

# UNPA

Universidad del Papaloapan

*Terra Uberrima, Mens Aperta*

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**TESIS**

**SOYA MODIFICADA CON MOLIENDA MECÁNICA DE ALTA ENERGÍA COMO SUSTRATO PARA EL CRECIMIENTO DE *Bacillus thuringiensis* Y DIFRACCIÓN DE RAYOS X PARA LA DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA CRY.**

**QUE PRESENTA EL  
INGENIERO AGRÓNOMO RIGOBERTO MARTÍNEZ GARCÍA**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

**DIRECTOR: DRA. ANA KARIN NAVARRO MARTINEZ**

**CO-DIRECTOR: DR. FERMÍN PÉREZ GUEVARA**



**DEDICADO.,**

**A mi madre [ALICIA], a mi hermano [M. Sc. ALFREDO]  
y mi padre [RIGOBERTO].**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad del Papaloapan [UNPA-Campus Tuxtepec] y al Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología [LINAN-Campus Tuxtepec], por haber aceptado a este individuo para realizar la maestría en sus instalaciones, realizar parte de este trabajo en sus laboratorios, a los técnicos que me brindaron su apoyo y a mis compañeros de la maestría por brindarme comentarios tan críticos en la realización de este trabajo.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco (CINVESTAV-Unidad Zacatenco) al departamento de Biotecnología y Bioingeniería por haber prestado sus instalaciones para llevar a cabo este trabajo, a los técnicos que me brindaron su apoyo para realizar este trabajo y al amigo Gurusamy por haberme apoyado para realizar ciertas técnicas.

A la Dra., Ana Karin Navarro Martinez por haber aceptado a este individuo en su grupo trabajo, orientándolo, moldeándolo e ilustrándolo y sobre todo aguantándolo gracias.....

Al Dr., Fermín Pérez Guevara por haberme permitido trabajar en su laboratorio y orientarme en este trabajo.

Al Dr., Erick Juárez Arellano por haberme apoyado este trabajo con las pruebas de difracción de rayos X [DRX].

Al Professor. Gwo-Chyuan Shaw por haber proporcionado la cepa BNA6.

AL Dr. J. Eleazar Barboza-Corona que nos proporcionó la cepa Cry-B.

Al Dr. Mario Pedraza Reyes que nos proporcionó la cepa *Bacillus subtilis* 168.

A los minios [Michell, Crisanto y Adrián].

A CONACYT por la beca para la realización de este trabajo [con número de registro 557669] y al proyecto Problemas Nacionales 2015 No. 2015-01-1847.

## CONTENIDO

|   |      |
|---|------|
| ÍNDICE DE FIGURAS .....   | v    |
| ÍNDICE DE TABLAS. ....  | viii |
| Abreviaturas .....  | ix   |
| Resumen .....   | x    |
| Abstract.....   | xi   |
| 1 INTRODUCCIÓN.....   | 12   |
| 2 ANTECEDENTES.....   | 12   |
| 2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....   | 13   |
| 2.2 Proteína Cry.....   | 13   |
| 2.3 Medios de cultivo para producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....                                | 14   |
| 2.4 Molienda mecánica de alta energía.....  | 17   |
| 2.5 Métodos de detección y cuantificación de proteína Cry .....   | 18   |
| 2.6 Difracción de rayos X .....   | 20   |
| 3 JUSTIFICACIÓN .....   | 22   |
| 4 HIPÓTESIS .....   | 23   |
| 5 OBJETIVO GENERAL.....   | 24   |
| 5.1 Objetivos específicos .....   | 24   |
| 6 MATERIALES Y MÉTODOS. ....  | 25   |
| 6.1 Microorganismos.....  | 25   |
| 6.2 Medios de cultivo. ....   | 26   |
| 6.2.1 Gerry Rowe/harina de soya (GR/HS) .....   | 27   |
| 6.2.2 Gerry Rowe/soya modificada (GR/SM).....   | 28   |
| 6.2.3 Medio Basal de Harina de Soya/Modificado (MHS/M).....   | 28   |
| 6.3 Fermentaciones. ....  | 29   |
| 6.4 Soya Modificada.....  | 30   |
| 6.5 Técnicas analíticas. ....   | 31   |
| 6.5.1 Conteo de bacilos y esporas. ....   | 31   |
| 6.5.2 Cuantificación de azúcares reductores.....  | 31   |
| 6.5.3 Determinación de nitrógeno amínico. ....  | 31   |
| 6.5.4 Medición de carbono y nitrógeno elemental [TOC]. ....   | 32   |
| 6.5.5 Cuantificación de CO <sub>2</sub> .....   | 32   |
| 6.5.6 Caracterización de los productos de fermentación por Difracción de rayos X<br>(método de polvos)..... | 33   |
| 6.5.7 Tinción de cristales de proteína Cry.....   | 33   |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 7     | RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 35 |
| 7.1   | Contenido carbono y nitrógeno .....   | 35 |
| 7.1.1 | Contenido de carbono y nitrógeno del medio Gerry Rowe.....  | 35 |
| 7.1.2 | Contenido de carbono y nitrógeno de la soya modificada con molienda mecánica de alta energía.....   | 38 |
| 7.2   | Cinéticas a nivel matraz.....   | 40 |
| 7.2.1 | Cinéticas del medio Gerry Rowe/harina de soya (GR/HS) sin/con hidrólisis. ....  | 40 |
| 7.2.2 | Cinéticas del medio Gerry Rowe/soya modificada (GR/SM) con molienda mecánica.....   | 42 |
| 7.3   | Detección de la proteína Cry mediante DRX.....  | 45 |
| 7.3.1 | Patrón de Difracción de la soya modificada con molienda mecánica. ....  | 45 |
| 7.3.2 | Patrones de difracción de polvos de los componentes del medio Gerry Rowe....  | 46 |
| 7.3.3 | Patrones de difracción de polvos del medio de cultivo de Gerry Rowe/soya modificada por molienda mecánica durante 5 minutos.....  | 48 |
| 7.3.4 | Patrones de difracción de polvos de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. HD-73 y <i>Bacillus subtilis</i> var. 168 en medio líquido y sólido. ....                                | 49 |
| 7.3.5 | Patrones de difracción de polvos de los cultivos en medio Gerry Rowe/soya modificada por molienda mecánica.....   | 51 |
| 7.4   | Patrones de difracción de los cultivos con medio Gerry Rowe/soya modificado con molienda mecánica de 2 cepas diferentes de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....                  | 53 |
| 7.4.1 | Difractogramas del cultivo <i>Bacillus thuringiensis</i> cepa BNA 6.....  | 53 |
| 7.4.2 | Difractogramas del cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> cepa Cry-B.....   | 54 |
| 7.5   | Cinéticas en fermentador de <i>Bacillus thuringiensis</i> HD-73 y cepa Cry-B usando medio Gerry Rowe Modificado con Soya modificada durante 5 minutos con molienda mecánica. .. | 56 |
| 7.5.1 | Cinética de crecimiento y esporulación. ....  | 56 |
| 7.5.2 | Cinética de consumo de azúcares reductores y nitrógeno amínico.....   | 59 |
| 7.5.3 | Cinéticas de liberación de CO <sub>2</sub> . ....   | 61 |
| 7.5.4 | Patrón de difracción en polvos en cinéticas a nivel reactor.....  | 65 |
| 8     | CONCLUSIONES.....   | 74 |
| 9     | PERSPECTIVAS .....  | 75 |
| 10    | BIBLIOGRAFIA.....   | 76 |
| 11    | ANEXO A .....   | 80 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 7.1. Concentración de carbono y nitrógeno en glucosa, peptona de caseína y extracto de levadura.....   | 37 |
| Figura 7.2. Concentración de carbono y nitrógeno en glucosa, peptona de caseína y extracto de levadura obtenida por medio del Analizador de carbono y nitrógeno elementales.....  | 38 |
| Figura 7.3. Concentración de azúcares reductores en la soya modificada por molienda mecánica a diferentes de tiempo de molienda obtenida mediante espectrofotometría de UV-Vis.....   | 39 |
| Figura 7.4. Concentración de nitrógeno amínico en la soya modificada por molienda mecánica a diferentes de tiempo de molienda obtenida mediante espectrofotometría de UV-Vis.....   | 40 |
| Figura 7.5. Cinéticas de crecimiento y esporulación en medio Gerry Rowe, en medio Gerry Rowe/harina de soya con hidrólisis y en medio Gerry Rowe/harina de soya sin hidrolizar de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD-73.....                           | 43 |
| Figura 7.6. Cinéticas de crecimiento en medio Gerry Rowe y medio Gerry Rowe/soya modificada tratada mecánicamente durante 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 8 minutos, 10 minutos y 20 minutos de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD-73..... | 45 |
| Figura 7.7. Cinéticas de esporulación en medio Gerry Rowe y en medio Gerry Rowe/soya modificada mecánicamente durante 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 8 minutos, 10 minutos y 20 minutos de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD-73.....     | 46 |
| Figura 7.8. Difractogramas de la soya modificada por molienda mecánica a diferentes tiempos molienda.....   | 47 |
| Figura 7.9. Difractogramas de los componentes del medio Gerry Rowe (parte I).....   | 48 |
| Figura 7.10. Difractogramas de los componentes del medio Gerry Rowe (parte II).....   | 49 |
| Figura 7.11. Difractogramas de los componentes del medio Gerry Rowe/soya modificada mecánicamente durante 5 minutos y la mezcla de los componentes.....   | 50 |
| Figura 7.12. Difractogramas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD-73 y <i>Bacillus subtilis</i> var. 168 obtenidos en un medio liquido (caldo nutritivo).....  | 51 |
| Figura 7.13. Difractogramas de las cinéticas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD-73 de los medios de Gerry Rowe y Basal de Harina de Soya con y sin hidrólisis.....  | 52 |
| Figura 7.14. Difractogramas de los cultivos de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD-73 con el medio Gerry Rowe/soya modificada con molienda mecánica a diferentes tiempos.....   | 53 |
| Figura 7.15. Difractogramas de tres cinéticas de <i>Bacillus thuringiensis</i> con la cepa HD-73 en el medio Gerry Rowe/soya modificada con molienda mecánica a 5, 8 y 10 minutos.....  | 54 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 7.16. Difractogramas de tres cultivos de <i>Bacillus thuringiensis</i> de la cepa BNA 6 en el medio Gerry Rowe/soya modificada con molienda mecánica a 5, 8 y 10 minutos.....  | 55 |
| Figura 7.17. Difractogramas de tres cultivos de <i>Bacillus thuringiensis</i> con la cepa Cry-B en el medio Gerry Rowe/soya modificada durante 5, 8 y 10 minutos de molienda mecánica.....  | 56 |
| Figura 7.18. Cinéticas de crecimiento HD73 (I), HD73 (II) y HD73 (III) y de esporulación HD73 (I), HD73 (II) y HD73 (III) de <i>Bacillus thuringiensis</i> en medio Gerry Rowe/soya modificada durante 5 minutos por molienda mecánica de alta energía..... | 59 |
| Figura 7.19. Cinética de crecimiento y de esporulación), del <i>Bacillus thuringiensis</i> de la cepa Cry-B, en el medio de Gerry Rowe/soya modificada durante 5 minutos.....   | 60 |
| Figura 7.20. Cinéticas de consumo de glucosa <i>Bacillus thuringiensis</i> de la cepa HD-73 (I), (II) y (III) en el medio de Gerry Rowe/soya modificada durante 5 minutos.....  | 61 |
| Figura 7.21. Cinéticas de consumo de nitrógeno amínico de <i>Bacillus thuringiensis</i> HD-73 (I), (II) y (III), en el medio de Gerry Rowe/soya modificada durante 5 minutos con molienda mecánica.....   | 61 |
| Figura 7.22. Cinética de consumo de glucosa y consumo de nitrógeno amínico, de <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry-B, en el medio de Gerry Rowe/soya modificada durante 5 minutos por molienda mecánica.....  | 62 |
| Figura 7.23. Cinética de crecimiento y liberación de CO <sub>2</sub> , durante la fermentación de <i>Bacillus thuringiensis</i> de la cepa HD-73 (I) en el medio de Gerry Rowe/soya modificada durante 5 minutos con molienda mecánica.....                 | 63 |
| Figura 7.24. Cinética de crecimiento y liberación de CO <sub>2</sub> , durante la fermentación de <i>Bacillus thuringiensis</i> de la cepa HD-73 (II), en el medio de Gerry Rowe/soya modificada durante 5 minutos de molienda mecánica.....                | 64 |
| Figura 7.25. Cinética de crecimiento y liberación de CO <sub>2</sub> de <i>Bacillus thuringiensis</i> de HD-73 (III), en el medio de Gerry Rowe/soya modificada durante 5 minutos con molienda mecánica.....  | 65 |
| Figura 7.26. Cinética de crecimiento y liberación de CO <sub>2</sub> , durante las fermentaciones de <i>Bacillus thuringiensis</i> cepa Cry-B en medio de Gerry Rowe/soya modificada con molienda mecánica durante 5 minutos.....                           | 66 |
| Figura 7.27. Difractogramas de la cinética de <i>Bacillus thuringiensis</i> HD-73 (I), en el medio de Gerry Rowe/soya modificada con molienda mecánica durante 5 minutos.....   | 68 |
| Figura 7.28. Difractogramas de la cinética de <i>Bacillus thuringiensis</i> HD-73 (II), en el medio de Gerry Rowe/soya modificada con molienda mecánica durante 5 minutos.....  | 69 |
| Figura 7.29. Difractogramas de la cinética de <i>Bacillus thuringiensis</i> HD-73 (III), en el medio de Gerry Rowe/soya modificada por molienda mecánica durante 5 minutos.....   | 71 |

Figura 7.30. Difractogramas de la cinética de *Bacillus thuringiensis* Cry-B, en el medio de Gerry Rowe/soya modificada con molienda mecánica durante 5 minutos.....72

Figura 7.31. Difractogramas de la cinética de *Bacillus thuringiensis* Cry-B, en el medio de Gerry Rowe/soya modificada con molienda mecánica durante 5 minutos.....73

## ÍNDICE DE TABLAS.

|  |    |
|--|----|
| Tabla 6.1. Componentes del medio de cultivo Gerry Rowe.....  | 27 |
| Tabla 6.2. Contenido del medio basal de harina de soya.....  | 28 |
| Tabla 6.3. Componentes del medio de cultivo de Gerry Rowe/harina de soya.....  | 28 |
| Tabla 6.4. Componentes del medio de cultivo de Gerry Rowe/soya modificada.....   | 29 |
| Tabla 6.5. Contenido del medio basal de harina de soya modificada.....   | 30 |
| Tabla 6.6. Condiciones de operación del fermentador.....   | 31 |
| Tabla 6.7. Procedimiento de teñido y desteñido de cristales de proteína Cry.....   | 35 |
| Tabla 7.1. Parámetros cinéticos de las fermentaciones en matraz con medio Gerry Rowe y en medio Gerry Rowe/harina de soya.....   | 42 |
| Tabla 7.2. Parámetros cinéticos de los cultivos con medio Gerry Rowe/soya modificada por molienda mecánica a diferentes tiempos.....   | 44 |
| Tabla 7.3. Parámetros cinéticos de los cultivos en fermentador de <i>Bacillus thuringiensis</i> HD-73 (I, II y III) con medio Gerry Rowe modificado con soya modificada durante 5 minutos..... | 58 |

## Abreviaturas

|                    |  |
|--------------------|--|
| GR                 | Medio Gerry Rowe.                                |
| GR/HS              | Medio Gerry Rowe/Harina de Soya.                 |
| GR/SM              | Medio Gerry Rowe/Soya Modificado.                |
| MHS                | Medio de Harina de Soya Basal.                   |
| MHS/M              | Medio de Harina de Soya Basal/Modificado.        |
| MHS/CH             | Medio de Harina de Soya Basal/ Con Hidrolisis.   |
| MHS/SH             | Medio de Harina de Soya Basal/ Sin Hidrolisis.   |
| TOC                | Total Organic Carbon (por sus siglas en ingles). |
| G                  | Glucosa.   |
| PC                 | Peptona de Caseína.                              |
| EL                 | Extracto de Levadura.                            |
| E08/mL             | Cuentasx10 <sup>8</sup> por Mililitro.           |
| g/L                | Gramos por Litro.                                |
| mg/L               | Miligramos por Litro.                            |
| X <sub>max</sub>   | Biomasa máxima obtenida.                         |
| Esp <sub>max</sub> | Esporulación máxima obtenida.                    |
| t <sub>xmax</sub>  | Tiempo de biomasa máxima obtenida.               |
| t <sub>0esp</sub>  | Tiempo esporulación máxima obtenida.             |
| u.a.               | Unidades Arbitrarias.                            |

## Resumen

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria de gran interés comercial debido su capacidad para producir la proteína Cry, ampliamente utilizada como controlador biológico de plagas y recientemente propuesta como posible fármaco contra el cáncer. Debido a la importancia comercial de *B. thuringiensis*, diversos trabajos se han publicado sobre los medios de cultivo para su producción buscando sustratos baratos y de alta disponibilidad. Sin embargo, estos sustratos requieren de un pretratamiento que incrementa los costos de producción. En trabajos previos del grupo de trabajo se ha utilizado a la molienda mecánica de alta energía como un método de pretratamiento rápido y de bajo costo.

En el presente trabajo se propone el uso de soya modificada por molienda mecánica de alta energía como sustrato para la producción de *Bacillus thuringiensis*. Para ello se comparó el crecimiento de la bacteria en diferentes medios de cultivo con soya texturizada, harina de soya o soya modificada por molienda mecánica. Por otro lado, también se han reportado diversas técnicas para la detección y cuantificación directa e indirecta de la proteína Cry. Sin embargo, en dichas técnicas no se utilizan estándares de las proteínas puras debidas a que existen más de 700 proteínas Cry de diferentes tamaños, a que su proceso de purificación es muy complicado y a que no existen en el mercado. Considerando que Cry es un cristal proteico, en el presente trabajo se propone el uso de la difracción de rayos X de polvos para la detección de dicha proteína de manera más rápida. Para lo cual se utilizaron tres cepas de *Bacillus thuringiensis*, la variedad HD-73 (variedad que produce proteína Cry y esporas), variedad BNA 6 una cepa asporogénea (produce Cry y no produce esporas) y una variedad acristalífera Cry-B (no produce Cry y si produce esporas). También se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis* 168 como control negativo ya que no produce proteína Cry pero si produce esporas.

La molienda mecánica de alta energía cambia las concentraciones de azúcares reductores y nitrógeno amínico. La mayor concentración de azúcares reductores y de nitrógeno amínico de la soya se obtuvo a los 5 y 8 min de molienda, respectivamente. La máxima concentración de bacilos se obtuvo con el medio Gerry Rowe con soya molida durante 5 min.

La difracción de rayos X de polvos es una técnica cualitativa que permitió la detección de cristales de proteína Cry. Los difractogramas de muestras a distintos tiempos permiten detectar el posible inicio de la formación de la proteína Cry.

## Abstract

Cry protein is used as bioinsecticide and recently as a possible drug for cancer treatment. Thus, *Bacillus thuringiensis* is a microorganism of commercial interest due to the Cry protein production. Many studies about growth medium of *Bacillus thuringiensis* production have been reported. Nowadays, cheap and highly available new substrates are sought. Although, these substrates normally require pretreatments that increase the production costs. In previous studies carried out in the work group high-energy ball milling has been used as a fast and low cost pretreatment. Thus, in this study the modification of soybean by high-energy ball milling and its use as a substrate for *Bacillus thuringiensis* production is proposed. Several culture media like texturized soybean, soybean meal and modified soybean were compared.

Several studies have reported the detection and quantification of Cry protein. However, because there are more than 700 Cry proteins of different sizes and conformations and that their purification process is very complicated, there are no reference standards for pure Cry proteins in the market. Thus, considering the crystalline nature of Cry protein in the present study, X ray powder diffraction is proposed for its detection. Three *Bacillus thuringiensis* strains were used var. *kurstaki* HD-73, producer of crystals and spores; BNA 6, producer of crystals but not spores; and Cry-B, who do not produce crystals but produce spores. *Bacillus subtilis* 168 was used as negative control (not produce crystals neither spores).

High-energy ball milling pretreatment of soybean affects the reducing sugar and amino nitrogen concentration. The maximum concentration of reducing sugar and amino nitrogen in soybean were obtained at 5 and 8 min of milling, respectively. The maximum bacilli concentration was obtained when the soybean milled during 5 min was used in the medium.

The crystals of Cry protein were detected with X ray powder diffraction. Through the diffractograms of samples at different times of the *Bacillus thuringiensis* culture it is possible to detect the onset of the formation of the Cry protein crystals.

## 1 INTRODUCCIÓN

La biotecnología agrícola propone el manejo integrado de plagas como una alternativa para la reducción de la dependencia del uso excesivo de insecticidas químicos. El manejo integrado de plagas contrarresta las plagas y las enfermedades de diferentes plantas utilizando un principio activo, que es un organismo vivo o una sustancia biológicamente activa. Dentro de estos se encuentran los microorganismos entomopatógenos como bacterias, hongos, virus, nematodos y protozoarios [Ibarra *et al.* 2006; Carreras, 2011].

Más del 90% de los productos biológicos utilizados actualmente en la agricultura son formulados a partir de *Bacillus thuringiensis*. Las ventas de estos productos en el año 2000 fueron de casi 200 millones de dólares. Algunos de los productos de *Bacillus thuringiensis* son: Bitoxibacillín, Eksotoxin, Agritol, Bactospeine, Bathurin, Biospor, Dipel, Javelin, Sporeine [Orietta, 2002].

El medio de cultivo y las condiciones de producción de este microorganismo juegan un papel importante en su toxicidad. *Bacillus thuringiensis* crece y esporula lentamente en medios definidos o minerales que son generalmente costosos. Sin embargo, se han empleado medios semidefinidos de materias primas como: melazas, líquido de remojo de maíz, harina de pescado, harina de soya o de semilla de algodón para su producción a costos reducidos [Pendlenton, 1969].

## 2 ANTECEDENTES

## **2.1 *Bacillus thuringiensis***

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria gram positiva, aerobia y esporógena del grupo I del género *Bacillus*. Se caracteriza por producir un cuerpo paraesporal cristalino durante su fase de esporulación [Bulla *et al.*, 1980; Soberón y Bravo., 2007]. Este es un cristal proteico constituido por  $\delta$ -endotoxinas, denominada proteína Cry ó Cyt. Estas proteínas tienen efecto tóxico contra insectos e invertebrados [Soberón y Bravo., 2007].

El ciclo de vida del *Bacillus thuringiensis* presenta tres fases secuenciales: crecimiento vegetativo, transición y esporulación, en las que se presentan cambios importantes en el metabolismo [Rowe, 1990; Rodríguez *et al.* 1991]. El crecimiento vegetativo de *Bacillus thuringiensis* se lleva a cabo a base del catabolismo de azúcares por la ruta de Embded-Meyerhof-Parnas [EMP] de un 93 a un 100% y muy pocas veces utiliza la vía de la pentosa fosfato [Nickerson *et al.* 1974]. En la etapa de esporulación se da la formación de esporas y de la proteína Cry. Por último, en la lisis celular la espora madura y el cristal paraesporal son liberados al medio [Bulla *et al.* 1971; Rowe, 1990].

## **2.2 Proteína Cry**

Las proteínas Cry son cualquiera proteína paraesporal de *Bacillus thuringiensis* que muestra un efecto tóxico contra insectos como: lepidópteros, coleópteros, dípteros, himenópteros y ácaros. Además, también afecta a invertebrados como: nemátodos, gusanos planos y protozoarios en el estado larvario [Orietta, 2002; Soberón y Bravo., 2007]. Las proteínas Cyt denotan a las proteínas paraesporales de *Bacillus thuringiensis* que muestren actividad hemolítica [Soberón

y Bravo, 2007]. Debido a la importancia económica de la proteína Cry como bioinsecticida se han realizado diversos estudios para generar medios de cultivo baratos y de fácil acceso para disminuir sus costos de producción [Soberón y Bravo, 2007].

### **2.3 Medios de cultivo para producción de *Bacillus thuringiensis***

La optimización del proceso de producción del complejo espora-cristal [ $\delta$ -endotoxina] para el control biológico de plagas contempla el desarrollo de diversos medios de cultivo capaces de satisfacer las necesidades nutricionales y energéticas de la cepa a desarrollar. De esta forma la optimización del proceso cumple con la condición de mantener bajos costos y altos rendimientos en la producción de bioinsectidas [Matsumoto *et al.* 2010; Yañez-Mendizábal *et al.* 2012].

Existe una gran variedad de medios de cultivo para *Bacillus thuringiensis* en la que se encuentran medios complejos constituidos por sales minerales, glucosa, peptona de caseína y extracto de levadura, básicamente. Dubois [1968] reportó una alta cantidad de esporas [ $2 \times 10^8$  esporas/mL] usando medios complejos de glucosa, peptona de caseína y sales minerales. Por otro lado, Smith [1982] usando como medio de cultivo extracto de levadura, sales minerales y agar, reportan  $2.5 \times 10^8$  esporas/mL en un periodo de 24 a 36 horas de fermentación.

Desde hace tiempo se han estado empleando medios semidefinidos de materias primas como: melazas, líquido de remojo de maíz, harina de pescado, harina de soya o de semilla de algodón. Por ejemplo, Pendleton [1969] reporta un medio de harina de pescado, almidón, carbonato de calcio y sales para producir *Bacillus thuringiensis*, reportando que éste se reproduce rápidamente. Dulmage, [1970] produjo esporas y  $\delta$ -endotoxina con 12 cepas de *Bacillus*

*thuringiensis* utilizando dos medios de cultivo. El primero consistía en dextrosa, triptosa, maicena, extracto de levadura y fosfatos; y el segundo estaba constituido de proflo-peptona, dextrosa y sales minerales. El autor reporta que la actividad tóxica de los extractos obtenidos de los medios, no corresponde a la cuenta de esporas ni a las cuentas de crecimiento de este microorganismo. El autor concluye que la toxicidad de las preparaciones de *Bacillus thuringiensis* varía con la cepa aislada, así como con el medio de cultivo empleado. Dulmage y de Barjac [1973], para *Bacillus thuringiensis* HD-187 [5a5b], utilizaron tres medios de cultivo diferentes, todos con 1.5 % peso de glucosa, 0.2 % peso de peptona, 0.2 % peso de extracto de levadura y sales minerales, diferenciado al 1 % peso de harina de semilla de algodón, 2% peso de harina de semilla de algodón y 2% peso de harina de semilla de algodón adicionando con remojo de maíz al 1 % peso. Los autores reportan  $2 \times 10^6$  UI/L de concentrado obtenido, teniendo un impacto en potencia de  $200 \times 10^3$  UI/mg.

Por otro lado, Goldberg *et al.* [1980] optimizaron las condiciones de producción del complejo espora-cristal [ $\delta$ -endotoxina] a una escala piloto con fermentadores de 500 L. El medio de cultivo consistía en una mezcla de glucosa 30.0 g/L, peptona de soya 20.0 g/L, extracto de levadura 4.5 g/l, liquido de remojo de maíz 5.0 mL/L, KCl 3.0 g/L,  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$  3.0 g/L,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  7.0 mL/L,  $\text{MgSO}_4$  2.0 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  36.0 mg/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  13.5 mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  7.5 mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  7.5 mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  40.0 mg/L de agua destilada. Las condiciones de fermentación utilizadas fueron: temperatura del medio 32 °C, aireación de 0.3 vvm, agitación de 120 a 160 rpm y pH de 6.2-7.4. Con lo cual reportan  $4 \times 10^9$  UFC/mL en un tiempo aproximado de 60 horas de fermentación.

Actualmente se ha preferido el uso de subproductos o desechos agrícolas para bajar los costos en la producción de *Bacillus thuringiensis*. Por ejemplo, en Brasil la producción de *Bacillus*

*thuringiensis* es en fermentación sumergida. Ernandes *et al.* (2013) estudiaron utilizaron licor de maíz, un subproducto del procesamiento industrial de la bellota, la triptosa y caldo con/sin adición de azúcar. El crecimiento celular se evaluó por densidad óptica a 620 nm, la producción de esporas por el recuento de células viables totales y CL<sub>50</sub> por bioensayos contra larvas de 4º estadio. Entre los cuatro sustratos evaluados, el medio compuesto por glucosa más licor de maíz presentó la mejor generación de esporas.

En el 2014, Patil *et al.* compararon dos fuentes diferentes de carbono-nitrógeno: garbanzo y la harina de soya. Comparando los costos de elaboración observaron que el medio con harina de soya es 23 veces más barato que el de garbanzo, en términos de la obtención de biomasa, de esporas, de la toxina y la CL<sub>50</sub>.

Los productos y desechos de origen agropecuario contienen altas cantidades de carbohidratos en forma de almidón y/o celulosa. Dichos sustratos son muy complejos en cuanto a su composición debido a que además del almidón y/o celulosa pueden contener pigmentos, fibra alimentaria, proteína, polifenoles, lignina, etc. En general, se requiere de un pretratamiento para romper estas moléculas en azúcares más pequeños y de fácil asimilación para el microorganismo [Karapinar y Kargi, 2006].

Dependiendo de los productos y/o desechos agropecuarios se puede requerir pretratamientos con procesos como corte o aplastamiento mecánico [Okamoto. 2000; Kim *et al.* 2004], hidrólisis enzimática ácida [Okamoto. 2000; Fang *et al.* 2006] o esterilización [Wang *et al.* 2003]. La hidrólisis es el pretratamiento más utilizado, aunque sus principales desventajas son el uso de ácidos o álcalis, el tiempo y la energía utilizada [Flores-Farías, 2004].

Por otro lado, se han reportado diversos métodos físicos como la sonicación, microondas y molienda mecánica para cambiar las propiedades fisicoquímicas de diferentes productos y/o

desechos agropecuarios. En particular utilizando molienda mecánica se ha reportado que se mejora la solubilidad y absorción de agua de la harina de arroz, almidón de maíz [Sheghua *et al.* 2014] y almidón de Yuca [Huang *et al.* 2008]. La molienda mecánica ligeramente despolimeriza la amilosa en almidones [Shmiele *et al.*, 2015]. Mientras que la amilopectina se convierte en fragmentos de bajo peso molecular y el tamaño molecular disminuye con el aumento del tiempo de molienda [Shmiele *et al.* 2015]. En el presente trabajo se propone el uso de soya modificada con molienda mecánica de alta energía como sustrato del medio de cultivo para la producción de *Bacillus thuringiensis*.

## **2.4 Molienda mecánica de alta energía**

La molienda mecánica es una técnica compleja de procesamiento de polvos bajo condiciones de no-equilibrio que involucra varias etapas que van desde la homogeneización de la mezcla de polvos hasta la síntesis de nuevos compuestos. A la molienda mecánica que modifica la estructura de los reactivos o elementos originales y termina en una transformación de fase (reacción química) se le conoce como procesos mecanoquímicos. La síntesis mecanoquímica es la etapa en la que se producen reacciones químicas y transformaciones de fase durante la molienda debido a la aplicación de energía mecánica. Una característica importante de la mecanoquímica es que la deformación plástica y los procesos químicos son simultáneos [Martínez, 2014].

Las reacciones mecanoquímicas pueden resultar en la síntesis de nuevos materiales; procesos de reducción / oxidación; reacciones de intercambio; descomposición y transformaciones de fases tanto en sólidos orgánicos como inorgánicos. Los materiales producidos de esta manera

ya han encontrado aplicaciones en áreas tales como materiales de almacenamiento de hidrógeno, sensores de gas, fertilizantes, catalizadores, entre otros. Esta técnica se ha convertido en uno de los mejores métodos de síntesis debido a su bajo costo de operación [Suryanarayana, 2001].

Debido a que el objetivo de la hidrólisis de los polímeros naturales es la ruptura de enlaces químicos (almidones, celulosas, etc.) para generar azúcares reductores, la energía transferida por las bolas durante la molienda de alta energía podría tener el mismo efecto en un solo paso. Cabe mencionar que la molienda mecánica de alta energía no se ha reportado y/o utilizado para la generación de azúcares reductores o como pretratamiento de sustratos para medios de cultivo.

## **2.5 Métodos de detección y cuantificación de proteína Cry**

Los métodos más empleados para la identificación y cuantificación de la proteína Cry son: Lowry, Bradford, electroforesis de proteínas, SDS-PAGE y ELISA.

El método de Lowry consiste en una valoración colorimétrica cuantitativa de las proteínas. Bajo condiciones alcalinas el  $\text{Cu}^{++}$  forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas y se reduce a  $\text{Cu}^+$ . El  $\text{Cu}^+$  así como los grupos R de la tirosina, el triptofano y la cisteína reaccionan con el reactivo de Folin. Este compuesto reacciona primero originando un producto inestable que se reduce lentamente a azul de molibdeno/tungsteno en medio ácido [Lowry *et al.* 1951]. El método de Bradford [Bradford, 1976] se basa en el color azul de Coomassie G-250. Dicho colorante cambia de azul a rojo cuando se une a la proteína. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. La

unión colorante-proteína es un proceso muy rápido [2 min] y el complejo permanece estable durante un tiempo relativamente largo, una hora. Consecuentemente, se considera éste un proceso muy rápido y que no requiere un tiempo crítico para el ensayo. Aunque es relativamente sensible a interferencias por detergente y líquidos orgánicos como el metanol y por cationes tanto de sodio como potasio y carbohidratos, como la sacarosa. Otras sustancias que interfieren en el ensayo son los agentes fuertemente alcalinos, aunque se puede evitar con la utilización de amortiguadores. Los únicos componentes encontrados que interfieren en el color del ensayo son altas concentraciones de detergentes como el SDS, Triton X-100, etc.

La electroforesis puede usarse para separar y comparar una mezcla compleja de proteínas y evaluar la pureza durante el proceso de aislamiento. Además, permite conocer algunos valores aproximados de las características fisicoquímicas como: la composición de subunidades, punto isoeléctrico, tamaño y carga [Miraglia *et al.* 2004]. En la electroforesis, la migración de las partículas o moléculas cargadas ocurre cuando se establece un campo eléctrico. La velocidad de la migración depende de la fuerza del campo eléctrico aplicado y de la carga neta de las moléculas a separar. La muestra se encuentra disuelta en una disolución llamada amortiguador de corrida. Cuando éste se encuentra en un pH cercano a 9.0 la mayor parte de las proteínas se encontrarán cargadas negativamente. Por lo tanto, al aplicar el campo eléctrico ellas migrarán al ánodo. En condiciones normales, la migración diferencial dependerá tanto de la carga como del tamaño y estructura de la proteína. Aunque, cuando se trata de un gel en el que se ha incluido un agente como el dodecil-sulfato de sodio [SDS], que carga negativamente a la proteína generando su desnaturalización, perdiendo la estructura terciaria y cuaternaria, se logra que la migración sólo dependa de su peso molecular [Miraglia *et al.* 2004].

El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) se fundamenta en la reacción entre el analito que se intercala entre el anticuerpo o antígeno de la fase sólida y el anticuerpo o antígeno marcado con una enzima. Estos compuestos al reaccionar generan un color que se puede medir fotométricamente. Este ensayo puede ser cuantitativo o cualitativo, es altamente sensible, proporciona un alto rendimiento y es ideal para el análisis en laboratorios de alto volumen, ya que la proteína no se desnaturaliza [Miraglia *et al.* 2004].

Las técnicas mencionadas permiten realizar una medida de la concentración de proteína Cry pero se tienen que tomar ciertas consideraciones para su cuantificación. Por ejemplo, para los métodos Lowry y Bradford se requiere hacer una purificación previa de la proteína Cry. Mientras que para la electroforesis en gel se utiliza suero albúmina de bovino como estándar, el cual no tiene la misma afinidad al azul de Coomassie [Farrera 1998]. Por otro lado, actualmente en el mercado existen kits para la detección de proteína Cry1AC y Cry2A de la empresa Agdia [<https://orders.agdia.com/bt-cry1ac-and-cry2a-elisa-kit-psm-14900>]. Sin embargo, estos kits son para la detección y/o cuantificación de una proteína específica. Considerando la naturaleza cristalina de la proteína Cry se propone en el presente trabajo la difracción de rayos X de polvos como una técnica útil para la detección de la misma.

## **2.6 Difracción de rayos X**

La difracción de rayos X es una técnica muy usada en las tareas relacionadas con la estructura cristalina de los sólidos; incluyendo geometría, constantes de red e identificación de materiales. La región de los rayos X dentro del espectro electromagnético es normalmente considerada entre 0.01–10 nm [0.1-100 Å]. Dentro de las propiedades de los rayos X se encuentra la

difracción. La producción de estos ocurre cuando un haz altamente energético de electrones choca con un blanco metálico. La interacción entre la radiación X da lugar al fenómeno de la dispersión, al igual que con otros tipos de radiación electromagnética. Cuando los rayos X son dispersados por el entorno ordenado de un cristal, tienen lugar interferencias entre los rayos ya que la distancia entre los centros de dispersión es del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación. El resultado de esto es la difracción. En los patrones DRX, la posición angular y la intensidad de los picos son característicos de cada material. Por tanto, comparando los patrones experimentales con la información contenida en diversas bases de datos de compuestos reportados en la literatura [estables y metaestables] se puede identificar la fase o fases presentes en una muestra determinada.

Los métodos con los que se pueden caracterizar los materiales usando radiación de rayos X monocromática son: de Laue, del cristal rotante y de polvos.

Para fines de este estudio se utilizó el método de polvos o de Debye-Scherrer, en el que el cristal a ser examinado es reducido a un polvo muy fino de tal manera que forme un conjunto de microcristales en todas las orientaciones posibles. El polvo es irradiado con un haz monocromático de rayos X de manera que todas las reflexiones se pueden observar en un sólo patrón de difracción.

Cabe mencionar que no se encontraron reportes en la literatura con patrones de difracción de rayos X de polvos de proteínas Cry o de cultivos de *Bacillus thuringiensis*. Únicamente se ha reportado el uso de difracción de rayos X de monocristales para determinar la estructura tridimensional de las proteínas Cry [Höfte and Whiteley. 1989, Marjolein *et al.* 1995, Seisuke *et al.* 2014 y Manoj *et al.* 2015].

### 3 JUSTIFICACIÓN

En México, la demanda de insecticidas químicos ha aumentado anualmente en un 15%, en tanto que el rendimiento de los cultivos ha disminuido en un 15 al 25% debido al ataque de plagas. Este problema está asociado a que los insectos plaga, han generado resistencia a los plaguicidas. Entre otros efectos nocivos que causan los plaguicidas están la contaminación, el incremento en la resistencia de las plagas, la supresión de los enemigos naturales de las plagas y consecuentemente la resurgencia de plagas secundarias, lo que constituye un círculo vicioso. Considerando un enfoque ecológico se ha promovido la necesidad de desarrollar tecnologías que involucren el uso de medidas de control que no dejen residuos peligrosos en el medio ambiente. En este contexto el uso de bioinsecticidas y de coadyuvantes naturales ofrece una alternativa fácil y segura para el humano y para la estabilidad del agroecosistema. Sin embargo, los costos de producción de estos bioinsecticidas son aún elevados debidos, en parte, a los altos precios de los sustratos que se utilizan como medio de cultivo y a los costos del pretratamiento de los mismos. Por lo tanto, se han desarrollado medios de cultivo basados en materias primas más baratas como la melaza, el líquido de remojo de maíz, la harina de pescado, la harina de soya o de semilla de algodón, haciendo uso de nuevos pretratamientos. En el presente trabajo se propone el uso de soya modificada con molienda mecánica de alta energía como sustrato para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* para la producción de *Bacillus thuringiensis*.

## 4 HIPÓTESIS

La molienda mecánica de alta energía modificará la estructura de los compuestos presentes en la soya mejorando el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* y de esta manera promoviendo un mejor rendimiento en la producción de proteína Cry.

## 5 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la soya modificada con molienda mecánica de alta energía como sustrato en la fermentación con *Bacillus thuringiensis* y detectar la proteína Cry producida por difracción de rayos X.

### 5.1 Objetivos específicos

- Cuantificar el contenido de carbono y nitrógeno de la soya modificada por molienda mecánica a diferentes tratamientos.
- Determinar las cinéticas de esporas, bacilos, CO<sub>2</sub>, carbono y nitrógeno consumido durante la fermentación de *Bacillus thuringiensis* con medio de cultivo de soya modificada mecánicamente.
- Explorar el uso de la técnica de difracción de rayos X de polvos para la detección de proteína Cry cristalina.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1 Microorganismos.

Se utilizaron tres cepas de *Bacillus thuringiensis*; la variedad HD-73 (variedad que produce esporas y proteína Cry), la variedad BNA 6 una cepa asporogénea (no produce esporas) y una variedad acristalífera Cry-B (no produce proteína Cry). La cepa HD-73 fue donada por el laboratorio de bioprocesos del departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN unidad Zacatenco). La cepa BNA6 es una cepa transformada, mutada en el gen *sigF* que fue donada por el Profesor Gwo-Chyuan Shaw del Institute of Biochemistry and Molecular Biology, School of Life Science, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan, Republic of China. La cepa Cry-B es una cepa transformada que fue reportada que no produce cristales de proteína Cry. Esta cepa fue donada por el Dr. J. Eleazar Barboza-Corona, del Laboratorio de Biotecnología y Microbiología molecular de la Universidad de Guanajuato. También se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis* 168 como control negativo para la detección de la proteína Cry por difracción de rayos X. Esto debido a que *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis* pertenecen al grupo denominado de *Bacillus cereus* y por lo tanto se encuentran muy relacionados filogenéticamente. La principal diferencia que tiene *Bacillus thuringiensis* con las otras bacterias pertenecientes al grupo de *Bacillus cereus* es que es la única que produce cristales parasporales durante la esporulación [Whiteley y Schnepf, 1986; Ibrahim *et al.* 2010]. La cepa de *Bacillus subtilis* 168 fue donada por el Dr. Mario Pedraza Reyes del laboratorio del Departamento de Biología de la División de Ciencias Naturales de la Universidad de Guanajuato.

## 6.2 Medios de cultivo.

Se utilizaron cinco medios de cultivo para evaluar el crecimiento de *Bacillus thuringiensis*: el medio Gerry Rowe (GR), el medio Gerry Rowe/harina de soya (GR/HS), el medio Gerry Rowe con soya modificada por molienda mecánica de alta energía (GR/SM), el medio basal de harina de soya (MHS) y el medio basal de Harina de soya modificado [MHS/M]. En las tablas 6.1 y 6.2 se presentan las concentraciones de los componentes del medio Gerry Rowe y del medio basal de Harina de soya, respectivamente. El medio GR fue formulado por Gerald E. Rowe en 1990. El medio basal de harina de soya y el medio de harina de soya fueron diseñado por Farrera (1998) específicamente para mejorar los rendimientos de producción de proteína Cry mediante *Bacillus thuringiensis*. El autor propone el uso del medio basal de harina de soya para el inóculo y el medio de harina de soya para la fermentación.

Tabla 6.1. Componentes del medio de cultivo Gerry Rowe (GR).

| <b>Componente</b>                         | <b>Cantidad para 1 L</b> | <b>Cantidad para 1 L</b> |
|---|--------------------------|--------------------------|
| Glucosa                                   |                          | 10 g                     |
| Peptona de caseína                        |                          | 3.2 g                    |
| Extracto de levadura                      |                          | 3.2 g                    |
| Cloruro de calcio dihidratado             |                          | 0.106 g                  |
| Cloruro de potasio                        |                          | 0.5 g                    |
| Sulfato de magnesio heptahidratado        |                          | 0.3 g                    |
| Sulfato manganoso                         |                          | 0.05 g                   |
| Sulfato de zinc heptahidratado            |                          | 0.0075 g                 |
| Sulfato de cobre pentahidratado           |                          | 0.0045 g                 |
| Citrato férrico                           |                          | 0.075 g                  |
| Fosfato de sodio dibásico anhidro         |                          | 1.856 g                  |
| Fosfato de sodio monobásico monohidratado |                          | 1.153 g                  |
| Antiespumante                             |                          | 1 mL                     |

Tabla 6.2. Contenido del medio basal de harina de soya (MHS)

| <b>Componente</b>                   | <b>Cantidad para 1 L</b> | <b>Cantidad para 1 L</b>    |
|-------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Glucosa                             |                          | 30 g                        |
| Harina de soya                      |                          | 19.5 g                      |
| Extracto de levadura                |                          | 3.2 g                       |
| Sólidos de cocimiento de maíz       |                          | 5 g                         |
| Sulfato manganoso                   |                          | 0.04 g                      |
| Sulfato de magnesio heptahidratado  |                          | 0.2 g                       |
| Sulfato de zinc heptahidratado      |                          | 0.0058 g                    |
| Sulfato de cobre pentahidratado     |                          | 0.0075 g                    |
| Cloruro de cobalto                  |                          | 0.03 g                      |
| Cloruro de potasio                  |                          | 3 g                         |
| Sulfato ferroso                     |                          | 0.0135 g                    |
| Ácido fosfórico industrial [85 %]   |                          | 7 mL                        |
| Antiespumante Mazu DF [Mazer, S.A.] |                          | 1 mL                        |
| Hidróxido de sodio                  |                          | El necesario para un pH 7.4 |

### 6.2.1 Gerry Rowe/harina de soya (GR/HS)

El medio Gerry Rowe/harina de soya (GR/HS), se obtuvo sustituyendo la peptona de caseína del medio Gerry Rowe por harina de soya. En la tabla 6.3. se presentan los componentes del medio Gerry Rowe/harina de soya (GR/HS).

Tabla 6.3. Componentes del medio de cultivo de Gerry Rowe/harina de soya (GR/HS)

| <b>Componente</b>                         | <b>Cantidad para 1 L</b> | <b>Cantidad para 1 L</b> |
|---|--------------------------|--------------------------|
| Glucosa                                   |                          | 10 g                     |
| Harina de Soya                            |                          | 3.2 g                    |
| Extracto de levadura                      |                          | 3.2 g                    |
| Cloruro de calcio dihidratado             |                          | 0.106 g                  |
| Cloruro de potasio                        |                          | 0.5 g                    |
| Sulfato de magnesio heptahidratado        |                          | 0.3 g                    |
| Sulfato manganoso                         |                          | 0.05 g                   |
| Sulfato de zinc heptahidratado            |                          | 0.0075 g                 |
| Sulfato de cobre pentahidratado           |                          | 0.0045 g                 |
| Citrato férrico                           |                          | 0.075 g                  |
| Fosfato de sodio dibásico anhidro         |                          | 1.856 g                  |
| Fosfato de sodio monobásico monohidratado |                          | 1.153 g                  |
| Antiespumante                             |                          | 1 mL                     |

### 6.2.2 Gerry Rowe/soya modificada (GR/SM)

El medio Gerry Rowe/soya modificada (GR/SM), se obtuvo sustituyendo la peptona de caseína del medio Gerry Rowe por soya tratada con molienda mecánica de alta energía a diferentes tiempos de molienda. En la tabla 6.4., se presentan los componentes del medio Gerry Rowe/soya modificado (GR/SM).

Tabla 6.4. Componentes del medio de cultivo de Gerry Rowe/soya modificada (GR/SM).

| <b>Componente</b>                                     | <b>Cantidad para 1 L</b> | <b>Cantidad para 1 L</b> |
|---|--------------------------|--------------------------|
| Glucosa   |                          | 10 g                     |
| Soya modificada con molienda mecánica de alta energía |                          | 3.2 g                    |
| Extracto de levadura                                  |                          | 3.2 g                    |
| Cloruro de calcio dihidratado                         |                          | 0.106 g                  |
| Cloruro de potasio                                    |                          | 0.5 g                    |
| Sulfato de magnesio heptahidratado                    |                          | 0.3 g                    |
| Sulfato manganoso                                     |                          | 0.05 g                   |
| Sulfato de zinc heptahidratado                        |                          | 0.0075 g                 |
| Sulfato de cobre pentahidratado                       |                          | 0.0045 g                 |
| Citrato férrico                                       |                          | 0.075 g                  |
| Fosfato de sodio dibásico anhidro                     |                          | 1.856 g                  |
| Fosfato de sodio monobásico monohidratado             |                          | 1.153 g                  |
| Antiespumante   |                          | 1 mL                     |

### 6.2.3 Medio Basal de Harina de Soya/Modificado (MHS/M).

El medio basal de harina de soya modificado se obtuvo sustituyendo la glucosa por melaza de caña. En la Tabla 6.5., se presentan los componentes del medio basal de harina de soya modificado.

Tabla 6.5. Contenido del medio basal de harina de soya modificada (MHS/M).

| Componente                          | Cantidad para 1 L | Cantidad para 1 L           |
|-------------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| Melaza de caña                      |                   | 30 g                        |
| Harina de soya                      |                   | 19.5 g                      |
| Extracto de levadura                |                   | 3.2 g                       |
| Solidos de cocimiento de maíz       |                   | 5 g                         |
| Sulfato manganoso                   |                   | 0.04 g                      |
| Sulfato de magnesio heptahidratado  |                   | 0.2 g                       |
| Sulfato de zinc heptahidratado      |                   | 0.0058 g                    |
| Sulfato de cobre pentahidratado     |                   | 0.0075 g                    |
| Cloruro de cobalto                  |                   | 0.03 g                      |
| Cloruro de potasio                  |                   | 3 g                         |
| Sulfato ferroso                     |                   | 0.0135 g                    |
| Ácido fosfórico industrial [85 %]   |                   | 7 mL                        |
| Antiespumante Mazu DF [Mazer, S.A.] |                   | 1 mL                        |
| Hidróxido de sodio                  |                   | La necesaria para un pH 7.4 |

El medio basal de harina de soya requiere de un proceso de hidrólisis para que los polímeros de carbohidratos se rompan en sus monómeros o cadenas cortas. La hidrólisis se realizó a pH de 2 a 120°C y 1.3 kg/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos, en una autoclave. Después la hidrólisis se ajustó el pH con Na(OH) al 50% estéril.

### 6.3 Fermentaciones.

Los matraces se inocularon directamente con discos de esporas previamente elaborados. El fermentador se inóculo con 250 mL de un cultivo de 12 horas de *Bacillus thuringiensis* en medio Gerry Rowe. Este a su vez fue inoculado con un disco de esporas. Las fermentaciones en matraz se realizaron con 250 mL de medio de cultivo en matraces de 1 L y se incubaron en una agitadora Thermo Scientific USA a 180 rpm a una temperatura de 32 °C. Cuando se alcanzó el 85 al 90 % de la esporulación total se dio por finalizada la fermentación. Se tomaron muestras cada 8 h.

Las fermentaciones a nivel reactor se realizaron en un biorreactor de 5 L totalmente equipado y las condiciones de operación se presentan en la Tabla 6.6. La fermentación finalizó cuando se alcanzó el 85 al 90 % de la esporulación total y se tomaron muestras cada dos horas durante la fermentación.

Tabla 6.6. Condiciones de operación del fermentador.

| <b>Características</b> | <b>Unidades</b>  |
|------------------------|--|
| Agitación              | 600 rpm  |
| Temperatura            | 30 °C ± 1 °C   |
| Aireación              | 1 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto)                    |
| pH                     | 7.4 ± 0.2 (manteniendo con NaOH 2M y H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0.67M) |
| Presión aire           | Presión aire 2 kg/cm <sup>2</sup>  |
| Oxígeno disuelto       | 20 %   |

#### **6.4 Soya Modificada.**

La soya modificada fue generada dentro del grupo de trabajo por Urzua, 2017. Se obtuvo a partir de soya comercial sometida a molienda mecánica de alta energía a diferentes tiempos toda del mismo lote. Se utilizó un molino planetario de bolas PM 400/2 marca RETSCHN, con un tazón de 250 mL a 400 rpm y con una muestra inicial de 5.5 g. El material de molienda fue de acero inoxidable con 9 bolas de 20 mm. Los tiempos de molienda fueron de 2, 3, 4, 5, 8, 10 y 20 minutos.

## **6.5 Técnicas analíticas.**

### **6.5.1 Conteo de bacilos y esporas.**

Se realizó por cuenta directa con cámara Neubauer, para lo cual se realizaron diluciones seriales de cada muestra (1:100 y 1:1000).

### **6.5.2 Cuantificación de azúcares reductores.**

La concentración de azúcares reductores se determinó mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) utilizando glucosa como estándar. De una solución de 1 g muestra/10 mL, se tomaron 10 mL y se realizaron diluciones 1:1, 1:5 y 1:10 en agua destilada. Se utilizó un espectrofotómetro (UV-Vis modelo Lambda UV-125 marca Perkin Elmer) y se obtuvieron lecturas a longitud de onda de 540 nm [Miller, 1959]. Las mediciones se realizaron por duplicado.

### **6.5.3 Determinación de nitrógeno amínico.**

La concentración de nitrógeno amínico se determinó mediante la técnica de reactivo de Ninhydrina utilizando glicina como estándar [Moore y Stein 1954]. Se tomaron 10 mL de la muestra y se diluyó 1:1, 1:5 y 1:10 en agua destilada. Se utilizó un espectrofotómetro (UV-Vis modelo Lambda UV-125 marca Perkin Elmer) y se leyó la absorbancia a 570 nm.

#### **6.5.4 Medición de carbono y nitrógeno elemental [TOC].**

Es una técnica automatizada que analiza cuantitativamente muestras sólidas, líquidos viscosos y filtros para determinar la concentración de C (carbón), H (hidrógeno), N (nitrógeno), S (azufre) y O (oxígeno). Se basa en la combustión completa de las muestras en condiciones óptimas (950 a 1300 °C y atmósfera de oxígeno puro) para convertirlos en elementos antes mencionados o en gases simples (anhidro carbónico, nitrógeno, agua y anhídrido sulfuroso) [Shimadzu, 2017]. El equipo utilizado para este análisis fue un SSM-5000A con un TOC-VCS/CP analyzer, de marca SHIMAZU. Se analizó la glucosa, la peptona de caseína y el extracto levadura, con las siguientes proporciones: 1:1, 1:3, 1:7 y 1:9 y se realizaron dos repeticiones.

#### **6.5.5 Cuantificación de CO<sub>2</sub>**

Para la medición de CO<sub>2</sub> se utilizó el EX-2000 (OFF-GAS CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> ANALYZER) de la marca New Brunswick Scientific, acoplado al fermentador BIOFLO 3000 (New Brunswick Scientific, USA) y a una computadora para la recolección de datos.

### **6.5.6 Caracterización de los productos de fermentación por Difracción de rayos X (método de polvos).**

Se tomaron 50 mL de las muestras de las cinéticas realizadas en matraz y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 25 minutos en tubos falcon de 50 mL. El sobrenadante se desechó quedando la pastilla que se expuso a congelación a -20 °C durante 36 a 48 horas. Posteriormente fue liofilizado para su deshidratación durante 12 a 24 horas a 1.5 pascales de presión en una liofilizadora (marca LOBCONCO). De las cinéticas del fermentador se tomaron 12 mL en tubos falcon de 15 mL y se congelaron a -20 °C durante 36 a 48 horas. Posteriormente se liofilizaron en las mismas condiciones que las muestras de matraz.

Los polvos obtenidos fueron analizados por difracción de rayos X utilizando un difractómetro Bruker (modelo D8 Advance). Las condiciones de medición fueron: radiación de Cu K $\alpha$ , con un voltaje de 40 kV y amperaje de 30 mA, intervalo de 5° - 50° en 2 theta, tamaño de paso de 0.1 °, tiempo de paso de 8 segundos y una velocidad de rotación de 30 rpm.

### **6.5.7 Tinción de cristales de proteína Cry.**

De la última muestra de los cultivos se realizaron frotis mediante calor. Para teñir estos frotis se les agrego directamente una solución de azul de Coomassie al 1% (en 40% metanol y 7% ácido acético). Para desteñir se utilizó etanol al 50% v/v; solución de etanol, ácido acético en agua destilada (30% etanol, 7% ácido acético); y solución de metanol, ácido acético en agua destilada (25% metanol, 10% ácido acético). En la Tabla 6.7 se presenta el orden y tiempo que se le agregaron las soluciones mencionadas para la tinción de los cristales de proteína Cry.

Los frotis teñidos fueron observados en el microscopio de contraste de fase a 100X (BIOLÓGICO DIGITAL motic, modelo DM45C-F) con aumento de 400X (40X en el objetivo por 10X en el ocular).

Tabla 6.7. Procedimiento de teñido y desteñido de cristales de proteína Cry.

| <b>Solución</b>         | <b>Tiempo</b> |
|-------------------------|---------------|
| Azul de Comassie        | 1 hora        |
| Etanol 50%              | 10 min        |
| Et/Ac/dH <sub>2</sub> O | 30 min        |
| Mt/Ac/dH <sub>2</sub> O | 10 min        |

## **7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **7.1 Contenido carbono y nitrógeno**

#### **7.1.1 Contenido de carbono y nitrógeno del medio Gerry Rowe**

Se analizaron los componentes del medio Gerry Rowe (GR) utilizando las técnicas azúcares reductoras y el método de ninhidrina. Para determinar la cantidad de carbono se consideró a todos los azúcares reductores como glucosa y la relación 0.4 g carbono/g glucosa. De la misma manera para el nitrógeno se consideró todo el nitrógeno amínico como glicina y la relación 0.18 g nitrógeno/g glicina.

Se determinó una concentración de carbono en glucosa de 435-385 mg/L, para la peptona de caseína una concentración de 228-224 mg/L y en el extracto de levadura de 264-236 mg/L de carbono. La concentración de nitrógeno en la peptona de caseína fue de 85-78 mg/L y en el extracto de levadura se presentó una concentración de nitrógeno de 92-89 mg/L, estos resultados se muestran en la Figura 7.1. La relación carbono:nitrógeno fue de 5:1, es decir, el carbono total obtenido de los sustratos representa 5 veces el contenido total de nitrógeno de la peptona de caseína y extracto de levadura.

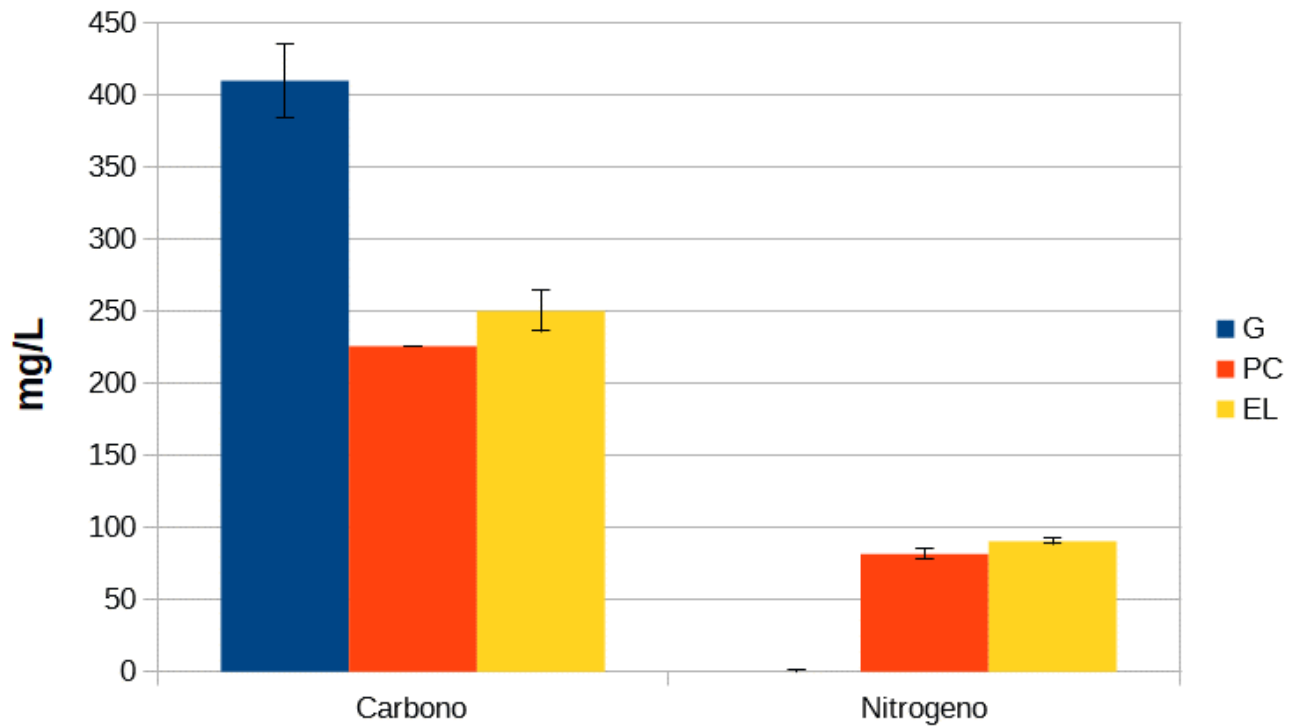


Figura 7.1. Concentración de carbono y nitrógeno en glucosa (G), peptona de caseína (PC) y extracto de levadura (EL).

Para corroborar los análisis anteriores se utilizó el Analizador de carbono y nitrógeno elementales (TOC). El carbono en la glucosa fue de 565 mg/L-490 mg/L, de la peptona de caseína de 573 mg/L-444 mg/L y el extracto de levadura de 521 mg/L-447 mg/L. Mientras que la concentración de nitrógeno obtenido en peptona de caseína fue de 130 mg/L-105 mg/L y del extracto de levadura fue de 126 mg/L-114 mg/L (Figura 7.2). En la peptona de caseína y extracto de levadura existe una relación de carbono:nitrógeno de 6:1 es decir el contenido total de carbono representa 6 veces el contenido total de nitrógeno.

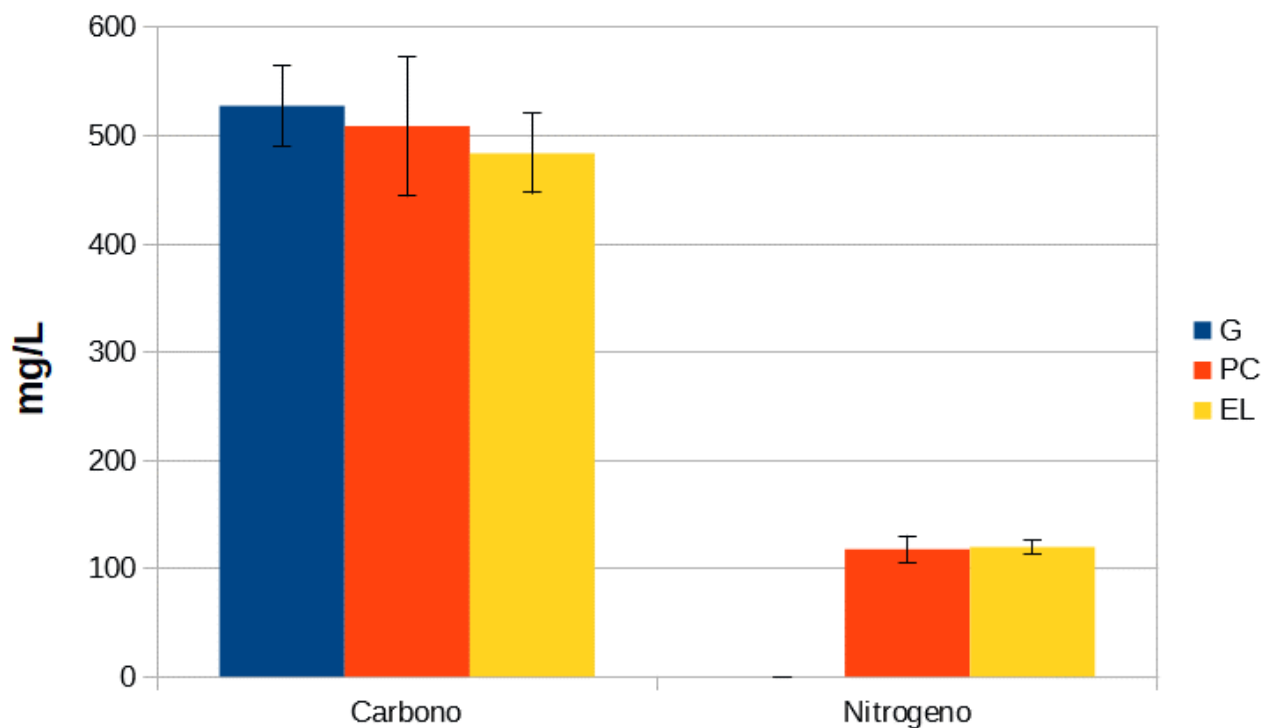


Figura 7.2. Concentración de carbono y nitrógeno en glucosa (G), peptona de caseína (PC) y extracto de levadura (EL). Los resultados fueron obtenidos por medio del Analizador de carbono y nitrógeno elementales (TOC).

Como era de esperarse la concentración de carbono y nitrógeno obtenida con el TOC es más alta debido a que mide la concentración elemental. Mientras que la técnica de DNS mide solo el carbono de los azúcares reductores por la reacción del reactivo DNS. De la misma manera la técnica de la ninhidrina sólo descarboxila y desamina los aminoácidos primarios formando el compuesto purpuran conocido como Purpura de Ruhemann.

Debido a que no se podía tener acceso continuo al TOC en el presente trabajo se utilizaron las técnicas de DNS y Ninhidrina para determinar el contenido de carbono y nitrógeno de las diferentes muestras.

### 7.1.2 Contenido de carbono y nitrógeno de la soya modificada con molienda mecánica de alta energía.

La molienda mecánica tuvo un gran efecto en la soya debido a los diversos procesos que se pudieron ocurrir: oxido-reducción de azúcares y proteínas, intercambios moléculas o descomposición de moléculas, generación de radicales que favorezcan la disponibilidad del carbono y nitrógeno, entre otros [Urzúa, 2017].

Los resultados sobre el contenido de azúcares reductores y nitrógeno amínico de la soya modificada por molienda mecánica se muestran en las Figura 7.3 y 7.4. La soya tratada a 5 y 20 minutos de molienda mecánica de alta energía presentan las mayores concentraciones de azúcares reductores. Mientras que las mayores concentraciones de nitrógeno amínico se obtuvieron a 2 y 8 minutos de molienda mecánica (Figura 7.4).

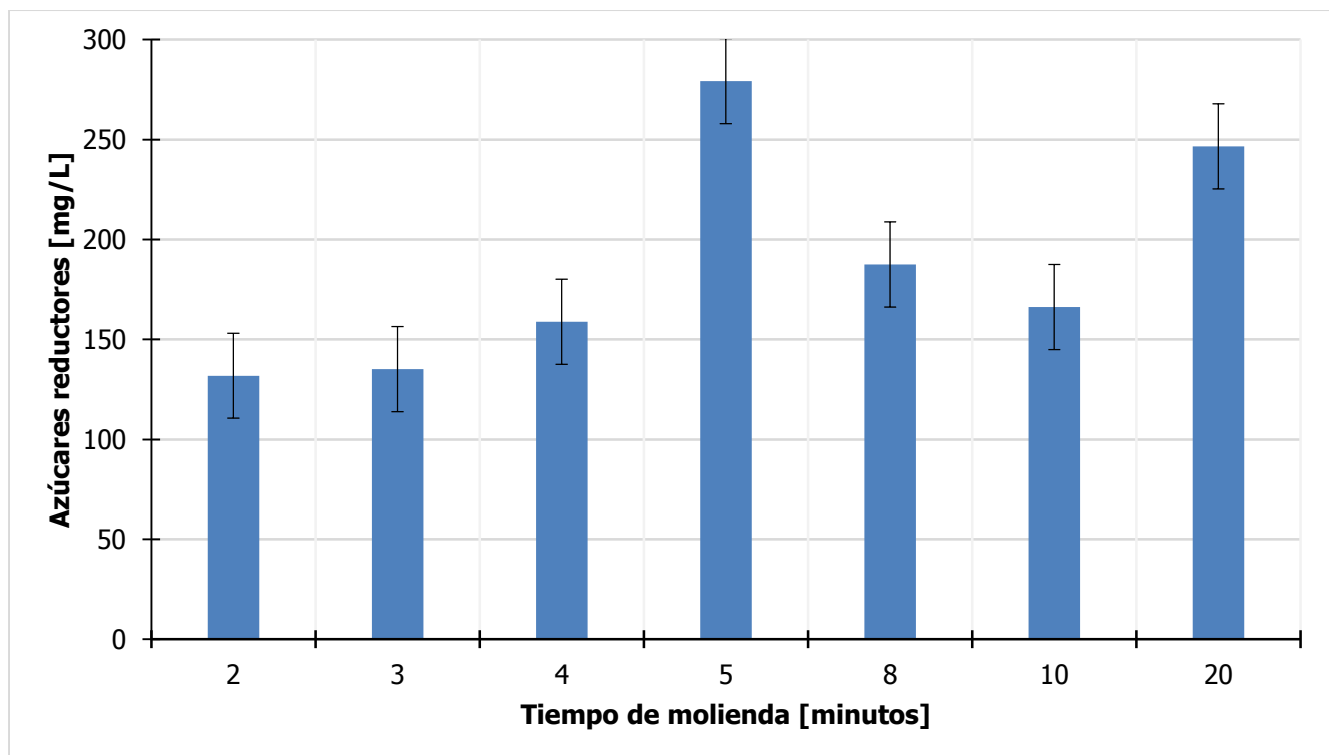


Figura 7.3. Concentración de azúcares reductores en la soya modificada por molienda mecánica (acero inoxidable con 9 bolas de 20 mm) a diferentes de tiempo de molienda, obtenida mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico.

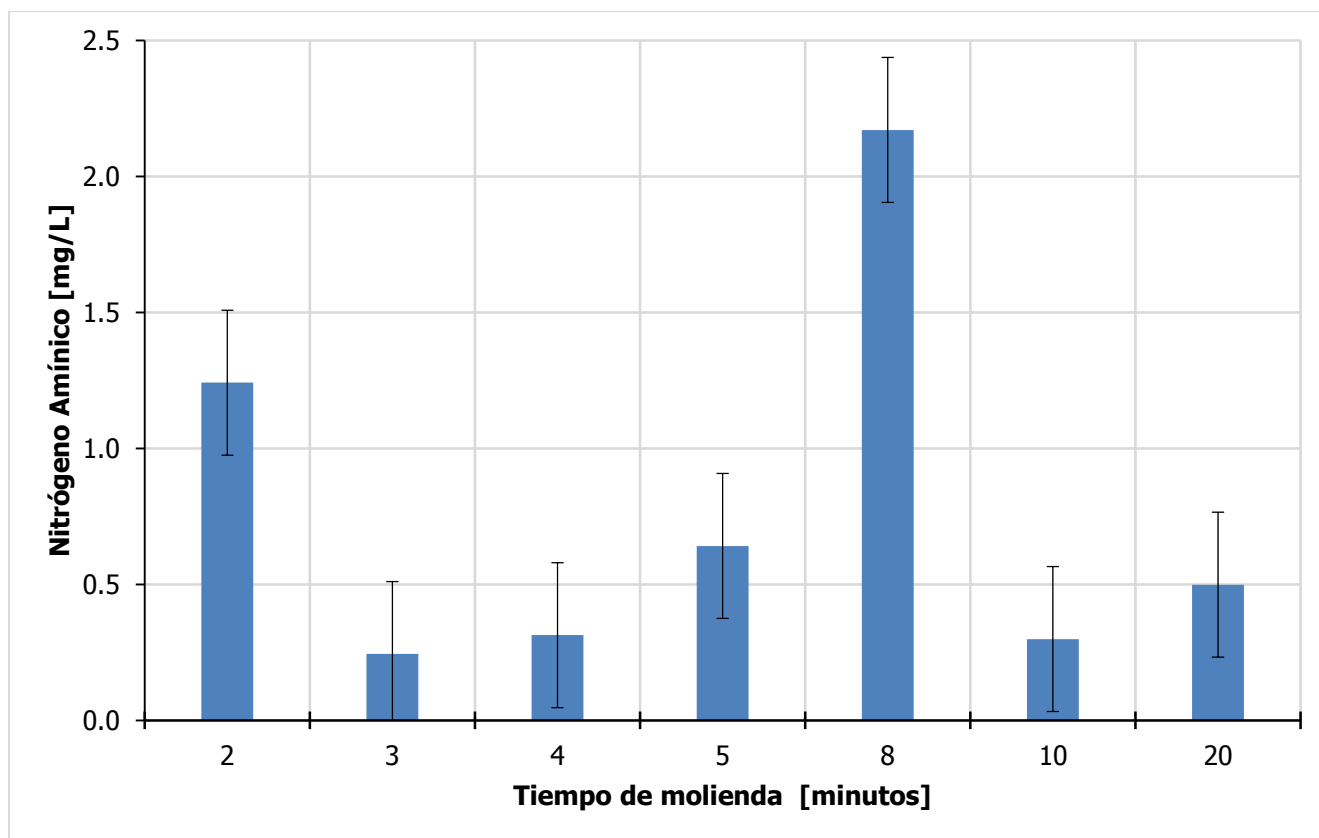


Figura 7.4. Concentración de nitrógeno amínico en la soya modificada por molienda mecánica (acero inoxidable con 9 bolas de 20 mm) a diferentes de tiempo de molienda, obtenida mediante la técnica de reactivo de Ninhydrina.

La concentración de azúcares reductores incrementa con el aumento en el tiempo de molienda hasta llegar al máximo y después disminuye (figura 7.3). Sin embargo, para el nitrógeno no se presenta ninguna relación aparente entre la concentración y el tiempo de molienda. Urzúa [2017] utilizando diferentes tiempos de molienda mecánica, número de bolas, tamaño de bolas y materiales de bola, reporta variaciones en el contenido azúcares reductores de diferentes almidones (plátano, yuca, jinicuil y frijol). No se encontraron otros reportes donde se utilice la molienda mecánica de alta energía para modificar el contenido de azúcares reductores. Sin embargo, hay reportes de que la molienda mecánica de alta energía genera otros cambios fisicoquímicos. Por ejemplo, Valentine *et al.* (2000) utilizaron la molienda de alta energía para reducir el tamaño de partículas del almidón de maíz, trigo y arroz. Los autores observaron que

la molienda mecánica afecta a la amilosa, que presenta una ligera despolimerización. Además, la amilopectina se convirtió en fragmentos de bajo peso. Schmiele *et al.* (2015) reportaron que, a los almidones obtenidos de castañas, mediante el tratamiento con un molino de bolas, se les induce la pérdida progresiva de la cristalinidad y la conversión de grandes regiones en material amorfo que vuelven a dichos almidones accesibles a agentes externos como el agua y enzimas amilolíticas.

## **7.2 Cinéticas a nivel matraz.**

### **7.2.1 Cinéticas del medio Gerry Rowe/harina de soya (GR/HS) sin/con hidrólisis.**

Las cinéticas se llevaron a cabo para diferenciar la producción de biomasa (tanto de bacilos y esporas) y tiempos de producción. Las cinéticas realizadas en medio Gerry Rowe (GR) y en medio de Gerry Rowe/harina de soya (GR/HS) con hidrólisis presentan la misma cantidad de biomasa (Figura 7.5, Tabla 7.1). El medio de Gerry Rowe/harina de soya (GR/HS), sin hidrolizar casi duplica la cantidad de biomasa de las anteriores. Sin embargo, la etapa de la esporulación sólo la alcanzaron los medios de Gerry Rowe (GR) y medio Gerry Rowe/harina de soya (GR/HS) con hidrólisis (Figura 7.5, Tabla 7.1). En las cinéticas del medio GR/HS sin/con hidrólisis, se inicia la fase de exponencial a las 16 horas y a las 8 horas en GR. De este modo, la fase estacionaria del medio GR/HS sin/con hidrólisis inicia a las 24 h y para el medio GR inicia a las 8 horas. La cinética de fermentación del medio GR/HS con hidrólisis duro 64 horas y del medio GR/HS sin hidrólisis se dio por terminada a las 128 horas sin observar esporas. La fase de

esporulación para GR inicio a las 24 horas y concluyo a las 64 horas, pero en GR/HS con hidrólisis inicio a las 72 horas y concluyo a las 128 horas (Figura 7.5).

Tabla 7.1. Parámetros cinéticos de las fermentaciones en matraz con medio Gerry Rowe y en medio Gerry Rowe/harina de soya.

| Parámetro     | Unidades           | GR  | GR/HS con hidrólisis | GR/HS sin hidrólisis |
|---------------|--------------------|-----|----------------------|----------------------|
| $X_{max}$     | $10^8$ células /mL | 6.7 | 6.0                  | 11.25                |
| $Esp_{max}$   | $10^8$ esporas /mL | 2.9 | 12.5                 |                      |
| $t_{x_{max}}$ | h                  | 26  | 72                   | 48                   |
| $t_{0_{esp}}$ | h                  | 40  | 72                   |                      |

**$X_{max}$ : Biomasa máxima obtenida.**

**$Esp_{max}$ : Esporulación máxima obtenida.**

**$t_{x_{max}}$ : Tiempo de biomasa máxima obtenida.**

**$t_{0_{esp}}$ : Tiempo esporulación máxima obtenida.**

**GR: Gerry Rowe.**

**GR/HS: Gerry Rowe/harina de soya.**

Se observa en la cinética de Gerry Rowe que su fase lag concluye a las 8 h, dando inicio a la fase de crecimiento exponencial que concluye a las 24 h. La fase estacionaria inicia a las 24 h y concluye a las 32 h. Por último, la fase de esporulación inicia a las 24 h y finaliza a las 64 horas. La cinética con medio Gerry Rowe con harina de soya con hidrólisis, la fase lag termina a las 16 h, dando inicio a la fase de crecimiento exponencial que concluye a las 24 h. Entonces inicia la fase estacionaria y concluyendo a las 64 h, iniciando la esporulación que concluye a las 128 h. Para la cinética en medio Gerry Rowe con harina de soya sin hidrólisis la fase lag termina a las 16 horas, en donde inicia la fase de crecimiento exponencial que concluye a las 24 h. A este tiempo inicia la fase estacionaria que concluye a las 128 h (Figura 7.5). En esta fermentación no se detectaron esporas.

El medio Gerry Rowe es traslucido, pero el medio Gerry Rowe/ harina de soya presenta sólidos en suspensión que dificultan las cuentas directas de bacilos y esporas. Sin embargo, la cantidad de biomasa obtenida en GR y GRHS con hidrólisis es muy semejante (Tabla 7.1). Para el medio GRHS sin hidrólisis la cantidad de biomasa es mayor ( $11.25 \times 10^8$  células/mL), pero no se

observaron esporas. La fase lag de los cultivos con medio de GRHS es del doble que para GR, al igual que la fase estacionaria, pero la fase de crecimiento exponencial dura la mitad del tiempo que para GR. Esto implica que con la harina de soya *Bacillus thuringiensis* requiere de mayor tiempo para adaptarse y poder consumir los sustratos del medio de cultivo, pero permite obtener mayores cantidades de biomasa.

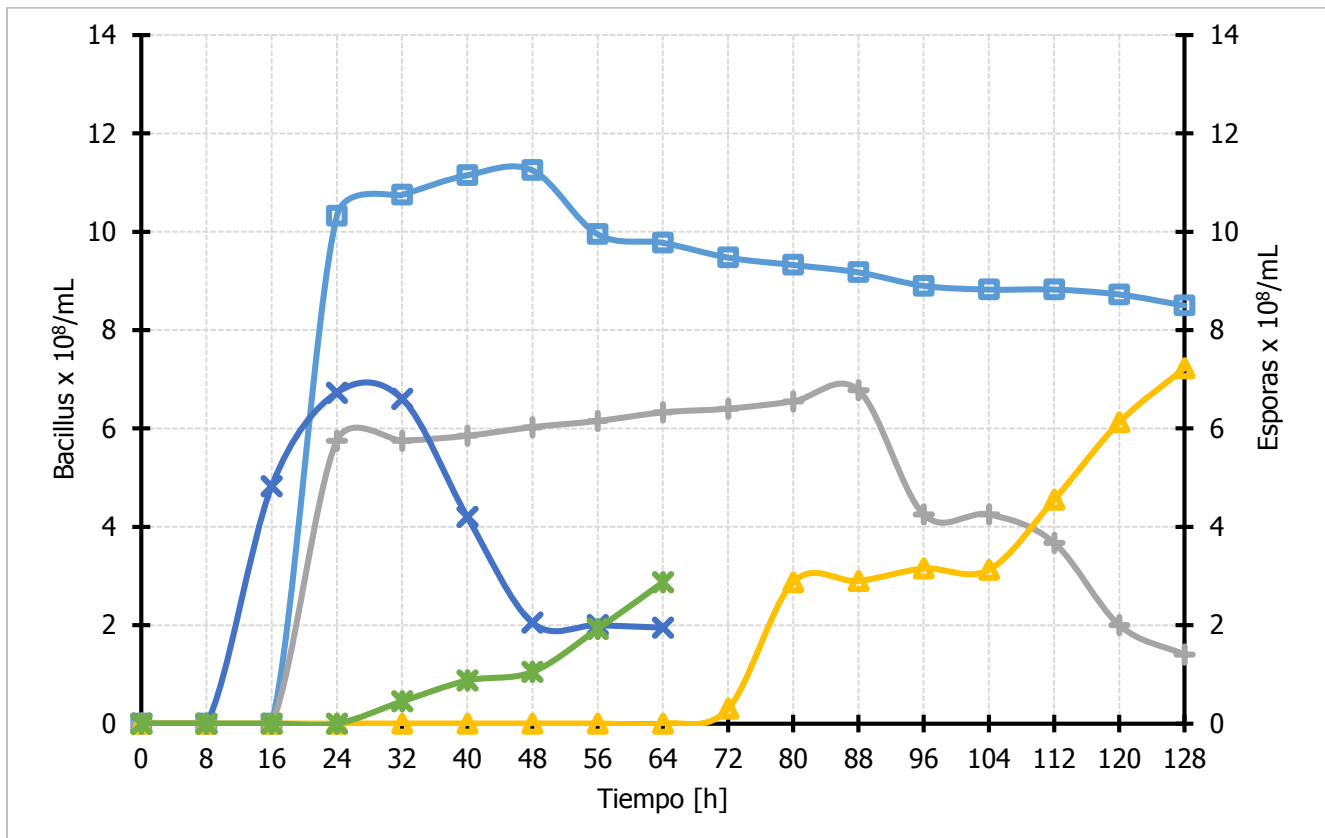


Figura 7.5. Cinéticas de crecimiento y esporulación del medio Gerry Rowe (bacilos  $\times$  y esporas  $\times$ ), del medio Gerry Rowe/harina de soya con hidrólisis (bacilos  $+$  y esporas  $\Delta$ ) y del medio Gerry Rowe/harina de soya sin hidrolizar (bacilos  $\square$  y esporas  $0$ ) de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73.

### 7.2.2 Cinéticas del medio Gerry Rowe/soya modificada (GR/SM) con molienda mecánica.

Se realizaron las cinéticas de crecimiento y esporulación de los medios GR/SM para comparar la producción de biomasa y de esporas entre ellos. En la Tabla 7.2 se presentan los resultados de las cinéticas y sus rendimientos de biomasa. Las mejores cinéticas de los medios fueron las formuladas con soya modificada tratada durante 5 y 20 minutos molienda mecánica.

Tabla 7.2. Parámetros cinéticos de los cultivos con medio Gerry Rowe/soya modificada por molienda mecánica a diferentes intervalos de tiempo.

| Parámetro     | Unidades           | GR  | GR/SM<br>2 min | GR/SM<br>3 min | GR/SM<br>4 min | GR/SM<br>5 min | GR/SM<br>8 min | GR/SM<br>10 min | GR/SM<br>20 min |
|---------------|--------------------|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| $X_{max}$     | $10^8$ células /mL | 6.7 | 18.5           | 17             | 20.5           | 28.3           | 22             | 18.8            | 26.3            |
| $Esp_{max}$   | $10^8$ esporas/mL  | 2.9 | 29             | 35.3           | 41.5           | 31.5           | 36             | 31.5            | 36.8            |
| $t_{x_{max}}$ | h                  | 26  | 40             | 32             | 32             | 40             | 32             | 24              | 32              |
| $t_{0_{esp}}$ | h                  | 40  | 40             | 32             | 40             | 40             | 40             | 32              | 40              |

$X_{max}$ : Biomasa máxima obtenida.

$Esp_{max}$ : Esporulación máxima obtenida.

$t_{x_{max}}$ : Tiempo de biomasa máxima obtenida.

$t_{0_{esp}}$ : Tiempo esporulación máxima obtenida.

GR: Gerry Rowe.

GR/SM: Gerry Rowe/ soya modificada con molienda mecánica.

En la Figura 7.6 y 7.7 se observa las cinéticas de crecimiento y esporulación en los medios de cultivo con soya modificada por molienda mecánica. Se pueden apreciar en la Figura 7.6 que para todas las cinéticas de crecimiento la fase lag termina a las 8 h, excepto para las fermentaciones en GR/SM 2 y 8 min en las que termina a las 16 h. Esto se debe al proceso de adaptación y posiblemente a los efectos de la molienda mecánica en la soya. La fase de crecimiento exponencial para todas las cinéticas inicia a las 8 h y concluyen a las 24 h excepto para la cinética de GR que va de las 8 a las 16 h. En la Figura 7.7 se observa fase de esporulación de las cinéticas. Podemos apreciar que la fase de esporulación inicia a las 24 h y concluye a las 56 h para los cultivos en GR y de GR/SM3, 4 y 10 min. La fase de esporulación para los medios de GR/SM 2, 5, 8 y 20 min y en el medio GR inicia a las 32 horas y concluye a las 104 horas excepto para GR/SM5 min, que concluye a las 96 horas.

El medio GR fue diseñado para el crecimiento y producción de proteína Cry por *Bacillus thuringiensis* [Rowe, 1990; Rowe y Margaritis, 1994]. Posteriormente se propuso el medio MSH para su producción a nivel industrial [Farrera, 1998; Navarro *et al*, 2006] obteniendo buenos resultados. Sin embargo, a nivel matraz el medio GR/SM 5 min presenta la mayor producción de bacilos y esporas, con respecto a todos los medios probados. Con dicho medio se obtuvo 4.22 veces más bacilos que con el medio GR. Mientras que con respecto al medio MHS sin hidrólisis aumento 2.5 veces. Lo que lo hace un medio viable para la producción de *Bacillus thuringiensis*.

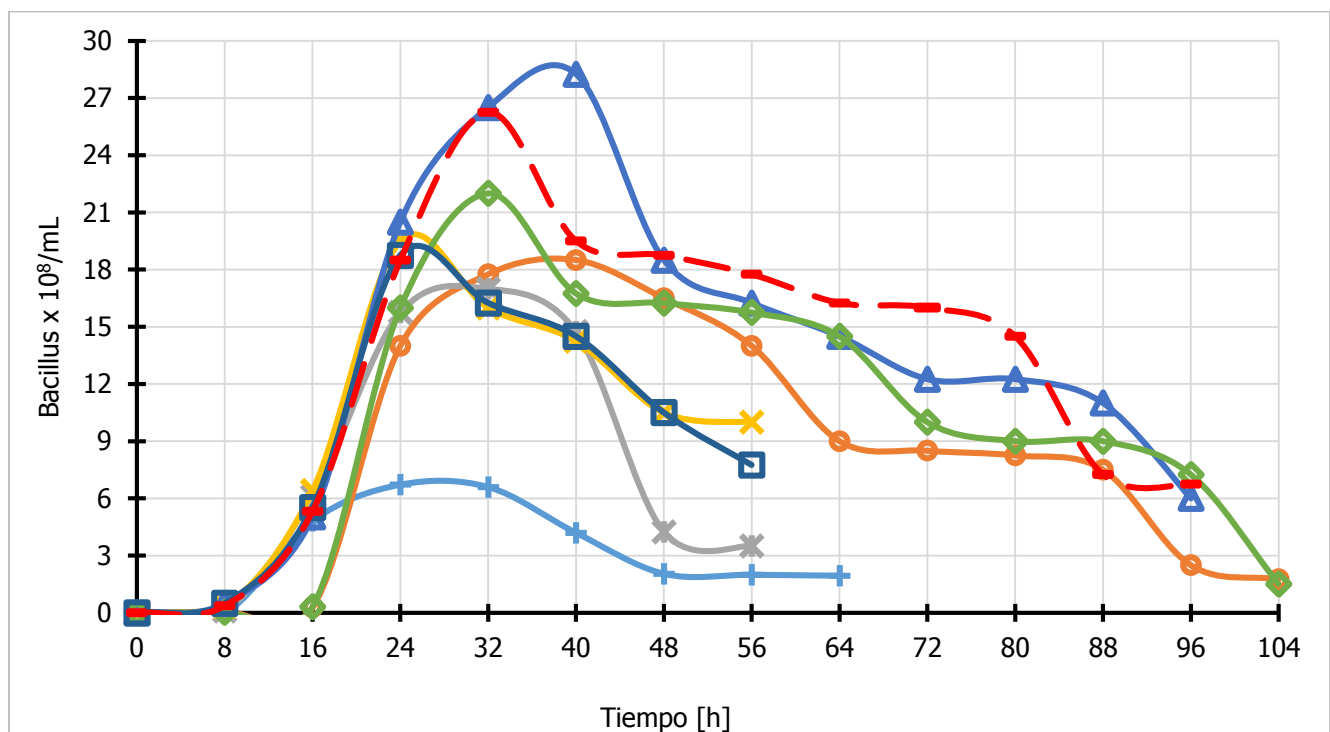


Figura 7.6. Cinéticas de crecimiento en medio Gerry Rowe (+) y medio Gerry Rowe/soya modificada tratada mecánicamente durante 2 minutos (○), 3 minutos (✕), 4 minutos (✕), 5 minutos (△), 8 minutos (◇), 10 minutos (■) y 20 minutos (---) de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73.

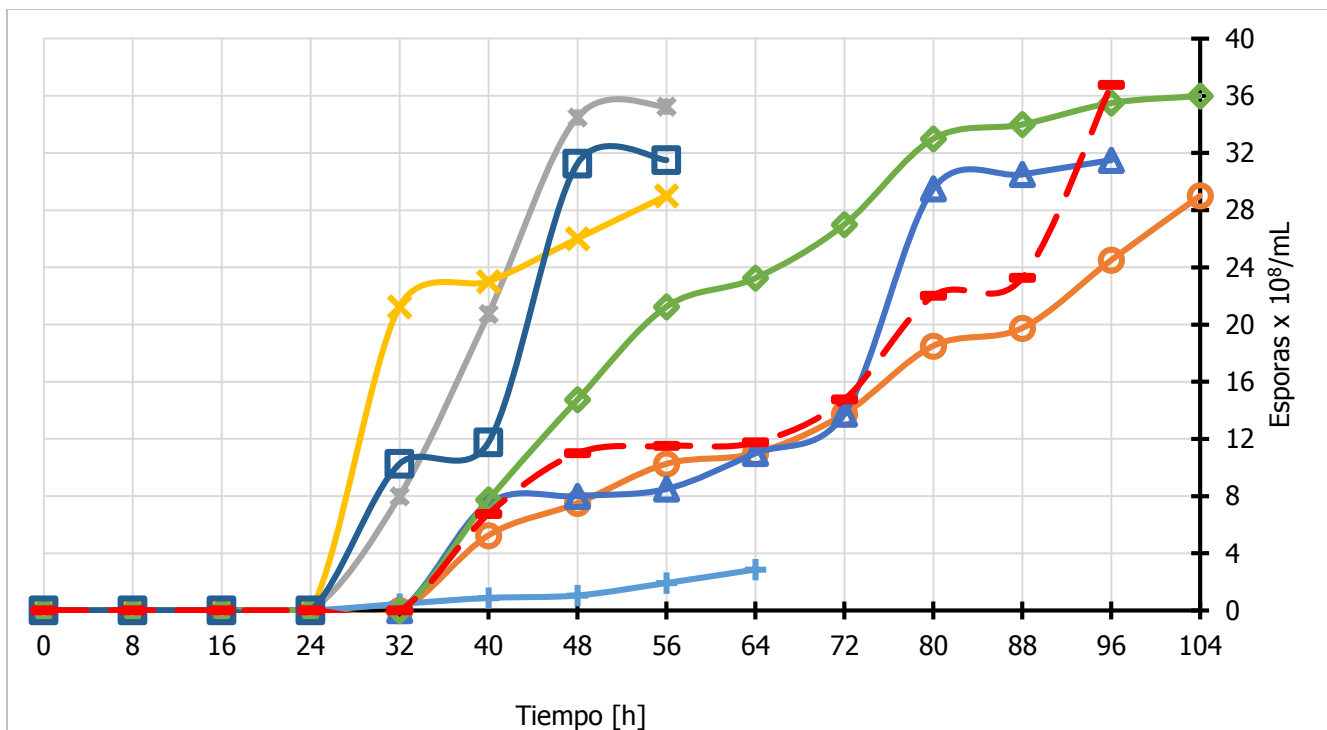


Figura 7.7. Cinéticas de esporulación del medio Gerry Rowe (+) y de los medios Gerry Rowe/soya modificada mecánicamente durante 2 minutos (⊖), 3 minutos (⊕), 4 minutos (✖), 5 minutos (▲), 8 minutos (◆), 10 minutos (■) y 20 minutos (--), de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73.

### 7.3 Detección de la proteína Cry mediante DRX.

Para realizar la detección de la proteína Cry mediante DRX por el método de polvos, primero se analizaron todos los componentes del medio de cultivo a manera de obtener un estándar de cada uno de ellos. Con esto se pudo definir cuales reflexiones corresponden a la proteína Cry y cuales a los compuestos del medio de cultivo.

#### 7.3.1 Patrón de Difracción de la soya modificada con molienda mecánica.

Los patrones de difracción de la soya modificada por molienda mecánica durante diferentes tiempos se presentan en la Figura 7.8. Observamos que la soya modificada durante 8 minutos

por molienda mecánica presenta una reflexión a  $26.6^\circ$  en  $2\theta$  indicando que el proceso de molienda mecánica posiblemente recristaliza las moléculas de la soya [Urzúa, 2017]. Se puede apreciar en los difractogramas de todas las muestras de soya modificada por molienda mecánica durante 2, 3, 4, 5, 8, 10 y 20 min, que su estructura es amorfa.

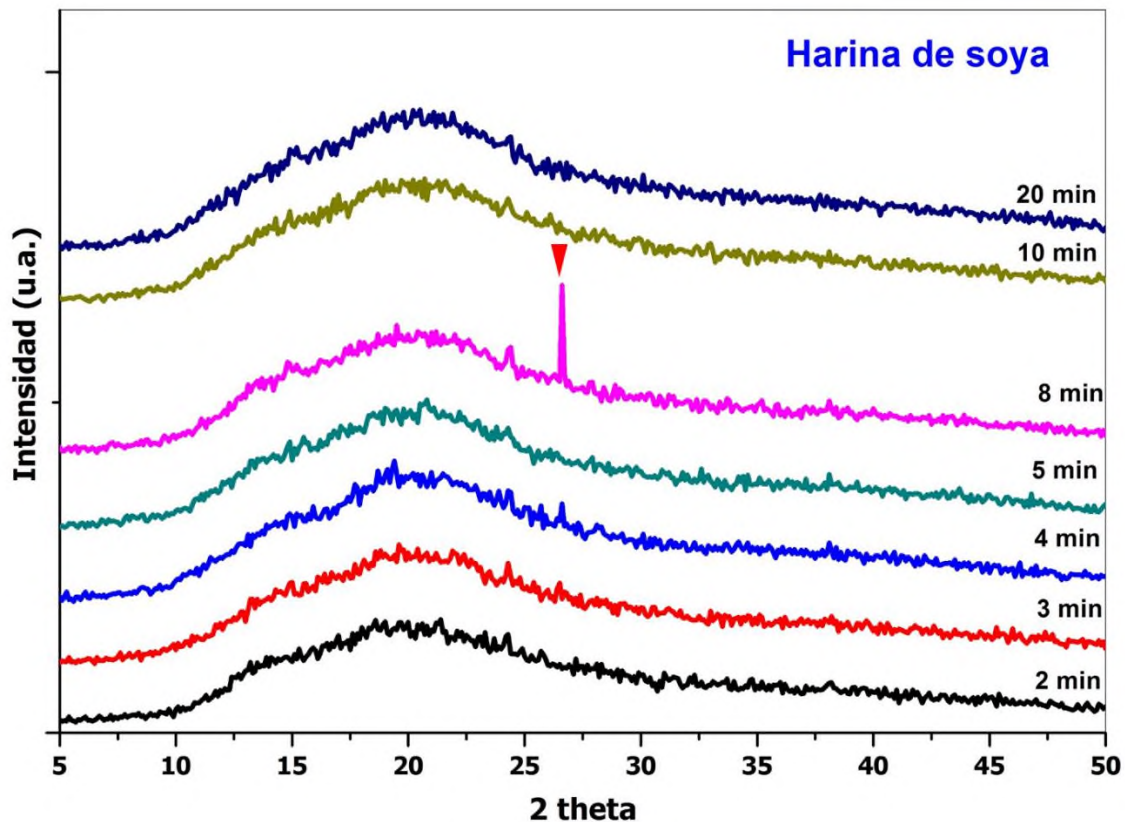


Figura 7.8. Difractogramas de la soya modificada por molienda mecánica a diferentes tiempos de molienda.

### 7.3.2 Patrones de difracción de polvos de los componentes del medio Gerry Rowe.

Los patrones de difracción que se le realizaron a los componentes del medio Gerry Rowe se observan en las Figuras 7.9 y 7.10. Se presentan los difractogramas de los componentes del medio Gerry Rowe: glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ), peptona de caseína, extracto de levadura y sales minerales: cloruro de calcio dihidratado ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ), cloruro de potasio (KCl), sulfato de

magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de zinc heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), citrato férrico ( $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FeO}_{10}$ ), fosfato de sodio dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y fosfato de sodio monobásico monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Los patrones de difracción de los componentes obtenidos se compararon con la información extraída de la base de datos cristalográficos PDF-4+2018 (Anexo A, Tabla 1).

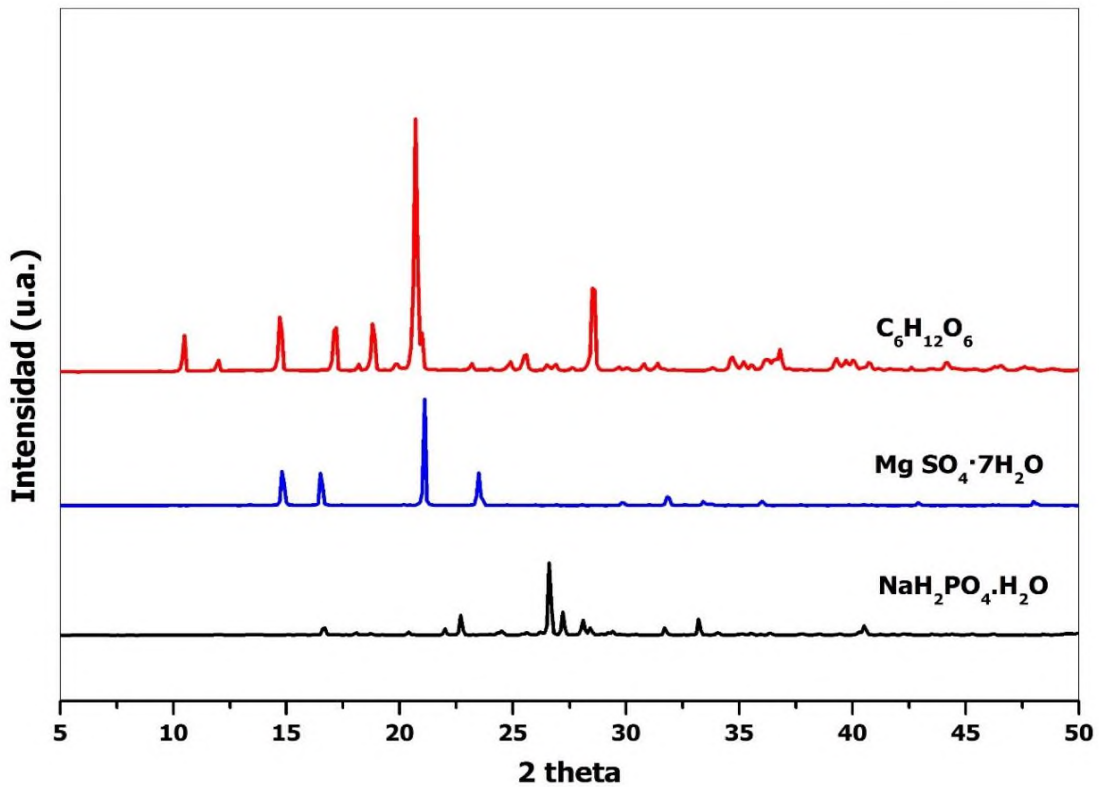


Figura 7.9. Difractogramas de los componentes del medio Gerry Rowe (parte I).

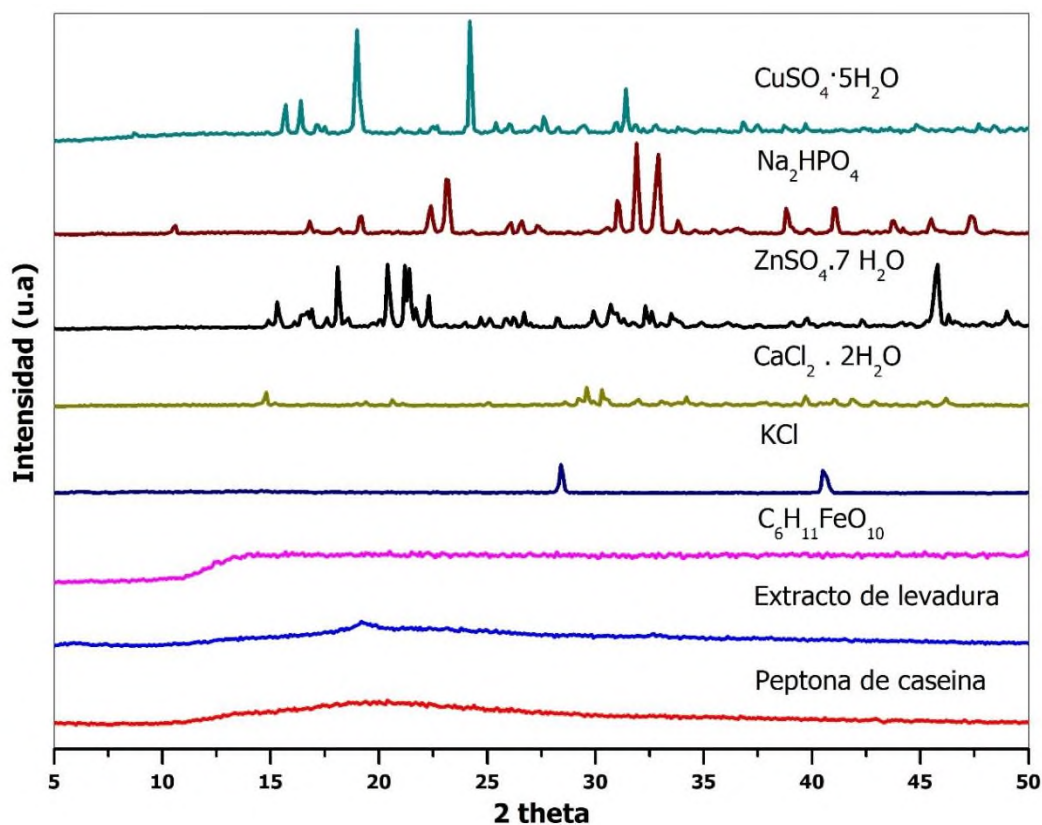


Figura 7.10. Difractogramas de los componentes del medio Gerry Rowe (parte II).

Cabe mencionar que los difractogramas obtenidos se compararon con la base de datos de DRX observándose que coinciden con los reportados para dichos compuestos o los elementos de cada compuesto. Los componentes del medio que no se encontraron en la base de datos de DRX son el extracto de levadura, la peptona de caseína y la soya.

### 7.3.3 Patrones de difracción de polvos del medio de cultivo de Gerry Rowe/soya modificada por molienda mecánica durante 5 minutos.

De la misma manera que para los componentes del medio también se realizó el difractograma de la soya modificada por molienda mecánica de alta energía durante 5 minutos (Figura 7.11).

También, se presenta en la Figura 7.11 el patrón de difracción de polvos de una mezcla de glucosa, extracto de levadura y la soya modificada por molienda mecánica durante 5 min.

El patrón de difracción (A) presenta todos los patrones (harina de soya molida a 5 minutos, extracto de levadura y glucosa) el cual se van desvaneciendo las reflexiones de la glucosa para no tener confusiones con los resultados futuros.

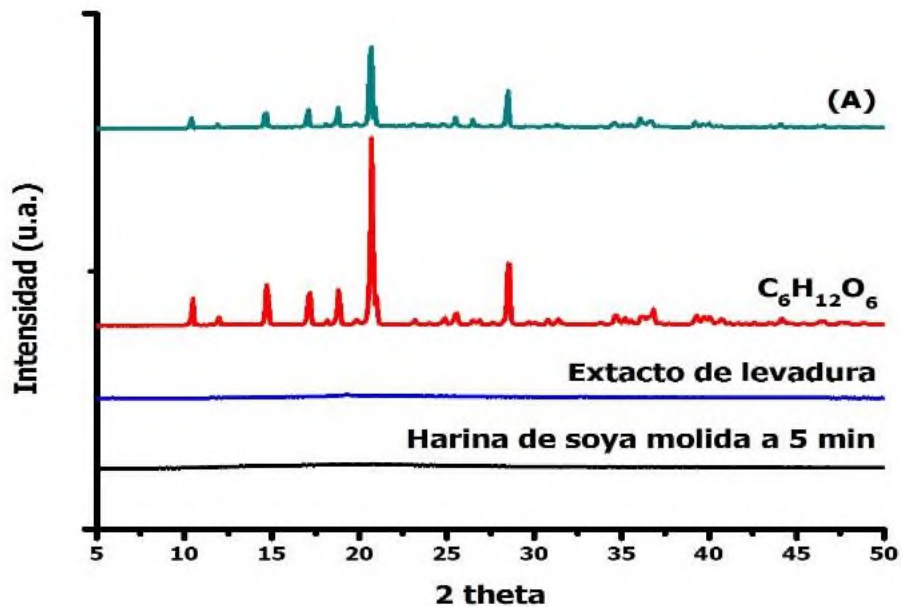


Figura 7.11. Diffractogramas de los componentes del medio Gerry Rowe/soya modificada mecánicamente durante 5 minutos y la mezcla de los componentes (A).

### 7.3.4 Patrones de difracción de polvos de *Bacillus thuringiensis* var. HD-73 y *Bacillus subtilis* var. 168 en medio líquido y sólido.

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria, que sintetiza un cristal que contiene proteína Cry, que es muy tóxica para una amplia gama de larvas de insectos [Zouari and Jaoua, 1999]. *Bacillus subtilis* pertenece al mismo género que *thuringiensis* pero no produce dicho cristal. En la Figura 7.12, se observan los patrones de difracción de polvos del cultivo de *Bacillus thuringiensis* var.

*kurstaki* HD-73 y *Bacillus subtilis* 168 obtenidos en medio líquido. Se observan dos fases en el patrón de difracción de la muestra de *Bacillus thuringiensis*, la primera fase consta de dos reflexiones a  $13.3^\circ$  y  $16.8^\circ$  en  $2\theta$ , la otra fase es menos cristalina que la primera, pero consta de 4 picos a  $22.2^\circ$ ,  $25.5^\circ$ ,  $27.3^\circ$  y  $30^\circ$  en  $2\theta$ . Mientras que la muestra de *Bacillus subtilis* presenta una estructura amorfa.

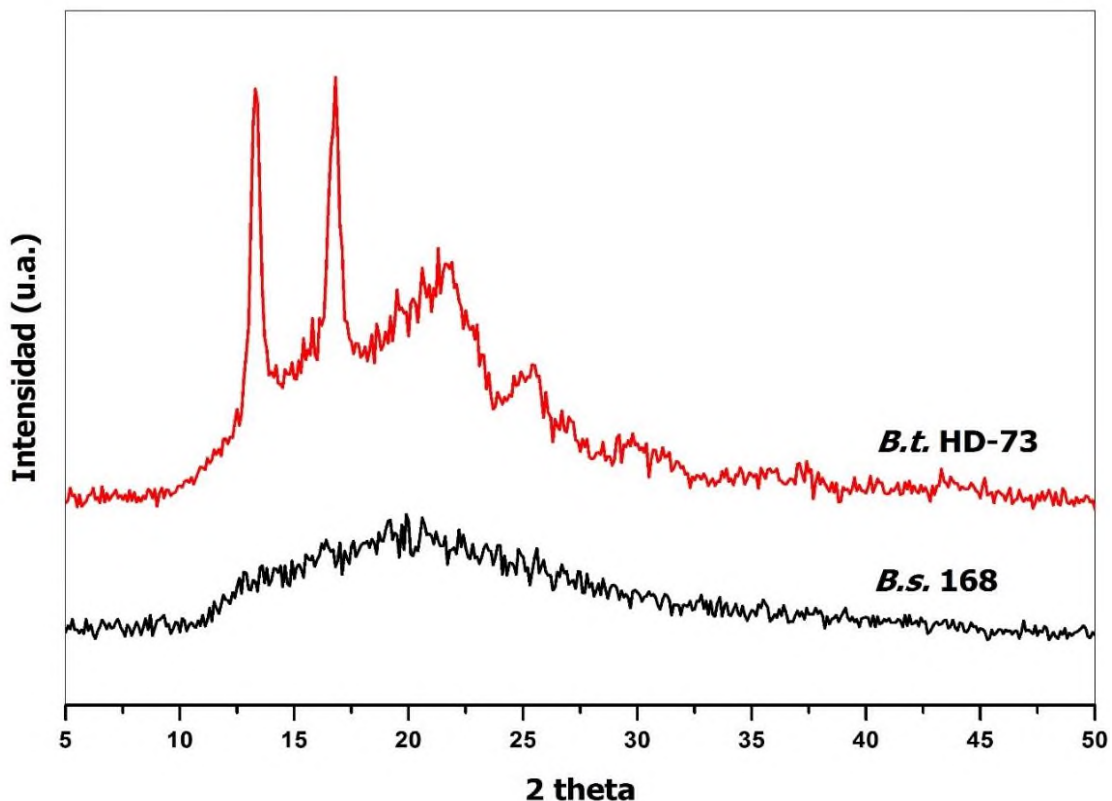


Figura 7.12. Diffractogramas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 (*B.t.* HD-73) y *Bacillus subtilis* var. 168 (*B.s.* 168) obtenidos en un medio líquido (caldo nutritivo).

En la Figura 7.15 se observan el patrón de difracción del cultivo del *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 en medio MHS con y sin hidrólisis y en medio GR. En la figura se observan dos fases en el patrón de difracción con medio GR, la primera fase consta de dos reflexiones a  $13.3^\circ$  y  $16.8^\circ$  en  $2\theta$ , la otra fase es menos cristalina que la primera, pero consta de 4 picos a  $22.2^\circ$ ,  $25.5^\circ$ ,

27.3° y 30° en 2θ. Los patrones de difracción del *B. thuringiensis* con medio Basal de Harina de Soya (MHS) sin hidrólisis y con hidrólisis presentan estructuras amorfas.

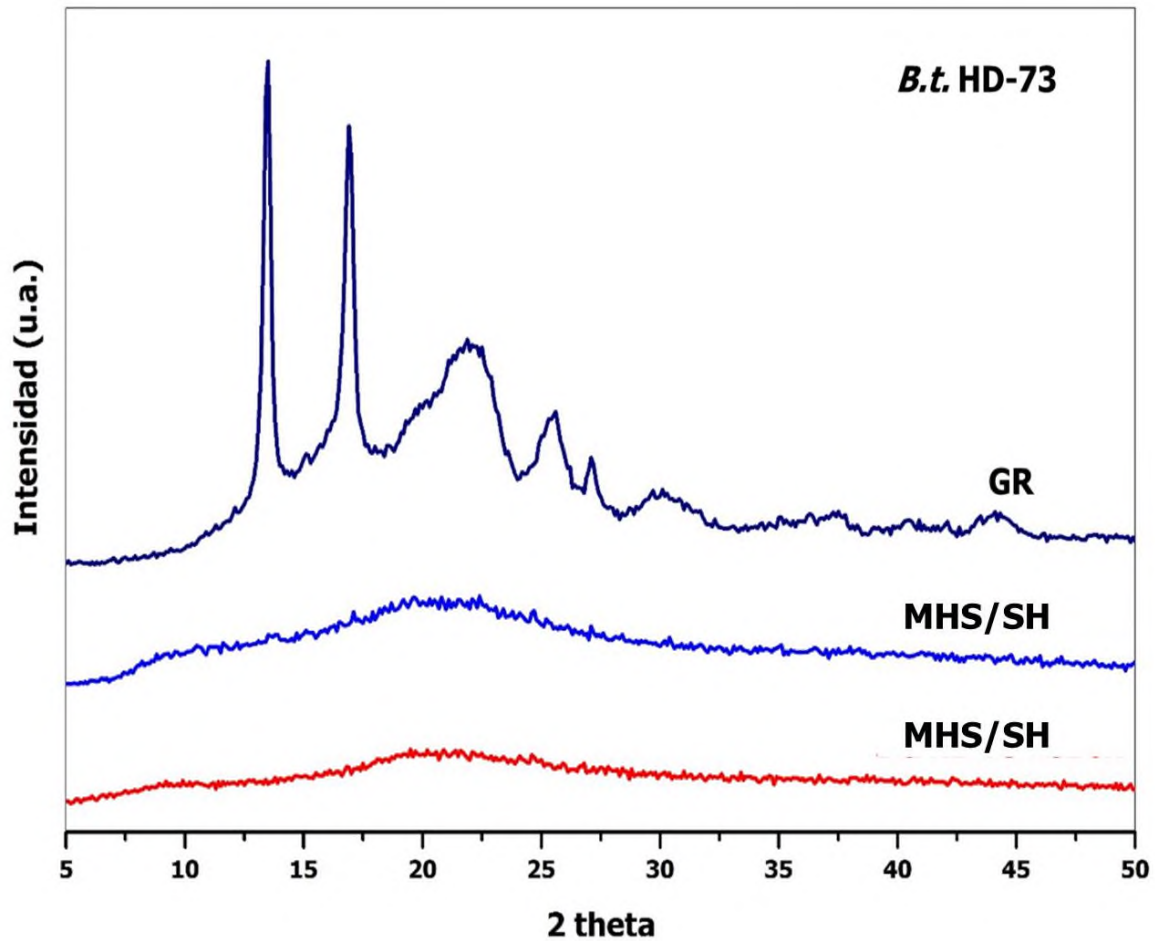


Figura 7.13. Diffractogramas de las cinéticas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 de los medios de Gerry Rowe (GRN) y Basal de Harina de Soya con (HSBCH) y sin hidrólisis (HSBSH).

### 7.3.5 Patrones de difracción de polvos de los cultivos en medio Gerry Rowe/soya modificada por molienda mecánica.

Para la utilización de los patrones de difracción en la presencia de proteína Cry, se observaron el comportamiento de los patrones de difracción en los productos de la fermentación de los cultivos Gerry Rowe/soya modificada por molienda mecánica durante 2, 3, 4, 5, 8, 10, 20

minutos de molienda (Figura 7.14). Se observa el mismo patrón de difracción de dos fases variando únicamente la cristalinidad en cada uno de los medios, que es representada con la intensidad de las reflexiones. Las cinéticas con productos de mayor cristalinidad, son las de los medios soya tratada durante 5 y 20 minutos. Con lo que podemos suponer la presencia de mayor cantidad de proteína Cry. Por lo tanto, el medio con mejores resultados es la que contiene soya tratada durante 5 minutos de molienda [GRM 5 min].

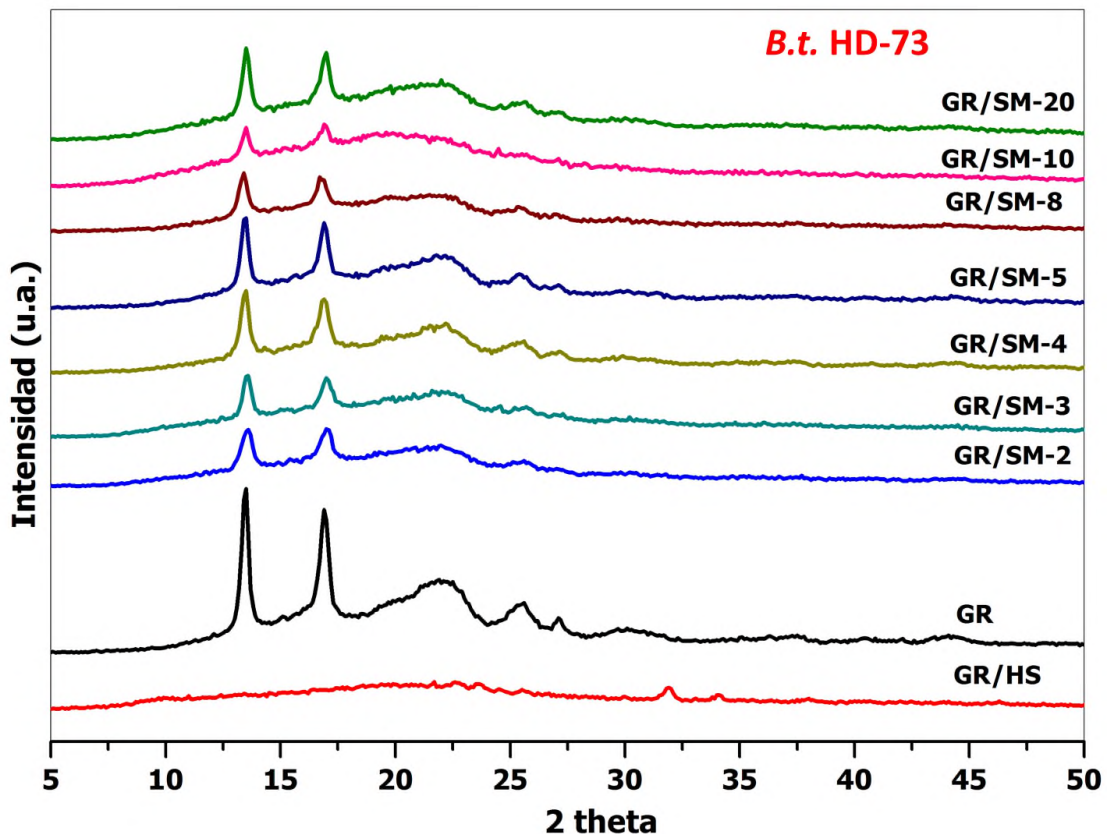


Figura 7.14. Difractogramas de los cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 con el medio GR/soya modificada con molienda mecánica a diferentes intervalos de tiempo.

En la Figura 7.15 se presentan los difractogramas de los cultivos con medio GR/soya modificada, tratada durante 5, 8 y 10 minutos por molienda mecánica de alta energía. En dicha figura se observa el mismo patrón de difracción.

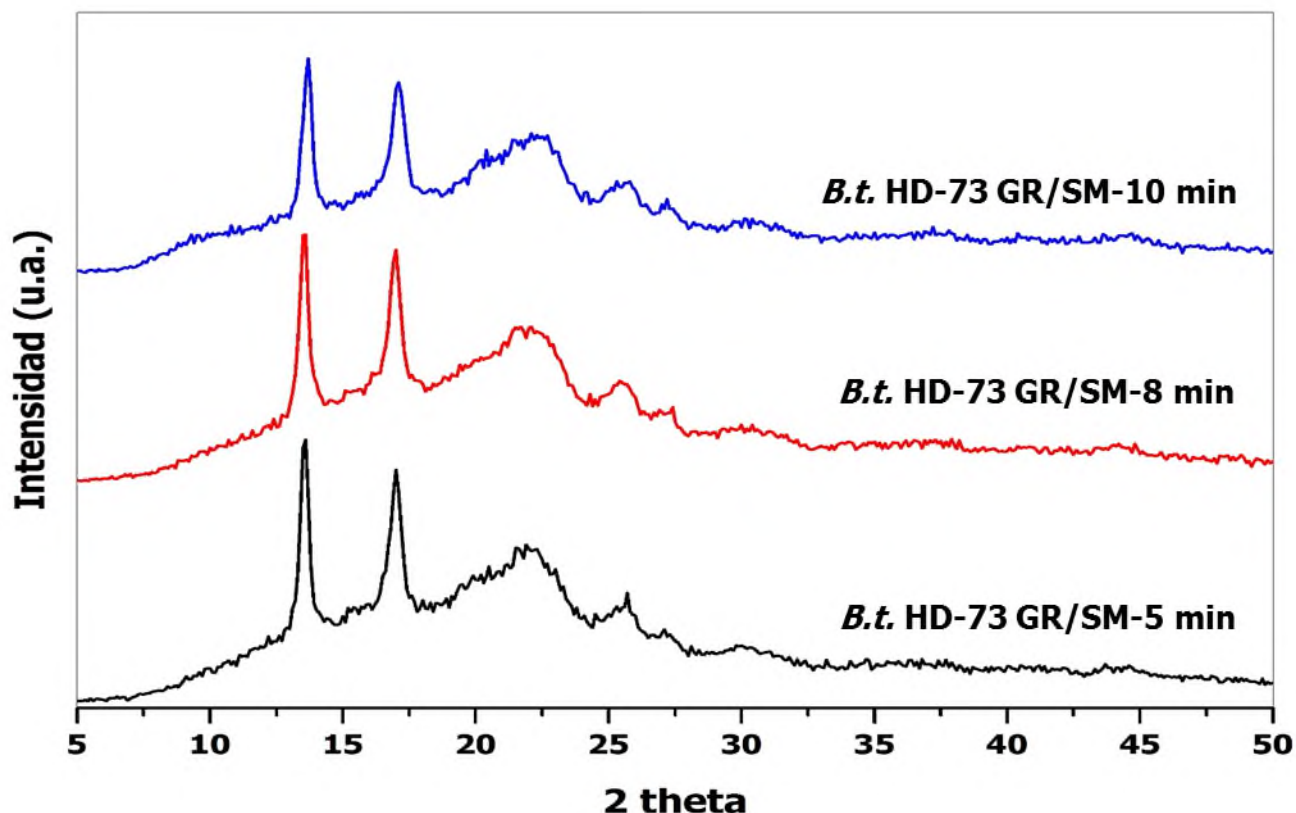


Figura 7.15. Difractogramas de tres cinéticas de *Bacillus thuringiensis* con la cepa HD-73 en el medio Gerry Rowe/soya modificada (GR/SM) con molienda mecánica con tres intervalos de tiempo.

#### 7.4 Patrones de difracción de los cultivos con medio Gerry Rowe/soya modificado con molienda mecánica de 2 cepas diferentes de *Bacillus thuringiensis*.

Para determinar si las reflexiones observadas en las figuras 7.12 a 7.15 son de los cristales de proteína Cry se utilizaron dos cepas de *Bacillus thuringiensis* transformadas. Una que no produce proteína Cry y si produce espora (Cry-B) y otra que no produce esporas pero si proteína Cry (BNA 6) (Figuras 7.18 y 7.19).

##### 7.4.1 Difractogramas del cultivo *Bacillus thuringiensis* cepa BNA 6.

Las esporas podrían interferir en los patrones de difracción, para descartar este efecto se utilizó una cepa no productora de esporas (pero que si produce proteína Cry) la cepa BNA 6 usando medios GR/SM de 5, 8 y 10 minutos de molienda. La Figura 7.16 confirma la presencia de las dos fases cristalinas. La primera fase consta de dos reflexiones a  $13.3^\circ$  y  $16.8^\circ$  en  $2\theta$  que posiblemente estén asociadas a la proteína Cry. La segunda fase que es menos cristalina que la primera, consta de 4 picos a  $22.2^\circ$ ,  $25.5^\circ$ ,  $27.3^\circ$  y  $30^\circ$  de  $2\theta$ . Lo cual podemos decir que ninguna de estas reflexiones en los patrones de difracción de rayos X corresponde a las esporas.

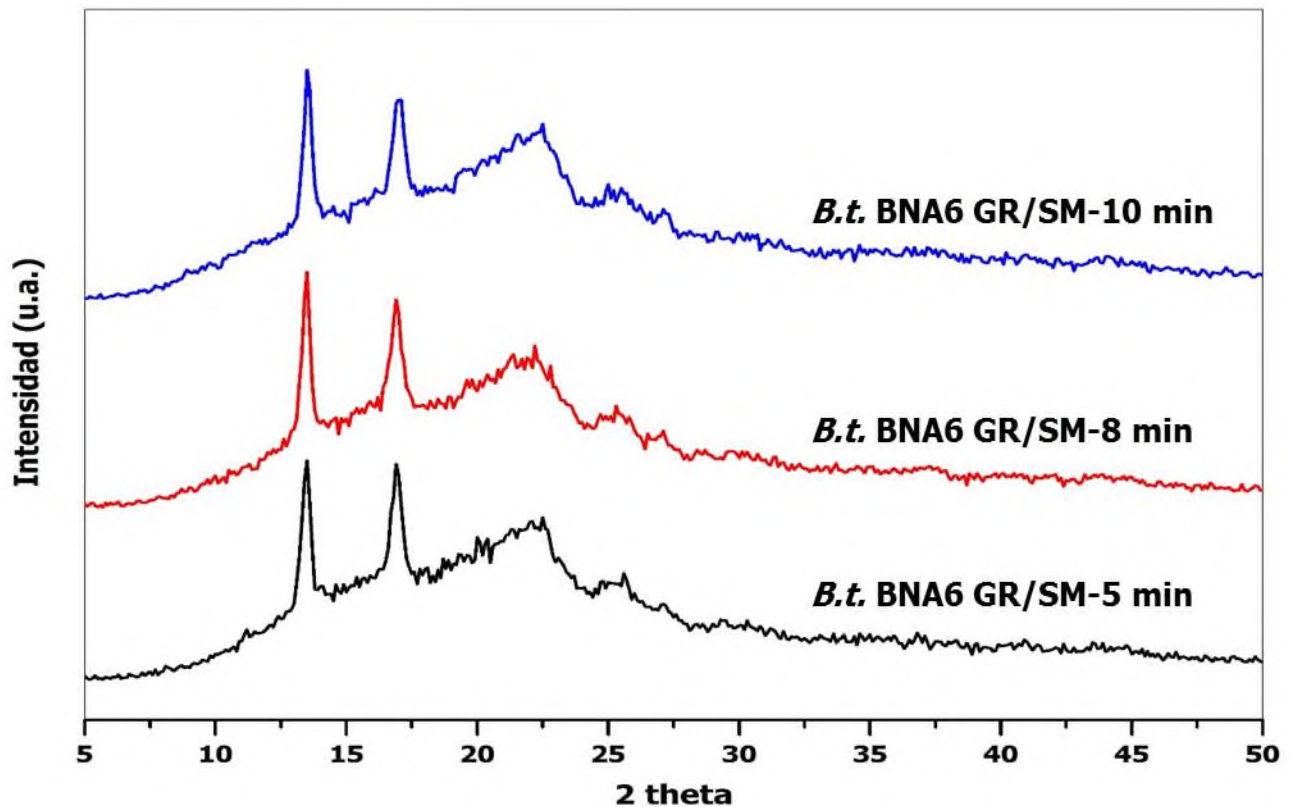


Figura 7.16. Diffractogramas de tres cultivos de *Bacillus thuringiensis* de la cepa BNA 6 en el medio Gerry Rowe/soya modificada (GR/SM) con molienda mecánica a 5, 8 y 10 minutos de molienda mecánica.

#### 7.4.2 Diffractogramas del cultivo de *Bacillus thuringiensis* cepa Cry-B.

La cepa Cry-B es una cepa modificada para no producir cristales de proteínas (pero si produce esporas) para lo cual se realizó también los difractogramas de polvos usando medios GRM de 5, 8 y 10 minutos de molienda como control negativo en la detección de la proteína Cry (Figura 7.17). Sin embargo, los difractogramas de la cepa Cry-B fueron similares al de *Bacillus thuringiensis* HD-73 y *Bacillus thuringiensis* de la cepa BNA 6. Podemos observar la presencia de las dos fases cristalinas presentes. La primera fase consta de dos reflexiones a  $13.3^\circ$  y  $16.8^\circ$  en  $2\theta$  que posiblemente estén asociadas a la proteína Cry. La segunda fase que es menos cristalina que la primera, consta de 4 picos a  $22.2^\circ$ ,  $25.5^\circ$ ,  $27.3^\circ$  y  $30^\circ$  de  $2\theta$ .

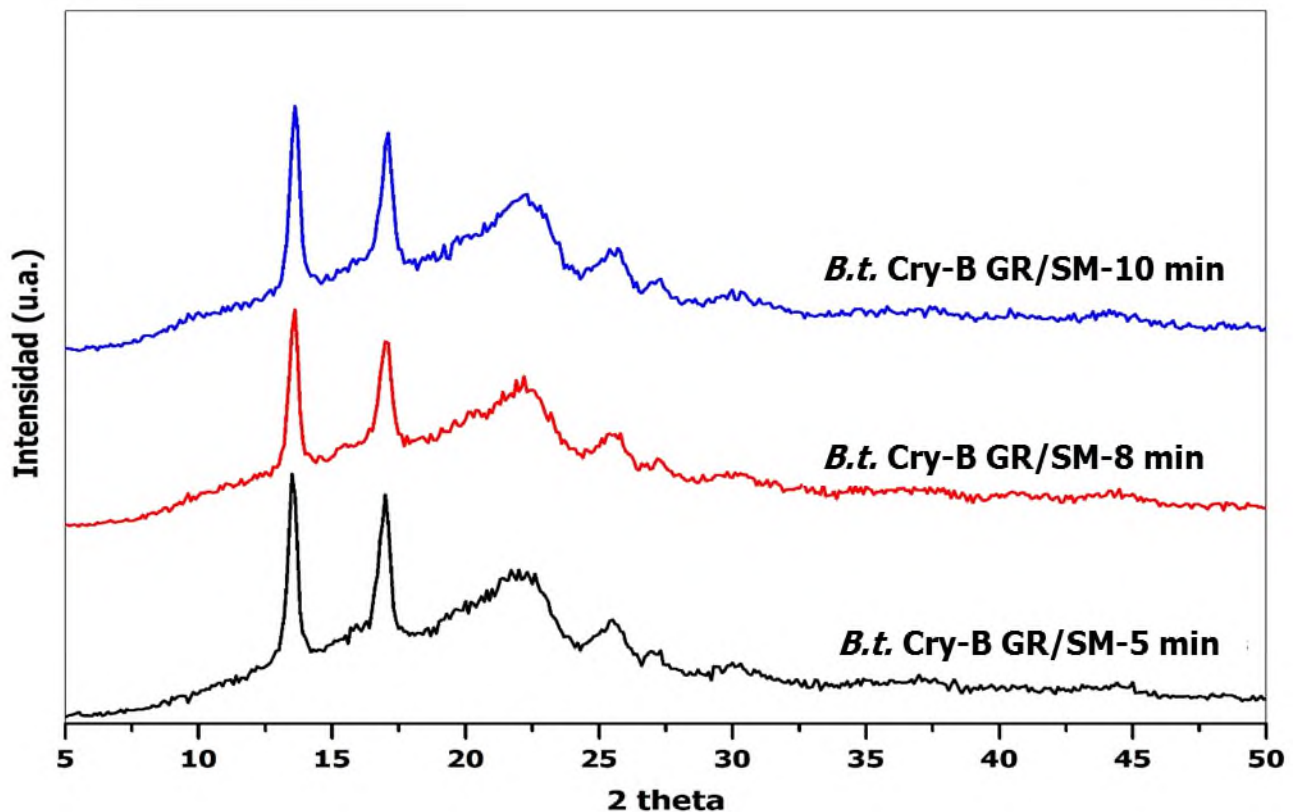


Figura 7.17. Difractogramas de tres cultivos de *Bacillus thuringiensis* con la cepa Cry-B en el medio Gerry Rowe/soya modificada (GR/SM) durante 5, 8 y 10 minutos de molienda mecánica.

Debido a que se detectaron estructuras cristalinas con el mismo patrón que la cepa HD-73, se realizaron pruebas de tinción para determinar la presencia de cristales en el cultivo de la cepa Cry-B. De las tinciones se observaron pequeñas estructuras azules con bordes definidos y

simétricos, presumiblemente cristales. Debido a que el microscopio no tiene cámara no se presentan las imágenes de dichos cristales. Pero concluimos que la cepa está produciendo cristales de proteína Cry.

Debido a que las reflexiones a  $13.3^\circ$  y  $16.8^\circ$  en  $2\theta$  no aparecen en los componentes del medio ni en el cultivo de *Bacillus subtilis* (si produce esporas y no produce Cry) pero si están presentes en los cultivos de la cepa BNA6 (no produce esporas y si produce Cry) y de la cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD73 (produce esporas y Cry) concluimos que dichas reflexiones corresponden a los cristales de proteína Cry.

## **7.5 Cinéticas en fermentador de *Bacillus thuringiensis* HD-73 y cepa Cry-B usando medio Gerry Rowe Modificado con Soya modificada durante 5 minutos con molienda mecánica.**

Se realizaron cuatro cultivos en fermentador, 3 para *Bacillus thuringiensis* HD-73 HD-73(I), HD-73(II) y HD-73(II) y una con la cepa Cry-B con el medio Gerry Rowe/soya modificada con 5 minutos de molienda para verificar detección de la presencia de cristales de proteína Cry durante la fermentación y el posible tiempo de inicio de formación de dicha proteína.

### **7.5.1 Cinética de crecimiento y esporulación.**

Se obtuvieron las cinéticas de crecimiento y esporulación de los cuatro cultivos en fermentador. Observamos que la cepa HD-73 de *Bacillus thuringiensis* (Tabla 7.3) obtuvo mayor concentración de biomasa en la fermentación HD-73(II) al igual que la cepa Cry-B. Sin embargo, difieren en el tiempo de producción máxima de biomasa, para HD-73(II) es a las 10 horas y para Cry-B es a las 12 horas.

Tabla 7.3. Parámetros cinéticos de los cultivos en fermentador de *Bacillus thuringiensis* HD-73 (I, II y III) con medio Gerry Rowe modificado con soya modificada durante 5 minutos.

| Parámetro     | Unidades           | HD-73 [I] | HD-73 [II] | HD-73 [III] | Cry-B |
|---------------|--------------------|-----------|------------|-------------|-------|
| $X_{max}$     | $10^8$ células /mL | 8.575     | 9.15       | 8.275       | 9.625 |
| $Esp_{max}$   | $10^8$ esporas /mL | 10.125    | 14.775     | 14.5        | 9.55  |
| $t_{x_{max}}$ | h                  | 8         | 10         | 10          | 12    |
| $t_{0_{esp}}$ | h                  | 10        | 10         | 14          | 14    |

$X_{max}$ : Biomasa máxima obtenida.

$Esp_{max}$ : Esporulación máxima obtenida.

$t_{x_{max}}$ : Tiempo de biomasa máxima obtenida.

$t_{0_{esp}}$ : Tiempo esporulación máxima obtenida.

En las Figuras 7.18 y 7.19 se puede apreciar, que la fase lag concluye a las 2 horas para las fermentaciones HD-73 (II), (III) y Cry-B. Para la fermentación HD-73 (I) la fase lag concluye a las 4 h. La fase de crecimiento exponencial para las cepas HD-73 (II) y (III) inicia a las 2 h y concluye 10 h, en la cepa HD-73 (I) inicia 4 h y concluye a las 8 h, por último, para la cepa Cry-B inicia a las 2 h y concluye a las 4 h.

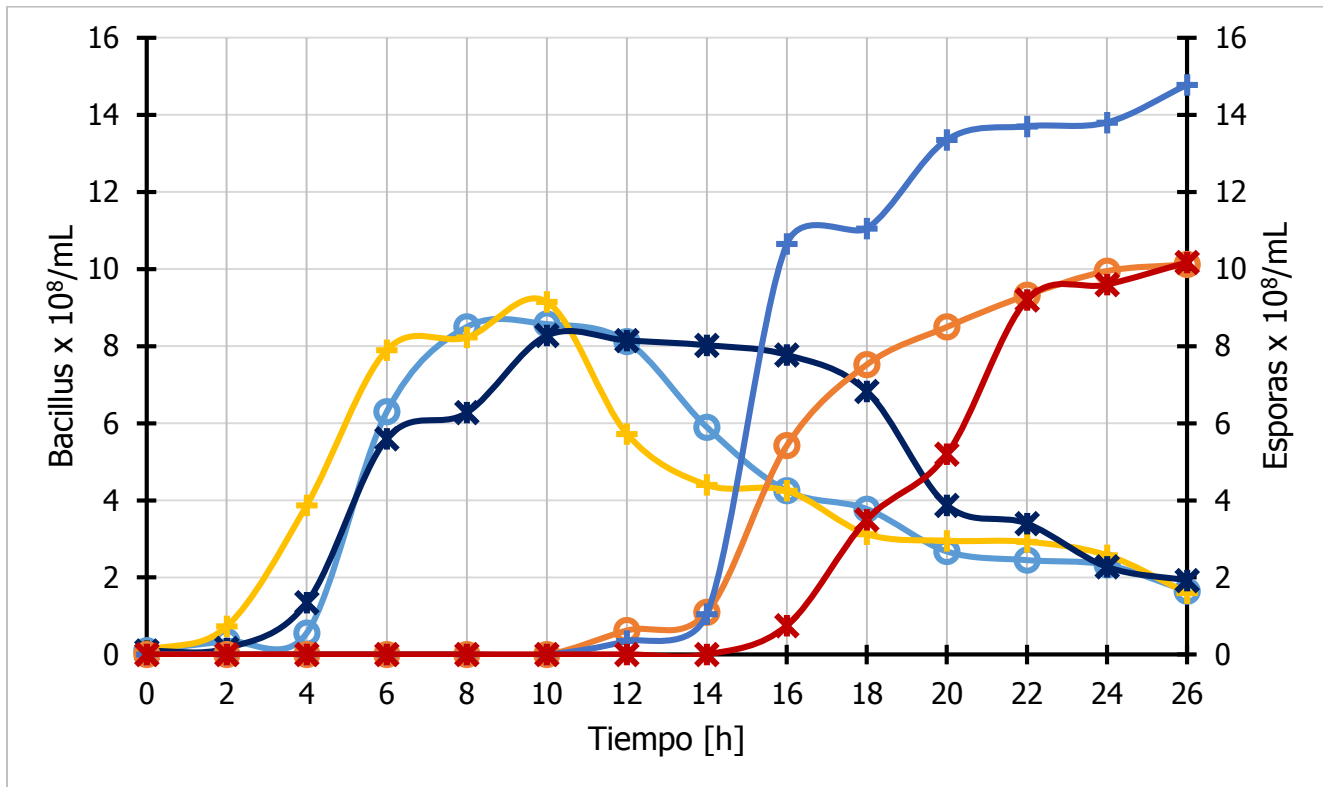


Figura 7.18. Cinéticas de crecimiento HD73 (I) (●), HD73 (II) (✖) y HD-73 (III) (✱) y de esporulación HD-73 (I) (○), HD73 (II) (✕) y HD73 (III) (✶) de *Bacillus thuringiensis* en medio Gerry Rowe/soya modificada durante 5 minutos por molienda mecánica de alta energía.

La fase de esporulación para las fermentaciones HD73 (I) y (II) inicia a las 10 h mientras que para HD73 (III) y Cry-B inicia a las 14 h. La concentración máxima de bacilos es prácticamente la misma para las cuatro fermentaciones (Tabla 7.3) pero menores a las obtenidas en los cultivos en matraz (Tabla 7.2).

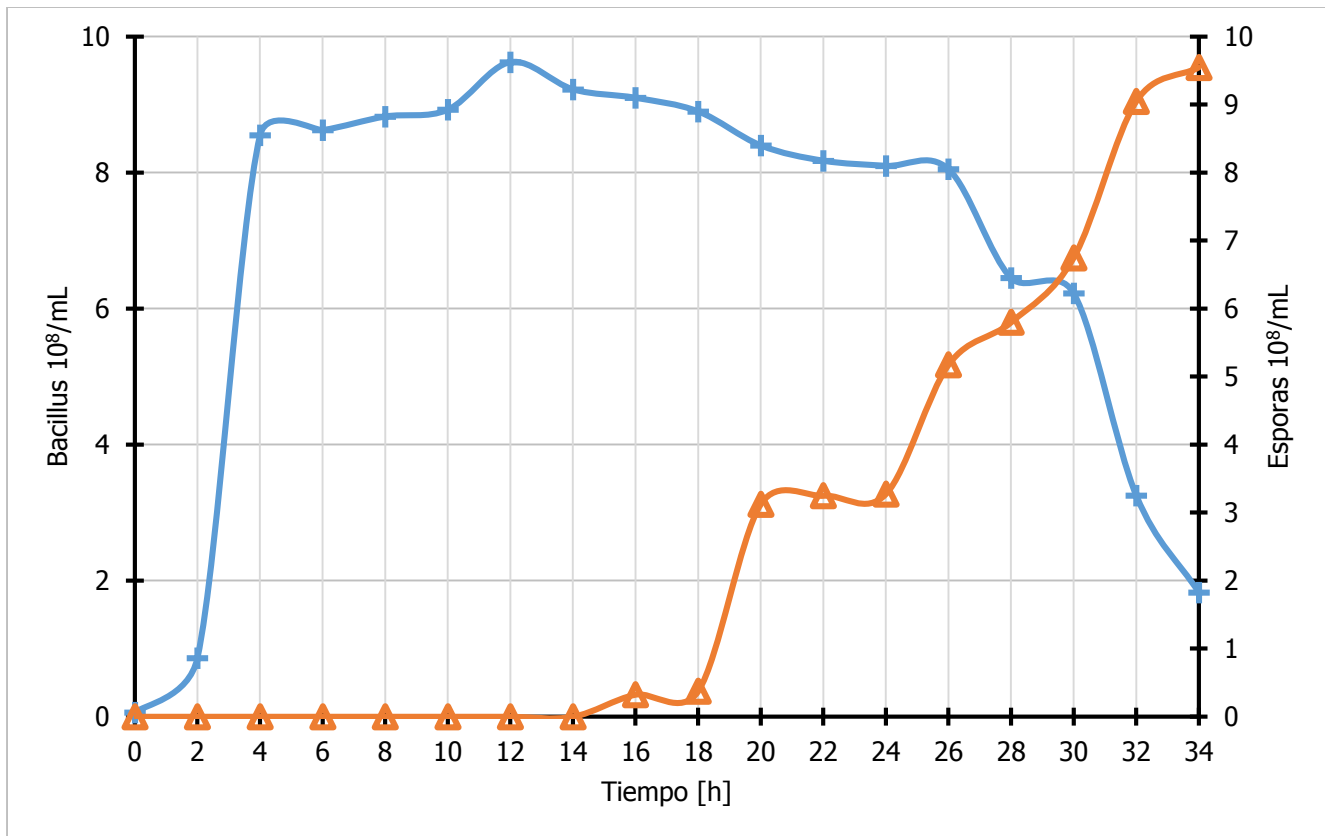


Figura 7.19. Cinética de crecimiento (+) y de esporulación ( $\Delta$ ), del *Bacillus thuringiensis* de la cepa Cry-B, en el medio de Gerry Rowe/soya modificada durante 5 minutos.

### 7.5.2 Cinética de consumo de azúcares reductores y nitrógeno amínico.

Se presenta el consumo de azúcares reductores y nitrógeno amínico para observar la disponibilidad de los requerimientos nutricionales del microorganismo. Como se observa en las Figuras 7.20 y 7.22, durante el crecimiento exponencial se consume el 80 % de la glucosa inicial, mientras que durante la fase de esporulación el consumo es mínimo.

Se observó el mismo comportamiento en la cinética de consumo de nitrógeno amínico (Figuras 7.21 y 7.22). Después del inicio de la esporulación la concentración de nitrógeno amínico sube

y baja debido a que las células se rompen y liberan al medio restos celulares. Además de que la germinación de las esporas formadas puede estar consumiendo el nitrógeno amínico.

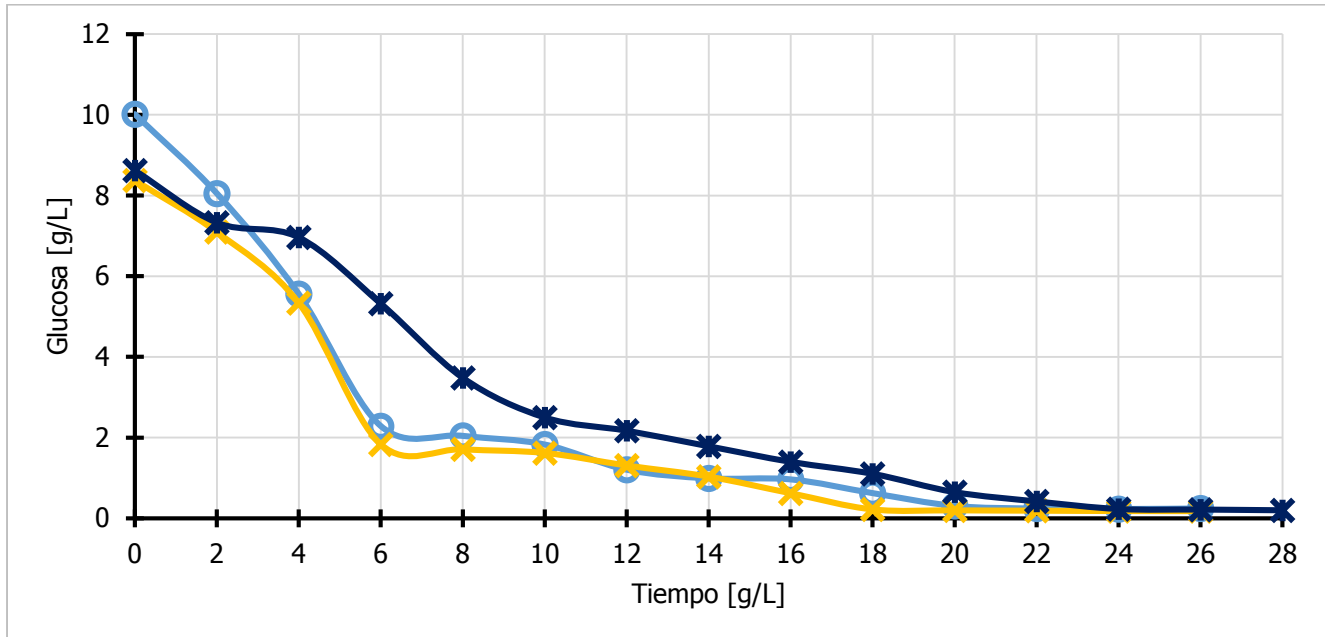


Figura 7.20. Cinéticas de consumo de glucosa *Bacillus thuringiensis* de la cepa HD-73 (I)(●), (II)(✕) y (III)(✕) en el medio de Gerry Rowe/soya modificada durante 5 minutos.

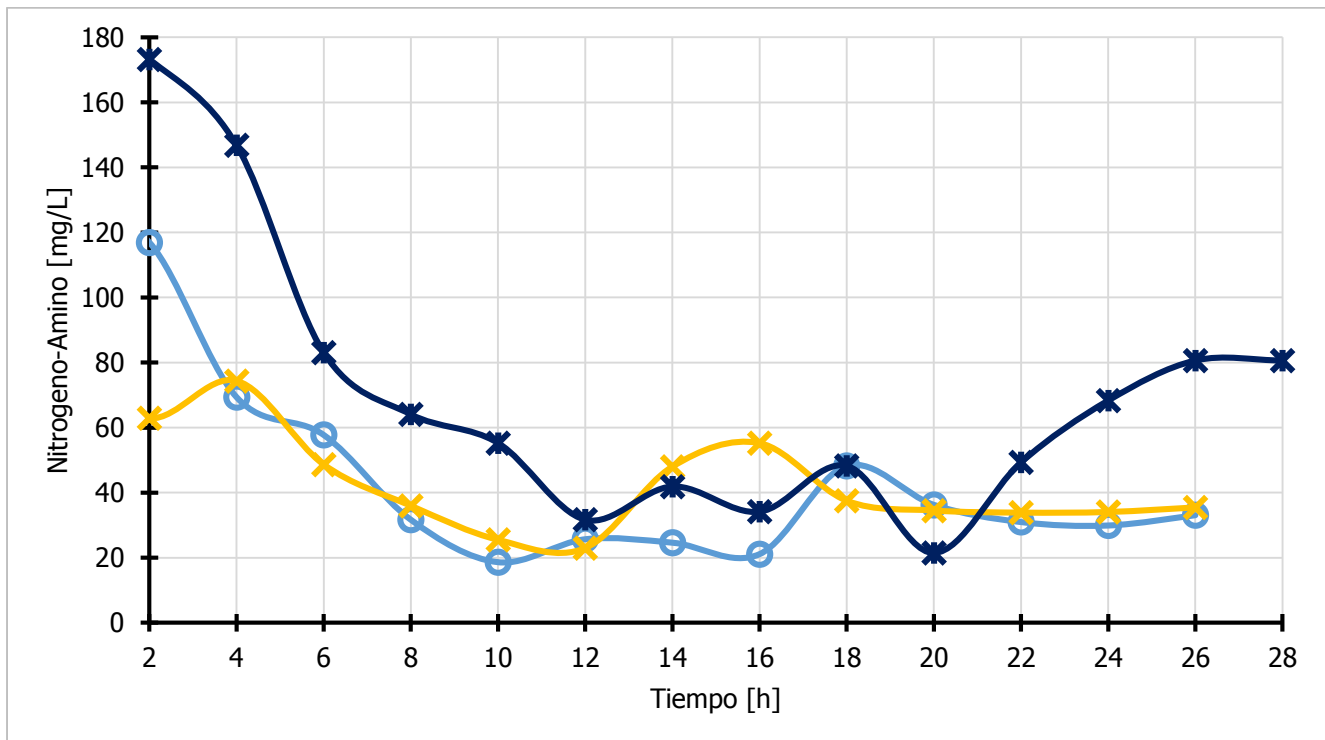


Figura 7.21. Cinéticas de consumo de nitrógeno amínico de *Bacillus thuringiensis* HD-73 (I)(●), (II)(✕) y (III)(✕), en el medio de Gerry Rowe/soya modificada durante 5 minutos con molienda mecánica.

La cinética de consumo de glucosa y nitrógeno amínico (Figuras 7.20. y 7.21.) de las cepas HD-73 (I, II y III) son muy parecidas, presentándose un consumo simultáneo de ambos nutrientes.

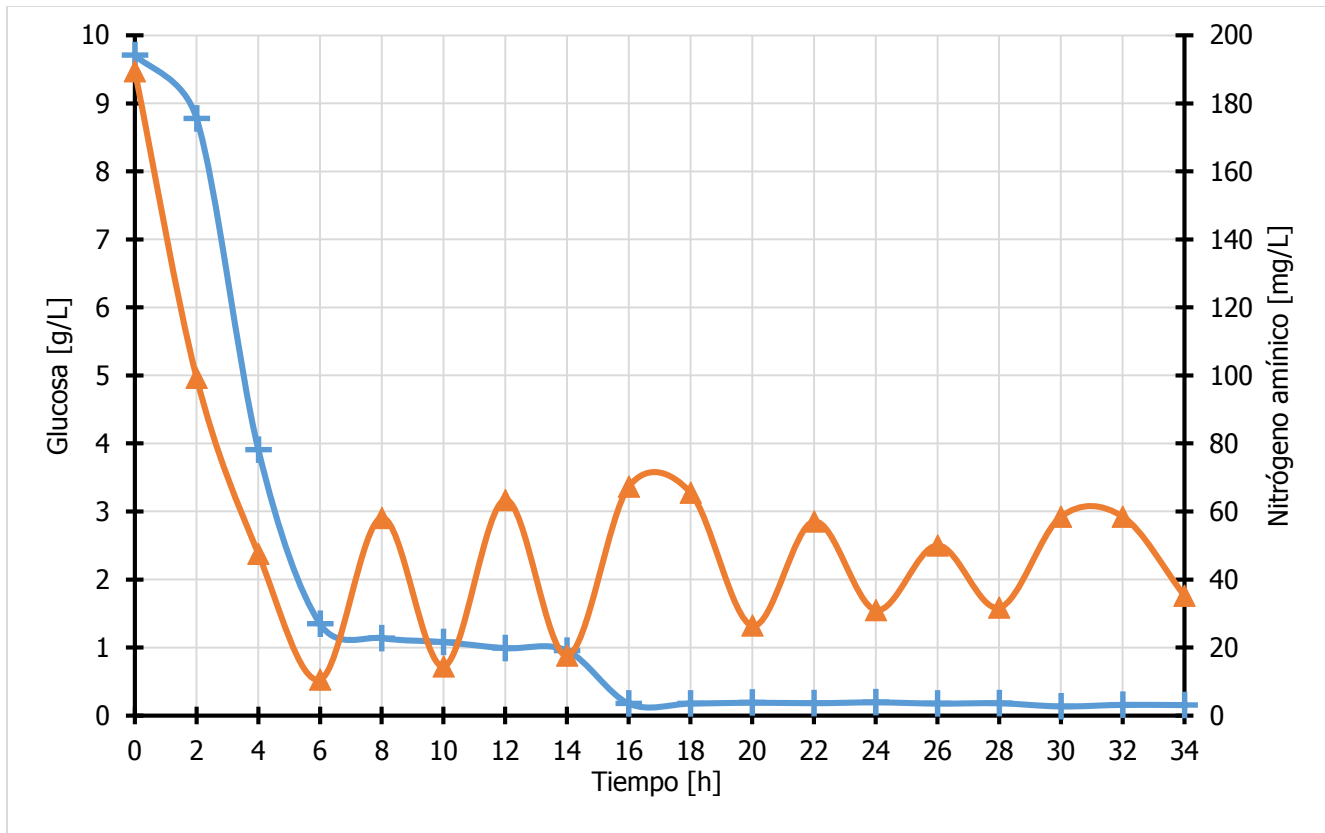


Figura 7.22. Cinética de consumo de glucosa (+) y consumo de nitrógeno amínico (Δ), de *Bacillus thuringiensis* Cry-B, en el medio de Gerry Rowe/soya modificada durante 5 minutos por molienda mecánica.

### 7.5.3 Cinéticas de liberación de CO<sub>2</sub>.

La máxima producción de CO<sub>2</sub> se observa antes de que se alcance la máxima concentración de biomasa. En la cinética de crecimiento de la cepa HD-73 (I) la concentración más alta de biomasa y de producción de CO<sub>2</sub> es a las 10 y 6 horas, respectivamente (Figura 7.23).

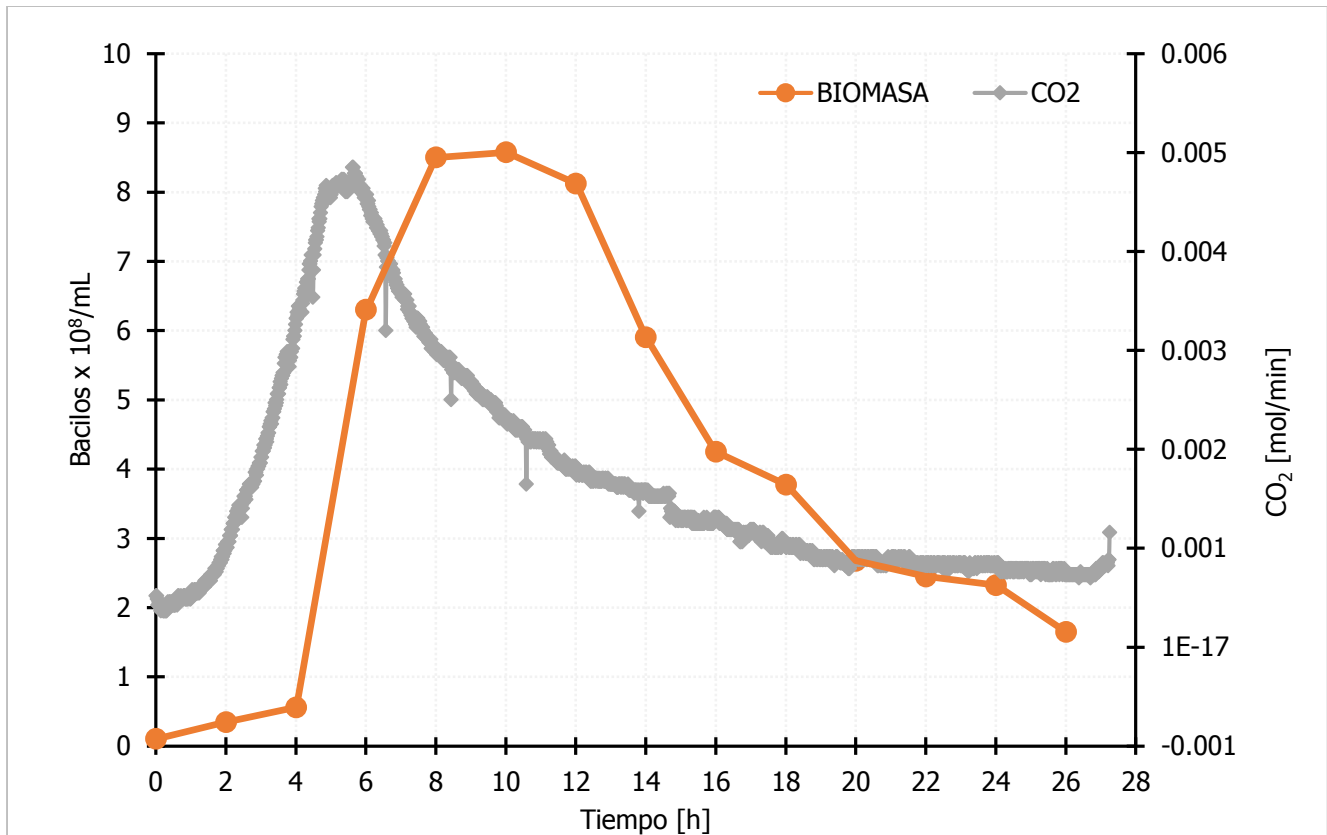


Figura 7.23. Cinética de crecimiento (biomasa) y liberación de CO<sub>2</sub>, durante la fermentación de *Bacillus thuringiensis* de la cepa HD-73 (I) en el medio de Gerry Rowe/soya modificada durante 5 minutos con molienda mecánica.

Para la fermentación de *Bacillus thuringiensis* HD-73 (II), la máxima concentración de biomasa se alcanza a las 8 horas y la máxima generación de CO<sub>2</sub> a las 6 horas de haber iniciado (Figura 7.24).

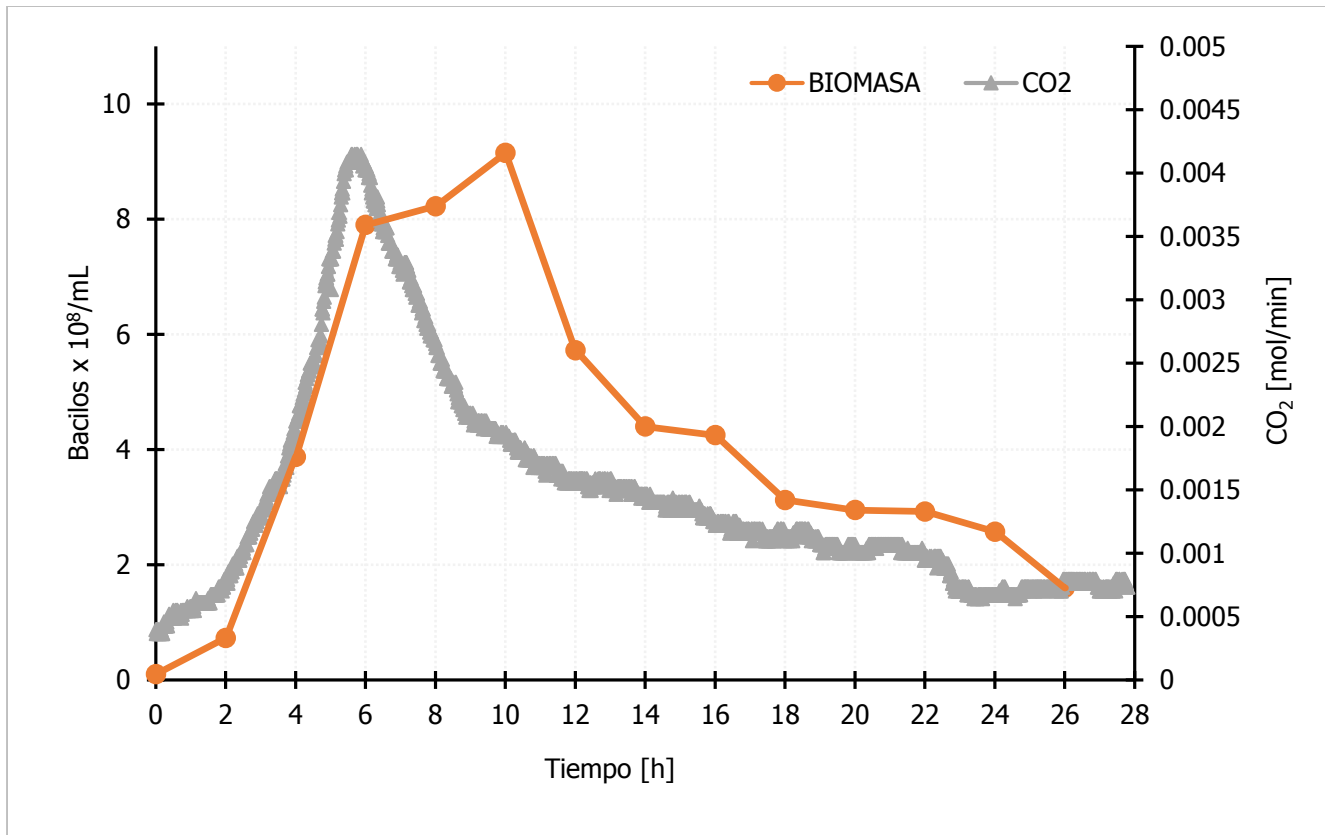


Figura 7.24. Cinética de crecimiento (biomasa) y liberación de CO<sub>2</sub>, durante la fermentación de *Bacillus thuringiensis* de la cepa HD-73 (II), en el medio de Gerry Rowe/soya modificada durante 5 minutos de molienda mecánica.

De la misma manera para la fermentación de la cepa HD-73 (III) el máximo crecimiento de biomasa se alcanza a las 10 horas y la máxima liberación de CO<sub>2</sub> se alcanza a las 6 horas (Figura 7.25).

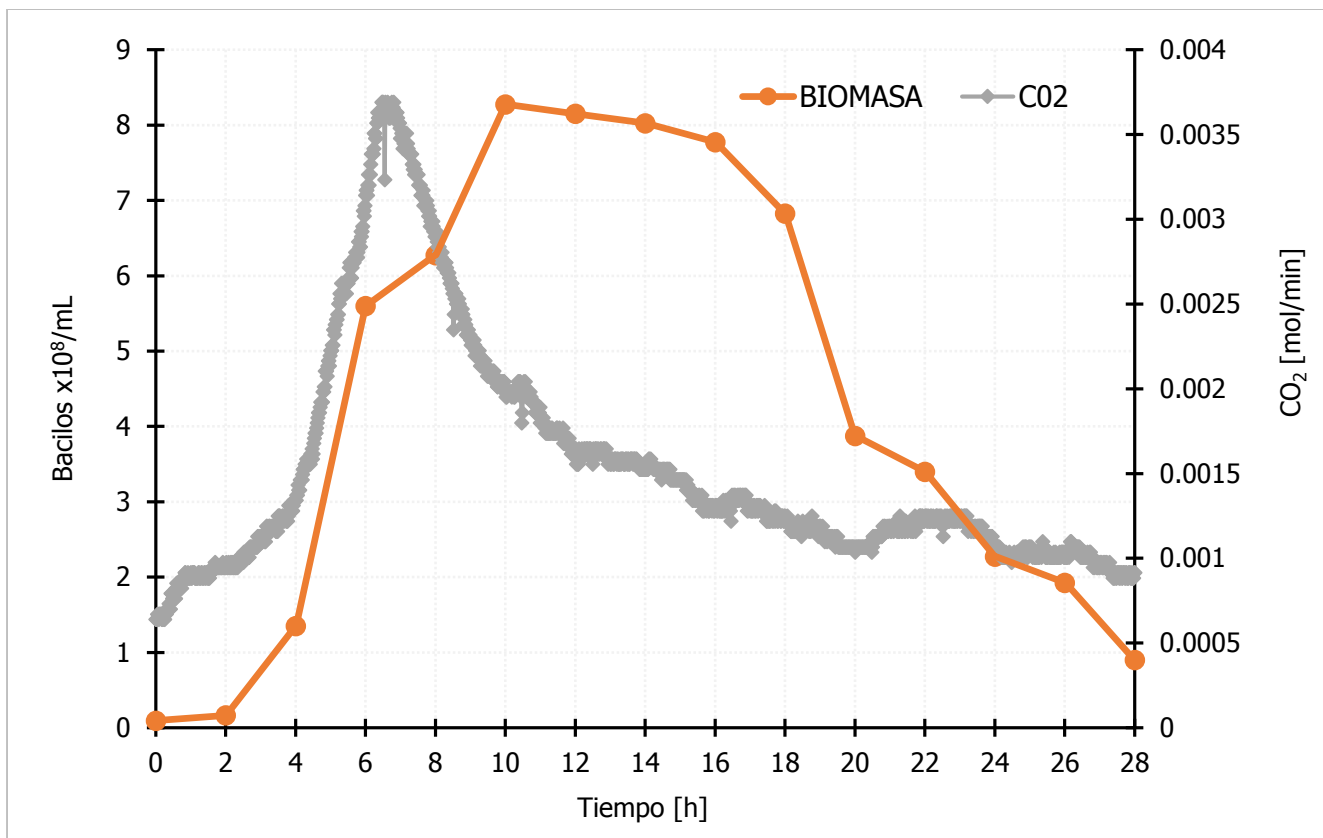


Figura 7.25. Cinética de crecimiento (biomasa) y liberación de CO<sub>2</sub> de *Bacillus thuringiensis* de HD-73 (III), en el medio de Gerry Rowe/soya modificada durante 5 minutos con molienda mecánica.

Las cinéticas de crecimiento de biomasa y liberación de CO<sub>2</sub> a cepa Cry-B se observan en la Figura 7.26. El crecimiento de biomasa alcanzó su máximo a las 12 horas mientras que la liberación de CO<sub>2</sub> alcanzó su máximo a las 6 horas.

Esto sucede debido a que el CO<sub>2</sub> es el resultado de la oxidación de la glucosa por lo tanto su consumo llega al máximo cuando se alcanza la mayor velocidad de crecimiento [Navarro *et al*, 2006]. La mayor velocidad de crecimiento se alcanza pasada la mitad del crecimiento exponencial. Se ha reportado que a la mitad del crecimiento exponencial se da el cambio entre las rutas del Embded-Meyerhof-Parnas y el ciclo del Ácido Gamma Aminobutírico. Lo que implica que la población de bacilos ha empezado el proceso de muerte-esporulación [Navarro *et al*, 2006].

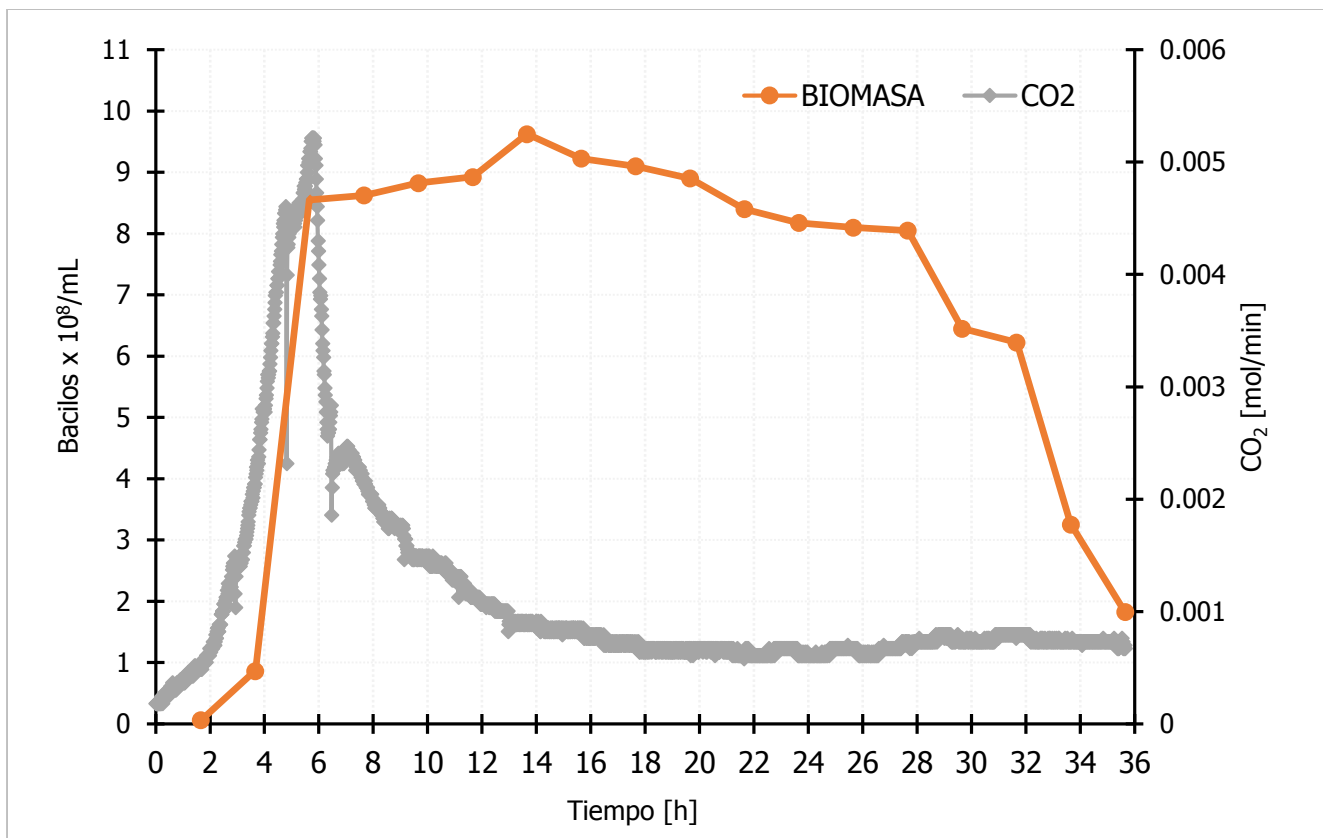


Figura 7.26. Cinética de crecimiento (biomasa) y liberación de CO<sub>2</sub>, durante las fermentaciones de *Bacillus thuringiensis* cepa Cry-B en medio de Gerry Rowe/soya modificada con molienda mecánica durante 5 minutos.

#### 7.5.4 Patrón de difracción en polvos en cinéticas a nivel reactor

Las Figuras 7.27 a 7.31 se muestran los patrones de difracción de las cuatro cinéticas de fermentación del *Bacillus thuringiensis* HD-73 (I, II y III) y Cry-B. Se presentan los difractogramas de las muestras colectadas cada dos horas para la detección de la proteína Cry a lo largo del cultivo.

La Figura 7.27 se muestra los patrones de difracción de polvos de la cinética de fermentación del *Bacillus thuringiensis* HD-73 (I). Se observa que de las 0 a las 10 horas, la estructura de los compuestos en el medio es completamente amorfa. Sin embargo, después de las 12 h y hasta las 26 h se presentan dos reflexiones a 13.3° y 16.8° en 2 $\theta$ , posiblemente asociadas a

la proteína Cry. Posteriormente observamos nuevas reflexiones a las 18 horas de fermentación que corresponden a las sales de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), fosfato de sodio dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y fosfato de sodio monobásico monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). La aparición de reflexiones características de las sales determina un posible proceso de recristalización debido a los cambios del medio de cultivo. Estas estructuras alcanzan su mayor cristalinidad a las 24 horas para posteriormente amorfizarse.

Los patrones de difracción de la cinética de fermentación del *Bacillus thuringiensis* HD-73 (II) se observan en la Figura 7.28. La estructura de los compuestos en el medio es completamente amorfa de las 0 a las 4 horas. Sin embargo, desde las 6 h y hasta las 26 h se presentan las dos reflexiones a  $13.3^\circ$  y  $16.8^\circ$  en  $2\theta$ , asociadas a la proteína Cry. También, se nota la presencia de reflexiones a las 8 horas que corresponden a la fase de fosfato de sodio dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). A las 12 horas se distingue una nueva reflexión a  $23.1^\circ$  en  $2\theta$  aún sin identificar. A partir de las 18 horas se logran observar las reflexiones de las sales de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y fosfato de sodio monobásico monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). A las 26 horas las estructuras de los sólidos en el medio son amorfas.

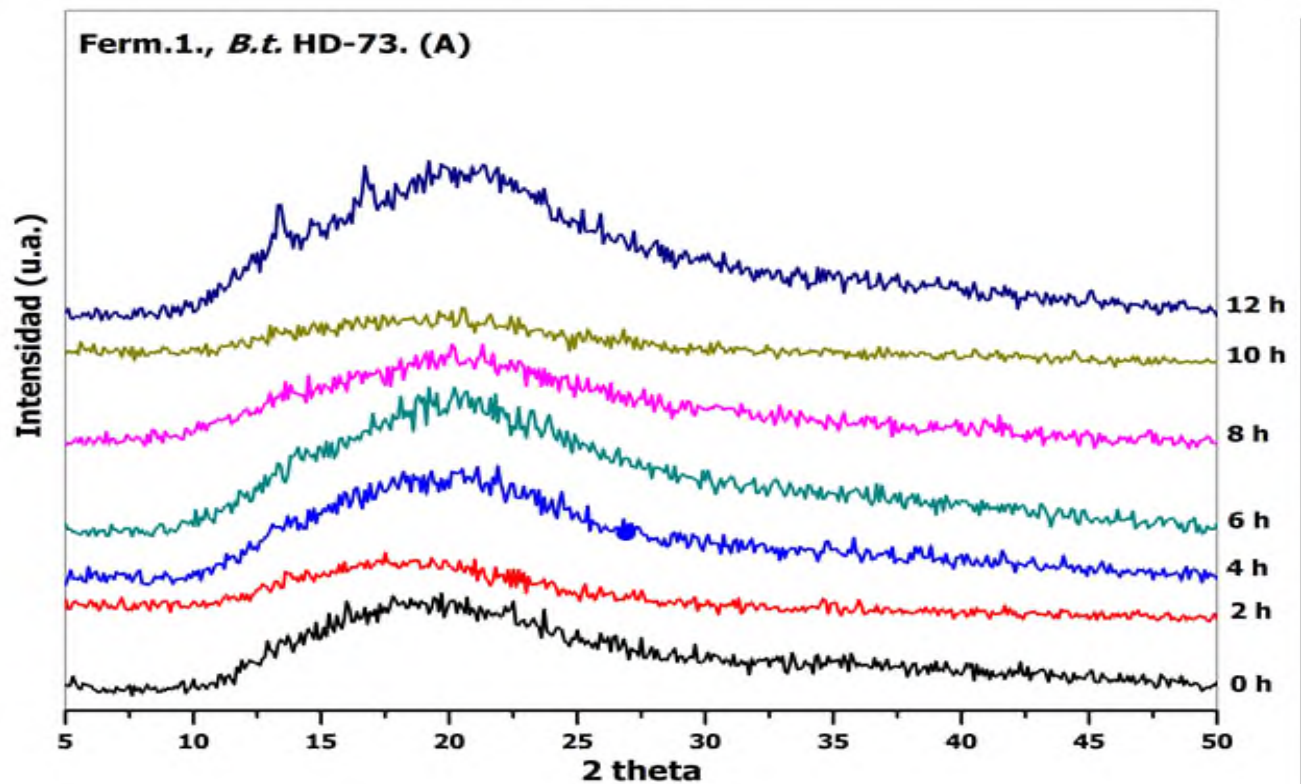
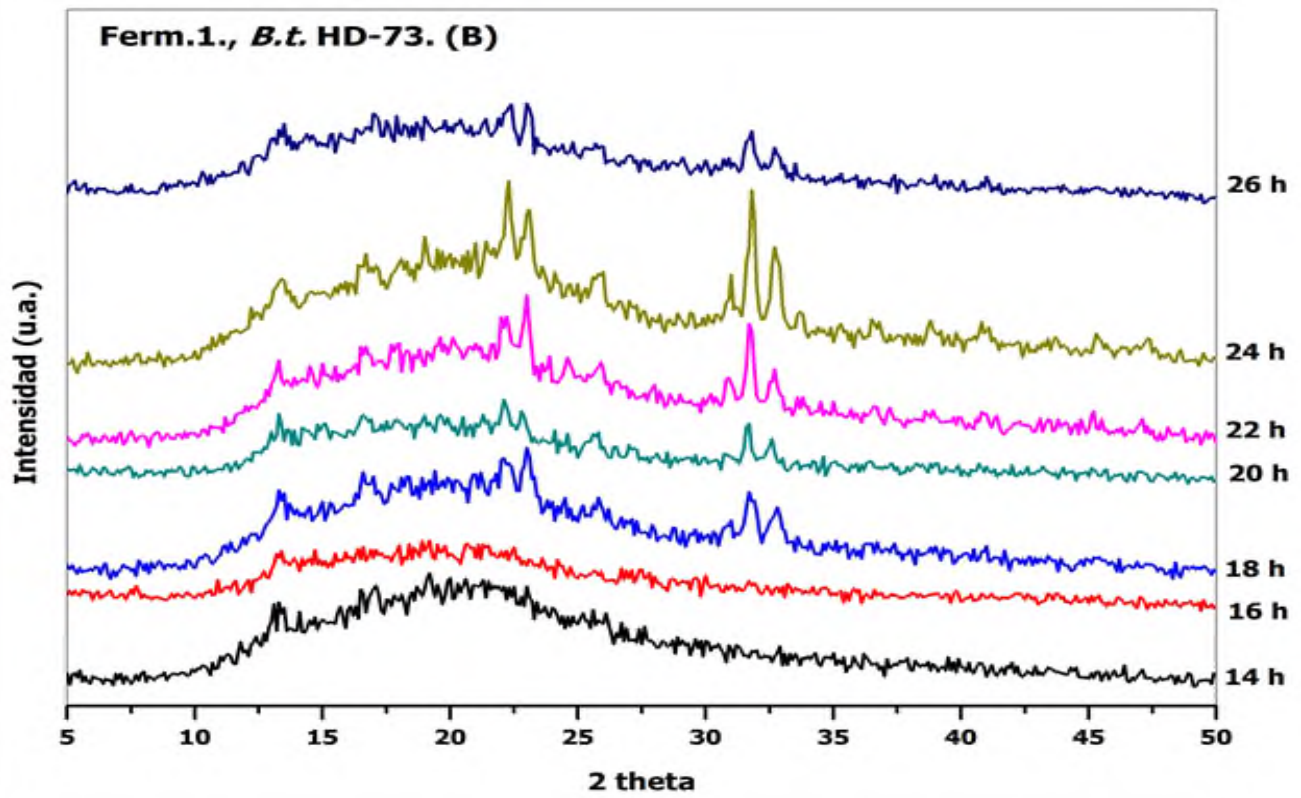


Figura 7.27. Difractogramas de la cinética de 0-12 h (A) y 14-26 h (B), de *Bacillus thuringiensis* HD-73 (I), en el medio de Gerry Rowe/soya modificada con molienda mecánica durante 5 minutos.

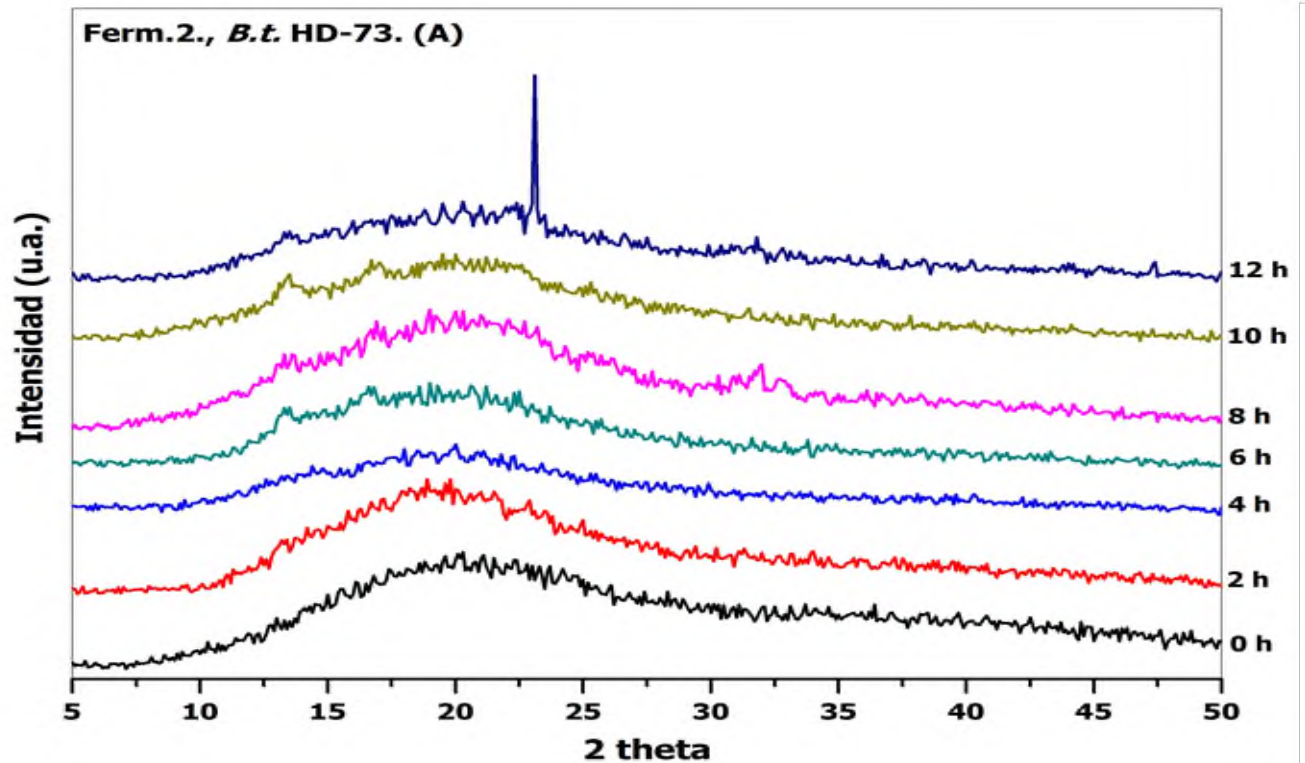
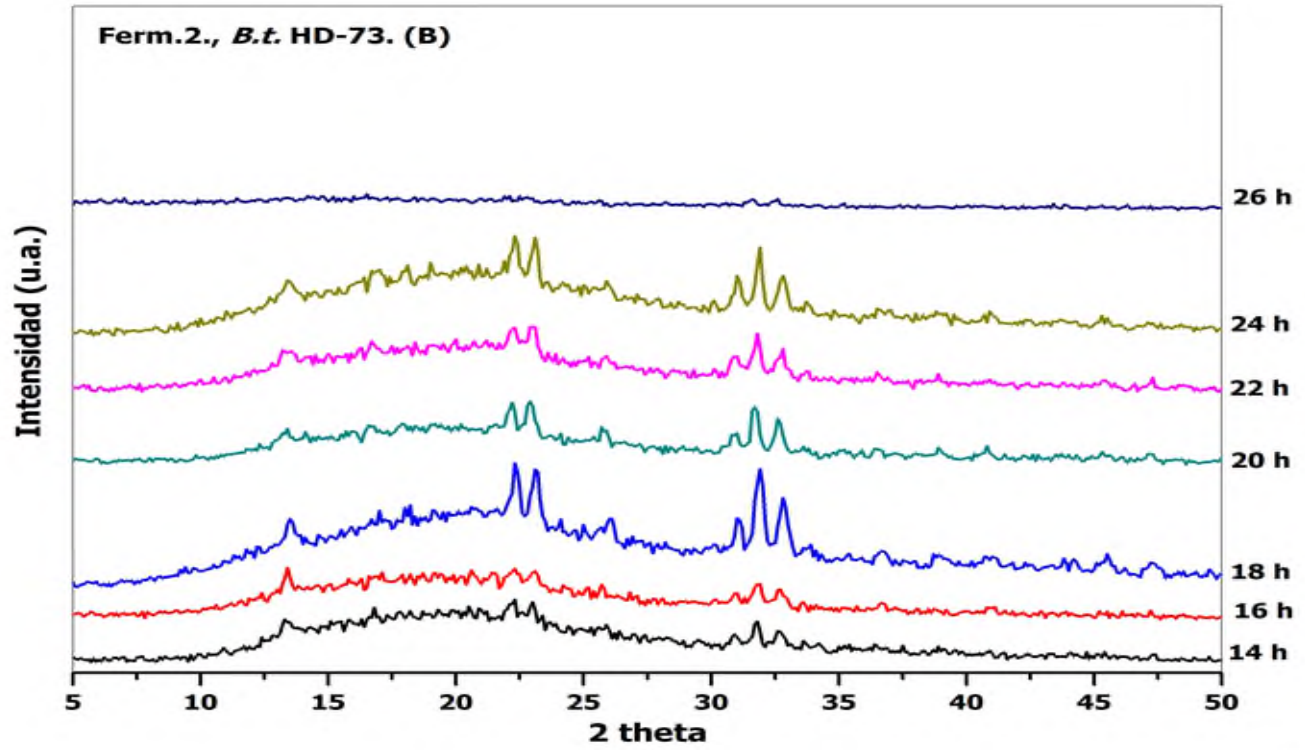


Figura 7.28. Difractogramas de la cinética de 0-12 h (A) y 14-26 h (B), de *Bacillus thuringiensis* HD-73 (II), en el medio de Gerry Rowe/soya modificada con molienda mecánica durante 5 minutos.

La Figura 7.29 muestra los patrones de difracción de polvos de la cinética de fermentación de *Bacillus thuringiensis* HD-73 (III). Se observa que de las 0 y hasta las 4 horas, la estructura de los compuestos en el medio de cultivo es completamente amorfa. Sin embargo, desde las 6 h hasta las 12 h se presentan las reflexiones a  $13.3^\circ$  y  $16.8^\circ$  en  $2\theta$ , asociadas a la proteína Cry. Estas señales desaparecen y reaparecen a las 18 horas y se mantiene hasta las 28 horas. Las reflexiones de la fase de fosfato de sodio dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) se observan a las 10 horas alcanzando su máximo a las 28 horas. Posteriormente observamos nuevas reflexiones a las 26 horas de fermentación que corresponden a las sales de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y fosfato de sodio monobásico monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). La aparición de reflexiones características de las sales determina un proceso de recristalización debido a los cambios del medio de cultivo, alcanzando las estructuras su mayor cristalinidad a las 28 horas.

Los patrones de difracción de la cinética en fermentador de *Bacillus thuringiensis* Cry-B se observan en la Figura 7.30 y 7.31. La estructura de los compuestos en el medio es completamente amorfa desde las 0 h y hasta las 6 horas. Sin embargo, desde las 8 h y hasta las 34 h se presentan las reflexiones a  $13.3^\circ$  y  $16.8^\circ$  en  $2\theta$ , asociadas a la proteína Cry. Su máxima cristalinidad la alcanzan a las 10 horas. También, se nota la presencia de reflexiones a las 12 horas que corresponden a la fase de fosfato de sodio dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). A partir de las 18 horas se comienza a observar las reflexiones de las sales de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y fosfato de sodio monobásico monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ).

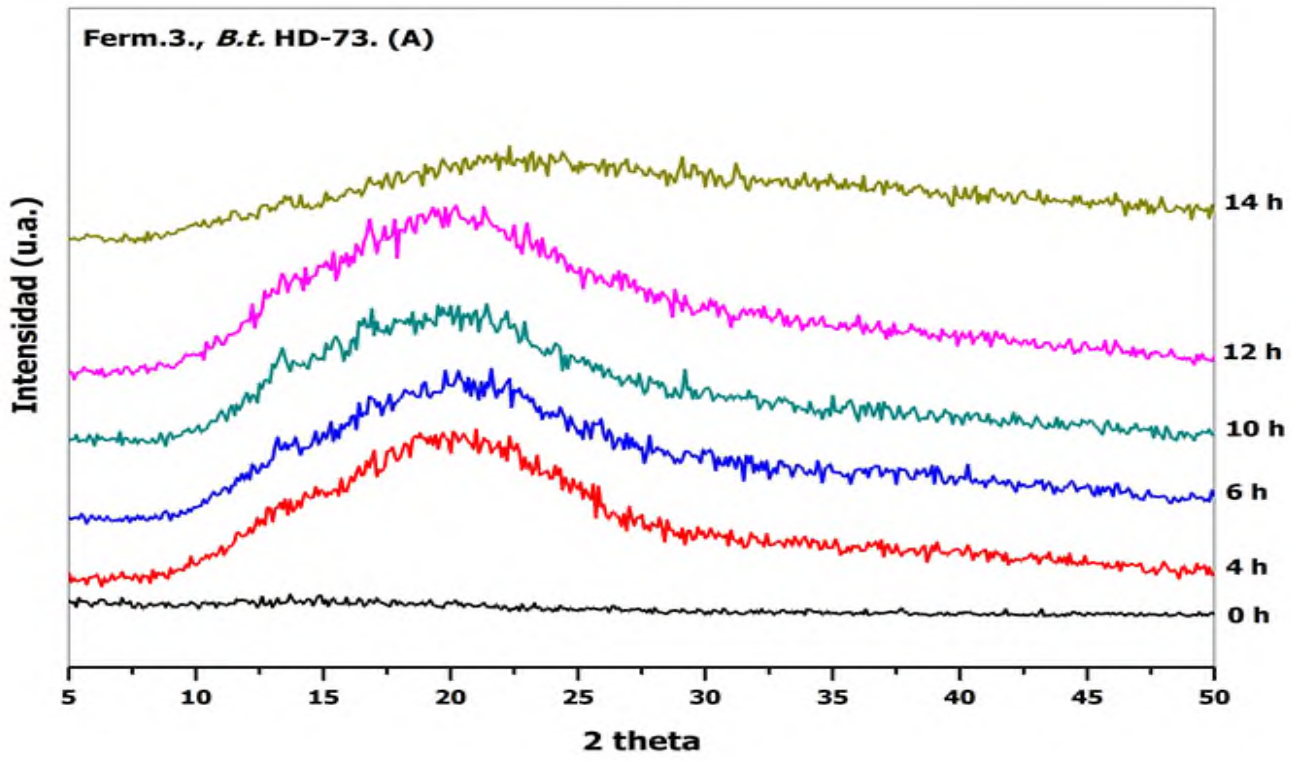
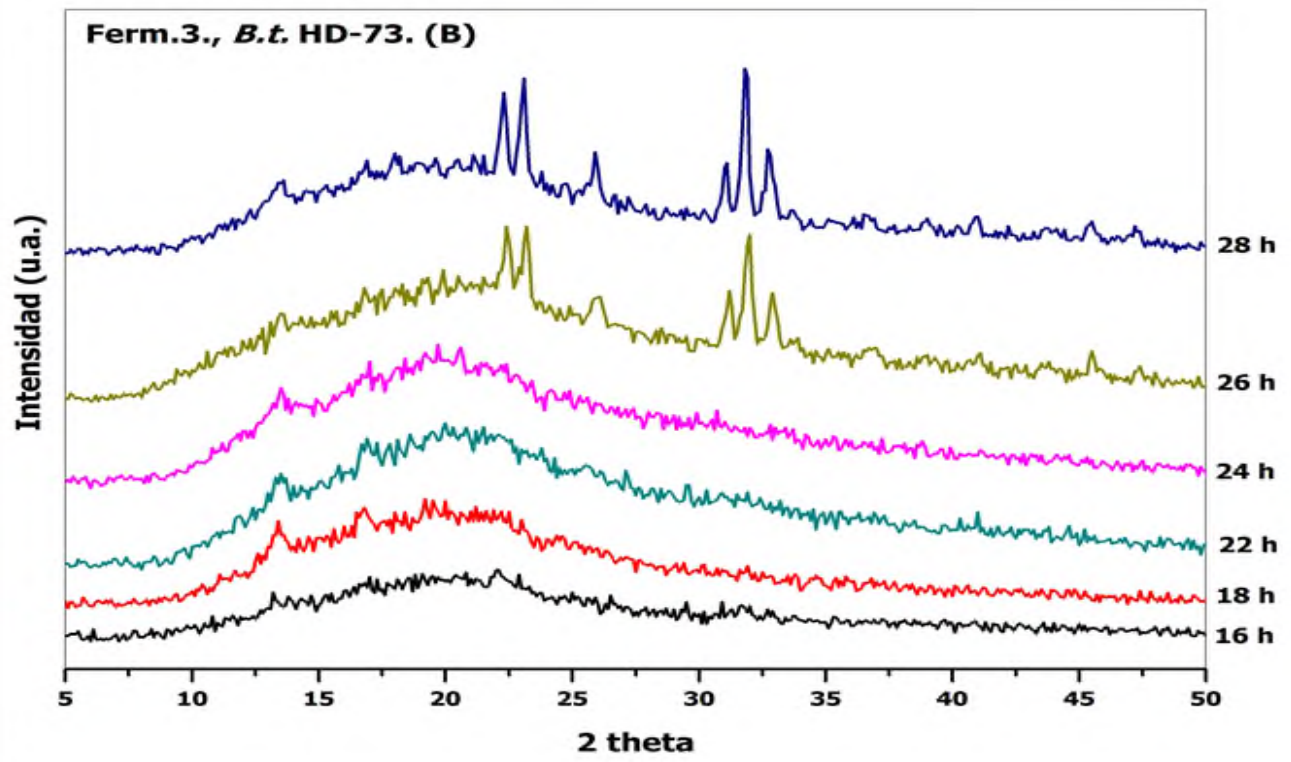


Figura 7.29. Difractogramas de la cinética de 0-14 h (A) y 16-28 h (B), de *Bacillus thuringiensis* HD-73 (III), en el medio de Gerry Rowe/soya modificada por molienda mecánica durante 5 minutos.

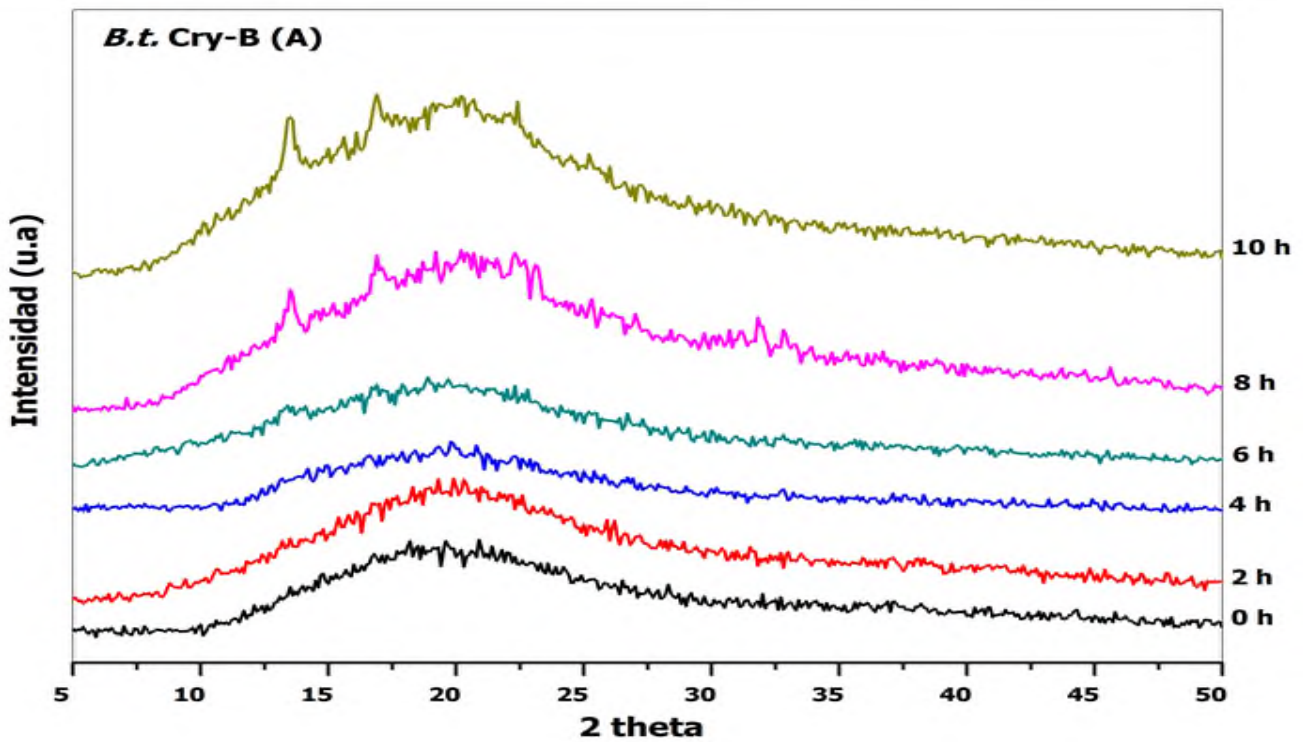
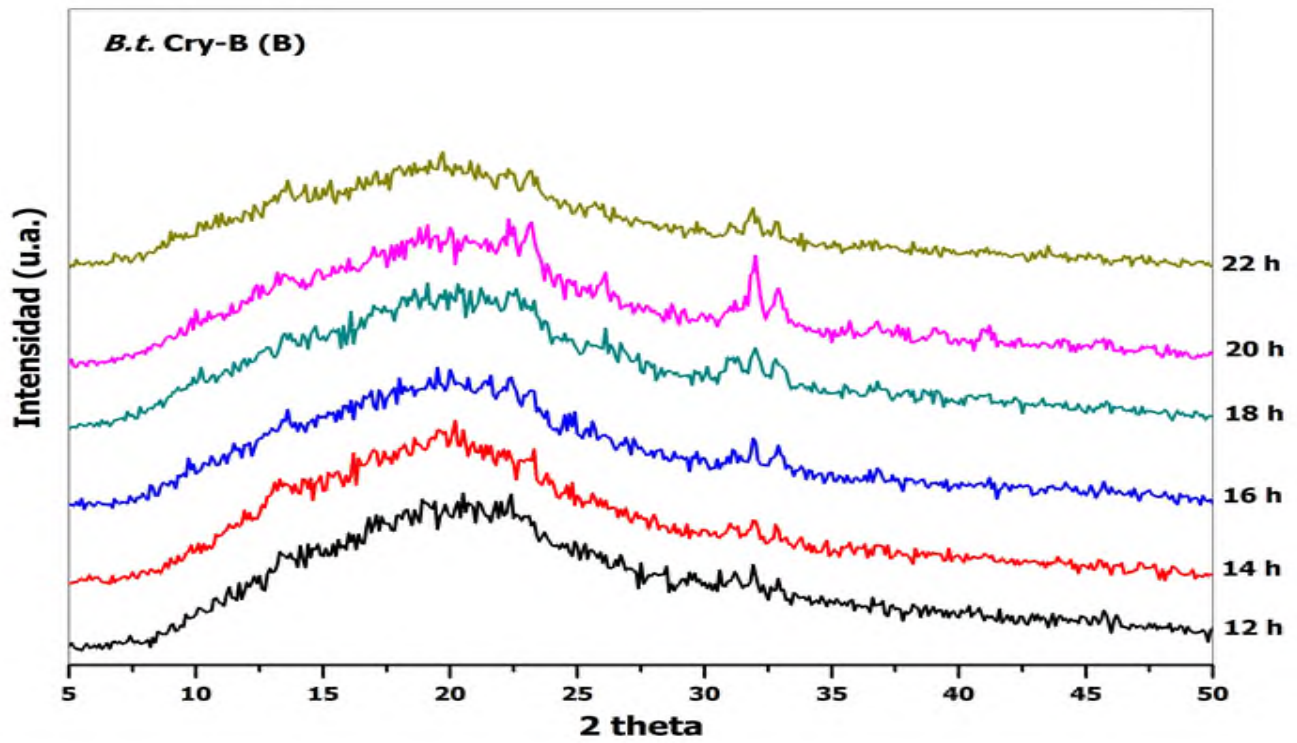


Figura 7.30. Difractogramas de la cinética 0-10 h (A) y 12-22 h (B), de *Bacillus thuringiensis* Cry-B, en el medio de Gerry Rowe/soya modificada con molienda mecánica durante 5 minutos.

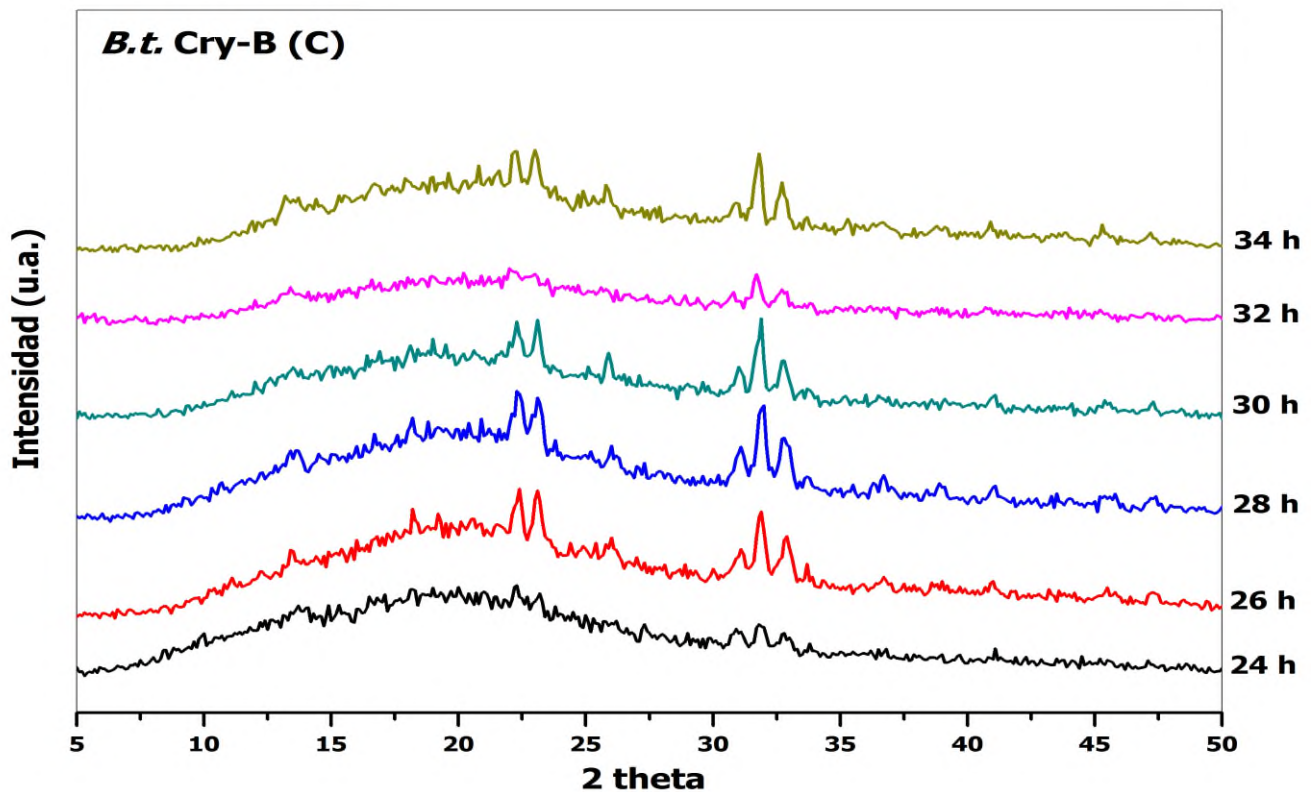


Figura 7.31. Difractogramas de la cinética 24-34 h (C), de *Bacillus thuringiensis* Cry-B, en el medio de Gerry Rowe/soya modificada con molienda mecánica durante 5 minutos.

Considerando el inicio de la esporulación cuando se detectaron las primeras esporas, la detección de la proteína Cry, mediante difracción de rayos X de polvos, se observó 2 h después del inicio de la esporulación para la fermentación HD-73 (I). Para la fermentación HD-73 (II) se detectó 4 h antes y para la fermentación HD-73 (III) 8 h antes. Mientras que para la fermentación Cry-B se detectó 6 h antes. Sin embargo, Bulla *et al.* (1980) reportaron que el proceso de esporulación se da en 7 etapas, aproximadamente 5-6 h, (I a VII). Durante la etapa III se empieza a formar la proteína Cry y en las etapas III y VI se van agregando más y más unidades de la proteína al cristal. Mientras que hasta la etapa VII se obtiene la espora madura. Posterior a esto se lisa la célula liberando al medio de cultivo la espora madura y el cristal

paraesporal. Por lo tanto, al observar la espora el proceso de esporulación ya termino y no es extraño detectar proteína Cry unas horas antes.

No es posible comparar estos resultados debido que hasta el momento no hay reportes en la literatura sobre pruebas de difracción de rayos X de polvos de cultivos de *Bacillus thuringiensis*. Existen reportes de difracción, pero de las proteínas puras obtenidas por recristalización para determinar su estructura.

## 8 CONCLUSIONES

La molienda mecánica de alta energía cambia los contenidos de azúcares reductores y nitrógeno amínico. La mayor concentración de azúcares reductores se obtuvo con 5 min de molienda y la mayor concentración de nitrógeno amínico con 8 min.

Las cinéticas de crecimiento en matraz de *Bacillus thuringiensis* HD-73 en medio Gerry Rowe con soya molida durante 5 min, mostraron los mejores resultados en el crecimiento de biomasa.

La difracción de rayos X de polvos es una técnica cualitativa que permite la detección de cristales de proteína Cry. Los difractogramas con las reflexiones de mejor definición se obtuvieron en medio líquido para las muestras que fueron lavadas con NaCl al 0.85% y solución de HCl con pH 2.

Los difractogramas de las cinéticas permiten detectar el posible inicio de la formación de la proteína Cry.

Las cinéticas a nivel reactor concuerdan con la literatura reportada que las proteínas Cry aparecen durante la esporulación ya que las reflexiones se presentan durante esta etapa.

A las últimas horas de fermentación las sales de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), fosfato de sodio dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y fosfato de sodio monobásico monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) se recristalizan.

## 9 PERSPECTIVAS

- Generar medios de cultivo con diferentes concentraciones de soya modificada con molienda mecánica de alta energía a diferentes tiempos de molienda.
- Usar otros productos orgánicos para generar mediante molienda mecánica de alta energía fuentes de carbono y/o nitrógeno para medios de cultivo.
- Realizar difracción de rayos X de polvos de otras cepas del grupo de *Bacillus cereus* para compararla con *Bacillus thuringiensis*. Además de cepas acristalíferas y asporógenas.
- Explorar la posibilidad de utilizar la difracción de rayos X para cuantificar la cantidad de la proteína Cry. Así como para diferenciar entre proteínas Cry.

## 10 BIBLIOGRAFIA

- Bradford, M., M. [1976]. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bulla, L. A., Bechtel, D. B., Kramer, K. J., Shethna, Y. I., Aronson, A. I., y Fitz, P. C. [1980]. Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC. Crit. Rev. Microbiol.* 8:147-204.
- Bulla, L. A., Julian, G. y Rhodes, R. A. [1971]. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects. III. Radiorespirometry of pyruvate, acetate, succinate and glutamate oxidation. *Can. J. Microbiol.* 17:1073-1079.
- Carreras, B. S. [2011]. Aplicaciones de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* en el control de fitopatógenos., *Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 12:129 -133.
- Dubois, N.R. [1968]. Laboratory batch production of *Bacillus thuringiensis* spore and crystals. *Appl. Microbiol.* 16:384-389.
- Dulmage, H.T. [1970]. Production of spore d-endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.* 16:384-389.
- Dulmage, H.T., y De Barjac, H. [1973]. HD-187, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* that produce high yields of  $\delta$ -endotoxin. *J. Invertebr. Pathol.* 22:273-277.
- Ernandes, S., Luiz Del Bianchi, V., y Oliveira M. I. [2013] Evaluation of two different culture media for the development of biopesticides based on *Bacillus thuringiensis* and their application in larvae of *Aedes aegypti*., *Acta Sci., Technol.* 35:11-18.
- Fang, H.H.P., Liu, H., and Zhang, T., [2004]. Bio-hydrogen production from wastewater. *Water Sci. Technol.* 4:77-85.
- Fang, H.H.P., Liu, H., Zhang, T., [2002]. Characterization of a hydrogen-producing granular sludge, *Biotechnol. Bioeng.* 78:44-52.
- Fang, Y., Hozalski, R.M., Clapp, L.W., Novak, P.J., Semmens, M.J., [2002]. Passive dissolution of hydrogen gas into groundwater using hollow-fiber membranes. *Water Res.* 36:3533-3542.
- Farrera, R.R. [1998]. Efecto del medio de cultivo sobre la esporulación y síntesis de *CryIA(c)* en *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73. Tesis de doctorado. CINVESTAV-IPN. México.
- Flores-Farias, S. [2004]. Obtención de almidón con tamaño de partículas reduciendo mediante pulverizado mezclado con alta energía. IPN. MEXICO
- Golberg, I., Sneh, B., Battat, E., y Klein, D. [1980] Optimization of medium for high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the Egyptian Cotton Leaf Worm *Spodopteralitoralis* Bois. *Biotechnol Lett* 2: 419-426.
- Höfte H. and Whiteley H. R. [1989]., Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*., *MICROBIOL MOL BIOL R Journal.*, Vol. 53. No. 2 p. 242-255.

- Ibarra, J. E., Del Rincón, M. C. C., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., García, R., Carrillo, J. A., Pereyra-Alfárez, B., Alcázar-Pizaña, A., Luna-Olvera, H., Galán-Wong, L., Pardo, L., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Soberón, M., y Bravo, A. [2006]. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos; *Rev. Latin.de Microbiol.* 48:113 – 120.
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M. y Bulla, L. A. [2010]. *Bacillus thuringiensis*. A genomics and proteomics perspective. *Bioeng Bugs*, 1:31–50.
- Karapinal, I., y Kargi, F. [2006]. Biohydrogen production from waste material. *Enzyme and Microbial Technol.* 38(5):569-582.
- Kim, I. S., Hwang, M. H., Jang, N. J., Hyun, S. H., Lee, S. T. [2004]. Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. *Int J Hydrogen Energy.* 29: 1133- 1140
- Lowry O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall R. J. [1951] Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Manoj S.N., Marianne M.L., Astrid B-B., Julie A.W., Donald H.D., Michael C.O., Richard W. B., Prosper N. B., Michael K. C., [2015]. Cry Protein Crystals: A Novel Platform for Protein Delivery. *PLoS One.*, 10(6).
- Marjolein M.G.M.T., Elisha G.A., Niccol, T., Gianfranco L., Cristina C., Alessandro P., Giampietro R., Par N., [1995]. Crystallisation and preliminary X-ray analysis of the “common-type” acylphosphatase. *FEBSJ.*, 364 (243-244).
- Martinez, G., A. [2014]. Efecto de la molienda mecánica en compuestos base Mg con impurificaciones de Mn O<sub>2</sub> y B como posibles materiales almacenadores de nitrógeno. Tesis de Maestría. Universidad del Papaloapan, México.
- Matsumoto, T., Sugiura, Y., Kondo, A., y Fukuda, H. [2010]. Efficient production of protopectinases by *Bacillus subtilis* using médium based on soybean flour. *Biochem. Engin. J.* 6:2:81-86.
- Moore. S. y Stein. W. H. (1954). A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* 211:907-913.
- Miraglia, M., Bernal, K., G., Brera, C., Corbisier, P., Holts-Jesen, A., y Koke, J. [2004] Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food Chem Toxica.*, 42:1157-1180.
- Monro, R. E. [1961]. Protein turnover and the formation of protein inclusions during sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* 81:225-232.
- Navarro, A. K., Farrera, R. R., Lopez R., y Perez-Guevara, F. [2006]. Relationship between poly-B-hydroxybutyrate production and  $\delta$ -endotoxin for *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biotechnol Lett.* 28:641-644.

- Nickerson, K. W., Julian, G., y Bulla, L. A. [1974]. Physiology of sporeforming bacteria associated with insect: radiorespirometric survey of carbohydrate metabolism in the 12 serotypes of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol.* 28:129-132.
- Okamoto, M., Miyahara, T., Mizuno, O., Noike, T., [2000]. Biological hydrogen potential of materials characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes. *Water Sci Technol*: 41(3):25-32.
- Orietta F. L. V. [2002]. Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología [Costa Rica]* 64:110-115.
- Patil, C. D., Borase, H. P., y Patil, S. V. [2014]., Evaluation of different culture media for improvement in bioinsecticides production by indigenous *Bacillus thuringiensis* and their application against larvae of *Aedes aegypti*. *Sci. World J.* 14:6-10.
- Pendleton, I.R. [1969]. Insecticides of crystal forming bacteria. *Procc. Biochem*; 29-32.
- Rodríguez, M. M., de la Torre M., y de Urquijo, N. E. [1991]. *Bacillus thuringiensis*: Características biológicas y perspectivas de producción. *Rev-Lat-amer.Microbiol.* 33:279-292.
- Rowe, G. E. [1990]. Central metabolism of *Bacillus thuringiensis* during growth and sporulation. London, Ontario, Canada. Ph. Dissert. pp. 295.
- Rowe, G. E., y Margaritis, A. [1994]. Endocellular fatty acid composition during batch growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. *J. Ferment. Bioeng.* 77:503-507.
- Seisuke K., Mutsuko K.N., Yoko S., Noboru O., Tomomi U.K., Motoaki W., Mariko I., Takaho T., Ken Y., Yasuharu N., Mikako S., Takehiko S., and Shigeyuki Y., [2014]., Structural Basis for the Specific Recognition of the Major Antigenic Peptide from the Japanese Cedar Pollen Allergen Cry j 1 by HLA-DP5. *J. Mol. Biol.*, 426, 3016–3027.
- Shimadzu (2017). <http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=ssm5000>.
- Schmiele M., Sech G., da Silva S. V., de Souza R. T., Lopez A. E., Nabeshima E. H., Chang Y. K., Steel C. J. (2015). Physicochemical, structural and rheological properties of chestnut (*Castanea sativa*) starch. *American Journal of Food Science and Technology.* 3, 1-7.
- Smith, A. R., [1982]. Effect of strain and médium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*. *Cand. J. Microbiol.* 28:1089-1095.
- Soberón, M., y Bravo A., [2007]. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias en su aplicación. 303-314.
- Suryanarayama, C. (2001). Mechanical alloying and milling. *Prog. Mater. Sci.*, 46(1-2), 1-184.
- Urzúa V. M. (2017). Transformación mecánica de alta energía de sustratos orgánicos con posible uso en medios de cultivo. Tesis de licenciatura. Universidad del Papaloapan.
- Wang, C.C., Chang, C.W., Chu, C.P., Lee, D.J., Chang, B.V., Liao, C.S., and Tay, J.H. [2003]. Using filtrate of waste biosolids to effectively produce bio-hydrogen by anaerobic fermentation, *Water Res.* 37: 2789–2793.

Yañez-Mendizabal, V., J., Viñas, I., usall, J., Torres., Solsona, C., Abadias, M., y Teixido, N. [2012]. Formulation devopment of the biocontrol agent bacillus subtilis stain CPA-8 by s pry-drying. J. of Appliend Microbiol., 112:954-965.

Zouari, N. and Jaoua, S. (1999). The Effect of Complex Carbon and Nitrogen, Salt, Tween-80 and Acetate on Delta-endotoxin Production by a *Bacillus thuringiensis* subsp *Kurstaki*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 23:497–502.

## 11 ANEXO A

Tabla 1. Reflexiones en  $2\theta$  de los compuestos empleados en el medio de cultivo.

| No | Compuesto                                     | Formula   | $2\theta$   |
|----|---|---|---|
| 1  | Cloruro de calcio dihidratado                 | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$           | 14.66, 19.16, 20.54, 21.05, 23.80, 24.22, 28.07, 29.23, 29.40, 29.57, 30.31, 31.98, 33.33, 33.82, 36.15, 38.31, 38.90, 39.63, 41.78, 42.18, 42.86, 48.46 y 49.34. |
| 2  | Cloruro de potasio                            | KCl   | 28.30 y 40.53.  |
| 3  | sulfato de magnesio heptahidratado            | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$           | 14.80, 16.58, 19.67, 21.05, 23.50, 25.99, 26.88, 27.06, 28.11, 29.92, 30.02, 31.02, 32.60, 33.48 y 33.69.   |
| 4  | Sulfato de zinc heptahidratado                | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$           | 16.51, 16.75, 19.94, 21.13 y 21.28.   |
| 6  | Sulfato de zinc heptahidratado                | $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$            | 18.48, 18.68, 26.25, 26.60, 27.02, 35.72 y 46.25  |
| 8  | Sulfato de cobre pentahidratado               | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$           | 8.54, 15.53, 16.24, 17.27, 18.78, 19.14, 20.84, 22.41, 24.06, 25.88, 27.13, 27.52, 28.14, 29.39, 32.80 y 33.61.   |
| 9  | Fosfato de sodio dibásico anhidro             | $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                           | 22.37, 23.20, 31.10, 31.95 y 32.90.   |
| 10 | Fosfato de sodio dibásico anhidro dihidratado | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 10.52, 16.81, 19.15, 26.57 y 31.20.   |
| 11 | Fosfato de sodio monobásico                   | $\text{NaH}_2\text{PO}_4$                           | 21.96, 22.67, 26.58, 27.02, 28.02 y 33.6.   |
| 12 | Fosfato de sodio monobásico monohidratado     | $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  | 16.46, 26.29 y 28.17.   |
| 13 | alfa-Glucosa                                  | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$                 | 10.12, 11.97, 14.69, 17.10, 18.81, 19.81, 20.70, 20.93 y 28.54.   |
| 14 | Citrato férrico                               | $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FeO}_{10}$            | -----   |
| 15 | Peptona de caseína                            | -----   | -----   |
| 16 | Extracto de levadura                          | -----   | -----   |