAAAGGGCGTCTGTACCAATACGGGTGGCTACATTGCTGACGCAGAGATTTACG
AATTGATGAGAGACCCTAAGCGCGTCACCAAGTCTTACAAGGACAAGGACAGTGACAGCAACATTCT
CGTCTACGACAACACCCAGTGGGTGAGTTACATGGACGAGGACACACTCGCATCACGAACCAAGCT
GTACAAGGGCTACAACATGGGCGGCACGACCAACTGGGCCATTGACCTAGAAGAAGTAAGCCCCGCC
GCCGCCTCACTCTAGCAGCTGGAGCAGCTTCTACGAGAAGATGAGCACCGGCGGAGATCCCTACCA
GGTGGGCAAGCGCAACGGCAACTGGACCAATCTCAAGTGCTCCGACCCGGCCGTCTCGGGCGTGC
GCAACCTGACGGCGGCGGAGCGCTGGGAGGCGCTCGACTGCGACGACGCGTGGAAGGACCTGAT
CAACGTCTGGAAGACCATTGACCGTCCCGAGGGCAGCCTGAGCTTTTCCGAGTCACTGTCGGCGAC
GGCCCACGGCCCGGAGCTTTCCAAGTGCGGCAACCTCTTGACACGAGCAACTGCAACTCGCCGC
TTGTGTGCGCGCAGATTGAAGGACCGGGCACGGGGCCCGCGGCGTATGAGATTTGGAAGTCTGCTC
GTCATTGTGCAGAAATGTACGCGAGCTACGCGCACGCGCTGACGGCTGCCATGGCCAAGTCGGTC
AACCCGGCGCTCGACGACTTTTTGCACAAGTTTGCACCCGTGCAACCGCCGCGGACAATAAGTGG
CTGCTGCTGCTGATTGACATGGTGACGCTGGGCGCCAGCATGGTGGCGGGGCCCTTTTTCAACTCG
TTTCTGTCCAAGCTTCCGTACTTTGTCGTCAATGAGAATGCGCTCGACAACATCAAGGACACGACCA
TGACGGTGATTGGCCAGAGCACCACATTGCAAAGGACCTGCTGGGCTCGTCGGGTAGCGACTGG
ACGCCGGAACAAGCAGGCCGAGTTTTCAAACCTACATGGGCCAGACCGTCACCGTCTGGAGCAAGTCG
CTGGCCACGGGTCTGAGCCACCTGTTTCGCGGCCAGGATGGCGATATTGACACGCTCTGGAATATC
ATCAAGGGGGGAAAGCTTATTGCGGGCCGTGCGAGCAAAAAGTCTAAGCGCGACGTCATTGACGCC
GTCGACCTCCTCCTCGACAGTGACAGCCGTGATGACGGTGACCTTTTCGACACTCGCGATCTTGTA
ACACCCGCGACCTTGTGACACTCGCGACGACGGCGACGCGCCAAAGCCCGGCGACGACGACTAC
AACACGCCCCGAGCTCGAAGCCAGCGTCAGCAAAGCTTTCTTTGGCTACGCCATCCCCGCACTCTGG
AGCGTCTCGGGCGCCTTCCCCGTGTCCTCGACACGGGCTACGCGTGCGGCAAGGTCGACCCCAT
CAAGGGCTACATGACGCCCCGACACGATGCACAAGACGTACGCGTGCGTCGACAACAAAATGTACTA
CCTGGGCAGCGCAAAGGGCGACGCGCAGTACTGCTACAAGCCCGCCGTGGGGTGCCCGGACAAC
GCCGGGACGAGAAGTTTACGGCGCCCGCGGGGCTGGACTCGCTGGACAAGACGAGCTTTGGGGG
GGTGACGCTGCAAGATCTTGTGAGGGGTCTGTTGCGACATACAAGGCCAACGGCAACTCCAACAA
GGGCAAGACGCCCCGACGCGACCGAAGGCAAGACGTTTGACAGCCTGTTTGACCAGGACATTGGA
CGCCTGGCTTCATCAGCATTCCCGTGTGACGCCCGGACATGGCCTACAAGGCGTGAGAGAGCTGG
AAGAACAAGCCCGACAAGGACCAGGTCGGCTACCCGTGCATTGACCCCAAGTAA

BbCLP2

ATGTCTGCGTTTAGATTGCTTTGGCTTCAAGCGGCTGTGGCCGCCATTGGCATCCTACCTGTTGAAG
GCCAGACTCGCCAAGCAGCCAGTCCAGGCTATATTGGAAGAGACTCTGCCTGTCCCACTCGATGCA
GCGTATCCGGTCCGAATCCCGCAAAATGGCCCATGTATCACCACCTTTGAACAATTTTATTCTTGAAA
GAAACTTTATTCTACCAGTTTGCCCTATACGATGCTGTGACGATCCAGACACCAATCACCACATCTA
TGCGTGCTCATCCTATGGCCCCGACTGGGAGAATCTTGCCAAATTTCTAATATCCAGCCACTGGTT
TCTAATGCTAATGCCACTTATGAAATCGGCTGGGATTCTGACGAAGGAGGGGGAGTTGCGTGTGAAC
TCCGATCCTTATTATCACAAACGCATCAATATCTCTCGAGCGGTTACGCAACCAATAATGAAAGGGCT
GCATTCCTTTACGGTCAAACAGGAAAAGCTCTCATTGGCCTCCGTATCGGAAAGGGTTTGAAAGTG
CCCGCGTGGGTGCCTTGGCTCTCACGATGCTGCAAGAACTTGGCCAACACTGACGTAGCCGCCA
GTACGTTGGCTATCCAGCTCTGTACGTCGACCTACGGTCGTGACCATACTTTGGACTTGTTGTTAC
AAGCCGAGGTGGATTCTCGAGCGTGCAGGAGAAGCTTAGGTCCTGGGAAAATGGCCAATGCGTACA
ATTGAGTCACTCCAAGCGCATCACGGGTCCCGCCTACTTCACAACTCCTCTTGAACAGGCACTGAAT
TATACAAACACGACTGGAAGCTGGAATCAAACACTTTTGC GCGGTGTCAAAGTCGGAATCGAGCAA
CAGGCGAATGCCGCACGGTTCAGGTCAAGTATCTCGAAGGCTGTCCAGAGCTCGCCGTCAAGTGCG
GCGTCTCTGGTTACGATTTTCGAGAGATACAACCCCGGAAACGACTTTTGCAGCACCTTGTTCCGGG
ACAGCACGTCTGCTGCTCTGCGGGCGAGCTGCCCCGATTACCGGCCGAAGCCGAACCCAGATGGCT
CCTGCAAGTCATGGCCGGTCCACGGCGGTGATACCTGCGCCAGTATTGCTGCAGAGAATGGCATT
CCATGGAAGAAATCGTCGTCTTCAACGAAAACACATGGGGCTGGAACGGATGCGGCAGCAACATGT
GGGAGGGCACGCTCATTTGCTTGACCAAGGGCACGCCACCGATGCCGGCACCAATCGCCAACACG
GTCTGCGGTCCGCAAGTCCCCGGTACGAGGCCGCCGACTGACGGTACGGATCTTTCAAAGCTAAAC
CCGTGCCCATTTGAATGCATGCTGCGATGTTTGGGGCCAGTGCGGTACTACTGCTGAGTTTTGTATCG
ACACCAGCACTGGCGCGCCGGGGACAGCGAAGAAGGGCACAAATGGGTGCATCTCAAACCTGCGGC
ACTGATCTGGCCCGCGGCGATGCGCCAGAAACATTTGCAAGATTGGCTATTTTGAAGGATACAACC
TTGCACGCAAGTGTCTCAATGTGGATGCCCGGCTGATTGATACGTCTCAATACGCATCTGCACTT
TGGATTGCGCAGCATCAGCGCCGACTACGAGATTGATATGCCTGACAACTCACAGAGTACGAGTTT
GAAAGTTTCAAGCGCTTGACGGGTGTCAAGAGAATCCTGTCAATTTGGTGGCTGGGAATTCTCGACGA
GCCAAGCACTTACAACATCTTCCGTCAAGGTGTCACGCCCGCGAACC GCCTTAAGCTGGCCACAA
ACATTGCCAACTACATCAAGAAGCATCGCCTTGATGGTGTTGATATTGACTGGGAGTATCCTTCTGCC
CCAGATATTCCCAACATTCCGGCCGGCGACAAATCCGAGGGCTACAACCTATCTTGCTTTCTCGCCG
TGCTGAAGAATCTTCTTCTGACGATCAGTGTCTATCGCGGCACCTGCCTCATATTGGTACCTGAA
GGGCTTCCCAATTGCCCAAATGAGCAAAATCATCGACTACATCGTTTACATGACCTACGACTTACACG
GTCAAAATCAGTGGTGCAGCCAGGTTGCCCGTCAGGCATGTGTCTACGCAGCGCTGTCAATCTAA
CCGAAACAGTCGAGGCCTTGGTCATGATTACGAAAGCTGGCGTACCTTCCAACAAGGTTGTTGTCGG
GGTCACTAGCTACGGACGATCCTTTGGCATGGCCAAGGCAGGATGCTACGGTCCAGACTGCTTCTA
CACTGGCGGGCCGGCCGATTCTCATGCCAAAAAGGGCGAGTGACCCGACACTGCTGGGTACATCTC
AGACGCCGAGATCAAGGCCATCATCAACACTCCAGAGCGCGTCAACCACAATTTCTCGACGGCAC
CAGTAACAGCAACATACTGGTGATGACACGGAGTGGGTATCATGGATGAGTCCCGAAGTCTTG
AACTACAGGACAAAAGTCTACAAGGCGTTCAACATGGGCGGCACGTCCAACCTGGGCCATTGACTTG
GAAAACACTACGTGGACCCTCCTCCCGGCATCGGGAGCTGGCCCGCGTTTGTTATCAAGGCGAGACAA
GGAAATGATCCATGGGACTATGGAGAGAGGCATGGAACTGGACCGAGATCAAATGCGACGACCGC
AGCGTGGCTGACCTACGCGGGTTGAGTCCCCAGTCACGTTGGAACATGATGGACGCTTCCGACGCC
TGGAATGACGCCGTTCAAGTATACAAGTCTATTGACAGGAAAAGAAATCGCATCTTTTCGCGATCCAT
CTCGGACACGATCCATGGCCCCCAACAGTCGGATTGTGGAGTTTTACTTACATGGAACAACTGCGAG
ACTATTCAACTCTGTACTGACATGGTCGGCTCTGGGACTGGACCGGCTGGCTATGAGATTTGGAATA
GCTTTGTCTCATCCGTGAAATATACTCCTCCTTTTACAACGCGCTCACCGCCGCTGGTGGTACATC
CATCACAGGTGAAATGGCAGCATTTGTCAAGACGTTTGCTCCTGTCCCGCCACCAAAGGATGACTCG
CTGTGGCTCAATATTTTGATGGATGCTGTGCGCCTTGGGTCGACGTTGGTTGCTGGCCCCCTTCTTCA

ACTCTGCCAATGCGGCAACGGCTGCCAACTTGAAGGACACGACCATGGCAATGATCTCTGGCACAA
CAAACATTGCAAAGGACCTTCTAGCTGGCAAATCACCAGAAAGCAATTGGACCGAAGATAAGCAAGA
TTTGTTTGGCGGTACATGGCCCAGACGGTCGATTTATGGGGCGCTTCAATTGAAGGCTCACTGTAT
TGGCTGTTCAATGGTACCGATGAGGCTATCAGTGCCTTGACCGAAATCATTTCCGATGGCAAGCTGA
TTGCCGGCGCCAACATGAATGTGCCCCGGCCGAAAGACATATTGCAAGGGTCGGCGTCTGATATGA
AGACCAACATGGCAAGGGCCTTTTTCTCGTACGCGATTCTGCCGTTTGGACAGCCTCAGGGCATCA
CCCATTTCGTCGTCGATTTCGGGCTACGCGTGCGGGACAATCGATCCCCTCGGCATTTACATGACGGT
GGACACGATGAGCAAGACCTGGGGTTGCTACGAGGACAAGCTGTACTACCTGGTCGTTCCAGAAGG
CGATGCGTATAAAAACGTGCAGAACCCGACGGGGCCCTGGAACGCACAAGGAAAAAACAAGTTTTC
ACCTCCTGCTGGCGTGCAGTCCTTGGGTGGTGATTTATTTGGTGGGGTGACGTTGTCTGATCTCATC
ACTGGATCCGTCCGCACTTACAAGAACAATGGCAACACAAACGGCGCTCCTCCAGCGGACCCGAGA
CACATCAACGCGGAAGATCTCATGAAGCAAGACGTCACGACCCCCGGCTTCATTTCGTCTCCCCGTG
TGCAGTCCCGAGATGGCCTTCAGGGCGTGGGACGGCCCCGGCGGCGACTCGCGCCTCAAGACGC
CCAACTACCCGTGCGTCGCGCTCAAGCTGCCGGACCGCTGCGGGCGACTCGACCTTTGTCGACCAG
ACGAGCGGCGCGTCGCCGCTCGTGTCCGACTGCGAGATGATCATCAAGAACCTGCAAAACGGGGA
CGGCCACGCGGACCACGAGGTGGAACGCGATTGGCAAGCAGCACCAGCTGGACCAGTACGGGA
GCTGCAAGTTTGGCGTGCAGGGCAAGGGCAAGAATGGCAACATTGACTTTCACGTCGGCGGGCAG
GACATTGTGGATCTGATCCGCGACTCGATTGATCGGTTTGGCGGGAGCGGACGGGTAGGCGCCAA
GGGAAGGATGAAGTGCGACGGCACGGTGAAGAAGCAGGATGTTGAGTGGGGTTTATACTAA

BbCLP3

ATGGCGTCTTTCATATCGTTGGCTACGGTGGCCAGCTTGCTTGCCGTGCTCCCCACCTCCATGGCA
GCATTCAGCCCAGGCTCACGCAACAACGCATTACGCCAGGCTCACTGAACAACACGTTTCAGCCCA
GGCTCACAGAAAAACATTGCCATTTACTGGGGTCAAAACTCGATCAACCAAGGCAGCGGCCCTCTCG
CCCCAAAGCGTCTTGGATACTATTGCGAGAACCCGATATCAACGTTATCCCGGTGCGGTTTCATGAA
TGGCATAACTCCTGCCATCACAACTTTGCGAATGCAGGCGATAACTGCACAGCGTTTGCTGACAAC
AAAGACGTCTTGAAGTCCCCCAAATTGAAGAGGACATCAAGACGTGCCAGGACAAACACAGCAAG
ACAATCGTGCTATCTCTCGGCGGAGCTACTTACTCTCAGGGCGGCTGGTCCAGCCCTAGTGAGGCC
GAGGCTGCGGCACAGACGGTATGGGATATGTTTGGACCCGTGCGTGGGAAACAAGGTCAACCGT
CCCTTTGGCAGCGCCGTTGTTGATGGCTTCGACTTTGACTTTGAGAGCACCACCAACAACCTCCCCG
CTTTTGGTGCCAACTGCGCAGCCTCATGGACGGTGCGGGAGGCAAGAAATTTTACCTGGCTGCTG
CCCCTCAGTGCGTCTTCCCCGACGCAGCCGTGGGCGCCGCTCTTGATGCCGTGCGGTTTGACTTTG
TCATGATTACGTTTTACAACAACCTGGTGTGGCGTGTCCAACCTCAAGGAGAACGCGACCACGCAAGA
CGCCTTCAACTTTGACGTCTGGGACAAGTGGGCGCACGGCAGCAAGAACCCCGACGTGAAGCTCCT
GCTAGGCATTCCCGCGGCTCCAGGTGCTGGCGGCGGATACACCGAGGGCTCCAAGCTCAAGGCGG
CCATCAACTACTCGAAAAAGTTTTCCAGCTTTGGCGGCGTCATGATGTGGGACATGTCGCAGCTCTA
CTCCAACAGTGGCTACTTGAAGGAGGTGCTTTCCGACATTGCGGGCGGCCCAACAACGACTGTCCC
TCCTGGGACAACAACGACCTCAAGCCCGTGTACCACTTCATCTCCGCCTCCGTCCGGTGGACTGGA
TAAGTATGCTCAGTGTGGTGGAAATGGCTACAACGGTCCAACAGTGTGCAAGGCTCCGTACACTTGC
GTCAAGCTGAGCGATTGGTGGTCGTCCTGCAATAA

BbCLP4

ATGGCTCCTTTTCTTCAAACCAGCCTCGCGCTCCTTCCATTGTTGGCTTCCACCATGGTCAGCGCCT
CGCCATTGGCGCCGCGAGCCGACACCTGCGCAACCAAGGGCCGGCCGGCCGGCAAAGTGCTCCA
GGGCTACTGGGAGAACTGGGACGGTGCCAAGAACGGAGTGCACCCTCCGTTTGGCTGGACGCCA
TCCAAAACCCCGACATTCGCAAGCACGGCTACAACGTCATCAATGCTGCCTTTCCCATCATCCAGCC
CGACGGCACCCGCGCTCTGGGAGGACGGCATGGACACAGGCGTCAAGGTGGCGAGCCCGGCCGAC
ATGTGCGAGGCCAAGGCAGCGGGCGCCACCATCTTGATGTCGATTGGCGGTGCTACTGCGGCCATT
GACCTGAGCTCGTCGGCTGTGGCTGACAAGTTTGTCTCGACCATTGTGCCGATTCTGAAAAAGTACA
ACTTTGACGGCATTGATATCGACATTGAATCCGGCCTCACAGGCAGCGGAAACATAAACACCCTGTC
CACCTCGCAGACCAACCTGATTAGAATCATTGACGGCGTTCTCGCGCAGATGCCCCGCAACTTTGG
CTTGACCATGGCGCCAGAGACTGCCTACGTTACCGGTGGGACGATTACGTACGGATCAATCTGGGG
CTCCTACCTCCCCATCATCAAAAAGTACCTCGACAACGGTCGTCTCTGGTGGCTCAACATGCAGTAC
TACAATGGCGAAATGTACGGCTGCTCTGGCGACTCGCACAAGGCCGGCACTGTGCAAGGGTTTCGTT
GCTCAGACCGACTGCCTGAACAAGGGACTTACTATTAGGGCGTGACAATCACGATTCCCTATGACA
AGCAAGTGCCTGGCCTTCTGCCAGCCGGGGGCTGGTGGCGGCCACATGTCCCGTCCAACGTG
GCGCAAGTTCTCTCCCACTACAAGGGCGCTTTGAAGGGATTGATGACTTGGTCTCTGAACTGGGAC
GGCTCCAAGAATTGGACATTTGGCGACAATGTCAAGGGGACTTTGGGGACTGCGTAA

BbCLP5

ATGAAGCTGTCTATACTCTCGTTCACCACTCTTGGCGTGGCTTCGGTCATGGCCGGGTCTGCTTCCG
TCTGCCCCAGCAACAACACCCATGCCACGGGAGCAGCCCTGCAAAACATTATCGACTACAAAAAG
GCGATCACCAGCTCATGGCCGGCTACTTCCGATCCTGGCGGGACAAGGCTAGCTCCACGGCCAACA
AGGTTTCCATGCTTGATTTGCCAGACTGTCTTGACATTGCCCTTGTTTTCCCCCAGGGCGACGAGCC
CGCGGCCTTTTGGACCGCGCTCAAAGATACCTACGTCCCCGCTCTGCACACGCGCGGCACCAAGGT
CGTCAGGAGCGTGCGCATTGCCCAGCTCATCAACAGCACCTGGGCAAATACGCCTGCTGGGTGGC
AGGGCCTCGCCGCTGACCTGCTGAAAAAGGTGACGATTACGGGCTGGACGGCTTGACATTGATG
TTGAACAAAGTCTCAGCGCCGCTCAGCTTCAGCAAGCTACGGGCGTTTTCAACGCACTGTCCAAGAA
GCTTGGCCCAAAGTCTGGCACCGGAAAAGTCTCATTTTTGACACCAACGGGGATGGCAGCCAGCC
ACTGTGGCGGAATGTATACTCTACCGTCAGCTATGTCCTGATCCAGTCCTATGGTCGCAGCCCTAGT
AGCTTGCAAAACACCTACAACCTCGTTCAAAGTTACATTTCCAGCAAGCAATACCTCATTGGCTTTTC
CTTCTACGAGGAGAATGGCGCCAACCTGGGGAGACACGACCTCTCCCATACGTCTAGCCGTGCCTG
GCAGTACGCCAAGTGGCAGCCTTCCGGCGCGACCAAAGGCGGCATCTTCTCATACGCCATTGACCG
TGATGGAGTTCCCATTTGGCGACAATAGGCTTCAGCCGACTGACTTCACTTGGACGCGAAAGCTGATT
TCGGCCATGAATCCGTAA

BbCLP6

ATGCAGTTGGCCTCTTTCATCGGACTCATTGCCACTTTGACTGCGAGTGCAATTGCCGAAGACTTGA
TCTTTCGTGGAAAGGGCTTCGGCACCTATTACTATGATGTCCGGCAACACCAAACGTGTGGCACTGA
TTTCAGCTTTCAGAATCAGGGAGGCGTTATGTGCAACTGGAACCTCGGTCTTGTGCTCAATGACATC
AATACGAACAACCTTGTGGCTATGAACAATCTCCTGCTGAAGACTCAAGCGGGCCGCACTACATATT
GTGGCAAAAGGGTCATTGTCACGGTCAACGGCGTGACCTCCAGCACGCCCTTTTTTATTGGCGATG
GCTGTGAGCGCTGTGCCCCGGGCTCGGATTCTGTGTGGAACCCAGGCGCTGCGGCCGGATTGGAC
TTTTCTTTCACGGCTCTTGACACCTTGTGCCATTGGCCTGCTCAAATGGGCACATTGATATTAGCTT
CGACATAGTGAATGAACTTTGTACCATTTTGATGTTTAA

BbCLP7

ATGACCTGGAAGGATGTTATGTCAGCATCTGCCATAGACAGTCTGGCCGTTTCGCAGACGAAAACATA
ATGTATGCCCTGCTGCTGTCGACTTTGCGAGTGCCACTAGCAAATGTATCAAATCACCGCTCAACAC
GGGTGTCCTCTTATGCAAAGAACTTCAAGAAGACACCAAAACCTGCCAGGCAAAAGGAAGGACTGTC
TTGATCTCGATGGGCGGCGGTAATTCCCCCTCACCAAATTGGGTGGATGCCGCAGACGCTGAGAAG
TCTGCGCAGCTCATATGGGACATGTTTGGACCCGTCACCTCCAGCAAAGTTGATCGGCCTTTTCGGCA
CATCTGTCGTAAACGGATTTGACCTTGACTTTGACACCGGCCAACCATCTTTCTGCTTTTGCTGA

BbCLP8

ATGAAGATCAACATCAGTATCCTCGGAGCACTCGCTCTCGCTGTTGGTGCGTCTGCCAAGTGCGTCC
ACACCAGAATCCCCAGCCGCAGCACCAGCACCAGCACCAGCACCACCGCCACCAGCAGCATC
AGCAGCACCACCGACACCACCGACACCACCGACACCACCGACACCACCGACACCACCGACACCAG
CAACAACAGCACCAGCAACATCCTCTACAAGGGCAAGGGCTTCGGTACCTACTACTACGACGTTGAG
CAGCTTCAGGCCTGCGGCGCCGACTTTACCACCCAGAACGTCGGCAACGTCATGTGCGGCTGGGA
CAGCGTCAAGACGCTCAACGACATCGACTCCAACAACCTCGTCGCCATGAACAGCCTGCTGCTCAA
GACCGCCGAGGGCCGTGCCAAGTACTGCGGCAAGCGGATCATTGTCACCGTCGACGGCGTCAAGT
CCGACATTCCCTTCTTCGTTGGCGATGGCTGCGAGCGCTGCGCCCGCGGGGACGAGACGCAGTGG
CAGTCTGGAGGGGCTGCTGGTCTCGACTTTTCTTTTCGACGCTCAACAAGCTGTCCCCTCTGGCTT
GCCAGGACGGCCACGTTGCAGTTGAGTATGAGATTGTCGATGAGACTCTGTACCACTTTGATACCAA
TTAA

Anexo 2

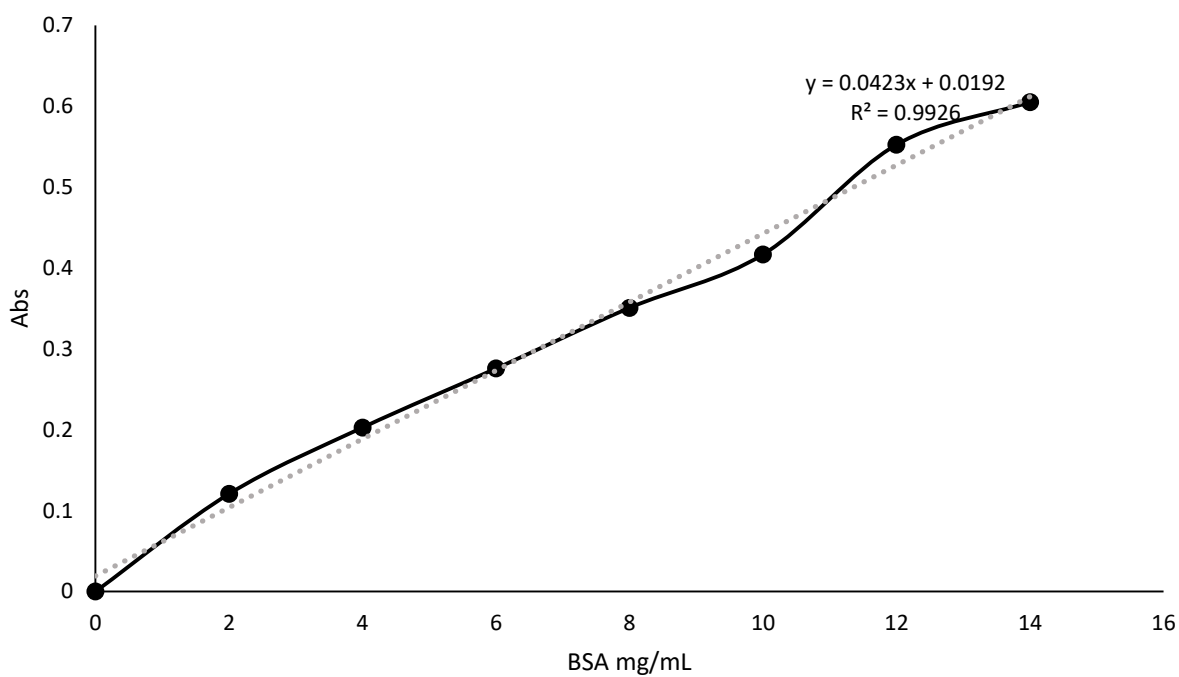


Figura A-2.1. Curva patrón de BSA para la determinación de proteína soluble total mediante el microensayo de Bradford.

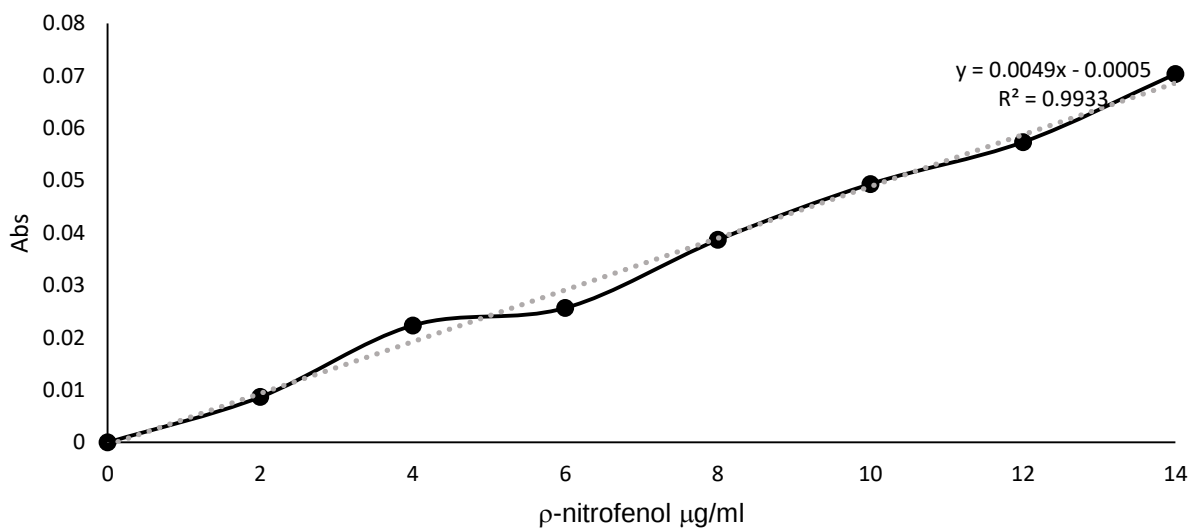


Figura A-2.2. Curva patrón de p-nitrofenol para la determinación de actividad N-acetilhexosaminidasa.

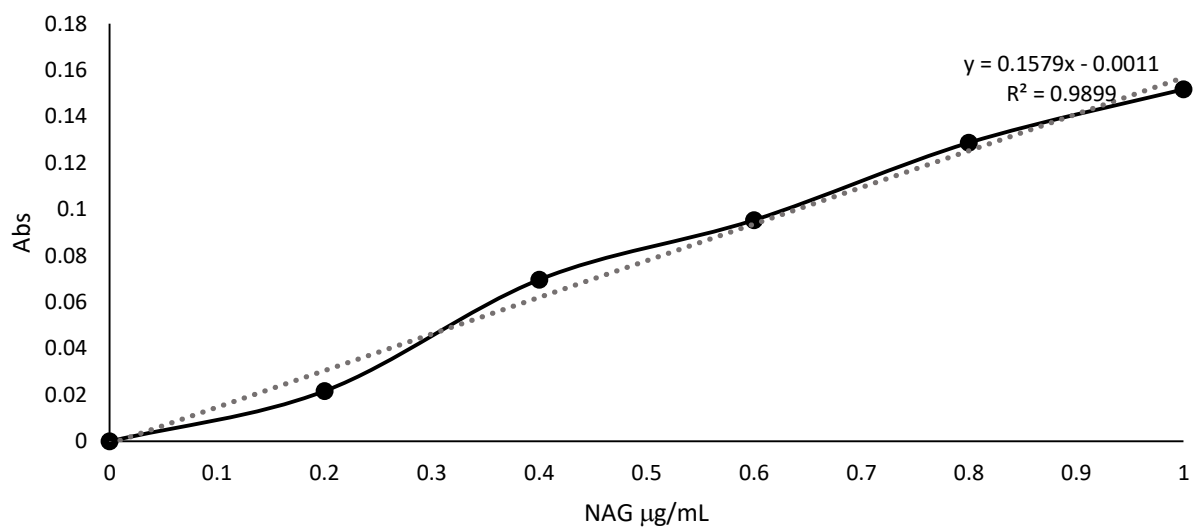
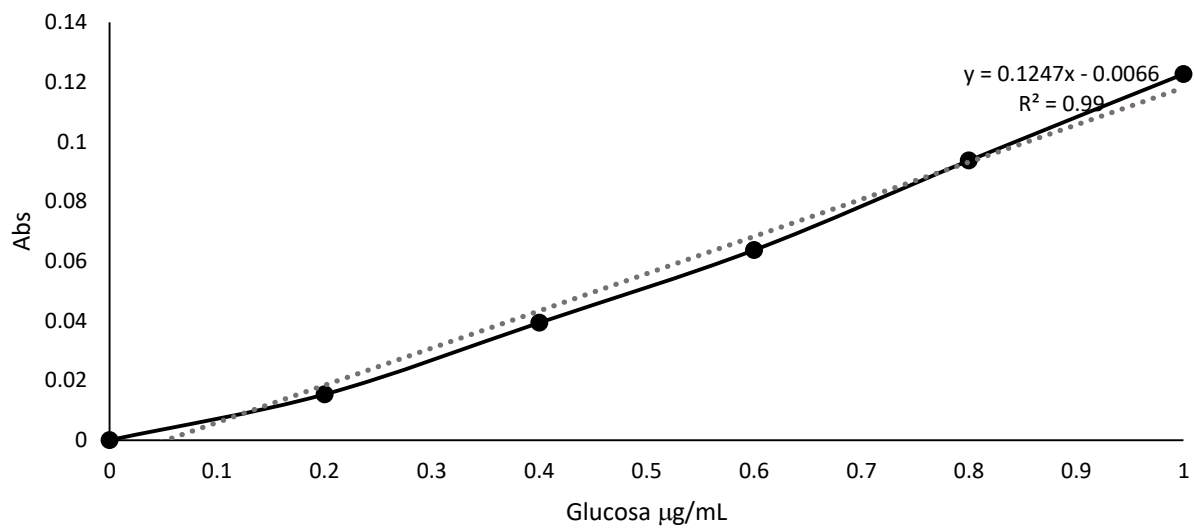


Figura A-2.3. Curva patrón de glucosa y NAG para la determinación de azúcares reductores mediante la técnica de DNS.

Anexo 3

A3.1. Modelo lineal general: Proteína soluble vs. Sustrato, Dia Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Sustrato	Fijo	5	1, 2, 3, 4, 5
Dia	Fijo	8	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Sustrato	4	405.553	101.388	297.56	0.000
Dia	7	13.368	1.910	5.60	0.000
Error	108	36.799	0.341		
Falta de ajuste	28	33.440	1.194	28.44	0.000
Error puro	80	3.359	0.042		
Total	119	455.719			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.583720	91.93%	91.10%	90.03%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	1.5473	0.0533	29.04	0.000	
Sustrato					
1	-1.277	0.107	-11.98	0.000	1.60
2	1.236	0.107	11.59	0.000	1.60
3	3.015	0.107	28.29	0.000	1.60
4	-1.145	0.107	-10.75	0.000	1.60
Dia					
0	0.388	0.141	2.75	0.007	1.75
1	0.219	0.141	1.56	0.122	1.75

2	-0.320	0.141	-2.27	0.025	1.75
3	0.095	0.141	0.67	0.502	1.75
4	0.081	0.141	0.57	0.568	1.75
5	0.204	0.141	1.44	0.151	1.75
6	0.060	0.141	0.43	0.670	1.75

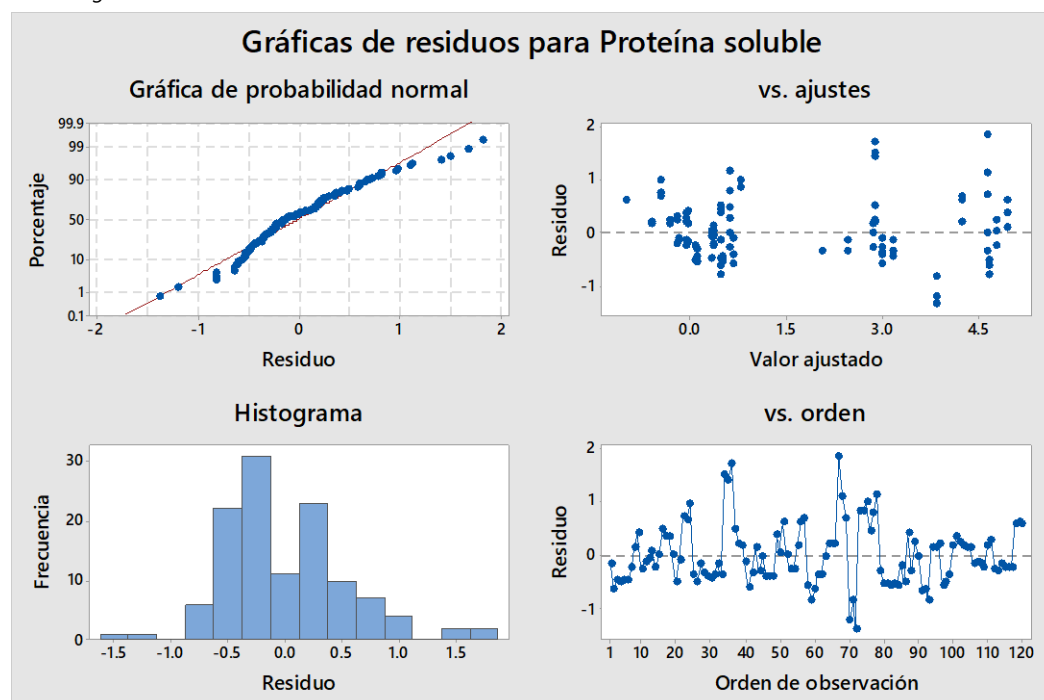
Ecuación de regresión

Proteína soluble = 1.5473 - 1.277 Sustrato_1 + 1.236 Sustrato_2 + 3.015 Sustrato_3
 - 1.145 Sustrato_4 - 1.828 Sustrato_5 + 0.388 Dia_0 + 0.219 Dia_1
 - 0.320 Dia_2 + 0.095 Dia_3 + 0.081 Dia_4 + 0.204 Dia_5 + 0.060 Dia_6
 - 0.728 Dia_7

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Proteína soluble	Ajuste	Resid	Resid est.	
34	4.369	2.878	1.491	2.69	R
35	4.274	2.878	1.396	2.52	R
36	4.558	2.878	1.680	3.03	R
67	6.449	4.622	1.827	3.30	R
70	2.619	3.834	-1.215	-2.19	R
72	2.454	3.834	-1.380	-2.49	R
78	1.745	0.622	1.123	2.03	R

Residuo grande R



A3.2. Modelo lineal general: EQasa (U/mL) vs. Sustrato, Día Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Sustrato	Fijo	5	1, 2, 3, 4, 5
Día	Fijo	8	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Sustrato	4	1073.8	268.440	14.65	0.000
Día	7	790.1	112.872	6.16	0.000
Error	108	1979.0	18.324		
Falta de ajuste	28	1810.7	64.669	30.74	0.000
Error puro	80	168.3	2.104		
Total	119	3842.9			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
4.28070	48.50%	43.26%	36.42%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	4.853	0.391	12.42	0.000	
Sustrato					
1	1.680	0.782	2.15	0.034	1.60
2	0.819	0.782	1.05	0.297	1.60
3	4.269	0.782	5.46	0.000	1.60
4	-3.631	0.782	-4.65	0.000	1.60
Día					
0	-1.08	1.03	-1.04	0.301	1.75
1	-1.26	1.03	-1.22	0.225	1.75
2	-3.95	1.03	-3.82	0.000	1.75
3	-2.44	1.03	-2.36	0.020	1.75

4	0.48	1.03	0.46	0.643	1.75
5	0.83	1.03	0.80	0.426	1.75
6	3.81	1.03	3.69	0.000	1.75

Ecuación de regresión

$$\begin{aligned} \text{EQasa (U/mL)} = & 4.853 + 1.680 \text{ Sustrato}_1 + 0.819 \text{ Sustrato}_2 + 4.269 \text{ Sustrato}_3 \\ & - 3.631 \text{ Sustrato}_4 - 3.137 \text{ Sustrato}_5 - 1.08 \text{ Día}_0 - 1.26 \text{ Día}_1 - 3.95 \text{ Día}_2 \\ & - 2.44 \text{ Día}_3 + 0.48 \text{ Día}_4 + 0.83 \text{ Día}_5 + 3.81 \text{ Día}_6 + 3.60 \text{ Día}_7 \end{aligned}$$

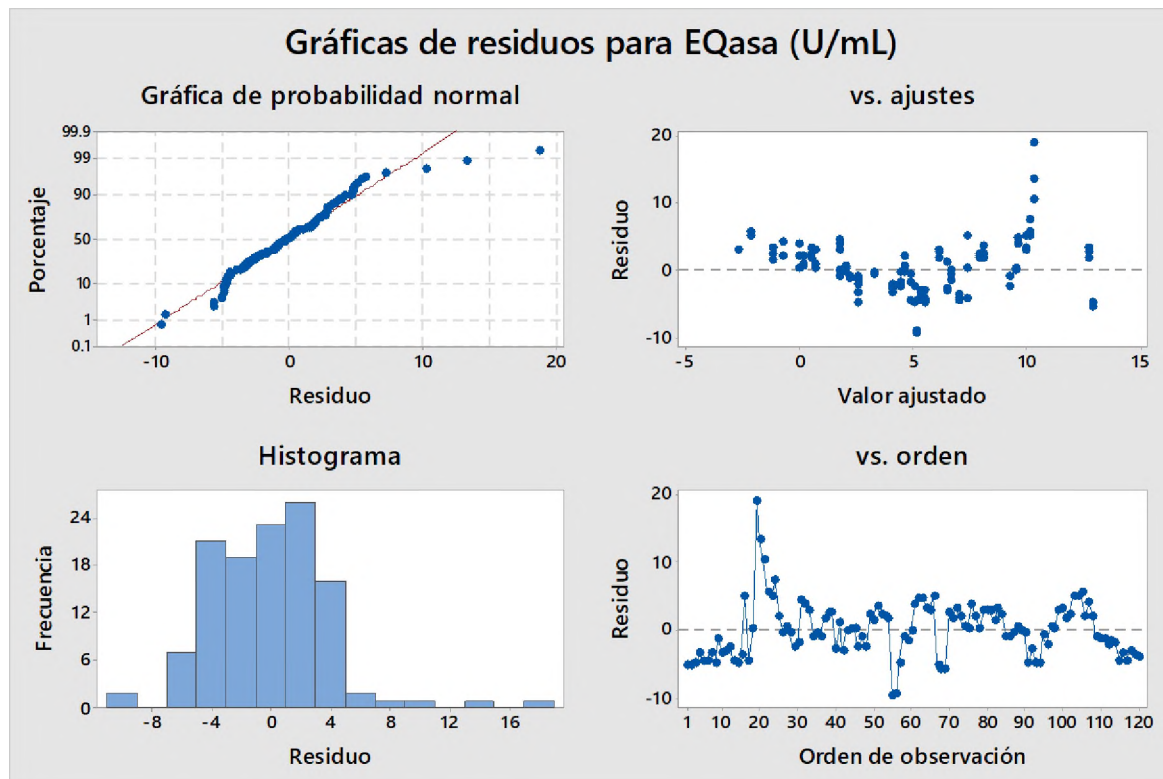
Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	EQasa (U/mL)	Ajuste	Resid	Resid est.	
19	29.07	10.35	18.72	4.61	R
20	23.60	10.35	13.25	3.26	R
21	20.53	10.35	10.19	2.51	R
55	-4.53	5.18	-9.71	-2.39	R
56	-4.27	5.18	-9.44	-2.33	R

Residuo grande R

Medias

Término	Media ajustada	Error estándar de la media
Sustrato		
1	6.533	0.874
2	5.672	0.874
3	9.122	0.874
4	1.222	0.874
5	1.717	0.874
Día		
0	3.78	1.11
1	3.59	1.11
2	0.91	1.11
3	2.42	1.11
4	5.33	1.11
5	5.68	1.11
6	8.67	1.11



A.3.2.1 ANOVA de un solo factor: Productividad máxima vs. Tratamiento

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	5	1, 2, 3, 4, 5

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	4	0.049755	0.012439	53.80	0.000
Error	10	0.002312	0.000231		
Total	14	0.052067			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0152057	95.56%	93.78%	90.01%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	3	0.1694	0.0300	(0.1499, 0.1890)
2	3	0.065741	0.001604	(0.046180, 0.085302)
3	3	0.14491	0.00642	(0.12535, 0.16447)
4	3	0.01323	0.01212	(-0.00633, 0.03279)
5	3	0.06204	0.00802	(0.04248, 0.08160)

Desv.Est. agrupada = 0.0152057

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
1	3	0.1694	A
3	3	0.14491	A
2	3	0.065741	B

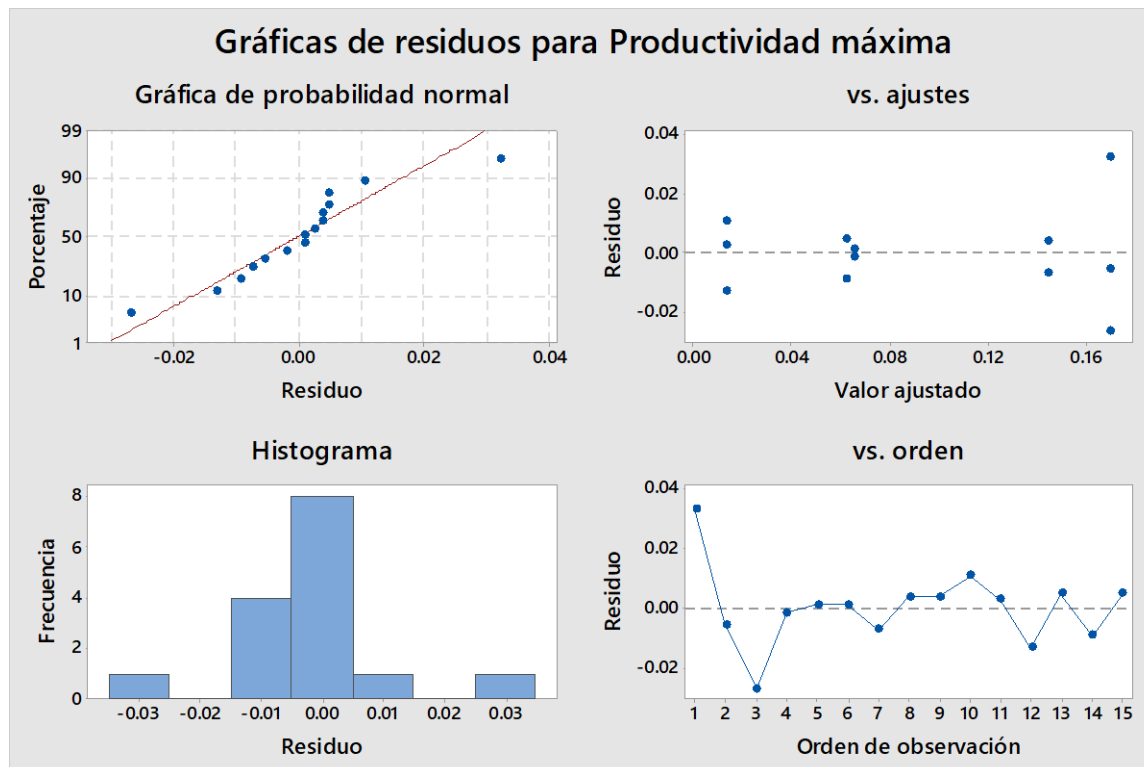
5	3	0.06204	B
4	3	0.01323	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
2 - 1	-0.1037	0.0124	(-0.1445, -0.0629)	-8.35	0.000
3 - 1	-0.0245	0.0124	(-0.0654, 0.0163)	-1.98	0.342
4 - 1	-0.1562	0.0124	(-0.1970, -0.1154)	-12.58	0.000
5 - 1	-0.1074	0.0124	(-0.1482, -0.0666)	-8.65	0.000
3 - 2	0.0792	0.0124	(0.0383, 0.1200)	6.38	0.001
4 - 2	-0.0525	0.0124	(-0.0933, -0.0117)	-4.23	0.012
5 - 2	-0.0037	0.0124	(-0.0445, 0.0371)	-0.30	0.998
4 - 3	-0.1317	0.0124	(-0.1725, -0.0909)	-10.61	0.000
5 - 3	-0.0829	0.0124	(-0.1237, -0.0420)	-6.67	0.000
5 - 4	0.0488	0.0124	(0.0080, 0.0896)	3.93	0.019

Nivel de confianza individual = 99.18%



A3.3. Modelo lineal general: Actividad NHasa (mU/mL) vs. Sustrato, Día

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Sustrato	Fijo	5	1, 2, 3, 4, 5
Día	Fijo	8	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Sustrato	4	367.33	91.8335	51.74	0.000
Día	7	38.70	5.5289	3.12	0.005
Error	108	191.69	1.7749		
Falta de ajuste	28	173.58	6.1994	27.39	0.000
Error puro	80	18.10	0.2263		
Total	119	597.72			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1.33225	67.93%	64.66%	60.41%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	3.340	0.122	27.46	0.000	
Sustrato					
1	-0.803	0.243	-3.30	0.001	1.60
2	0.211	0.243	0.87	0.388	1.60
3	3.094	0.243	12.72	0.000	1.60
4	-2.229	0.243	-9.16	0.000	1.60
Día					
0	-0.837	0.322	-2.60	0.011	1.75
1	-0.503	0.322	-1.56	0.121	1.75
2	0.271	0.322	0.84	0.402	1.75

3	0.198	0.322	0.61	0.540	1.75
4	0.532	0.322	1.65	0.101	1.75
5	0.956	0.322	2.97	0.004	1.75
6	-0.055	0.322	-0.17	0.865	1.75

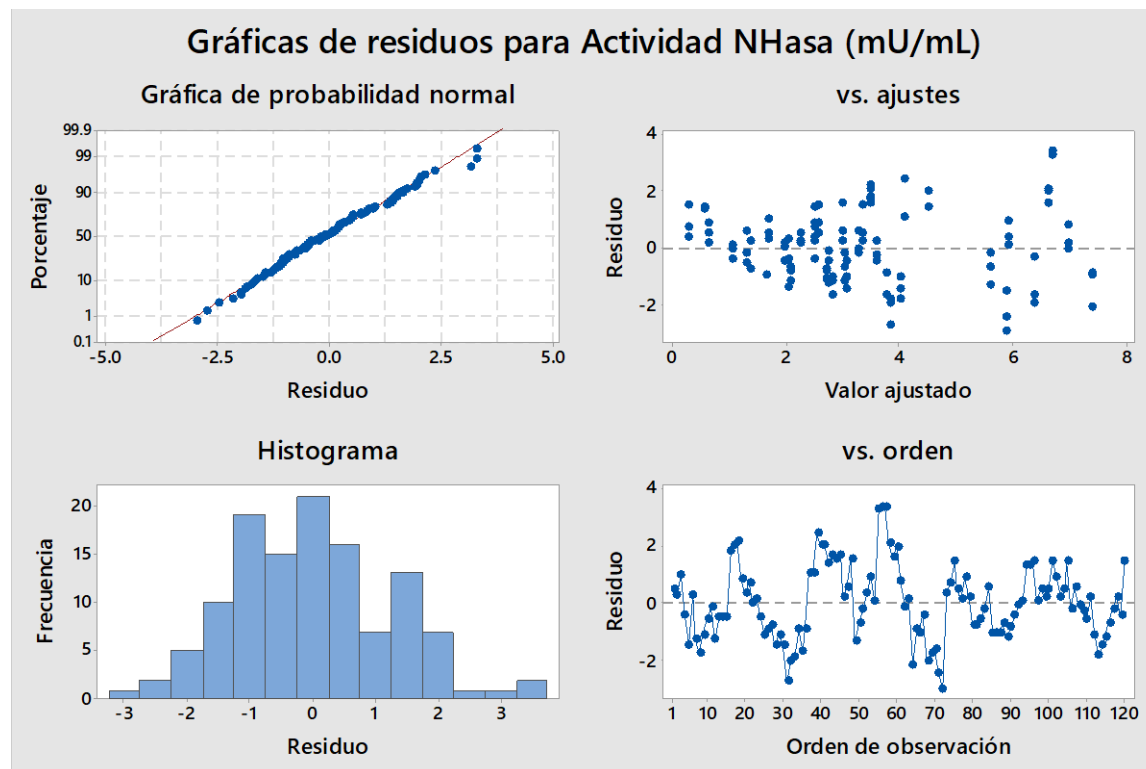
Ecuación de regresión

$$\begin{aligned} \text{Actividad NHasa (mU/mL)} = & 3.340 - 0.803 \text{ Sustrato}_1 + 0.211 \text{ Sustrato}_2 + 3.094 \text{ Sustrato}_3 \\ & - 2.229 \text{ Sustrato}_4 - 0.273 \text{ Sustrato}_5 - 0.837 \text{ Día}_0 - 0.503 \text{ Día}_1 \\ & + 0.271 \text{ Día}_2 + 0.198 \text{ Día}_3 + 0.532 \text{ Día}_4 + 0.956 \text{ Día}_5 \\ & - 0.055 \text{ Día}_6 - 0.560 \text{ Día}_7 \end{aligned}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Actividad NHasa (mU/mL)	Ajuste	Resid	Resid est.	
31	1.100	3.821	-2.721	-2.15	R
55	9.903	6.705	3.198	2.53	R
56	10.025	6.705	3.320	2.63	R
57	10.025	6.705	3.320	2.63	R
72	2.934	5.873	-2.939	-2.33	R

Residuo grande R



A.3.3.1 ANOVA de un solo factor: productividad vs. tratamientos

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
tratamientos	5	1, 2, 3, 4, 5

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tratamientos	4	0.069453	0.017363	448.30	0.000
Error	10	0.000387	0.000039		
Total	14	0.069841			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0062235	99.45%	99.22%	98.75%

Medias

tratamientos	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	3	0.045053	0.001092	(0.037047, 0.053059)
2	3	0.05230	0.00294	(0.04429, 0.06030)
3	3	0.208002	0.001470	(0.199996, 0.216008)
4	3	0.010996	0.000140	(0.002990, 0.019002)
5	3	0.08405	0.01348	(0.07604, 0.09206)

Desv.Est. agrupada = 0.00622349

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tratamientos	N	Media	Agrupación
3	3	0.208002	A
5	3	0.08405	B
2	3	0.05230	C

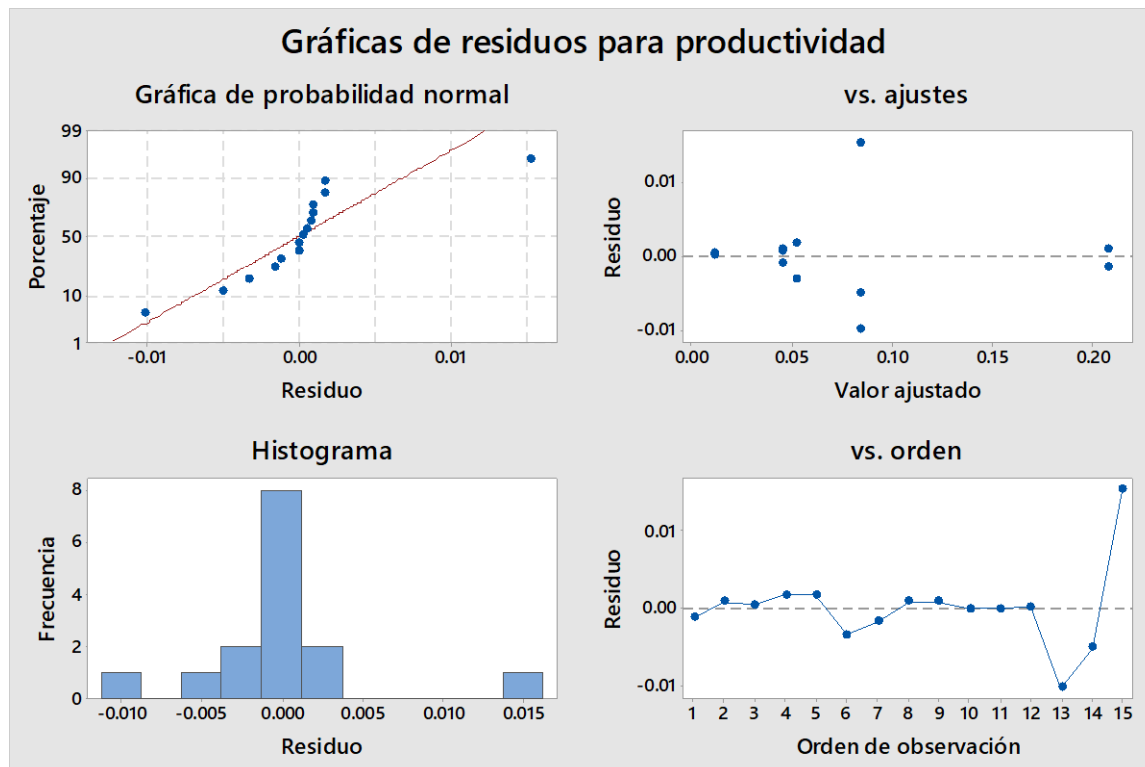
1	3	0.045053	C
4	3	0.010996	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
2 - 1	0.00724	0.00508	(-0.00946, 0.02395)	1.43	0.627
3 - 1	0.16295	0.00508	(0.14624, 0.17966)	32.07	0.000
4 - 1	-0.03406	0.00508	(-0.05076, -0.01735)	-6.70	0.000
5 - 1	0.03900	0.00508	(0.02229, 0.05571)	7.67	0.000
3 - 2	0.15570	0.00508	(0.13900, 0.17241)	30.64	0.000
4 - 2	-0.04130	0.00508	(-0.05801, -0.02459)	-8.13	0.000
5 - 2	0.03175	0.00508	(0.01504, 0.04846)	6.25	0.001
4 - 3	-0.19701	0.00508	(-0.21371, -0.18030)	-38.77	0.000
5 - 3	-0.12395	0.00508	(-0.14066, -0.10724)	-24.39	0.000
5 - 4	0.07305	0.00508	(0.05635, 0.08976)	14.38	0.000

Nivel de confianza individual = 99.18%



A3.4. Modelo lineal general: NAG mg/mL vs. Sustrato, Dia

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Sustrato	Fijo	4	1, 2, 3, 4
Dia	Fijo	8	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Sustrato	3	0.8275	0.275840	35.30	0.000
Dia	7	0.1045	0.014929	1.91	0.078
Error	85	0.6642	0.007814		
Falta de ajuste	21	0.4956	0.023602	8.96	0.000
Error puro	64	0.1686	0.002634		
Total	95	1.5962			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0883978	58.39%	53.49%	46.92%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0.23568	0.00902	26.12	0.000	
Sustrato					
1	0.0919	0.0156	5.88	0.000	1.50
2	0.0895	0.0156	5.73	0.000	1.50
3	-0.1187	0.0156	-7.59	0.000	1.50
Dia					
0	0.0410	0.0239	1.72	0.090	1.75
1	0.0278	0.0239	1.16	0.248	1.75
2	-0.0382	0.0239	-1.60	0.113	1.75
3	-0.0113	0.0239	-0.47	0.638	1.75

4	-0.0239	0.0239	-1.00	0.319	1.75
5	0.0389	0.0239	1.63	0.107	1.75
6	0.0146	0.0239	0.61	0.543	1.75

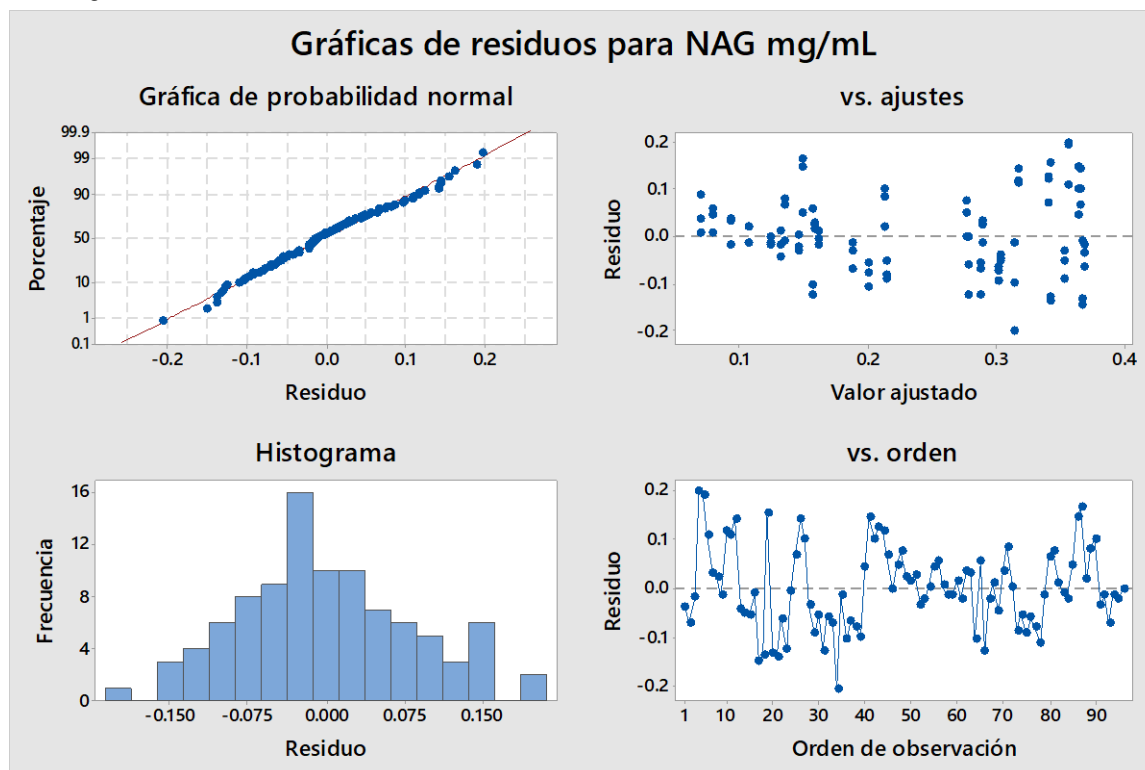
Ecuación de regresión

$$\begin{aligned} \text{NAG mg/mL} = & 0.23568 + 0.0919 \text{ Sustrato}_1 + 0.0895 \text{ Sustrato}_2 - 0.1187 \text{ Sustrato}_3 \\ & - 0.0627 \text{ Sustrato}_4 + 0.0410 \text{ Dia}_0 + 0.0278 \text{ Dia}_1 - 0.0382 \text{ Dia}_2 - 0.0113 \text{ Dia}_3 \\ & - 0.0239 \text{ Dia}_4 + 0.0389 \text{ Dia}_5 + 0.0146 \text{ Dia}_6 - 0.0488 \text{ Dia}_7 \end{aligned}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	NAG mg/mL	Ajuste	Resid	Resid est.	
4	0.5516	0.3554	0.1963	2.36	R
5	0.5453	0.3554	0.1899	2.28	R
34	0.1083	0.3139	-0.2056	-2.47	R

Residuo grande R



A3.5. ANOVA de un solo factor: Glucosa mg/mL vs. Día

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Día	8	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Día	7	0.9174	0.13106	2.22	0.088
Error	16	0.9438	0.05899		
Total	23	1.8613			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.242876	49.29%	27.11%	0.00%

Medias

Día	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
0	3	2.982	0.328	(2.685, 3.279)
1	3	2.5564	0.0764	(2.2591, 2.8536)
2	3	2.6141	0.0958	(2.3168, 2.9114)
3	3	2.6171	0.0638	(2.3199, 2.9144)
4	3	2.2373	0.1431	(1.9401, 2.5346)
5	3	2.739	0.525	(2.441, 3.036)
6	3	2.733	0.222	(2.435, 3.030)
7	3	2.6597	0.0211	(2.3624, 2.9569)

Desv.Est. agrupada = 0.242876

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Día	N	Media	Agrupación
-----	---	-------	------------

0	3	2.982	A	
5	3	2.739	A	B
6	3	2.733	A	B
7	3	2.6597	A	B
3	3	2.6171	A	B
2	3	2.6141	A	B
1	3	2.5564	A	B
4	3	2.2373		B

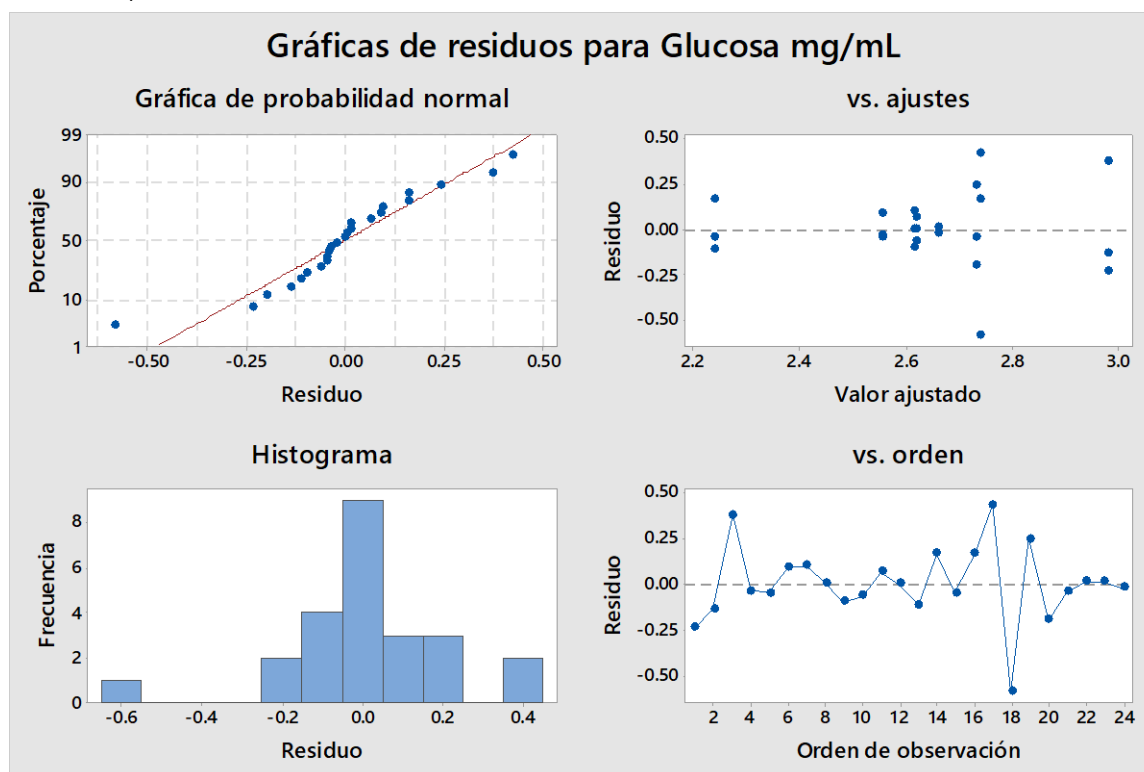
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
1 - 0	-0.425	0.198	(-1.113, 0.262)	-2.15	0.429
2 - 0	-0.368	0.198	(-1.055, 0.319)	-1.85	0.597
3 - 0	-0.365	0.198	(-1.052, 0.322)	-1.84	0.606
4 - 0	-0.744	0.198	(-1.432, -0.057)	-3.75	0.029
5 - 0	-0.243	0.198	(-0.930, 0.444)	-1.23	0.912
6 - 0	-0.249	0.198	(-0.936, 0.438)	-1.26	0.902
7 - 0	-0.322	0.198	(-1.009, 0.365)	-1.62	0.731
2 - 1	0.058	0.198	(-0.629, 0.745)	0.29	1.000
3 - 1	0.061	0.198	(-0.626, 0.748)	0.31	1.000
4 - 1	-0.319	0.198	(-1.006, 0.368)	-1.61	0.739
5 - 1	0.182	0.198	(-0.505, 0.869)	0.92	0.979
6 - 1	0.176	0.198	(-0.511, 0.863)	0.89	0.983
7 - 1	0.103	0.198	(-0.584, 0.790)	0.52	0.999
3 - 2	0.003	0.198	(-0.684, 0.690)	0.02	1.000
4 - 2	-0.377	0.198	(-1.064, 0.310)	-1.90	0.569
5 - 2	0.125	0.198	(-0.563, 0.812)	0.63	0.998
6 - 2	0.119	0.198	(-0.569, 0.806)	0.60	0.998
7 - 2	0.046	0.198	(-0.642, 0.733)	0.23	1.000
4 - 3	-0.380	0.198	(-1.067, 0.307)	-1.92	0.560
5 - 3	0.122	0.198	(-0.566, 0.809)	0.61	0.998
6 - 3	0.115	0.198	(-0.572, 0.803)	0.58	0.999

7 - 3	0.043	0.198	(-0.645, 0.730)	0.21	1.000
5 - 4	0.501	0.198	(-0.186, 1.188)	2.53	0.251
6 - 4	0.495	0.198	(-0.192, 1.182)	2.50	0.263
7 - 4	0.422	0.198	(-0.265, 1.109)	2.13	0.438
6 - 5	-0.006	0.198	(-0.693, 0.681)	-0.03	1.000
7 - 5	-0.079	0.198	(-0.766, 0.608)	-0.40	1.000
7 - 6	-0.073	0.198	(-0.760, 0.614)	-0.37	1.000

Nivel de confianza individual = 99.68%



A3.6. ANOVA de un solo factor: Biomasa (g) vs. Tiempo (h)

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tiempo (h)	7	0, 24, 48, 72, 96, 120, 144

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tiempo (h)	6	0.044212	0.007369	68.52	0.000
Error	14	0.001506	0.000108		
Total	20	0.045717			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0103700	96.71%	95.30%	92.59%

Medias

Tiempo (h)	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
0	3	0.000200	0.000100	(-0.012641, 0.013041)
24	3	0.001350	0.000450	(-0.011491, 0.014191)
48	3	0.011700	0.000300	(-0.001141, 0.024541)
72	3	0.013500	0.001200	(0.000659, 0.026341)
96	3	0.016400	0.000400	(0.003559, 0.029241)
120	3	0.086500	0.000300	(0.073659, 0.099341)
144	3	0.1267	0.0274	(0.1139, 0.1395)

Desv.Est. agrupada = 0.0103700

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tiempo (h)	N	Media	Agrupación
------------	---	-------	------------

144	3	0.1267	A
120	3	0.086500	B
96	3	0.016400	C
72	3	0.013500	C
48	3	0.011700	C
24	3	0.001350	C
0	3	0.000200	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
24 - 0	0.00115	0.00847	(-0.02777, 0.03007)	0.14	1.000
48 - 0	0.01150	0.00847	(-0.01742, 0.04042)	1.36	0.814
72 - 0	0.01330	0.00847	(-0.01562, 0.04222)	1.57	0.701
96 - 0	0.01620	0.00847	(-0.01272, 0.04512)	1.91	0.503
120 - 0	0.08630	0.00847	(0.05738, 0.11522)	10.19	0.000
144 - 0	0.12650	0.00847	(0.09758, 0.15542)	14.94	0.000
48 - 24	0.01035	0.00847	(-0.01857, 0.03927)	1.22	0.874
72 - 24	0.01215	0.00847	(-0.01677, 0.04107)	1.43	0.775
96 - 24	0.01505	0.00847	(-0.01387, 0.04397)	1.78	0.581
120 - 24	0.08515	0.00847	(0.05623, 0.11407)	10.06	0.000
144 - 24	0.12535	0.00847	(0.09643, 0.15427)	14.80	0.000
72 - 48	0.00180	0.00847	(-0.02712, 0.03072)	0.21	1.000
96 - 48	0.00470	0.00847	(-0.02422, 0.03362)	0.56	0.997
120 - 48	0.07480	0.00847	(0.04588, 0.10372)	8.83	0.000
144 - 48	0.11500	0.00847	(0.08608, 0.14392)	13.58	0.000
96 - 72	0.00290	0.00847	(-0.02602, 0.03182)	0.34	1.000
120 - 72	0.07300	0.00847	(0.04408, 0.10192)	8.62	0.000
144 - 72	0.11320	0.00847	(0.08428, 0.14212)	13.37	0.000
120 - 96	0.07010	0.00847	(0.04118, 0.09902)	8.28	0.000
144 - 96	0.11030	0.00847	(0.08138, 0.13922)	13.03	0.000
144 - 120	0.04020	0.00847	(0.01128, 0.06912)	4.75	0.004

Nivel de confianza individual = 99.58%

A3.7. ANOVA de un solo factor: pH vs. Tiempo (h)

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tiempo (h)	8	0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tiempo (h)	7	18.9104	2.70149	369.86	0.000
Error	16	0.1169	0.00730		
Total	23	19.0273			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0854644	99.39%	99.12%	98.62%

Medias

Tiempo (h)	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
0	3	3.00667	0.00577	(2.90206, 3.11127)
24	3	5.5767	0.1102	(5.4721, 5.6813)
48	3	5.6367	0.0945	(5.5321, 5.7413)
72	3	5.5833	0.1692	(5.4787, 5.6879)
96	3	5.7533	0.0808	(5.6487, 5.8579)
120	3	5.7900	0.0458	(5.6854, 5.8946)
144	3	5.68667	0.00577	(5.58206, 5.79127)
168	3	5.74333	0.00577	(5.63873, 5.84794)

Desv.Est. agrupada = 0.0854644

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tiempo (h)	N	Media	Agrupación
------------	---	-------	------------

120	3	5.7900	A
96	3	5.7533	A
168	3	5.74333	A
144	3	5.68667	A
48	3	5.6367	A
72	3	5.5833	A
24	3	5.5767	A
0	3	3.00667	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
24 - 0	2.5700	0.0698	(2.3282, 2.8118)	36.83	0.000
48 - 0	2.6300	0.0698	(2.3882, 2.8718)	37.69	0.000
72 - 0	2.5767	0.0698	(2.3349, 2.8184)	36.92	0.000
96 - 0	2.7467	0.0698	(2.5049, 2.9884)	39.36	0.000
120 - 0	2.7833	0.0698	(2.5416, 3.0251)	39.89	0.000
144 - 0	2.6800	0.0698	(2.4382, 2.9218)	38.41	0.000
168 - 0	2.7367	0.0698	(2.4949, 2.9784)	39.22	0.000
48 - 24	0.0600	0.0698	(-0.1818, 0.3018)	0.86	0.986
72 - 24	0.0067	0.0698	(-0.2351, 0.2484)	0.10	1.000
96 - 24	0.1767	0.0698	(-0.0651, 0.4184)	2.53	0.250
120 - 24	0.2133	0.0698	(-0.0284, 0.4551)	3.06	0.105
144 - 24	0.1100	0.0698	(-0.1318, 0.3518)	1.58	0.757
168 - 24	0.1667	0.0698	(-0.0751, 0.4084)	2.39	0.309
72 - 48	-0.0533	0.0698	(-0.2951, 0.1884)	-0.76	0.993
96 - 48	0.1167	0.0698	(-0.1251, 0.3584)	1.67	0.704
120 - 48	0.1533	0.0698	(-0.0884, 0.3951)	2.20	0.402
144 - 48	0.0500	0.0698	(-0.1918, 0.2918)	0.72	0.995
168 - 48	0.1067	0.0698	(-0.1351, 0.3484)	1.53	0.782
96 - 72	0.1700	0.0698	(-0.0718, 0.4118)	2.44	0.288
120 - 72	0.2067	0.0698	(-0.0351, 0.4484)	2.96	0.124
144 - 72	0.1033	0.0698	(-0.1384, 0.3451)	1.48	0.807

168 - 72	0.1600	0.0698	(-0.0818, 0.4018)	2.29	0.354
120 - 96	0.0367	0.0698	(-0.2051, 0.2784)	0.53	0.999
144 - 96	-0.0667	0.0698	(-0.3084, 0.1751)	-0.96	0.975
168 - 96	-0.0100	0.0698	(-0.2518, 0.2318)	-0.14	1.000
144 - 120	-0.1033	0.0698	(-0.3451, 0.1384)	-1.48	0.807
168 - 120	-0.0467	0.0698	(-0.2884, 0.1951)	-0.67	0.997
168 - 144	0.0567	0.0698	(-0.1851, 0.2984)	0.81	0.990

Nivel de confianza individual = 99.68%

Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Tiempo (h)	N	Media	Agrupación
120	3	5.7900	A
96	3	5.7533	A B
168	3	5.74333	A B
144	3	5.68667	A B C
48	3	5.6367	B C
72	3	5.5833	C
24	3	5.5767	C
0	3	3.00667	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
24 - 0	2.5700	0.0698	(2.4221, 2.7179)	36.83	0.000
48 - 0	2.6300	0.0698	(2.4821, 2.7779)	37.69	0.000
72 - 0	2.5767	0.0698	(2.4287, 2.7246)	36.92	0.000
96 - 0	2.7467	0.0698	(2.5987, 2.8946)	39.36	0.000
120 - 0	2.7833	0.0698	(2.6354, 2.9313)	39.89	0.000
144 - 0	2.6800	0.0698	(2.5321, 2.8279)	38.41	0.000
168 - 0	2.7367	0.0698	(2.5887, 2.8846)	39.22	0.000
48 - 24	0.0600	0.0698	(-0.0879, 0.2079)	0.86	0.403

72 - 24	0.0067	0.0698	(-0.1413, 0.1546)	0.10	0.925
96 - 24	0.1767	0.0698	(0.0287, 0.3246)	2.53	0.022
120 - 24	0.2133	0.0698	(0.0654, 0.3613)	3.06	0.008
144 - 24	0.1100	0.0698	(-0.0379, 0.2579)	1.58	0.135
168 - 24	0.1667	0.0698	(0.0187, 0.3146)	2.39	0.030
72 - 48	-0.0533	0.0698	(-0.2013, 0.0946)	-0.76	0.456
96 - 48	0.1167	0.0698	(-0.0313, 0.2646)	1.67	0.114
120 - 48	0.1533	0.0698	(0.0054, 0.3013)	2.20	0.043
144 - 48	0.0500	0.0698	(-0.0979, 0.1979)	0.72	0.484
168 - 48	0.1067	0.0698	(-0.0413, 0.2546)	1.53	0.146
96 - 72	0.1700	0.0698	(0.0221, 0.3179)	2.44	0.027
120 - 72	0.2067	0.0698	(0.0587, 0.3546)	2.96	0.009
144 - 72	0.1033	0.0698	(-0.0446, 0.2513)	1.48	0.158
168 - 72	0.1600	0.0698	(0.0121, 0.3079)	2.29	0.036
120 - 96	0.0367	0.0698	(-0.1113, 0.1846)	0.53	0.606
144 - 96	-0.0667	0.0698	(-0.2146, 0.0813)	-0.96	0.354
168 - 96	-0.0100	0.0698	(-0.1579, 0.1379)	-0.14	0.888
144 - 120	-0.1033	0.0698	(-0.2513, 0.0446)	-1.48	0.158
168 - 120	-0.0467	0.0698	(-0.1946, 0.1013)	-0.67	0.513
168 - 144	0.0567	0.0698	(-0.0913, 0.2046)	0.81	0.429

Nivel de confianza simultánea = 55.69%

