

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO DE
BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**

TITULO:

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE
QUITINASAS EN CEPAS MEXICANAS DE *B. thuringiensis*”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**

PRESENTA

BIÓLOGO JUAN MAURICIO FORTUNA GONZÁLEZ

Reynosa, Tam.

Diciembre 2009



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

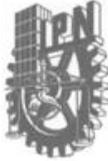
CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa Tam, el día 30 del mes Noviembre del año 2009, el (la) que suscribe Juan Mauricio Fortuna González alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica con número de registro B071080, adscrito a Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Ninfa María Rosas García y José Eleazar Barboza Corona y cede los derechos del trabajo intitulado “Caracterización bioquímica y molecular de quitinasas en cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis*”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Blvar. Del Maestro esq. Elías Piña S/N Col. Naciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México. Tels. 01-8999243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Juan Mauricio Fortuna González

Nombre y firma



SIP-14-D

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tam. siendo las 12:00 horas del día 20 del mes de Noviembre del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG para examinar la tesis titulada:
Caracterización bioquímica y molecular de quitinasas en cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis*.

Presentada por el alumno:

<u>Fortuna</u> Apellido paterno	<u>González</u> Apellido materno	<u>Juan Mauricio</u> Nombre(s)
Con registro: B 0 7 1 0 8 0		

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Ninfa María Rosas García

Dr. José Eleazar Barboza Corona

Dr. Raymundo Rosas Quijano

Dr. José Alberto Narváez Zapata

Dra. Paulina Estrada de los Santos

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Alberto Mendoza Herrera

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Doctora Ninfa María Rosas García y la co-dirección del Doctor Eleazar Barboza Corona.

DEDICATORIA

A mi esposa Patricia Eugenia y a mi hijo Mauricio Bernabé, quienes son la razón mas importante de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al centro de Biotecnología Genómica por darme la oportunidad de realizar mis estudios.

A los compañeros de Laboratorio que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme, Alejandro y Jesús.

A la Doctora Ninfa María Rosas García, por su dirección, apoyo y consejos.

A el Doctor Eleazar Barboza Corona, por el gran apoyo al proyecto.

A el Ing. Martín Santamaría por sus recomendaciones y palabras de aliento.

Al Club Rotario de Reynosa por su gran apoyo.

A todos ellos les doy las gracias por haberme ayudado a concluir este proyecto.

Contenido

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
Quitina.....	5
Quitinasas.....	6
Las quitinasas en <i>B. thuringiensis</i>	12
Descripción de <i>B. thuringiensis</i>	12
Reportes sobre la actividad sinérgica de las quitinasas y <i>B. thuringiensis</i>	13
Caracterización Bioquímica y molecular de algunas quitinasas de <i>B. thuringiensis</i>	14
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Selección de las cepas mexicanas de <i>B. thuringiensis</i> con actividad quitinolítica	22
Determinación preliminar de la actividad quitinolítica	22
Determinación de la actividad quitinolítica en las cepas seleccionadas	24
Determinación de la actividad quitinolítica	27
Determinación del tipo de actividad quitinolítica mediante zimogramas.....	28
Obtención de los genes de quitinasa en <i>B. thuringiensis</i>	29
Extracción del DNA de las cepas seleccionadas	29
Amplificación de los genes de las quitinasas de las cepas seleccionadas.....	30
Purificación de los amplicones por medio del “QIAquick PCR Purification Kit”	31
Clonación de los genes de quitinasa al vector pBluescript II KS(+)	32
Digestión del vector pBluescript II KS(+) con Sall y PstI y ligación con los amplicones.....	33

Transformación de <i>E. coli</i> con el vector recombinante	35
Obtención de las células electrocompetentes.....	35
Electroporación de las células.....	36
Selección de las cepas recombinantes.....	36
Caracterización bioquímica y molecular de las quitinasas recombinantes obtenidas	37
Determinación del pH óptimo.....	38
Determinación de la temperatura óptima	39
Análisis estadísticos.....	39
Determinación de la secuencia nucleotídica	39
RESULTADOS.....	41
Secuencia de los genes de quitinasa provenientes de las cepas MR10, MR11, MR21, MR33 Y RN52.....	67
Secuencia del gen que codifica una endoquitinasa proveniente de la cepa MR10.....	67
Secuencia gen que codifica una endoquitinasa proveniente de la cepa MR11.....	70
Secuencia gen que codifica una endoquitinasa proveniente de la cepa MR21.....	72
Secuencia gen que codifica una endoquitinasa proveniente de la cepa MR33.....	75
Secuencia gen que codifica una endoquitinasa proveniente de la cepa RN52	79
DISCUSIÓN	83
CONCLUSIONES	87
RECOMENDACIONES	88
LITERATURA citada	89
ANEXOS	96
Anexo 1	96
Alineamiento múltiple de las quitinasas recombinante de las cepas MR10 y de MR11, MR21, MR33 y RN52.	96
Identidad entre las quitinasas recombinante de las cepas MR10 y de MR11, MR21, MR33 y RN52.102	
Anexo 2	103
Alineamiento de los sitios catalíticos de las endoquitinasas provenientes de las cepas MR10, MR11, MR21, MR33, RN52 con otras quitinasas.....	103
Anexo 3	106

RESUMEN

Se realizó el análisis bioquímico y molecular de quitinasas en cepas nativas mexicanas de *Bacillus thuringiensis*. Se examinaron 98 cepas provenientes de los estados de Tamaulipas, Nayarit y Michoacán mediante su crecimiento en placas de agar-quitina. Las cepas MR10, MR11, MR21, MR33 y RN52 fueron seleccionadas por su producción quitinolítica y sometidas a ensayos mediante el método fluorogénico para determinar su actividad. Se realizaron zimogramas utilizando sustratos sintéticos derivados de la quitina: tetrámero [4-MU (GlcNAc)₃] 4-metilumbeliferil-β-D-N,N',N''-triacetilquitotriosa; trímero:[4-MU (GlcNAc)₂] 4-metilumbeliferil-β-D-N,N'-diacetilquitobiosa; dímero:[4-MU GlcNAc] 4-metilumbeliferil-N-acetil-β-D-glucosamina y se determinó que la actividad presentada por las cepas seleccionadas es de endoquitinasa. Posteriormente se clonaron los genes de las endoquitinasas en células de *E. coli* DH5α. Se corroboró la actividad enzimática de las endoquitinasas secretadas por las cepas recombinantes. Se realizaron además análisis de pH de las endoquitinasas recombinantes donde se observó una actividad óptima entre pH 6.5 y 7.5, el análisis de temperatura óptima indicó una actividad a 50°C y a 60°C. La determinación de la secuencia de las endoquitinasas de las cepas MR10, MR11, MR21, MR33 Y RN52 reveló una similitud entre ellas del 97% al 99%; en relación con otras secuencias de endoquitinasas de *Bacillus thuringiensis*, el análisis reveló una similitud que oscila desde el 94% al 99%, .

ABSTRACT

Biochemical and molecular analysis were conducted in Mexican native strains of *Bacillus thuringiensis*. Ninety-eight strains native to Tamaulipas, Nayarit and Michoacan states were grown on chitin-agar plates. The strains MR10, MR11, MR21, MR33, and RN52 were selected and their chitinase activity was assayed using fluoregenic chitin derivative 4-methylumbelliferyl- β -D-N,N',N''-triacetylchititriose (tetramer fluorescent derivative), 4-methylumbelliferyl- β -D-N,N'-diacetylchitobioside (trimeric fluorescent derivative), and 4-methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (dimeric fluorescent derivative). The chitinolytic activity was determined as endochitinase in all strains.

Endochitinase genes were cloned in *E. coli* DH5 α cells. Enzymatic activity of secreted endochitinases was tested again. pH and temperature analysis were conducted, and the recombinant endochitinases retained enzymatic activity at pH of 6.5 and 7.5, and demonstrated the highest activity at 50°C and 60°C.

Sequence analysis revealed a high similarity (97% and 99%) among endochitinases from MR10, MR11, MR21, Mr33 and RN52, related to other chitinases, all the endochitinases have a similarity of 94% to 99%.

INTRODUCCIÓN

Las quitinasas son enzimas que degradan a la quitina. En la actualidad las aplicaciones biotecnológicas de las quitinasas son diversas, ya que son utilizadas en la industria farmacéutica, alimentaria y en control biológico. La producción de estas enzimas se realiza en una amplia gama de organismos, sin embargo, existen reportes que muestran que *B. thuringiensis* produce quitinasas con un gran potencial para utilizarlas además del control biológico, en los rubros biotecnológicos antes mencionados.

B. thuringiensis es una bacteria Gram positiva, la cual es morfológicamente semejante a *B. cereus* y *B. anthracis*. Sin embargo, durante la fase de esporulación, *B. thuringiensis* forma cristales o cuerpos parasporales formados por millones de proteínas denominados Cry, los cuales presentan actividad contra una gran diversidad de insectos y cuyo efecto tóxico puede ser incrementado (disminución de la dosis letal media) por la acción sinérgica de quitinasas bacterianas.

Debido a la importancia que *B. thuringiensis* tiene como organismo utilizado en el control biológico y además como un posible productor de quitinasas con aplicaciones en diversas áreas biotecnológicas, el siguiente trabajo tratará sobre la caracterización bioquímica y molecular de quitinasas de cepas mexicanas de *B. thuringiensis*. Para llevar a cabo lo anterior, en este trabajo se seleccionaron varias cepas cultivándolas en medio de Castañeda-quitina coloidal y se detectó su actividad quitinolítica. Diversos genes que codifican quitinasas en las cepas seleccionadas fueron amplificados, clonados y secuenciados. Las secuencias deducidas de aminoácidos fueron analizadas

in silico y comparadas con las reportadas en el GenBank para otras quitinasas de *B. thuringiensis*.

ANTECEDENTES

Quitina

La quitina es el compuesto orgánico más abundante en el planeta después de la celulosa. Podemos encontrarla en organismos marinos como el camarón, las jaibas, cangrejos y kril, constituyendo la quitina hasta el 75% del peso de estos organismos, además, está presente en el exoesqueleto e intestino de los insectos y en las paredes de los hongos (Wang y Chang 1997; Barboza-Corona *et al.* 2007).

Debido a hallazgos paleontológicos, se han encontrado trazas de quitina en los remanentes de la cutícula de fósiles de artrópodos, con una edad aproximada de 420 millones de años, correspondiente al periodo Silúrico (Jollès y Muzzarely 1999, Bierstedt, *et al.* 1998).

La molécula de quitina se encuentra conformada por polímeros lineales insolubles de β -1-4 *N*-acetilglucosamina (GlcNAc). Para su síntesis, necesita del precursor activado uridina difosfato *N*-acetil-D-glucosamina, y de la enzima quitina sintetasa (Lehninger 1995). Los estudios por difracción de rayos X demuestran que se pueden encontrar tres formas polimórficas de este polímero, siendo estas α -, β -, γ - quitina, las cuales difieren en el arreglo molecular de las cadenas.

Las aplicaciones de la quitina en la actualidad abordan diversas áreas, como la agricultura, medicina, tratamientos de aguas, elaboración de cosméticos y biosensores (Lárez-Velásquez 2006).

Debido a que la quitina ha estado presente en la naturaleza durante miles de años, diversos organismos han desarrollado un sistema compuesto por varias enzimas (quitinasas) capaces de hidrolizarla y liberar moléculas de N-acetilglucosamina que le sirve como fuente de carbono y nitrógeno.

Quitinasas

De acuerdo con la Comisión de Enzimas de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), las quitinasas son enzimas que hidrolizan a la quitina, por lo tanto, se encuentran agrupadas dentro de la clase tres, que corresponde a las glicosil hidrolasas. Su secuencia aminoacídica permite clasificar el conjunto de las glicosilhidrolasas en familias y conforme a este criterio, las quitinasas se agrupan dentro de las familias 18, 19 y 20 (Polaina 2004). La familia 18 es diversa en términos evolutivos, ya que se encuentran quitinasas de organismos como bacterias, hongos, virus, animales y de algunas plantas. La familia 19 comprende quitinasas presentes en plantas y en *Streptomyces*. Estas dos familias no comparten similitud en la secuencia aminoacídica; además, su estructura 3D y mecanismos moleculares son diferentes, lo cual hace pensar que provienen de diferentes ancestros. La familia 20 incluye a la β -N-acetilhexosaminidasa que se encuentra en *Streptomyces* y en el humano. Las quitinasas se clasifican en dos grandes categorías de acuerdo al lugar en donde se lleva a cabo la reacción de hidrólisis en el sustrato:

- 1) Endoquitinasas
- 2) Exoquitinasas

Las endoquitinasas son enzimas que se unen de manera aleatoria a sitios internos, lo cual genera multímeros de bajo peso molecular de GlcNAc, tales como quitotetraosa, quitotriosa y diacetilquitobiosa. Las exoquitinasas a su vez se dividen en dos subcategorías, las quitobiosidasas y las β -1-4 *N*-glucosaminosidasas. Las quitobiosidasas catalizan la liberación de diacetilquitobiosa comenzando con los extremos terminales no reducidos de las microfibras de quitina, y las β -1-4 *N*-glucosaminosidasas se unen a productos oligoméricos de endoquitinasas y quitobiosidasas, generando monómeros de GlcNAc. Además, existe una vía que involucra la desacetilación de la quitina a quitosana, la cual es convertida en residuos de glucosamina por acción de la quitosanasas. Las quitinasas se clasifican también de acuerdo al grupo de organismos que las producen, partiendo para ello de las secuencias de los dominios catalíticos. Así tenemos que en plantas, las quitinasas se clasifican en cinco clases y se representan con los números romanos I, II, III, IV y V. En los hongos se clasifican en grupos, siendo estos el A y el B, por último en las bacterias, las quitinasas están claramente separadas en tres subfamilias que son la A, B y C (Dahiya *et al.* 2006).

Las quitinasas son enzimas que poseen un papel importante en diversos organismos. En los virus, se ha observado que están implicadas en la patogénesis, en los insectos en la degradación de su exoesqueleto durante la muda, en hongos tienen un papel importante en procesos de autólisis, nutrición y morfogénesis. En las plantas estas enzimas están involucradas en procesos de respuesta a stress y de resistencia contra hongos fitopatógenos. En los

vertebrados se encuentran en el tracto digestivo y en las bacterias, están implicadas en la nutrición y el parasitismo (Taira *et. al.* 2002; Patil *et al.* 2000, Merzendorfer 2006).

Por otro lado, la expresión de los genes de quitinasa en microorganismos es controlada por medio de un sistema inductor/represor, en el cual, la quitina u otros productos de la degradación actúan como inductores. En hongos, se ha observado que la glucosa y otras fuentes de carbono funcionan como represores del sistema. La expresión de los genes *ech42* y *chit36* de *Trichoderma harzianum* es inducida por medio de paredes celulares, por quitina coloidal o por la ausencia de carbono, por otro lado, la presencia de altas concentraciones de glucosa o de glicerol inhibe su expresión. Investigaciones posteriores demuestran que la transcripción del gene *ech42* puede ser inducido por otros medios como el estrés fisiológico, bajas temperaturas y por una alta presión osmótica. Además, se han encontrado cuatro copias de un elemento hipotético de respuesta al estrés (CCCCT) que se ubica en el promotor de este gen. Un elemento similar de respuesta al estrés se ha reportado en *Saccharomyces cerevisiae* (Felse y Panda 1999).

De manera general, las quitinasas presentan una conformación modular, siendo variables la cantidad de ellos de acuerdo con el organismo en el cual se encuentren. La familia 18 de las glicosilhidrolasas presenta en hongos una estructura de cinco multidominios o regiones:

- 1) La región N-terminal, correspondiente al péptido señal
- 2) El dominio catalítico
- 3) Una región rica en serina/treonina

- 4) Un dominio de unión a quitina
- 5) Una región C-terminal

Sin embargo, se ha observado que no se necesitan todas las regiones de la enzima para que esta sea activa (Duo-Chan 2006). El mecanismo de acción de las enzimas se puede presentar de dos formas, por medio de un mecanismo de retención de doble desplazamiento y el mecanismo de inversión de desplazamiento sencillo. El mecanismo de retención de doble desplazamiento fue descrito por primera vez para explicar el funcionamiento catalítico de la enzima lisozima (Stryer 2001). Este proceso se observa en la figura 1:

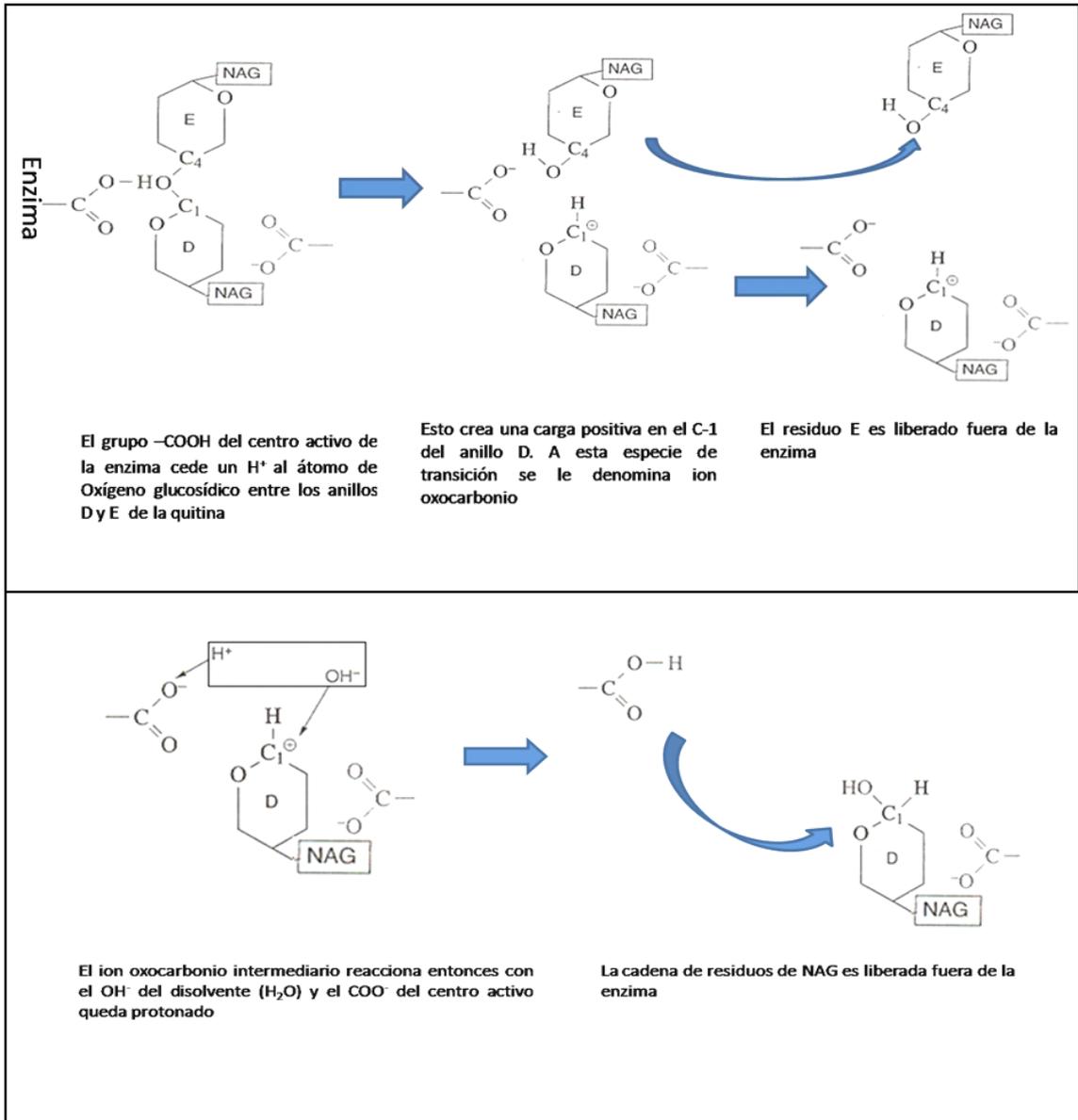


Fig. 1. Mecanismo de acción por retención de doble desplazamiento.

El mecanismo de inversión de desplazamiento sencillo presenta una inversión de la configuración anomérica, en el cual, una molécula de agua actúa como nucleófilo. Lo anterior se sugiere a partir de estudios de cristalografía de rayos X, debido a que el segundo carboxilato catalítico está lo suficientemente cerca para coordinar a la molécula de agua en un mecanismo de desplazamiento sencillo (Brameld y Goddard 1998).

Son varios los géneros bacterianos que producen quitinasas, entre ellos, podemos encontrar algunos representantes del género *Serratia*. El ejemplo más distintivo de este género lo tiene *Serratia marcescens*, la cual es la especie tipo del género y su estudio ha sido de gran utilidad en su aplicación en la industria biotecnológica, debido a su alta producción de quitinasas y su capacidad para degradar a la quitina. Esta enterobacteria es patógena para el hombre, sin embargo, su estudio se enfoca en la expresión de sus genes *chiA* productores de quitinasas aplicados en el área de control biológico y de otros giros biotecnológicos. Estos genes al ser clonados y producir cepas recombinantes, producen efectos sinérgicos, potenciadores o de mayor expresión de la enzima (Ruiz-Sánchez *et al.* 2005a, Ruiz-Sánchez *et al.* 2005b; Grimont y Grimont 2006).

Las quitinasas en *B. thuringiensis*

Descripción de B. thuringiensis

B. thuringiensis es el organismo entomopatógeno más utilizado en términos de control biológico. Es una bacteria Gram positiva, es aerobia estricta y morfológicamente parecida a *B. cereus* y *B. anthracis*, sin embargo, al entrar en su etapa de esporulación produce cristales proteicos denominados Cry, los cuales son tóxicos para larvas de insectos susceptibles, que son plagas de cultivos. *B. thuringiensis* es considerada una bacteria ubicua ya que se ha aislado de sistemas muy diversos como el agua, el suelo, las hojas de las plantas y solo ocasionalmente de insectos muertos (Soberón y Bravo 2006). El mecanismo de acción de las proteínas Cry se lleva a cabo de la manera siguiente:

Los cristales paraesporales de *B. thuringiensis* son ingeridos por la larva del insecto, solubilizándose en el intestino de éste y liberando las proteínas cristalinas en su forma de protoxina. La solubilización del cristal se lleva a cabo en un pH alcalino, el cual existe en insectos susceptibles. La proteólisis en el tracto digestivo del insecto produce la activación del fragmento tóxico. Este fragmento tóxico que atraviesa la membrana peritrófica, la cual protege el epitelio intestinal contra el daño mecánico debido al paso del alimento, a la acción de los radicales libres, y a la invasión por microorganismos, se une a moléculas específicas de la membrana epitelial creando poros que conducen a un desequilibrio osmótico y lisis celular. El tejido intestinal en tales condiciones es incapaz de retener y asimilar los compuestos vitales para la larva del

insecto, lo cual provoca su muerte. La unión de estas proteínas tóxicas al epitelio se explica por una alta afinidad de ellas a moléculas presentes en la membrana, denominadas receptores. Sin embargo, estas moléculas no son en un sentido estricto receptores, ya que su función seguramente no es de servir de unión a un agente que producirá la muerte al organismo (Caballero y Ferré 2001).

Reportes sobre la actividad sinérgica de las quitinasas y B. thuringiensis

Existen diversos reportes que mencionan tras la adición de quitinasas, un efecto potenciador de la actividad insecticida asociada a *B. thuringiensis*. En 1974, Smirnoff reportó la adición de quitinasa a una preparación comercial; en 1983, Sneh *et al.*, utilizaron quitinasas producidas por bacterias que se encontraban en el tracto digestivo de los insectos y en 1996 Wiwat *et al.*, emplearon una preparación cruda de quitinasa de *B. circulans*. Sin embargo, todas estas preparaciones al ser extractos crudos podían haber llevado proteasas o algún otro contaminante que potenciara el efecto de *B. thuringiensis*.

Para evitar esta posible contaminación, en 1998, clonaron y expresaron el gen de la quitinasas *chiA* de *Serratia marcescens* en una cepa recombinante de *E. coli*. La quitinasa obtenida fue combinada con bacterias liofilizadas de *B. thuringiensis* cepa HD133 y IPS78, ambas con actividad quitinolítica. Los organismos blanco seleccionados para la prueba fueron larvas de *Culicoides nubeculosus* y *Spodoptera littoralis*. Los resultados confirmaron que las quitinasas producidas por la cepa recombinante potenciaban el efecto tóxico de *B. thuringiensis*. La explicación más aceptada para este potenciamiento en la actividad insecticida es el siguiente: al presentar el insecto una membrana

peritrófica cuyo componente principal es la quitina, la quitinasa degrada esta barrera permitiendo el paso más fácilmente de las proteínas Cry, uniéndose éstas a las moléculas receptoras, propiciando así la formación de poros en el epitelio, causando la muerte del insecto con dosis menores de cristales (Sampson y Gooday 1998).

*Caracterización Bioquímica y molecular de algunas quitinasas de *B. thuringiensis**

El análisis *in silico* de la endoquitinasa ChiA-HD73 de *B. thuringiensis* sugiere un marco de lectura abierto que codifica una proteína de 676 aminoácidos con una masa molecular deducida de 74.5 kDa, un promotor hipotético y una secuencia Shine-Dalgarno río arriba. El programa Signal Peptide Prediction sugiere la presencia de un péptido señal hipotético con un punto de unión localizado entre Leu-23 y Thr-24. Esta enzima posee una estructura modular compuesta de un dominio catalítico y un dominio hipotético de unión a quitina (ChBD) (Barboza-Corona *et al.* 2007). La identidad con otras quitinasas de acuerdo con su dominio catalítico se muestra en el cuadro 1.

Tabla 1. Identidad de diversas endoquitinasas bacterianas con respecto a la endoquitinasa ChiA-HD73 de *B. thuringiensis*

Organismo	Proteína	Identidad
<i>B. circulans</i>	Chi41	68.4%
<i>B. subtilis</i>	Chi	67.1%
<i>Serratia marcescens</i>	ChiA	39.7%
<i>Enterobacter agglomerans</i>	ChiA	39.7%

Los residuos Trp-591, Tyr-595 y Trp-626 de la quitinasa ChiA-HD73 son altamente conservados no solamente en *B. thuringiensis*, también en otras bacterias como *Serratia marcescens* y *B. circulans*.

Una aplicación potencial sugerida para esta enzima es como agente de control biológico en contra de hongos fitopatógenos, para ser expresada en plantas transgénicas y como agente sinérgico en *B. thuringiensis* potenciando su toxicidad contra insectos plaga susceptibles. Un uso biotecnológico adicional posible de esta endoquitinasa es la producción de oligosacáridos empleados en la industria alimentaria (Barboza-Corona *et al.* 2007).

El análisis *in silico* de la endoquitinasa ChiA74 de *B. thuringiensis* serovar. *kenyae*, reveló que es una enzima modular compuesta de tres dominios: un dominio perteneciente a la familia 18 de quitinasas, dos dominios para fibronectina (FLDs) y un dominio de unión a quitina (CBD). Las identidades con otras quitinasas de acuerdo al dominio catalítico de la familia 18 (Gly-147 a Ser-222) se presentan en el cuadro 2. Las pruebas bioquímicas muestran que el rango de pH de esta enzima se encuentra entre 4 y 9, la

temperatura óptima se estimó en 57.2°C y su peso molecular es de 70 kDa (Barboza-Corona *et al.* 2003).

Tabla 2. Identidad de diversas endoquitinasas bacterianas con respecto a la endoquitinasa ChiA74 de *B. thuringiensis* serovar *kenyae*

Organismo	Proteína	Identidad
<i>B. cereus</i>	ChiB	100%
<i>B. thuringiensis</i> serovar. <i>pakistani</i>	ChiA71	98.7%
<i>B. circulans</i>	Chi41	68.4%
<i>B. circulans</i>	ChiA	65.8%
<i>B. subtilis</i>	Chi	67.1%
<i>Clostridium paraputrificum</i>	ChiA	43.4%
<i>Serratia marcescens</i>	ChiA	39.7%
<i>Enterobacter agglomerans</i>	ChiA	39.7%

El gene de la quitinasa *chi225* presenta un marco de lectura abierto de 2031 nucleótidos que codifican una proteína de 676 aminoácidos con una masa molecular calculada de 74 kDa. Presenta una secuencia Shine-Dalgarno que se encuentra 5 pb rio arriba del codón de iniciación. Presenta un promotor hipotético idéntico a los reportados para el gen *chiA71* de *B. thuringiensis* subsp. *pakistani* y para el gen *chiA74* de *B. thuringiensis* subsp. *kenyae*. Al

igual que otros genes de quitinasas reportados para *B. thuringiensis*, su expresión se lleva a cabo durante la fase de crecimiento vegetativo (Driss *et al.* 2005).

JUSTIFICACIÓN

Las aplicaciones de las quitinasas en biotecnología son diversas. En la industria alimentaria son usadas para producir quitooligosacáridos, los cuales son utilizados como prebióticos. Los prebióticos son ingredientes no digeribles de la dieta que producen efectos beneficiosos, estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon, las que tienen a su vez la propiedad de elevar el potencial de salud del hospedero (Cagigas y Anest, 2002).

Desde hace tiempo es posible clonar los genes de quitinasas de diversos organismos en *E. coli*. Uno de los primeros genes de quitinasas clonados fue de *Enterobacter agglomerans*, obteniendo buenos resultados (Chernin *et al.* 1997)

En el área de control biológico, existen buenas expectativas para producir plantas transgénicas que expresen el gen de la quitinasa, generando en ellas de esta manera resistencia a hongos fitopatógenos. Algunos estudios con el gen de quitinasa *chit42* de *Trichoderma harzianum*, que codifica una poderosa endoquitinasa, han logrado su expresión en tabaco, manzana y papa consiguiendo con ello un alto nivel de resistencia (Lorito *et al.* 1998, Bolar *et al.* 2000). En plantas trasgénicas de tabaco, que expresan la quitinasa Cts1 de *Saccharomyces cerevisiae*, se observó la inhibición de la germinación de esporas y el crecimiento de las hifas de *Botrytis cinerea* (Carstens *et al.* 2003).

Bacillus thuringiensis es una bacteria de gran utilidad desde hace ya varias décadas, puesto que sus esporas y cristales son los componentes activos de una gran variedad de bioinsecticidas disponibles en el mercado, y su

capacidad para producir quitinasas, ha despertado interés en la búsqueda de un mayor número de aplicaciones biotecnológicas. En *B. thuringiensis*, las quitinasas ofrecen un potenciamiento de su efecto tóxico, incluso, combinando cepas atóxicas quitinolíticas con cepas tóxicas no quitinolíticas (Lertcanawanichakul *et al.* 2004). Liu *et al.* (2002) reportaron un efecto potenciador al encontrar que la cepa tóxica DL5789 de *B. thuringiensis* en combinación con la cepa quitinolítica atóxica T04A001 de *B. thuringiensis*, aumentó su toxicidad en un rango de 2.35 y un valor de LC₅₀ de 0.446 mg g⁻¹ al primer instar larvario de *Spodoptera exigua*. En contraste, el valor de LC₅₀ solamente de la cepa DL5789 fue de 1.047 mg g⁻¹.

Posteriormente en algunos estudios las quitinasas fueron adicionadas al principio activo de *B. thuringiensis*, lo que motivó a que diversos grupos hayan tratado de sobre expresar las quitinasas en el mismo *B. thuringiensis* con el propósito de producir en un mismo biorreactor ambos compuestos (proteínas Cry y quitinasas) en concentraciones óptimas que permitan lograr algún efecto sinérgico (Casique-Arroyo *et al.* 2007).

Las quitinasas producidas por *B. thuringiensis* también tienen potencial para el control biológico de hongos fitopatógenos, ampliando de esta manera el rango de aplicaciones para esta bacteria. Trabajos recientemente reportados indican que las quitinasas de *B. thuringiensis* inhiben el crecimiento de los hongos *Sclerotium rolfsii* en un 100% y de *Aspergillus terreus*, *A. flavus*, *Nigrospora sp.*, *Rhizopus sp.*, *A. niger*, *Fusarium sp.*, *A. candidus*, *Absidia sp.* y *Helminthosporium sp.*, en porcentajes que oscilan entre 55% a 82% (Reyes-Ramirez *et al.* 2004; Morales de la Vega *et al.* 2006).

Otros usos que se han sugerido para la utilización de las quitinasas de *B. thuringiensis*, además del control biológico, es la producción de oligosacáridos para la industria alimentaria y farmacéutica (Yong-Seok *et al.* 2007, Rojas-Avelizapa *et al.* 1999). En este punto es importante comentar que recientemente se reportó la producción de quitinasas bacterianas en un sistema heterólogo y su efectividad en la producción de quitooligosacáridos con efecto inhibitorio contra bacterias patógenas de importancia en alimentos (Barboza-Corona *et al.* 2008).

Debido a lo anteriormente descrito, el empleo de las quitinasas en los diversos campos de la biotecnología es muy amplio, y especialmente el empleo de *B. thuringiensis* como un agente de control biológico así como productor de estas enzimas. A la fecha, se han reportado 21 secuencias en el GenBank que corresponden a quitinasas de *B. thuringiensis* sin embargo, sólo 7 de ellas han sido caracterizadas bioquímica y molecularmente. El tener una mayor cantidad de quitinasas caracterizadas de *B. thuringiensis*, así como el realizar una mayor búsqueda de ellas, son motivos que ofrecen buenas expectativas de desarrollar nuevos formulados o de procesos novedosos para la obtención de productos con valor agregado, ampliando considerablemente las aplicaciones de esta bacteria.

HIPÓTESIS

Las quitinasas producidas por las cepas mexicanas presentan diferencias en sus actividades enzimáticas debido a las diferencias en las secuencias nucleotídicas de sus genes.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar bioquímica y molecularmente las quitinasas que se encuentren en las cepas nativas mexicanas de *B. thuringiensis*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el perfil de quitinasas en una colección de cepas nativas mexicanas de *B. thuringiensis*
2. Caracterizar los genes de quitinasas en las cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas de acuerdo con su perfil quitinolítico.
3. Caracterizar bioquímicamente las quitinasas producidas por los genes seleccionados

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de las cepas mexicanas de *B. thuringiensis* con actividad quitinolítica

Se seleccionaron 96 cepas de *B. thuringiensis* de la colección del Laboratorio de Biotecnología Ambiental. Como cepa de referencia se utilizó *Serratia marcescens* Nima (proporcionada por el Dr. R. Cruz-Camarillo), debido a que es una buena productora de quitinasas y está bioquímicamente caracterizada (Barboza-Corona *et al.* 2005). Las cepas de estudio fueron aisladas de suelo de cultivos agrícolas de los estados de Tamaulipas, Nayarit y Michoacán.

Determinación preliminar de la actividad quitinolítica

Se preparó quitina coloidal de la siguiente manera: a 10 g de quitina comercial obtenida de caparazones de cangrejos (Sigma) se adicionaron 100 ml de ácido fosfórico concentrado (85% v/v) y se mezcló hasta obtener una solución homogénea que se almacenó a 4°C durante 24 h. Posteriormente se añadieron 100 ml de agua destilada a la solución y se almacenó a 4°C. Esta operación se repitió a las 48 h. Posteriormente la solución de quitina se centrifugó y el precipitado se lavó con agua purificada varias veces para eliminar el ácido fosfórico y obtener un pH de 7.0. Para neutralizar el ácido se utilizó NaOH 10 M. La quitina húmeda obtenida se secó en una estufa a 80°C y

después se molió primeramente en un molino manual para maíz y/o café y posteriormente en un mortero. La quitina molida se pasó por un tamiz del número 60 para homogenizar el tamaño de partícula.

Posteriormente se preparó el medio Castañeda-quitina de la siguiente manera: en 100 ml de agua se mezclaron 0.06% (p/v) de citrato de amonio, 0.02% de NaCl, 0.04% de KH_2PO_4 , 0.04% de Na_2CO_3 y 0.01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; (pH 7.0). Esta solución se complementó agregando de un 12-15% de quitina coloidal y 2.5 g de agar (Castañeda-Agulló 1955).

Los microorganismos incluyendo el testigo, se sembraron en placas con medio Castañeda-quitina y se incubaron de 3-6 días para observar los halos de degradación. El criterio de selección para elegir las cepas con mayor potencial quitinolítico se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Criterios de selección para cepas quitinolíticas de acuerdo al tamaño del halo de degradación.

Valor	Característica
0	No hay crecimiento
1	Se observa crecimiento
2	Degradación del total del sustrato por debajo de la colonia
3	Formación de halos de hidrólisis menores a 1 mm
4	Formación de halos de hidrólisis mayores a 1 mm

Determinación de la actividad quitinolítica en las cepas seleccionadas

Para determinar la actividad quitinolítica de las cepas seleccionadas se tomaron 18 tubos de ensaye de 50 ml estériles, y a nueve de ellos se les adicionaron 3 ml del medio Castañeda y a los nueve restantes se les adicionaron 3 ml del medio NB. El medio NB se preparó adicionando 8 g de caldo nutritivo, 1.5 g de extracto de levadura y 0.05 g de $MnCl_2$ en 50 ml de NaH_2PO_4 1 M. Después de esterilizar el medio se adicionaron 1.22 ml de $MgSO_4$ 1 M y 0.68 ml $CaCl_2$ 1M (previamente esterilizados).

Los tubos con medio Castañeda y NB se inocularon con las cepas seleccionadas y se colocaron en agitación a 200 rpm y a 28 °C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a 600 nm para obtener una densidad óptica de 1 en un espectrofotómetro DV 650 marca Beckman-Coulter USA. Se utilizaron como blancos el medio Castañeda-quitina y el medio NB para calcular la densidad bacteriana. A continuación se inocularon 9 matraces de 250 ml con 40 ml de medio Castañeda-quitina y 9 matraces de 250 ml con 40 ml de medio NB, de acuerdo a la cantidad estimada de cultivo. Los matraces se incubaron en agitación a 200 rpm durante 72 h a 28 °C.

Al término de este periodo de tiempo, los cultivos de cada uno de los matraces se transfirieron a tubos de 50 ml y se centrifugaron a 3800 rpm durante 20 min a 4 °C. Al sobrenadante se le adicionó sulfato de amonio hasta lograr una saturación del 80% dicha cantidad se calculó en base a la Tabla 4 de acuerdo a la cantidad de sobrenadante obtenido.

Tabla 4. Porcentaje de saturación de soluciones de sulfato de amonio

%	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	gr/100 ml de solución																
0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
15	2.6	5.4	8.2	11.2	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
25		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
30			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8
35				0	2.9	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.8	29.6	32.9	36.9	41.0	45.3
40					0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	26.3	29.6	33.5	37.6	41.8
45						0	3.0	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3
50							0	3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.5	26.8	30.8	34.8
55								0	3.1	6.1	9.3	12.7	16.1	20.1	23.5	27.3	31.2
60									0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.8	20.1	23.9	27.9
65										0	3.2	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4
70											0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9
75												0	3.3	6.6	10.1	13.7	17.4
80													0	3.4	6.7	10.3	13.9
85														0	3.4	6.8	10.5
90															0	3.4	7.0
95																0	3.5
100																	0

Adaptado de “Data for Biochemical Research” (R.M. C. Dawson, D.C. Elliott, W.H. Elliott, and K.M. Jones, eds) 2nd Ed. Oxford Univ. Press, London, 1969.

El contenido de cada matraz fue transferido a tubos de 50 ml y almacenado a 4°C durante toda la noche. Posteriormente los sobrenadantes se centrifugaron a 3800 rpm durante 20 min a 4 °C. El precipitado obtenido se colectó y se resuspendió en un buffer de fosfatos 100 mM pH 6. El buffer de fosfatos se preparó de acuerdo a la metodología de Sambrock y Russell (2001).

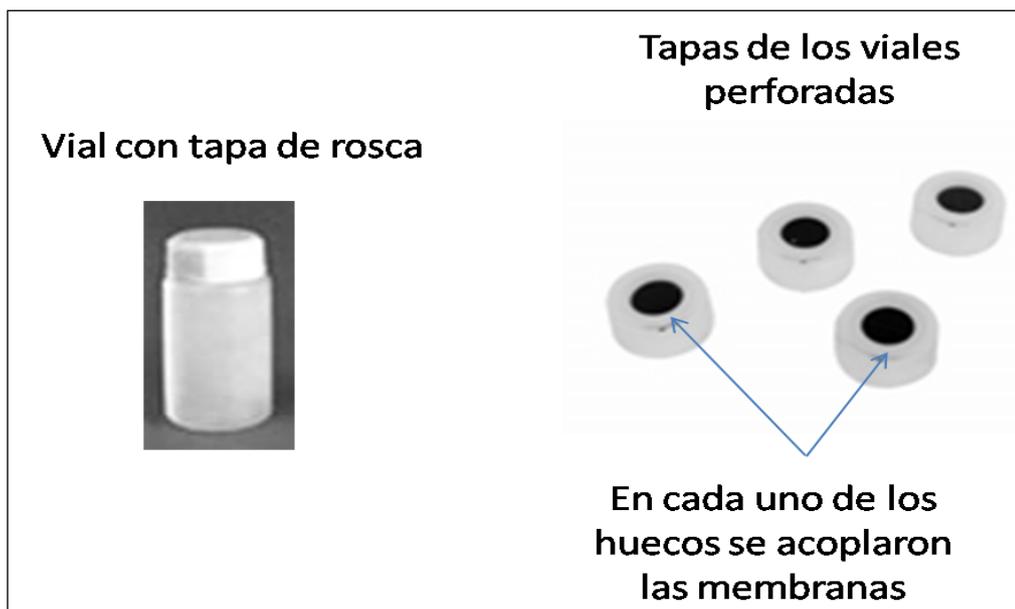


Fig. 2. Viales y roscas perforadas utilizadas en las diálisis

Los precipitados se sometieron a una diálisis para lo cual se utilizó una membrana de celulosa con un tamaño de corte de 15 kDa y viales con tapón de rosca. Se hizo una perforación a cada una de las tapas de los viales para acoplar la membrana (Fig. 2). Los precipitados fueron colocadas en los viales y éstos se colocaron en los contenedores que se sumergieron en un recipiente que contenía 6 l de buffer de fosfatos 100 mM pH 6 y un agitador magnético para mantener el buffer en constante circulación. Cada tubo se insertó en un trozo de poliestireno expandido para que no se hundieran. El recipiente con agitación se refrigeró por 12 h. A las 6 h se desechó el buffer del recipiente y se cambió por uno recién preparado. Posteriormente los precipitados dializados fueron resuspendidos en buffer de fosfatos 100 mM, pH 6.8, en tubos de 20 ml y se mantuvieron a 4°C hasta su uso en los ensayos siguientes.

Determinación de la actividad quitinolítica

La actividad de la quitinasa se determinó por el método fluorogénico para lo cual se prepararon 100 ml de una solución patrón de 4-metilumbeliferona (MU) 5 mM a partir de la cual se prepararon diluciones que se utilizaron para la calibración del fluorómetro (Turner modelo TD-360). A partir de esta solución, se prepararon 50 ml de MU 1 μ M, con Na₂CO₃ 0.2 M. Para realizar la curva de calibración se hicieron diluciones de 0.1 hasta 0.9 μ M. Los derivados sintéticos [4-MU (GlcNAc)₃] 4-metilumbeliferil- β -D-N,N',N''-triacetilquitotriosa (tetramero), [4-MU (GlcNAc)₂] 4-metilumbeliferil- β -D-N,N'-diacetilquitobiosa (trímero) y [4-MU GlcNAc] 4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-glucosamina (dímero) se prepararon de la siguiente manera: cada derivado sintético (tetramero, trímero, dímero) se disolvió en buffer de fosfatos 100 mM pH 6.8 para obtener una concentración final de 1 mg/ml. Se mantuvieron en refrigeración por toda noche y al siguiente día se mezclaron en un vortex.

Para determinar la actividad quitinolítica del precipitado se preparó un buffer de reacción con 120 μ l del derivado sintético solubilizado en 15 ml de buffer de fosfatos 100 mM pH 6.8. Se hizo una solución con 10 μ l del precipitado dializado, 215 μ l de H₂O destilada estéril y 300 μ l del buffer de reacción. Esto se homogenizó con micropipeta lentamente. Se incubó a 37°C durante 30 min. Posteriormente, se agregaron 300 μ l de Na₂CO₃ 0.2 M, se mezcló suavemente en vortex y se leyó en el fluorómetro previamente calibrado con las diluciones de MU. La actividad quitinolítica se midió en unidades enzimáticas (U). Esta fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μ mol de MU

en 1 h (Barboza-Corona *et al.* 2003). Los datos obtenidos se sometieron a un ANOVA y prueba de Tukey para comparación de medias con una $P = 0.05$ utilizando el software SPSS v. 10.0

Determinación del tipo de actividad quitinolítica mediante zimogramas

A 37.5 μl de las muestras dializadas y resuspendidas se les adicionaron 7.5 μl de 2-mercaptoetanol 2X. A continuación las muestras fueron colocadas en agua hirviendo durante 5 ó 6 min y se centrifugaron a 14000 rpm durante 4 min. Se tomaron 20 μl de cada una de las muestras y se separaron en dos geles de poliacrilamida al 12%. La electroforesis se corrió durante 1 h a 80 V y a 120 V durante 2 h. A continuación los geles se procesaron de la siguiente manera: uno de ellos se tiñó con azul de Coomasie durante 2 h, utilizando un agitador orbital en movimiento lento. Subsiguientemente se retiró el colorante y se destiñó durante el tiempo necesario revisando el gel constantemente, hasta la visualización de las bandas. El otro gel se lavó 4 veces por 15 min con buffer de caseína/EDTA (10 g /L de caseína, 2 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl, pH 9), con el propósito de remover el SDS. Posteriormente, se equilibró durante 20 min con buffer de fosfatos 6.8 M, haciendo cambios cada 5 min. Para preparar el zimograma, los geles de poliacrilamida se cubrieron con un gel de agarosa del tipo VIII de bajo punto (Sigma) de fusión al 1% en buffer de fosfatos 100 mM y se adicionaron de 75 μl 4-MU-(GlcNAc)₃, 4-MU-(GlcNAc)₂ o 4-MU-GlcNAc [1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$] (SIGMA), (Barboza-Corona *et al.* 2003). El gel se incubó (tapado con papel Aluminio) a 37 °C por 10min, la actividad de quitinasa se observó bajo la luz UV y se fotografió en el sistema “Gel Doc” (BioRad). Al tomar la foto se colocó una regla junto al gel, para luego comparar el peso molecular de la

quitinasa con un marcador de peso molecular (Invitrogen life Technologies). Es importante comentar que para que la agarosa se pueda esparcir de manera homogénea sobre el gel, se debe de preparar en el microondas mediante pulsos de 2 segundos, revisando que la mezcla quede transparente antes de colocarla en el gel.

Obtención de los genes de quitinasa en *B. thuringiensis*

Extracción del DNA de las cepas seleccionadas

Las cepas seleccionadas se activaron en tubos Falcón con 2 ml de medio LB y se incubaron durante 12 h con agitación a 180 rpm a 28°C en el Environ Shaker de Lab Line (Melrose Park IL). Posteriormente se vertió todo el contenido de los tubos Falcón para inocular 6 matraces Erlenmeyer de 250 ml con 75 ml de medio LB y se incubaron con agitación a 180 rpm durante 17 h a 28 °C. Las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 20 min y a 4°C, se tiro el sobrenadante y a la pastilla se le adicionó 2 ml de una solución de TES-sacarosa al 20%, lizosima 2 mg/ml y 1 µl/ml de RNAsa a una concentración de 10 mg/ml, y se incubó a 37°C durante 90 a 120 min. en la incubadora Shel Lab mod 1545 (Melrose park, IL). A cada tubo se agregaron 3 ml de una solución de SDS al 8% en TES y se incubaron en baño María durante 15 min, posteriormente a cada tubo se le agregaron 1.5 ml de acetato de sodio 3 M pH 4.8, se incubaron por 30 min y se centrifugaron a 13000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se colectó en tubos de 1.5 ml, se les agregó 1 volumen de alcohol isopropílico y se incubaron durante la noche a -

20°C. Para recuperar el DNA los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 20 min a 4°C. La pastilla obtenida se lavó 2 veces con 1000 µl de etanol al 70%, el sobrenadante se decantó. El DNA concentrado se resuspendió en 100 µl de TRIS 10 mM.

Para llevar a cabo la confirmación de la obtención del DNA, se cargaron 5 µl del DNA en 3 ml de buffer de carga Blue/Orange 6X en un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1%.

Amplificación de los genes de las quitinasas de las cepas seleccionadas

Para la amplificación del gen de quitinasa, se utilizaron los primers ChiA74-1 y ChiA74-3 reportados por Barboza-Corona *et al.* (2007). Su diseño se basó en regiones conservadas de ChiA74 que incluyen secuencias reguladoras como el promotor, sitio de unión a ribosoma y el terminador transcripcional.

Las secuencias de los primers son las siguientes:

ChiA74-1 (5'- ACGCGTCGACCTTTCTACGTCTTTAATAATTGGCTCCATA-3')

ChiA74-3 (5'- AACTGCAGCGAAAGCCTTTCCCTAACAGGTGACTATC-3')

Los nucleótidos subrayados corresponden a los sitios *Sall* y *PstI* respectivamente.

Para llevar a cabo la amplificación se utilizó el kit de PCR, PCR Supermix High Fidelity de Invitrogen.

La mezcla de reacción se indica en la Tabla 5:

Tabla 5. Cantidades de la mezcla de reacción para la amplificación de los genes de quitinasa en cepas de *B. thuringiensis*

Reactivos	Cantidades (μL)
DNA	1.5 μ L
Oligo directo ChiA74-1	2 μ L
Oligo reverso ChiA74-1	2 μ L
PCR MIX	45 μ L
TOTAL	50.5 μ L

El ciclo utilizado fue el siguiente:

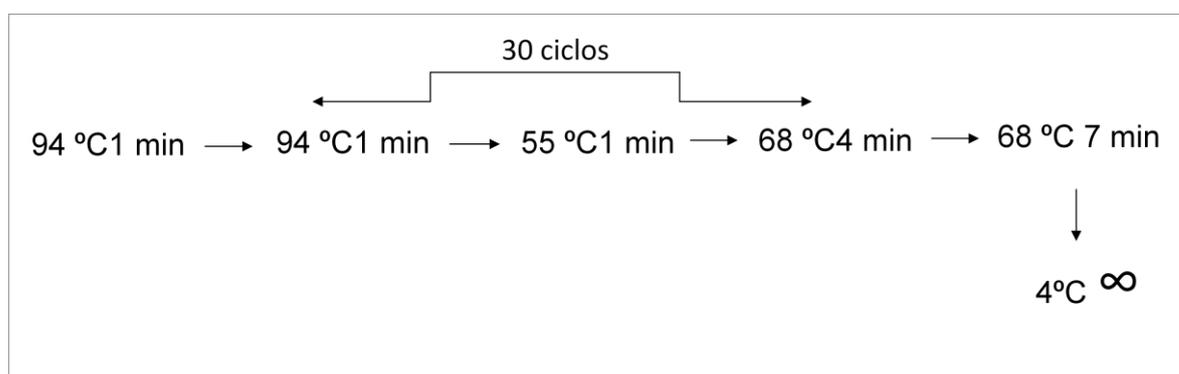


Fig. 3. Ciclo de PCR para la amplificación de los genes de quitinasa

Purificación de los amplicones por medio del “QIAquick PCR Purification Kit”

La purificación de los productos de PCR se realizó de acuerdo al protocolo descrito a continuación: los productos de PCR se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 ml. A cada muestra se le adicionaron 5 volúmenes de buffer PB. Posteriormente se transfirió la mezcla a las columnas QIAquick con sus respectivos tubos de 2 ml para colecta. Se procedió a centrifugar durante 30 a 60 seg a 14000 rpm en una microcentrifuga Hemle 2160M (Alemania

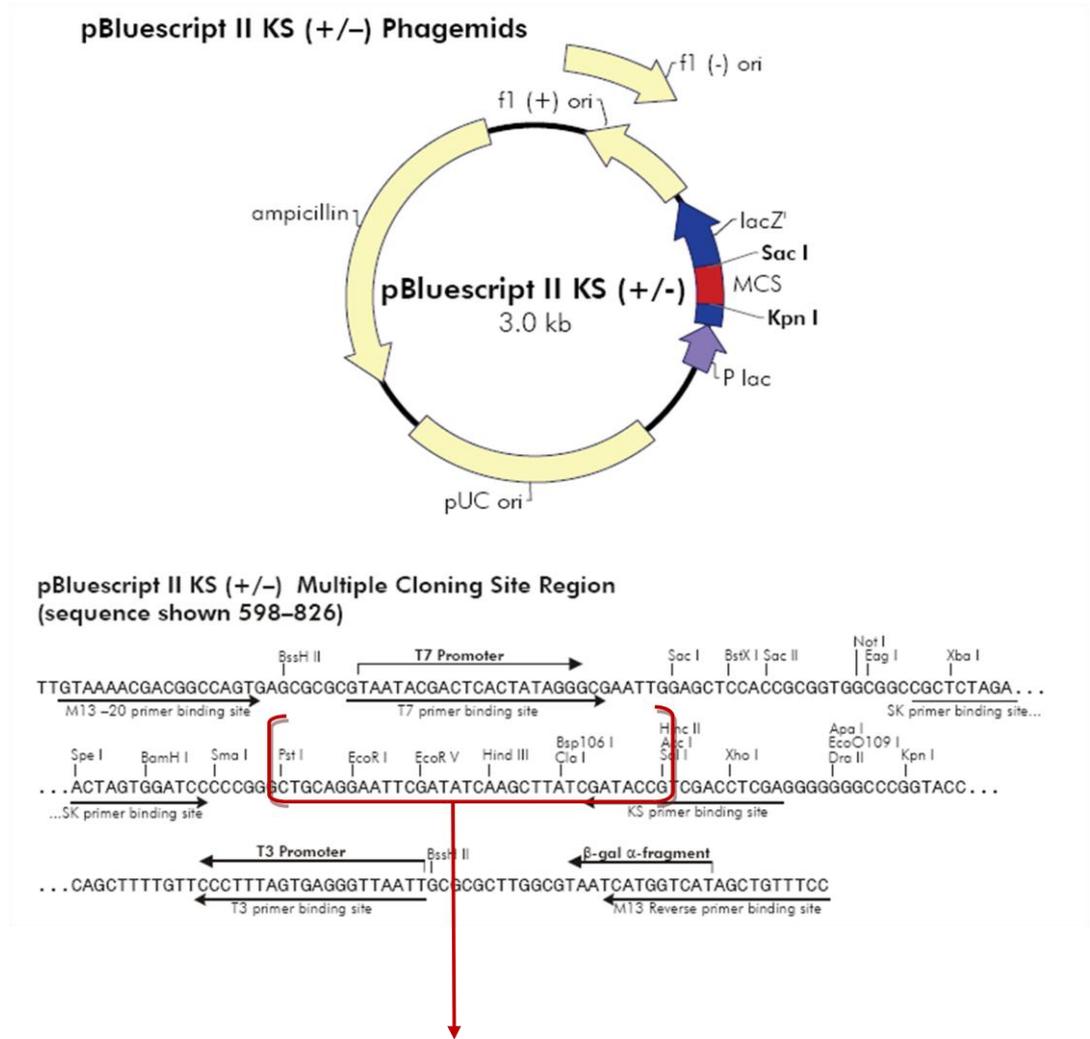
2000). La solución colectada en los tubos se desechó y se reutilizó el mismo tubo. Se agregaron 0.75 ml de buffer PE a la columna, se centrifugó durante 60 seg y se desechó el sobrenadante. La columna se centrifugó por un período adicional de 1 min a 14000 rpm para eliminar completamente el etanol del buffer PE. La columna fue transferida a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y el DNA eluido con 30 o 50 µl de TRIS 10 mM pH 8 (buffer EB).

Clonación de los genes de quitinasa al vector pBluescript II KS(+)

Antes de clonar los genes que codifican quitinasas se procedió a la amplificación del vector pBluescript II KS(+) (Stratagene, La Jolla CA, USA) (Figura 4). Para realizarlo, se tomaron 100 µl de células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH5αF' [*supE44, ΔlacU169 (F80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*] y se les añadieron 2 µl del vector (~ 400 ng) en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se mezclaron y transfirieron a una celda para electroporar de 0.2 cm (Invitrogen). Las muestras fueron electroporadas a 2.5 kV y después transferidas a 1 ml de medio LB donde fueron incubadas a 37°C durante 1 h. Finalmente, las células se distribuyeron en cajas de agar LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL), 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-2-D-galactopyranoside (X-GAL, 64µg/mL), y isopropyl-2-D-thiogalactopyranoside (IPTG, 0.2 mM) y se incubaron a 37 °C durante 12 a 16 h. Se seleccionaron varias colonias azules y los plásmidos fueron obtenidos mediante minipreparaciones de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Quiagen).

Digestión del vector pBluescript II KS(+) con Sall y PstI y ligación con los amplicones

Tanto el pBluescript II KS(+) como los amplicones fueron digeridos con las enzimas *Sall* y *PstI* de acuerdo con la recomendaciones del proveedor (Invitrogen). La Fig. 4 esquematiza el procedimiento.



Región del sitio múltiple de clonación donde se llevó a cabo la digestión con las enzimas *Sac I* y *Pst I*, y la posterior ligación de los genes al vector

Fig.4. Representación esquemática del vector pBluescript II KS(+). En el mapa se muestran los sitios de corte del vector donde fueron clonados los amplicones. (Tomado de pBluescript II Phagemid Vectors INSTRUCTION MANUAL, Catalog #212205, #212206, #212207 and #212208.Revision A.01)

Para llevar a cabo la ligación, los productos digeridos fueron purificados mediante un kit de extracción de geles (Quiagen) y su concentración corroborada en geles de agarosa al 1%. De acuerdo a la concentración de los productos digeridos se llevó a cabo una ligación a 16°C durante toda la noche. El plásmido generado se denominó pBluescript II-gQuit. Se realizó una diálisis con membranas Millipore® de los productos de ligación obtenidos para eliminar las sales de la reacción de ligación, disminuyendo así la conductancia y el riesgo de shock durante el proceso de electroporación en las células de *E. coli* DH5α. Para llevar a cabo la diálisis se tomó una caja petri estéril y se le adicionó agua desionizada estéril. Se cortaron las membranas y se colocan en la superficie del líquido. Posteriormente se tomaron las muestras del producto de ligación y se depositaron sobre la membrana, se tapó la caja y se dializó a temperatura ambiente durante 30 min. El DNA se recolectó y se almacenó en congelación a -20°C hasta su introducción en células electrocompetentes.

Transformación de *E. coli* con el vector recombinante

Obtención de las células electrocompetentes

Las células se prepararon a partir de una célula de *E. coli* DH5α. Se cultivaron durante toda la noche en 500 ml de medio LB a 37°C y en agitación rotatoria a 180 rpm. Posteriormente, el cultivo bacteriano se centrifugó en tubos de 50 ml a 3800 rpm durante 20 min y a una temperatura de 4 °C. Las pastillas obtenidas fueron concentradas en un solo matraz y se resuspendieron en 100 ml de agua destilada fría. Nuevamente se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriores, se desechó el sobrenadante y la pastilla obtenida se

resuspendió en 100 ml de glicerol al 10% estéril. Este paso se repitió tres veces. La pastilla obtenida en la última centrifugación se resuspendió en glicerol al 10% estéril en un volumen de 3 ml. Se hicieron alícuotas de 100 μ l en tubos de 1.5 ml y se congelaron a -20 °C.

Electroporación de las células

Se tomaron con una pipeta 50 o 100 μ l de las bacterias electrocompetentes y 5 μ l del producto de ligación y se depositó en cubetas (Bio-Rad) de 1 ml sumergidas en hielo. El contenido de la cubeta se mezcló con la pipeta, haciéndolo lentamente y posteriormente se colocó en el electroporador (Gene pulser de Bio-Rad) y se dio un pulso de 25 μ F, 200 Ω y 2.5 kV. Inmediatamente se agregó 1 ml de medio LB, la mezcla se homogenizó y se pasó a tubos de ensayo desechables estériles con tapa de 10 ml de capacidad y la muestra fue incubada durante 1 h a 37°C y a 180 rpm. El cultivo fue sembrado en cajas de LB que contenían IPTG, Xgal, ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C.

Selección de las cepas recombinantes

Las colonias blancas fueron “picadas” con una punta esteril de micropipeta y transferidas a tubos de ensayo con 3 ml de medio LB/ampicilina. Se mantuvieron a una temperatura de 37°C y con agitación rotatoria de 180 rpm durante toda la noche. Posteriormente se realizaron minipreps utilizando el QIAprep Spin Miniprep Kit de Qiagen. El protocolo utilizado fue el sugerido por el fabricante.

Una vez obtenidas las minipreps, se tomaron 5 μ l de cada muestra y se corrieron en geles de agarosa al 1% que contenía bromuro de etidio. El corrimiento del gel se llevó aproximadamente durante 1 h a 80-100 V. Se seleccionaron aquellas muestras que migraban más lentamente que el vector, las cuales fueron digeridas con *Sall*, *Pst*I o ambas. El tamaño del inserto fue determinado mediante la escalera de 1 kb (Invitrogen®) (Fig. 5).

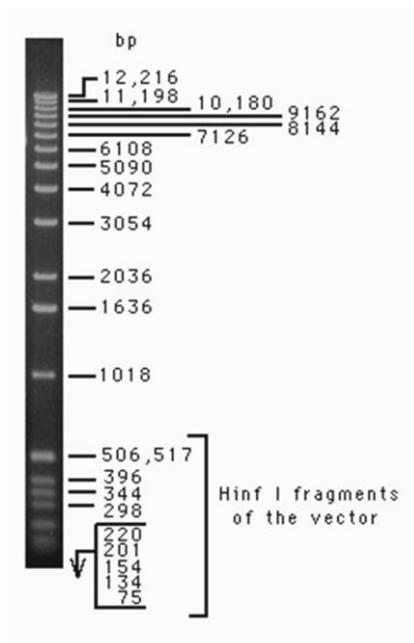


Fig. 5. Marcador de peso molecular de 1 kb DNA ladder de Invitrogen®

Caracterización bioquímica y molecular de las quitinasas recombinantes obtenidas

Para determinar la actividad quitinolítica de las cepas recombinantes se tomaron 7 tubos de ensaye de 50 ml estériles, y se les adicionaron 3 ml del medio LB. El medio LB se preparó adicionando 8 g en 300 ml de agua purificada. Los tubos con medio LB se inocularon con las 5 cepas

recombinantes, con *E. coli* y *E. coli* recombinante, se colocaron en agitación a 180 rpm y a 37°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a 600 nm para obtener una densidad óptica de 1. Se utilizó como blanco medio LB para calcular la densidad bacteriana. A continuación se inocularon 7 matraces de 250 ml con 40 ml de medio LB con una alícuota de bacterias de acuerdo a la cantidad estimada en el cultivo. Los matraces se incubaron en agitación a 180 rpm durante 72 h a 37°C.

Al término de este periodo de tiempo, los cultivos de cada uno de los matraces se transfirieron a tubos de 50 ml y se centrifugaron a 3800 rpm durante 20 min a 4 °C en una centrifuga refrigerada Allegra 6R marca Beckman Coulter USA. Al sobrenadante se le adicionó sulfato de amonio hasta lograr una saturación del 80%, dicha cantidad se calculó en base a la Tabla 4.

La medición de la actividad quitinolítica de las clonas recombinantes se efectuó por medio del método fluorogénico descrito anteriormente.

Determinación del pH óptimo

La actividad quitinolítica fue medida en un rango de pH de 3.5 a 9.5, utilizando los derivados fluorescentes. Para realizar este ensayo se utilizaron 2 buffers: McIlvaine (pH 3.5 a 7.5) y de fosfatos/glicina (pH 7.5 a 9.5). El pH de los buffers fue ajustado adicionando NaOH 10 M. La temperatura de la reacción fue de 37°C y el tiempo de incubación de 1 h. La medición de la actividad se llevó a cabo mediante el método fluorogénico. La variante con respecto al método descrito con anterioridad es que se utilizaron los buffers en rangos de

pH de 3.5, 4.5, 5.5..... 10.5, a diferencia del buffer de fosfatos utilizado de manera constante para todas las reacciones a pH 6.8.

Determinación de la temperatura óptima

La temperatura óptima fue determinada en un rango entre los 10 °C hasta los 70 °C mediante la medición de la actividad en contra de los tres sustratos análogos de quitina de cada una de las quitinasas recombinantes obtenidas. La temperatura de la reacción fue variable, siendo los rangos utilizados 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C y 70°C; el tiempo de incubación fue 1 h. La medición de la actividad se llevó a cabo mediante el método fluorogénico descrito anteriormente. Se utilizó un buffer de fosfatos a pH 6 para realizar la mezcla de reacción.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos de la actividad quitinolítica tanto de las cepas parentales como de las cepas recombinantes, así como el pH y la temperatura de las enzimas recombinantes fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de medias por la prueba de Tukey, $P < 0.05$.

Determinación de la secuencia nucleotídica

La secuencia de los genes de las clonas seleccionadas se determinó en un secuenciador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). Se emplearon los

primers universales (M13-forward y M13-reverse) para empezar la secuenciación sobre el fragmento ya que este sitio se encuentra en el vector de clonación y flanquea al fragmento de interés. Además, se diseñaron primers de acuerdo a regiones conservadas de los fragmentos de estudio. Las muestras fueron preparadas de acuerdo al protocolo de la Unidad de Secuenciación del Departamento de Biotecnología del Centro de Biotecnología Genómica del IPN.

Para la lectura de los resultados obtenidos en el secuenciador, se utilizó el software BioEdit v7.0.9.; el diseño de los primers, alineamiento y su posterior ensamblaje se realizó con la suite bioinformática Lasergene v7.0.0.

Los análisis requeridos para búsqueda de los dominios de las proteínas, así como el análisis químico *in silico* de las mismas, se llevaron a cabo mediante programas disponibles en la red. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, <http://pfam.sanger.ac.uk/>, <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>)

RESULTADOS

Las cepas analizadas provenían de 3 estados (Nayarit, Tamaulipas, Michoacán) de la República Mexicana. En la Tabla 6 se muestra las diferentes cepas analizadas en este trabajo así como la forma en que se clasificaron.

Tabla 6. Cepas analizadas de *B. thuringiensis* para búsqueda de cepas quitinolíticas.

Cepas								
Nayarit		Tamaulipas			Michoacán			
MR2	RN47	RT30	RT21	RT3	MR17	MR27	MR8	
RN43	VR9	RT24	RT38	RT20	MR12	MR19	MR10	
RN54	RN49	RT32	RT31	RT14	MR31	MR42	MR21	
RN53	MR33	RT25	RT33	RT13	MR15	MR14		
MR117	RN42	RT41	RT28	RT17	MR25	MR20		
MR1	MR5	RT35	RT29	RT10	MR29	MR26		
RN44	RN48	RT22	RT39	RT7	MR13	MR18		
RN307	RN52	RT34	RT9	RT18	MR9	MR36		
MR3		RT23	RT12	RT15	MR22	MR24		
RN45		RT26	RT8		MR16	MR37		
RN46		RT27	RT11		MR11	MR34		
MR6		RT40	RT2		MR30	MR23		
MR4		RT36	RT4		MR28	MR35		

De las 85 cepas estudiadas se seleccionaron 8, de las cuales 4 fueron de Michoacán y 4 de Nayarit. Estas cepas mostraron la formación de halos de hidrólisis de quitina mayores a 1 mm (criterio 4) (Tabla 7).

Tabla 7. Cepas seleccionadas de *B. thuringiensis* con actividad quitinolítica

Clave de cepa	Cepa	Criterio de selección
1	MR11	4
2	RN52	4
3	MR19	4
4	RN47	4
5	RN48	4
6	MR10	4
7	MR33	4
8	MR21	4

Cuando las cepas fueron cultivadas en medio NB, las proteínas de secreción presentaron actividad principalmente contra el derivado fluorescente tetramérico. De manera particular la cepa RN48 presentó una actividad estadísticamente igual a la de *S. marscesens* ($F= 18.483$, $gl= 8,18$ $P\leq 0.01$). Por otro lado, las cepas MR11, RN47, RN48, MR10 y MR21 presentaron la mayor actividad hacia el trímero ($F= 100.28$, $gl=8,18$, $P\leq 0.01$). A excepción de la cepa control, todas la demás presentaron actividades muy pequeñas contra el derivado dimérico ($F=913.162$, $gl= 8,18$, $P\leq 0.01$), (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de la actividad quitinolítica (U/ml) de las cepas cultivadas en medio NB con los tres sustratos análogos de quitina.

Cepa	Tetrámero‡	Trímero‡	Dímero‡
	Valor medio de la actividad de quitinasa (U/ml) ± EE*	Valor medio de la actividad de quitinasa (U/ml) ± EE*	Valor medio de la actividad de quitinasa (U/ml) ± EE*
MR11	0.8033 ± 0.0549ab	0.9167 ± 0.008c	0.030± 0.000a
RN52	0.7500 ± 0.0058a	0.8300± 0.001b	0.016± 0.003ª
MR19	0.7333 ± 0.0088a	0.7967± 0.006b	0.020± 0.000a
RN47	0.8900 ± 0.0173bc	0.9200± 0.020c	0.030± 0.000a
RN48	0.9200 ± 0.0058cd	0.9033± 0.008c	0.026± 0.000a
MR10	0.8900 ± 0.0058bc	0.9200± 0.015c	0.030± 0.000a
MR33	0.8200 ± 0.0115abc	0.6567± 0.012ª	0.020± 0.003ª
MR21	0.9000 ± 0.0115bc	0.9033± 0.003c	0.026± 0.072ª
<i>S. marscesens</i> Nima	1.0200 ± 0.0177d	0.6700± 0.000a	2.213± 0.072b

*Valores con letras iguales no tienen diferencia significativa

Prueba de Tukey P< 0.05

‡ Tetrámero : [4-MU (GlcNAc)₃] 4-metilumbeliferil-β-D-N,N',N''-triacetilquitotriosa, Trímero:[4-MU (GlcNAc)₂] 4-metilumbeliferil-β-D-N,N'-diacetilquitobiosa, Dímero:[4-MU GlcNAc] 4-metilumbeliferil-N-acetil-β-D-glucosamina

Con respecto a las cepas cultivadas en medio Castañeda-quitina, la cepa que presentó mayor actividad con el tetrámero fue la RN47 (F=110.256, gl= 8, 18, P≤). Las cepas MR11, RN47, RN48, MR10 y MR21 fueron las que presentaron mayor actividad hacia el trímero (F=150.059, gl= 8,18, P≤ 0.01),

aunque estos valores fueron menores que los producidos por la cepa control. Con excepción de ésta última, todas las cepas de *B. thuringiensis* presentaron una actividad muy pequeña con el derivado dimérico (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de la actividad quitinolítica (U/ml) de las cepas cultivadas en medio Castañeda- quitina con los tres sustratos análogos de quitina

Cepa	Tetrámero‡	Trímero‡	Dímero‡
	Valor medio de la actividad de quitinasa (U/ml) ± EE*	Valor medio de la actividad de quitinasa (U/ml) ± EE*	Valor medio de la actividad de quitinasa (U/ml) ± EE*
MR11	0.8600 ± 0.0153ab	0.8767 ± 0.0033c	0.0200± 0.0000a
RN52	0.8967 ± 0.0384ab	0.5933± 0.0176a	0.0200± 0.0000a
MR19	0.9133 ± 0.0186b	0.7700± 0.0058b	0.0200± 0.0000a
RN47	0.9200 ± 0.0058bc	0.8933± 0.0033c	0.0233± 0.0033a
RN48	0.8167 ± 0.0133a	0.8867± 0.0176c	0.0200± 0.0000a
MR10	0.8767 ± 0.0167ab	0.9067± 0.0067c	0.0167± 0.0033a
MR33	0.8800 ± 0.0200ab	0.5800± 0.0200a	0.0133± 0.0033a
MR21	0.8967 ± 0.0033ab	0.9100± 0.0058c	0.0167± 0.0033a
<i>S. marscesens</i> Nima	1.4533 ± 0.0088c	1.1267± 0.0240d	2.0967± 0.0088b

*valores con letras iguales no tienen diferencia significativa

Prueba de Tukey P<(.05)

‡ Tetrámero : [4-MU (GlcNAc)₃] 4-metilumbeliferil-β-D-N,N',N''-triacetilquitotriosa, Trímero:[4-MU (GlcNAc)₂] 4-metilumbeliferil-β-D-N,N'-diacetilquitobiosa, Dímero:[4-MU GlcNAc] 4-metilumbeliferil-N-acetil-β-D-glucosamina

Una vez determinado la actividad quitinolítica tanto en medio semisólido como en líquido, se procedió a determinar la actividad de las proteínas de secreción en geles de poliacrilamida mediante zimogramas. Este ensayo tenía como propósito determinar el peso molecular de las diferentes quitinasas producidas por la bacteria, así como dilucidar su tipo de actividad (endoquitinasa, exoquitinasa). Se determinó la actividad *in situ* empleando tres derivados fluorescentes. Bajo las condiciones presentadas en los ensayos (zimogramas) no se detectó actividad en las cepas MR19, RN47 Y RN48 contra ninguno de los sustratos usados, por lo cual será necesario en futuros ensayos concentrar más las proteínas de secreción de dichas cepas (Figs. 6 a 11).



Fig. 6 Zimograma mostrando la actividad de las cepas de *B. thuringiensis* con el tetrámero



Fig. 7. Zimograma mostrando la actividad la actividad de las cepas de *B. thuringiensis* con el trímero



Fig. 8. Zimograma mostrando la actividad de las cepas de *B. thuringiensis* con el dímero

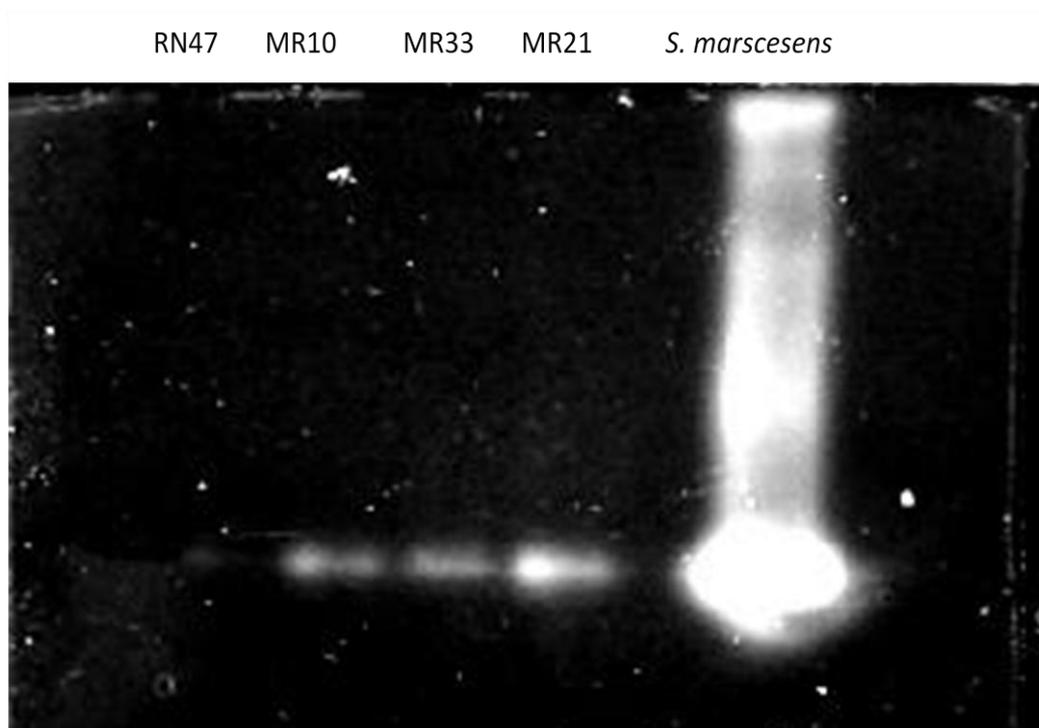


Fig. 9 Zimograma mostrando la actividad de las cepas de *B. thuringiensis* con el tetrámero

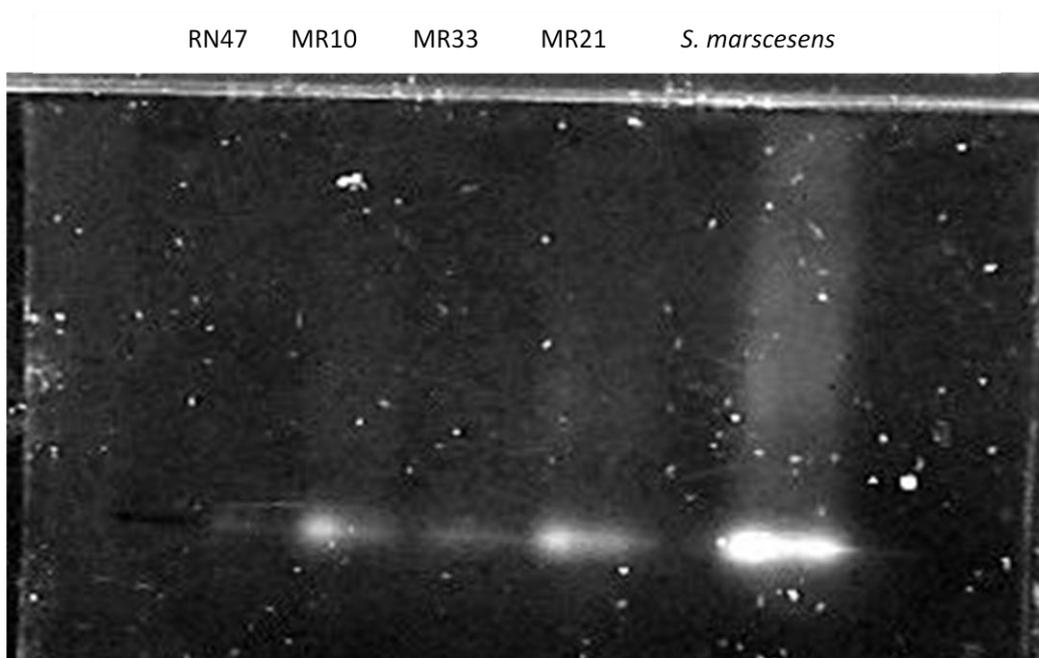


Fig. 10 Zimograma mostrando la actividad de las cepas de *B. thuringiensis* con el trímero

RN47 MR10 MR33 MR21 *S. marscesens*

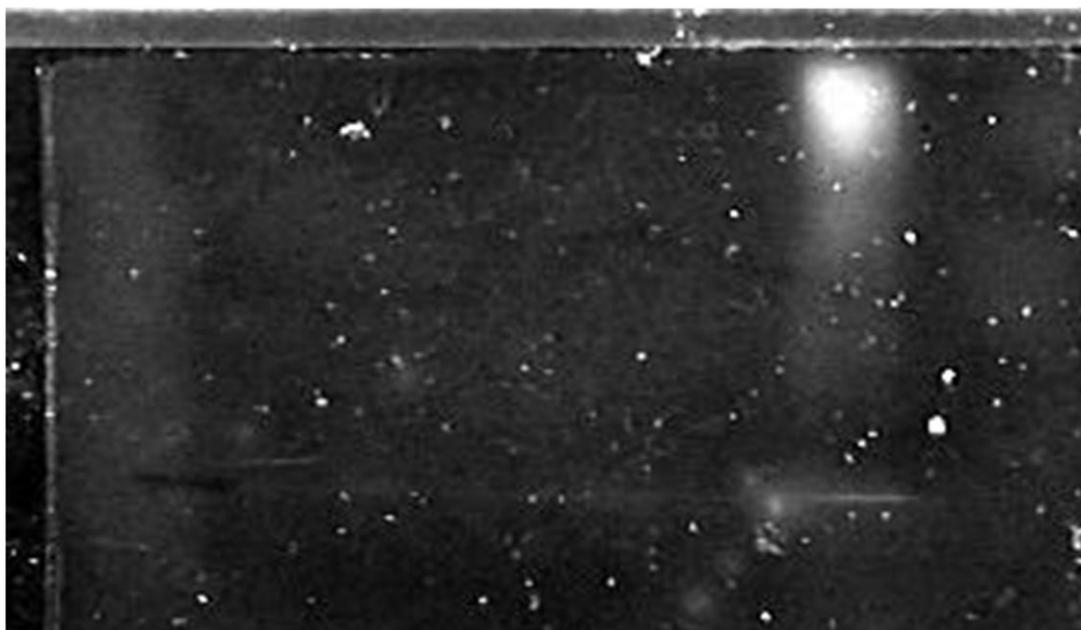


Fig. 11. Zimograma mostrando la actividad de las cepas de *B. thuringiensis* con el dímero

Tal como se indicó previamente, las cepas MR10, MR11, MR21, MR33 y RN52 presentaron actividad hacia el tetrámero y/o del trímero o en ambas, sin embargo no se detectó actividad contra el dímero. Esto indica que dichas cepas presentan endoquitinasas de aproximadamente 70 kDa. En la Tabla 10 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en los zimogramas.

Tabla 10. Resumen de las actividades quitinolíticas presentadas por las proteínas de secreción de diferentes cepas de *B. thuringiensis*

Cepa	Tetrámero	Trímero	Dímero	Tipo de enzima
MR11	✓	✓	X	Endoquitinasa
RN52	✓	X	X	Endoquitinasa
MR19	X	X	X	No presenta actividad
RN47	X	X	X	No presenta actividad
RN48	X	X	X	No presenta actividad
MR10	✓	✓	X	Endoquitinasa
MR33	✓	X	X	Endoquitinasa
MR21	✓	✓	X	Endoquitinasa

Tal como se mostró en la Tabla 10, de las 8 cepas seleccionadas, en 4 de ellas (MR10, MR11, MR21, MR33 Y RN52) pudo detectarse (bajo las condiciones del ensayo) la producción de endoquitinasas. Con el propósito de clonar los genes que codifican dichas enzimas se procedió a la obtención de DNA de las 5 cepas, se empleo un método de concentración de plásmidos el cual no evita que las muestras contengan restos de DNA cromosómico. Las 5 cepas presentan un patrón de plásmidos muy similar (Fig. 12). Empleando oligonucleótidos específicos diseñados con base a la secuencia nucleotídica de la endoquitinasa *chiA74* (GenBank AF424979) (Barboza-Corona y col. 2007) se logró amplificar un amplicón de ~ 2.5 Kb en cada una de las cepas (Fig. 13).

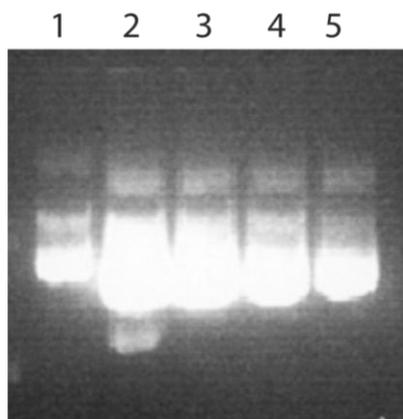


Fig. 12. Patrón de plásmidos de diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Carril 1, MR10; carril 2, MR11; carril 3, MR21; carril 4, MR33; carril 5, RN52.

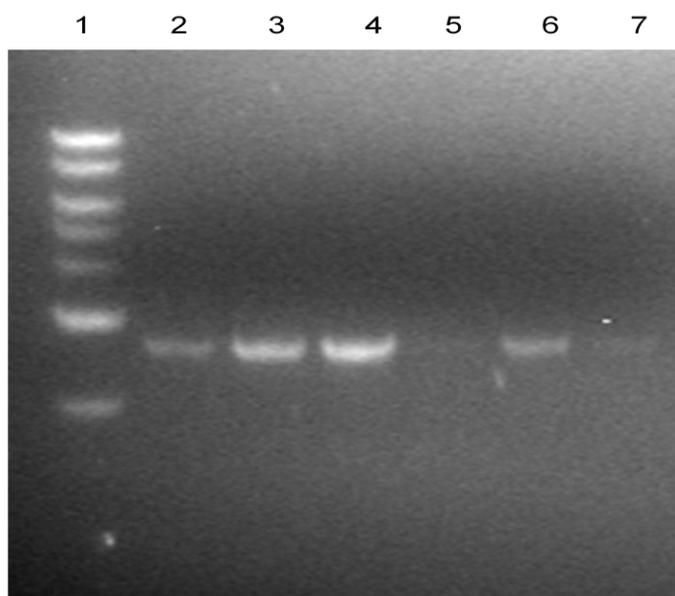


Fig. 13. Amplicones obtenidos a partir de diversas cepas de *B. thuringiensis* empleando oligonucleotidos específicos endoquitinasas. Carril 1, escalera de 1 Kb (invitrogen); carril 2, MR10; carril 3, MR11; carril 4, MR21; carril 6, MR33; carril 7, RN52.

Los amplicones de cada una de las cepas fueron puestos a ligar con el vector pBluescript II KS+ e introducidas en *Escherichia coli*. Se seleccionaron varias colonias blancas las cuales fueron etiquetadas de acuerdo a la cepa de la cual procedían agregándoles un número consecutivo, por ejemplo: MR101, es una transformante obtenida con el amplicón de la cepa MR10.

De las transformantes obtenidas con el amplicón de MR10, se seleccionaron varias clonas, MR102, MR107, MR1015 y MR1017 (Fig. 14), las cuales presentaban igual o migración más lenta que el vector pBluescript.

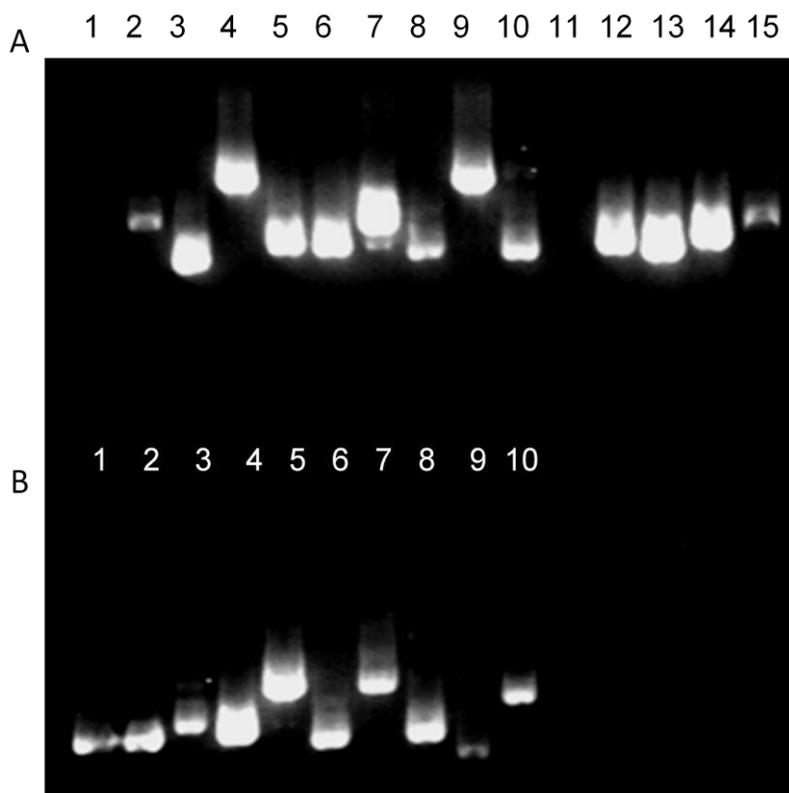


Fig. 14. Análisis de los plásmidos obtenidos de varias clonas de *E. coli* recombinantes transformadas con el pBluescript-amplicón de la cepa MR10 de *B. thuringiensis*. Los carriles A15 y B1 del gel corresponden al Vector

pBluescript II KS; carril A4, MR102; carril A9, MR107; carril B5, MR1015; carril B7, MR1017.

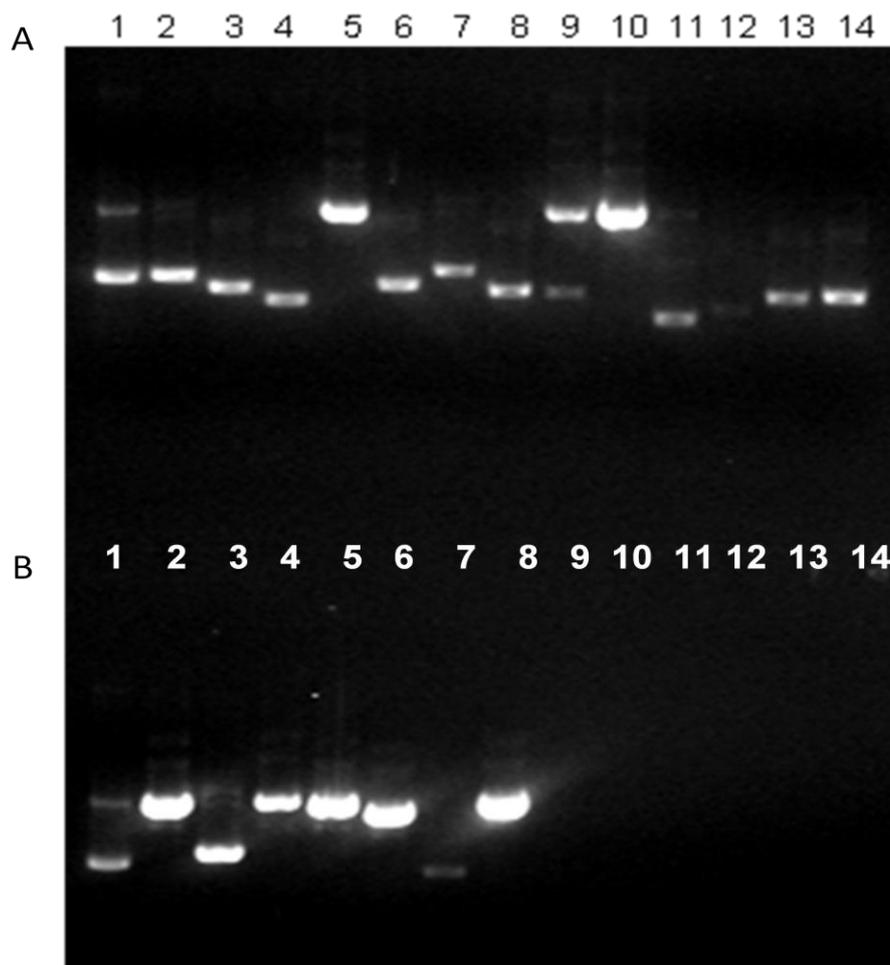


Fig. 15. Análisis de los plásmidos obtenidos de varias clonas de *E. coli* recombinante transformada con el pBluescript-amplicón de *B. thuringiensis* MR21. Carril A1 Y B1 Vector pBluescript II KS; carril A5, MR214; carril B2, MR2116 carril B8, MR2120.

Para la cepa MR11, las clonas que fueron seleccionadas para las digestiones fueron las MR112, MR117 Y MR1120 (no se muestran fotografías de estas clonas). Las clonas seleccionadas de la cepa MR21 fueron la MR2116, MR214 y MR2120. (Fig. 15). Después de transformar *E. coli* con la construcción pBluscript-amplicón MR33, se seleccionaron las siguientes clonas: MR331, MR334 y la MR3320 (Fig. 16).

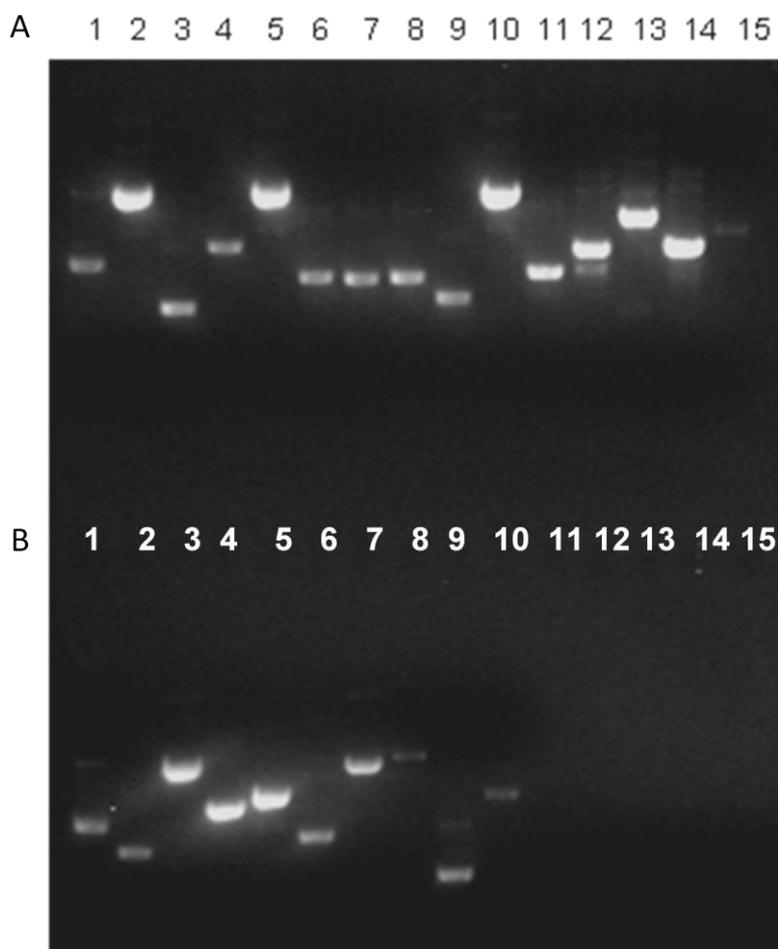


Fig. 16. Visualización en un gel de agarosa al 0.8% del DNA de las clonas obtenidas después de transformar *E. coli* con la construcción pBluscript-amplicón de *B. thuringiensis* MR33. Carril A1, Vector pBluescript II KS; carril A2, MR331; carril A5 MR334; carril B8, MR3320.

Con relación a las transformantes obtenidas con el pBluescript-amplicón de *B. thuringiensis* RN52, las clonas seleccionadas fueron RN528, RN5211 y RN5215 (Fig. 17)

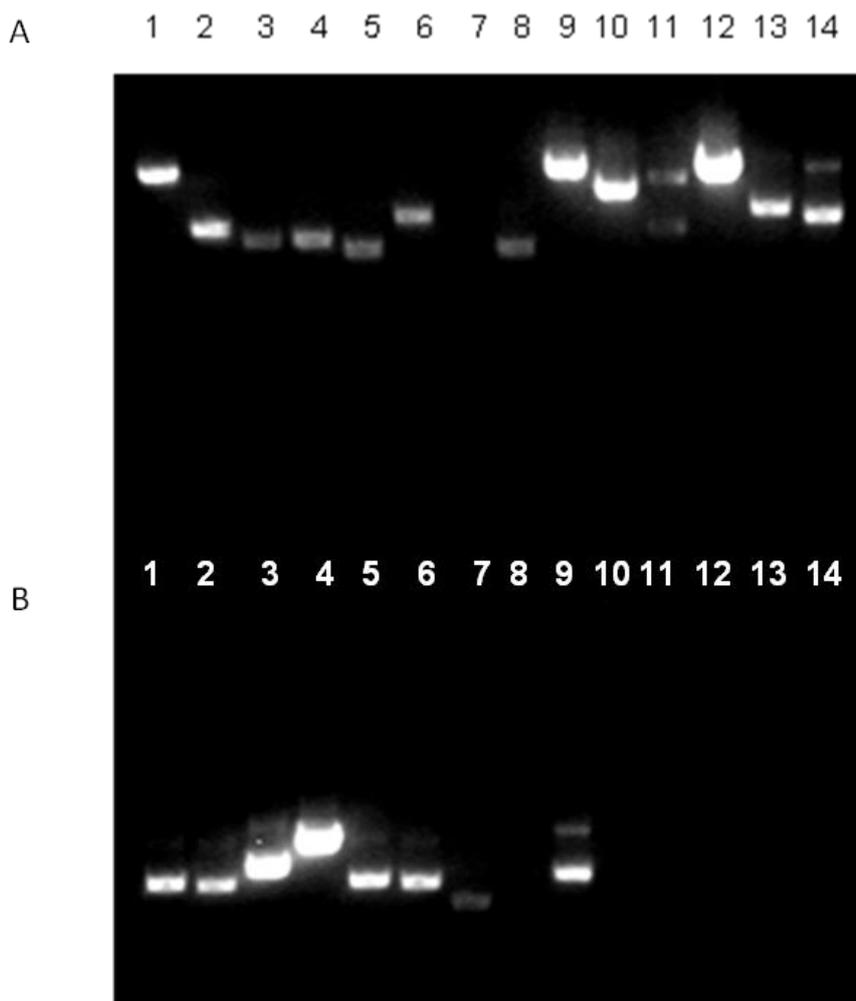


Fig. 17. Visualización en un gel de agarosa al 0.8% de los plásmidos recombinantes extraídos de *E. coli* transformada con el pBluescript-amplicón RN52 de *B. thuringiensis* RN52. Carril B4 RN5215; carril A9, RN528; carril A12, RN5211; carril A14, vector pBluescript II KS.

De las transformantes seleccionadas se eligieron cinco clonas (MR1015, MR112, MR2120, MR334, RN5211) y sus plásmidos recombinantes fueron digeridos con *Sall* y *PstI* (sitios de restricción contenidos en los oligonucleótidos empleados para la amplificación) con el fin de liberar los amplicones clonados en el vector (Fig. 18). Una vez demostrado la obtención de transformantes con los amplicones, se procedió a realizar la detección en la producción de quitinasas con el propósito de demostrar la síntesis de una quitinasa funcional. Adicionalmente se determinó la secuencia de los genes clonados.

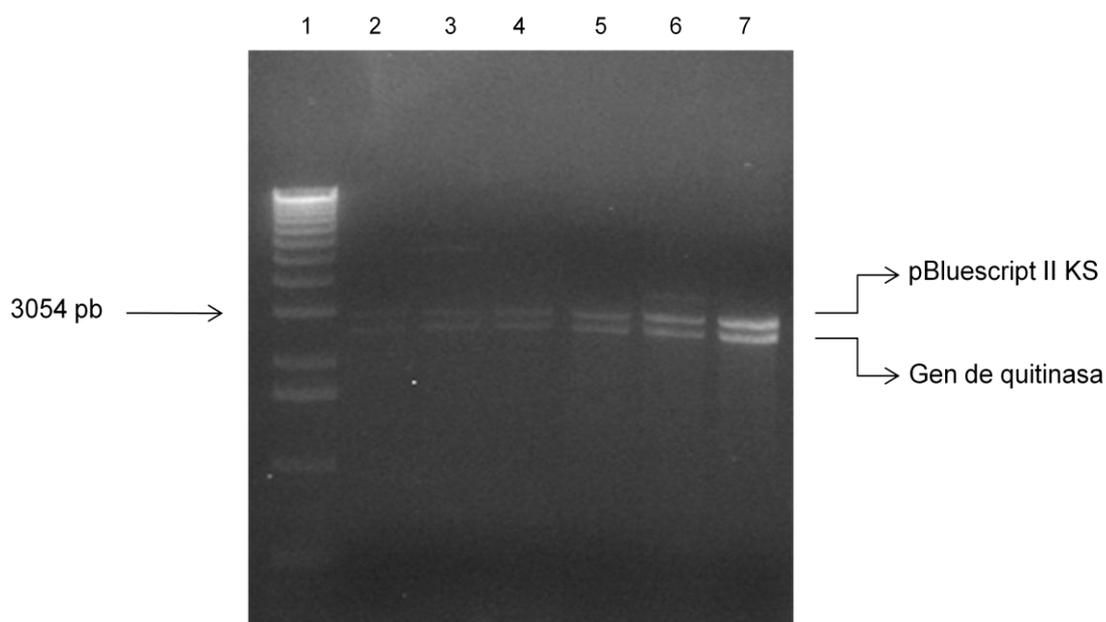


Fig. 18. Digestión de diversas transformantes seleccionadas con *Sall* y *PstI*. Carril 1, Marcador de DNA de 1 Kb (invitrogen); carriles 2 y 3, MR1015; carril 4, MR112; carril 5, MR2120; carril 6, MR334; carril 7, RN5211. Obsérvece la liberación de los genes de quitinasas (~ 2.5 Kb).

Cuando la actividad de quitinasa de las proteínas de secreción de las transformantes seleccionadas fue analizada con derivados fluorescentes de quitina se observó que no hay diferencia significativa entre ellas con relación a la hidrólisis del tetrámero ($F=1255.604$, $gl= 6,14$, $P\leq 0.01$). Por otro lado, si se encontraron diferencias significativas con el trímero ($F=550.579$, $gl= 6,14$, $P\leq 0.01$) y la mayor actividad fue detectada con la transformante MR2120. No se encontró actividad contra el dímero, lo cual confirmó que las quitinasas analizadas poseen una actividad de endoquitinasa (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de la actividad quitinolítica (U/ml) de las cepas recombinantes con los tres sustratos análogos de quitina.

*Valores con letras iguales no tienen diferencia significativa. Prueba de Tukey $P < 0.05$
 ‡ tetrámero : [4-MU (GlcNAc)₃] 4-metilumbeliferil- β -D-N,N',N''-triacetilquitotriosa; trímero:[4-MU (GlcNAc)₂] 4-metilumbeliferil- β -D-N,N'-diacetilquitobiosa; dímero:[4-MU GlcNAc] 4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-glucosamina.

Cepa	Tetrámero‡	Trímero‡	Dímero‡
	Valor medio de la actividad de quitinasa (U/ml) \pm EE*	Valor medio de la actividad de quitinasa (U/ml) \pm EE*	Valor medio de la actividad de quitinasa (U/ml) \pm EE*
MR1015	0.5467 \pm 0.0176b	0.5133 \pm 0.0033c	0.0167 \pm 0.0033ab
MR112	0.5233 \pm 0.00033b	1.0233 \pm 0.0176d	0.0200 \pm 0.0000ab
MR2120	0.5267 \pm 0.0033b	1.1433 \pm 0.0058e	0.0367 \pm 0.0133b
MR334	0.5467 \pm 0.0033b	1.0533 \pm 0.0033d	0.0200 \pm 0.0000ab
RN5211	0.5167 \pm 0.0033b	0.3400 \pm 0.0176b	0.0100 \pm 0.0000a
<i>E. coli</i>	0.0200 \pm 0.0000a	0.0167 \pm 0.0067a	0.0100 \pm 0.0000a
<i>E. coli</i> + pBs	0.0100 \pm 0.0000a	0.0100 \pm 0.0200a	0.0100 \pm 0.0000a

La actividad a diferentes valores de pH fue evaluada empleando el derivado tetramérico. La endoquitinasa sintetizada por la transformante

MR1015 presentó su mayor actividad entre pH 6.5 y 7.5. Los valores se presentan en la Tabla 12 (F=814.643, gl= 7,16, P≤ 0.01).

Tabla 12. Actividad a diferentes pHs de la endoquitinasa de la transformante MR1015.

*Valores con letras iguales no tienen diferencia significativa Prueba de Tukey P<0.05.

La actividad se evaluó con el derivado tetramérico.

pH	Actividad (U/ml) ± EE*
3.5	0.5096± 0.0198c
4.5	0.6803 ± 0.0027d
5.5	0.7360± 0.0017e
6.5	0.8400 ± 0.0090f
7.5	0.8056 ± 0.0037f
8.5	0.6896 ± 0.0128d
9.5	0.3736 ± 0.0065b
10.5	0.0346 ± 0.0024a

La quitinasa de la clona MR112 presentó un valor máximo entre un pH de 6.5 y 7.5. Los valores de pH de 6.5 y 7.5 no presentaron una diferencia

significativa ($F=791.083$, $gl= 7,16$, $P\leq 0.01$). Los resultados se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Actividad a diferentes pHs de la endoquitinasa de la transformante MR112

*Valores con letras iguales no tienen diferencia significativa Prueba de Tukey $P<0.05$.

La actividad se evaluó con el derivado tetramérico.

Valores de pH	Actividad (U/ml) \pm EE*
3.5	0.6133 \pm 0.0133b
4.5	0.6533 \pm 0.0088bc
5.5	0.7066 \pm 0.0033d
6.5	0.8233 \pm 0.0033e
7.5	0.8133 \pm 0.0133e
8.5	0.8033 \pm 0.0033e
9.5	0.6933 \pm 0.0120cd
10.5	0.0700 \pm 0.0000a

La actividad de endoquitinas de la transformante MR2120 presento un valor máximo entre un pH de 6.5 y 7.5. Los valores de pH de 6.5 y 7.5 no

presentaron una diferencia significativa ($F=206.806$, $gl= 7,16$, $P\leq 0.01$) (Tabla 14).

Tabla 14. Actividad a diferentes pHs de la endoquitinasa de la transformante MR2120

*Valores con letras iguales no tienen diferencia significativa Prueba de Tukey $P < 0.05$. La actividad se evaluó con el derivado tetramérico.

Valores de pH	Actividad (U/ml) \pm EE*
3.5	0.5833 \pm .0133b
4.5	0.6566 \pm .0088bc
5.5	0.7066 \pm .0033c
6.5	0.8133 \pm .0033d
7.5	0.8200 \pm .0133d
8.5	0.8100 \pm .0033d
9.5	0.8333 \pm .0120cd
10.5	0.1386 \pm .0000a

La quitinasa de la clona MR334 presentó un valor máximo entre un pH de 6.5 y 7.5. Los valores de pH de 6.5 y 7.5 no presentaron una diferencia significativa ($F=275.932$, $gl= 7,16$, $P\leq 0.01$) (Tabla 15).

Tabla 15. Actividad de la endoquitinasa sintetizada por la transformante MR334.

*Valores con letras iguales no tienen diferencia significativa Prueba de Tukey $P <$

Valores de pH	Actividad (U/ml) \pm EE*
3.5	0.6300 \pm .0000b
4.5	0.6866 \pm .0033bc
5.5	0.7300 \pm .0057c
6.5	0.8433 \pm .0066d
7.5	0.9033 \pm .0393d
8.5	0.8566 \pm .0176d
9.5	0.6966 \pm .0066bc
10.5	0.0740 \pm .0005a

0.05.La actividad se evaluó con el derivado tetramérico.

La quitinasa de la cepa recombinante RN5211 presento un valor máximo a un pH de 6.5 (F=946.000, gl= 7,16, P≤ 0.01) (Tabla 16).

Tabla 16. Actividades de la quitinasa sintetizada por la cepa recombinante RN5211

Valores de pH	Actividad (U/ml) ± EE*
3.5	0.4200± .0152c
4.5	0.6266 ± .0088e
5.5	0.7000± .0000f
6.5	0.8033 ± .0033g
7.5	0.7200 ± .0100f
8.5	0.4933 ± .0145d
9.5	0.1833 ± .0033b
10.5	0.0200 ± .0000a

*Valores con letras iguales no tienen diferencia significativa Prueba de Tukey P< 0.05.

La actividad se evaluó con el derivado tetramérico.

Una vez determinado el pH de mayor actividad (~ 6.5) se procedió determinar la temperatura óptima de actividad de cada una de quitinasas recombinantes. Todos los ensayos de temperatura fueron realizados a pH 6.5.

La quitinasa recombinante expresada en clona MR1015 presentó su mayor actividad a 60°C, aunque no se encontró diferencia significativa con la actividad a 40 y 50°C ($F=86.287$, $gl= 6,14$, $P\leq 0.01$). Los resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Análisis de la actividad quitinolítica de la recombinante MR1015 a diversas temperaturas

Temperatura (°C)	Actividad (U/ml) \pm EE*
40	0.6300 \pm 0.0058b
50	0.6233 \pm 0.0088b
60	0.7067 \pm 0.0145b
70	0.0530 \pm 0.0182a

*Valores con letras iguales no tienen diferencia significativa Prueba de Tukey $P < 0.05$. La actividad se evaluó con el derivado tetramérico.

La quitinasa recombinante clonada a partir de la cepa MR11 presentó su mayor actividad en el rango de temperatura de los 60° C. Entre ellos no se observó una diferencia significativa ($F=143.592$, $gl= 6,14$, $P\leq 0.01$). Los resultados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Análisis de la actividad quitinolítica de la recombinante MR112 a diferentes temperatura

Temperatura (°C)	Actividad (U/ml) ± EE*
40	0.6100± 0.0000b
50	0.6000± 0.0058b
60	0.6733± 0.0088c
70	0.0390± 0.0010a

*Valores con letras iguales no tienen diferencia significativa Prueba de Tukey $P < 0.05$. La actividad se evaluó con el derivado tetramérico.

La quitinasa de la cepa MR21 expresada en *E. coli* presentó su mayor actividad en el rango de temperatura de los 60° C. Entre ellos no se observó una diferencia significativa ($F=149.736$, $gl= 6,14$, $P \leq 0.01$). Los resultados se muestran en la Tabla19.

Tabla 19. Análisis de la actividad quitinolítica de recombinante MR2120 a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Actividad (U/ml) ± EE*
40	0.5867± 0.0296b
50	0.6100± 0.0000c
60	0.6800± 0.0000d
70	0.0367± 0.0033a

*Valores con letras iguales no tienen diferencia significativa Prueba de Tukey $P < 0.05$. La actividad se evaluó con el derivado tetramérico.

La quitinasa de la transformante MR334 presentó su mayor actividad en el rango de temperatura de los 60° C. Entre ellos no se observó una diferencia significativa ($F=58.585$, $gl= 6,14$, $P \leq 0.01$). Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Análisis de la actividad quitinolítica de la cepa MR334 a diversas temperaturas

Temperatura (°C)	Actividad (U/ml) ± EE*
40	0.6067± 0.0033b
50	0.6167± 0.0033b
60	0.6800± 0.0058c
70	0.0500± 0.0000a

*valores con letras iguales no tienen diferencia significativa Prueba de Tukey $P < 0.05$. La actividad se evaluó con el derivado tetramérico.

La quitinasa producida por recombinante RN5211 presentó su mayor actividad entre los rangos de temperatura entre los 50° C y los 60° C. Entre ellos no se observó una diferencia significativa ($F=87.537$, $gl= 6,14$, $P \leq 0.01$) (Tabla 21).

Tabla 21. Análisis de la actividad quitinolítica de la cepa RN5211 en diversos rangos de temperatura

Temperatura (°C)	Actividad (U/ml) ± EE*
40	0.6000± 0.0058b
50	0.6167± 0.0088bc
60	0.6833± 0.0088c
70	0.0367± 0.0033a

*Valores con letras iguales no tienen diferencia significativa Prueba de Tukey $P < 0.05$. La actividad se evaluó con el derivado tetramérico.

Secuencia de los genes de quitinasa provenientes de las cepas MR10, MR11, MR21, MR33 Y RN52.

Secuencia del gen que codifica una endoquitinasa proveniente de la cepa MR10

TTTTGGCTCCATACAATTTTTCTCAAATCAAAAATGGTGAGCTTTTTCTCCCATACCAATCTTTAGTTTT
CATATAGTTTTGTATTCAAGCCTTTTTGTA**TTGAGA**AAGCTTTTTCAAC**TTAATA**AAGCGTTTACACTA
AATCTTACATTTGTTACGATTTAATCACCCAGCTCCCTTGATAGACTTCGTGATGCTGATCATTTTA
TCTAGATGTTTCATACGTCTAGATTCATTTTGGTTTATTGGCGTATGCCTTTAAATATATCTTTATTTT**GA**
AAGGAGAA**ATG**GCTATGAGGTCTCAAAAATTCACACTGCTATTACTATCTCTACTACTTTTTCTTACCTCTT
TTTTCTACAAATTTTATTACTCAAATCTCGCATTAGCAGATTACCAAAGCAAAGTCAAAAATTTGTTG
GGTACTTTCTTCGTGGGGCGTTTACGGACGTAATTATCAAGTTGCTGACATTGATGCATCAAAGCTTA
CTCHCCTTAACTATGCTTTCGCGGATATTTGTTGGAATGGAAAACATGGAAACCCTTCTACTCATCCTGA
TAATCCAAATAAACAAACGTGGAACGTAAAGAATCTGGTGTACCATTGCAAAAATAAGAGGTTCTAA
TGGTACTCTCGTACTCGGTGAACCATGGGCTGATGTTACCAAATCGTATCCTGGCCAGGGACAACCTG
GGAAGATTGCGATAAATATGCCCGTTGCGGAAATTTGGGGAACATAAACGATTAAAAGCTAAATATC
CTCACTTAAAAACAATTATTTCCGTTGGTGGCTGGACTTGGTCTAACCGCTTTTCTGATATGGCCGCTGA
TGAAAAACAAGAAAAGTATTTGCTGAATCTACAGTAGCTTTTCTTCGCGCATATGGGTTTGATGGCGT
AGATTTAGACTGGGAATATCCGGGCGTTGAAACGATTCTGGTGGTAGTTATCGTCCTGAAGATAAAC
AAAATTTCACTCTCCTTCTTCAAGATGTCCGAAATGCTTTGAATAAAGCAGGTGCTGAAGATGGCAAC
AATATTTACTAACAATCGCTTCAGGCGCAAGCCAACGCTACGCTGATCATAACAGAGCTAAAGAAAATTT
CTCAAATACTCGATTGGATTAATATTATGACATATGATTTCCACGGCGGATGGGAAGCTACTTCTAATCA
TAATGCAGCTCTATATAAGGATCCAAATGACCCAGCAGCAAATACGAATTTTTACGTAGATGGTGCTAT
AAATGTTTATACAAATGAAGGTGTTCCAGTCGATAAACTAGTATTAGGCGTACCCTTTTACGGACGTGG
CTGGAAAAGTTGTGGCAAAGAAAATAACGGACAATATCAACCTTGCAAACCAGGTAGTGATGGGAAAC
TTGCTTCTAAAGGTACTTGGGATGATTATTCTACCGGTGACACAGGTGTGTATGATTACGGTGATTTAG
CAGCCAATTACGTTAATAAAAATGGTTTTGTACGCTACTGGAATGACACAGCTAAAGTACCTTATTTATA
TAATGCAACTACAGGCACATTTATTAGCTACGATGACAATGAATCTATGAAATACAAAACAGACTATAT
AAAGACGAAAGGTTTAAAGTGAGCAATAAAATGGGAACATAAGCGGAGATTGCCGTACAAGTCCAAAA
TATAGTTGCAGTGGTCCAAAATTACTTGATACGCTAGTAAAAGAATTACTTGGTGGACCTATTAGTCAA
AAAGATACTGAGCCACCAACGAATGTTAAAACGTTGTAGTTACGAATAAAAATTCAAACTCAGTTCAA
TTAAACTGGACTGCATCTACTGATAACGTAGGAGTTATGGAATATGAAATTACTGCTGGAGAAGAGAA
ATGGAGTACAACAACAAATAGCATTACAATTAACCTTAAACCTAATACGGAATACACATTTTCAAT
AATTGCCAAAGATGCTGCTGGAAATAATCACAACCTACCGCTCTTACTGTCAAACCGGATGAAGCTAA
TACGACACCCCCTGATGGAAATGGTACTGCTACATTTTCAAGTCACTTCGAATTGGGGCAGCGGTTATAA
CTTCTCGATTATAATCAAAAATAATGGAACGACTCCTATTAATAAATTGGAAATTAGAATTTGATTATAGC
GGTAATTTAACACAAGTTTGGGATTCTAAAATTAGTAGTAAAACAATAATCATTATGTAATTACGAAC
GCAGGATGGAATGGTGAATTCCTCCTGGTGGATCTATTACAATTGGCGGTGCAGGAACAGGTAATCC
TGCCGAACCTTTTAAATACCGTCATTAGCGAAAACCTAGACGTAATATCCATTAATTAATTCATAAAGTTT
GAATTTAGGTTTGGCAATACCTCCTAAATTCAACTTTTAAATTTTACGAAAATCAAAAATATCATAAT
AACCTATTATAATTATATTTAATTTCTAATATGAAGTTTATATGAAGTTCATTTGAATTTTACATGAATTT
CTTTAATTTCTATTGTCTTCTATAATATCCATATTATCCTTTACATAAAGGAATTATCTTCATTCCATTTG
AACTATCTATATTTTCTGAAAGATAGTCACCTGTTAGGGAAAGGCTTTTA

El análisis de la secuencia nucleotídica nos indica un promotor hipotético (-35 TTGAGA y -10 TTAATA) en rojo y una secuencia Shine - Dalgarno (5'- AGGAGA- 3') en azul río arriba del marco de lectura abierto. El péptido hipotético se compone de 702 aminoácidos y una masa molecular de 77.4 kDa y un punto isoeléctrico predicho de 6.58. Para el análisis anterior se utilizó el software ORF finder del sitio del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y el software Protein CalculatorV3.3 (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>). El análisis realizado por medio del software SignalIP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), reveló un péptido señal hipotético entre las posiciones Ala-59 y Asp-60, tanto para las bacterias Gram-negativas como para las Gram-positivas. No se encontró coincidencia para células eucariotas. El análisis del gen de MR10 revela tres dominios: el dominio de la familia 18 de las glicosilhidrolasas, se encuentra entre el aminoácido 138 y el 549; el dominio de unión a fibronectina, el cual se encuentra entre los aminoácidos 584 y 660 y el dominio de unión a celulosa que se encuentra entre los aminoácidos 678 y 771. El análisis se realizó mediante la búsqueda de dominios en diversas familias de proteínas en <http://pfam.sanger.ac.uk/>. A continuación se presenta un esquema de los diversos dominios que tiene la endoquitinasa de MR10 (Fig. 19)

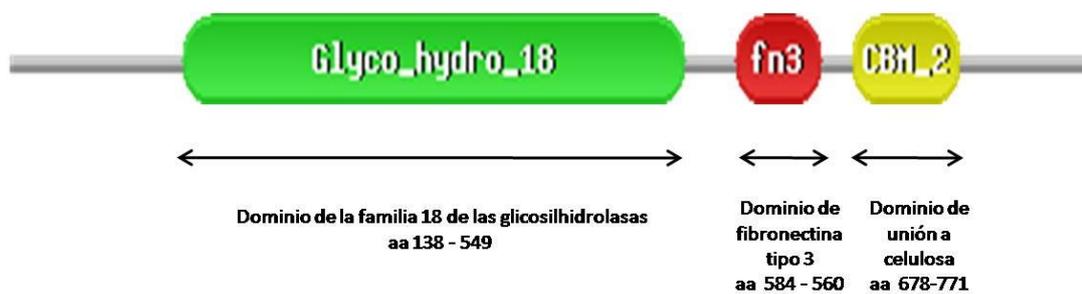


Fig. 19. Dominios presentes en la endoquitinasa de la cepa MR10. Dominio de la familia 18 de las glicosilhidrolasas (glyco_hidro_18), dominio de fibronectina (fn3) y dominio de unión a la celulosa (CBM_2).

Secuencia gen que codifica una endoquitinasa proveniente de la cepa MR11

GGCTCCATACAATTTTTCTCAAATTTATTATAATGAGCTTTTTCTCCCATACCAATCTTTAGTTTTCAT
ATATAGTTTGTATTCAAGCCTTTTTGTA**TTGAGA**AAGTCTTTTTCAAC**TTAATA**AAGCGTTTACACTAAAT
CTTACATTTGTTACGATTTAATCACCCCCAGCTCCCTTGATAGACTTCGTGATGTCTGATCATTTTTATCT
AGATGTTTCATACGTCTAGATTCATTTTGGTTTATTGGCGTATGCCTTTAAATATATCTTTTATTT**GAAA**
GGAGAAATGGCTATGAGGTCTCAAAAATTCACACTGCTATTACTATCTCTACTACTTTTTCTTACCTTTTT
TCTCACAAATTTTATTACTCCAAATCTCGCATTAGCAGATTCACCAAAGCAAAGTCAAAAAATTTGTTGGG
TACTTTCTTCGTGGGGCGTTTACGGACGTAATTATCAAGTTGCTGACATTGATGCATCAAAGCTTACTC
ACCTTAACTATGCTTTTCGCGGATTTTGGTGAATGGAAAACATGGAAACCCTTCTACTCATCCTGATAA
TCCAAATAAACAAACGTGGAACGTAAAGAATCTGGTGTACCATTGCAAAATAAAGAGGTTCTAATG
GTACTCTCGTACTCGGTGAACCATGGGCTGATGTTACCAAATCGTATCCTGGCTCAGGGACAACCTGGG
AAGATTGCGATAAATATGCCCGTTGCGGAAATTTGGGGAACTAAAACGATTAAAAGCTAAATATCCTC
ACTTAAAAACAATTATTTCCGTTGGTGGCTGGACTTGGTCTAACCGCTTTTCTGATATGGCCGCTGATGA
AAAAACAAGAAAAGTATTTGCTGAATCTACAGTAGCTTTTCTTCGCGCATATGGGTTTATGATGGCGTAGA
TTTAGACTGGGAATATCCGGGCGTTGAAACGATTCCTGGTGGTAGTTATCGTCTGAAGATAAACAAAA
TTTCACTCTCCTTCTTCAAGATGTCCGAAATGCTTTGAATAAAGCAGGTGCTGAAGATGGCAAACAATAT
TACTAACAAATCGCTTCAGGCGCAAGCCAACGCTACGCTGATCATACAGAGCTAAAGAAAATTTCTCAA
ATACTCGATTGGATTAATATTATGACATATGATTTCCACGGCGGATGGGAAGCTACTTCTAATCATAATG
CAGCTCTATATAAGGATCCAAATGACCCAGCAGCAAATACGAATTTTACGTAGATGGTGCTATAAATG
TTTATACAAATGAAGGTGTTCCAGTCGATAAACTAGTATTAGGCGTACCCTTTTACGGACGTGGCTGGA
AAAGTTGTGGCAAAGAAAATAACGGACAATATCAACCTTGCAAACCAGGTAGTGATGGGAAACTTGCT
TCTAAAGGTAAGTGGGATGATTATTCTACCGGTGACACAGGTGTGTATGATTACGGTGATTTAGCAGCC
AATTACGTTAATAAAAATGGTTTTGTACGCTACTGGAATGACACAGCTAAAGTACCTTATTTATATAATG
CAACTACAGGCACATTTATTAGCTACGATGACAATGAATCTATGAAATACAAAACAGACTATATAAAGA
CGAAAGGTTAAGTGGAGCAATGTTTTGGGAACTAAGCGGAGATTGCCGTACAAGTCCAAAATATAGT
TGCAGTGGTCCAAAATTAAGTACTTGATACGCTAGTAAAAGAATTACTTGGTGGACCTATTAGTCAAAAAGAT
ACTGAGCCACCAACGAATGTTAAAAACGTTGTAGTTACGAATAAAAATTCAACTCAGTTCAATTAAC
TGGACTGCATCTACTGATAACGTAGGAGTTATGGAATATGAAATTAAGTCTGGAGAAGAGAAATGGAG
TACAACAACAATAGCATTACAATTAAAAACCTAAAACCTAATACGGAATACACATTTTCAATAATTGCC
AAAGATGCTGCTGGAAATAAATCACAACCTACCGCTTACTGTCAAACGGATGAAGCTAATACGACA
CCTCCTGATGGAAATGGTACTGCTACATTTTTCAGTCACTTTCGAATTGGGGCAGCGGTTATAACTTCTCGA
TTATAATCAAAAATAATGGAACGACTCCTATTAATAAATTGAAATTAGAATTTGATTATAGCGGTAATTT
AACACAAGTTTGGGATTCTAAAATTAGTAGTAAAACAATAATCATTATGTAATTACGAACGCAGGATG
GAATGGTGAATTCCTCCTGGTGGATCTATTACAATTGGCGGTGCAGGAACAGGTAATCCTGCCGAAC
TTTAAATACCGTCATTAGCGAAAACCTAGACGTAATATCCATTAATTAATTAAGTTTGAATTTAGG
TTTGAGCAATACCTCCTAAATTCAACTTTTAATTTTACGAAAAATCAAAAATATCATAATAACCTATTAT
AATTATATTTAATTTCTAATATGAAGTTTATATGAAGTTCATTTGAATTTTACATGAATTTCTTTAATTTT
TATTGTCTTCTATAATATCCATATTATCCTTTACATAAAGGAATTATTTTCATTTTGAACCTATCTA
TATATATAAAGAAAGATAGTCACCTGTTAGGGAAAGGCTTTTCG

El análisis de la secuencia nucleotídica nos indica un promotor hipotético (-35 TTGAGA y -10 TTAATA) en rojo y una secuencia Shine - Dalgarno (5'-AGGAGA- 3') en azul río arriba del marco de lectura abierto. El péptido hipotético se compone de 701 aminoácidos y una masa molecular de 77.5 kDa y un punto isoeléctrico predicho de 6.48. Para el análisis anterior se utilizó el software ORF finder del sitio del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y el software Protein CalculatorV3.3 (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>). El análisis realizado por medio del software SignalIP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), reveló un péptido señal hipotético entre las posiciones Ala-59 y Asp-60, tanto para las bacterias Gram-negativas como para las Gram-positivas. No se encontró coincidencia para células eucariotas.

El análisis del gen proveniente de MR11 reveló tres dominios: el dominio de la familia 18 de las glicosilhidrolasas, se encuentra entre el aminoácido 138 y el 549; el dominio de unión a fibronectina, el cual se encuentra entre los aminoácidos 584 y 660 y el dominio de unión a celulosa que se encuentra entre los aminoácidos 678 y 771. El análisis se realizó mediante la búsqueda de dominios en diversas familias de proteínas en <http://pfam.sanger.ac.uk/>. A continuación se presenta un esquema de los diversos dominios que tiene el péptido MR11 (Fig. 20)

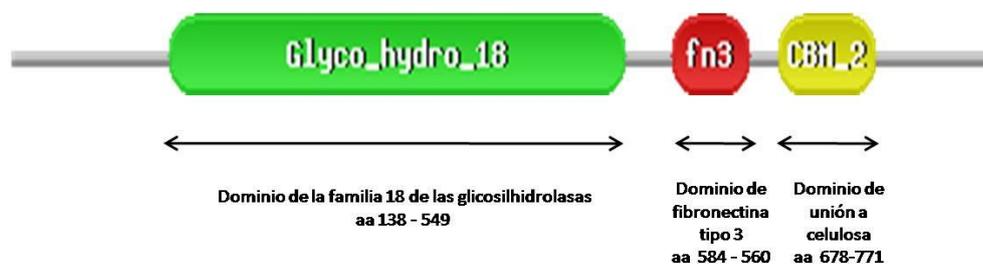


Fig. 20. Dominios presentes en la endoquitinasa proveniente de la cepa MR11. Dominio de la familia 18 de las glicosilhidrolasas (glyco_hidro_18), dominio de fibronectina (fn3) y dominio de unión a la celulosa (CBM_2).

Secuencia gen que codifica una endoquitinasa proveniente de la cepa MR21

TTTTTCTCAAATTTATTTATAATGAGCTTTTTCTTCCCATACCAATCTTTAGTTTTCATATATA
GTTTGTATTCAAGCCTTTTTGTA**TTGAGA**AAGTCTTTTTCAAC**TTAATA**AAGCGTTTACACTA
AATCTTACATTTGTTACGATTTAATCACCCCCAGCTCCCTTGTATAGACTTCGTGATGTCTG
ATCATTTTATCTAGATGTTTCATACGTCTAGATTCATTTTGGTTTATTGGCGTATGCCTTTAA
ATATATCTTTTTATTT**GAAAGG**GAGAA**ATGG**GCTATGAGGTCTCAAAAATTCACACTGCTATTAC
TATCTCTACTACTTTTTCTTACCTTTTTCTCACAAATTTTATTACTCCAAATCTCGCATTAGC
AGATTCACCAAAGCAAAGTCAAAAAATTGTTGGGTACTTTCCTTCGTGGGGCGTTTACGGA
CGTAATTATCAAGTTGCTGACATTGATGCATCAAAGCTTACTCACCTTAACTATGCTTTTCGC
GGATATTTGTTGGAATGGAAAACATGGAAACCCTTCTACTCATCCTGATAATCCAAATAAAC
AAACGTGGAAGTGTAAAGAATCTGGTGTACCATTGCAAAATAAAGAGGTTCTAATGGTACT
CTCGTACTCGGTGAACCATGGGCTGATGTTACCAAATCGTATCCTGGCTCAGGGACAACCTT
GGGAAGATTGCGATAAATATGCCCGTTGCGGAAATTTCCGGGAACTAAAACGATTAAGC
TAAATATCCTCACTTAAAAACAATTATTTCCGTTGGTGGCTGGACTTGGTCTAACCGCTTTT
CTGATATGGCCGCTGATGAAAAACAAGAAAAGTATTTGCTGAATCTACAGTAGCTTTTTCTT
CGCGCATATGGGTTTGTGGCGTAGATTTAGACTGGGAATATCCGGGCGTTGAAACGATTC
CTGGTGGTAGTTATCGTCCTGAAGATAAACAAAATTTCACTCTCCTTCTTCAAGATGTCCGA
ARTGCTTTGAATAAAGCAGGTGCTGAAGATGGCAAACAATTTTACTAACAAATCGCTTCAGG
CGCAAGCCAACGCTACGCTGATCATAACAGAGCTAAAGAAAATTTCTCAAATACTCGATTGG
ATTAATATTATGACATATGATTTCCACGGCGGATGGGAAGCTACTTCTAATCATAATGCAGC
TCTATATAAGGATCCAAATGACCCAGCAGCAAATACGAATTTTTACGTAGATGGTGTCTATAA
ATGTTTATACAAATGAAGGTGTTCCAGTCGATAAACTAGTATTAGGCGTACCCTTTTACGGA
CGTGGCTGGAAAAGTTGTGGCAAAGAAAATAACGGACAATATCAACCTTGCAAACCAGGTA
GTGATGGGAACTTGCTTCTAAAGTACTTGGGATGATTATTCTACCGGTGACACAGGTGT
GTATGATTACGGTGATTTAGCAGCCAATTACGTTAATAAAAAATGGTTTTGTACGCTACTGGA
ATGACACAGCTAAAGTACCTTATTTATATAATGCAACTACAGGCACATTTATTAGCTACGAT
GACAATGAATCTATGAAATACAAAACAGACTATATAAAGACGAAAGGTTTAAAGTGGAGCAAT
GTTTTGGGAACTAAGCGGAGATTGCCGTACAAGTCCAAAATATAGTTGCAGTGGTCCAAAA
TTACTTGATACGCTAGTAAAGAATTACTTGGTGGACCTATTAATCAAAAAGATACTGAGCC
ACCAACGAATGTTAAAAACATTGTAGTTACGAATAAAAATTCAAACTCAGTTCAATTAACCTG
GACTGCATCTACTGATAACGTAGGAGTTACGGAATATGAAATTAAGTCTGCTGGAGAAGAGAAA
TGGAGTACAACAACAATAAGCATTACAATTAAAAACCTTAAAACCTAATACGGAATACAAATTT
TCAATAATTGCCAAAGATGCTGCTGGAAATAAATCACAACCTACCGCTTCTACTGTCAAAAC
GGATGAAGCTAATACGACACCTCCTGATGGAAATGGTACTGCTACATTTTCAGTCACTTCG
AATTGGGGCAGCGTTATAACTTCTCGATTATAATCAAAAATAATGGAACGACTCCTATTAA
AAATTGGAAATTAGAATTTGATTATAGCGGTAATTTAACACAAGTTTGGGATTCTAAAATTAG
TAGTAAAACAATAATCATTATGTAATTACGAACGCAGGATGGAATGGTGAATTCCTCCTG
GTGGATCTATTACAATTGGCGGTGCAGGAACAGGTAATCCTGCCGAACTTTTAAATACCGT
CATTAGCGAAAACCTAGACGTAATATCCATTAATTAATCACTAAAGTTTGAATTTAGGTTTGA
GCAATACCTCCTAAATTCAAACTTTTAAATTTACGAAAAATCAAAAATATCATAATAACCTATT
ATAATTATATTTAATTTCTAATATGAAGTTTATATGAAGTTCAATTTGAATTTACATGAATTC
CTTTAATYTCTATTGTCTTCTATAATATCCATATTATCCTTTACATAAAGGAATTATTTTCAT
TCCATTTTGAATCTATATWTATAGGAAGATAGTCACCTGTTAGGAAAAGGCTT

El análisis de la secuencia nucleotídica nos indica un promotor hipotético (-35 TTGAGA y -10 TTAATA) en rojo y una secuencia Shine - Dalgarno (5'-

AGGAGA- 3´) en azul río arriba del marco de lectura abierto. El péptido hipotético se compone de 701 aminoácidos y una masa molecular de 77.5 kDa y un punto isoeléctrico predicho de 6.64. Para el análisis anterior se utilizó el software ORF finder del sitio del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y el software Protein CalculatorV3.3 (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>). El análisis realizado por medio del software SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), reveló un péptido señal hipotético entre las posiciones Ala-59 y Asp-60, tanto para las bacterias Gram-negativas como para las Gram-positivas. No se encontró coincidencia para células eucariotas.

El análisis del gen MR21 revela tres dominios: el dominio de la familia 18 de las glicosilhidrolasas, se encuentra entre el aminoácido 134 y el 545; el dominio de unión a fibronectina, el cual se encuentra entre los aminoácidos 580 y 656 y el dominio de unión a celulosa que se encuentra entre los aminoácidos 674 y 767. El análisis se realizó mediante la búsqueda de dominios en diversas familias de proteínas en <http://pfam.sanger.ac.uk/>. A continuación se presenta un esquema de los diversos dominios que tiene la endoquitinasa de la cepa MR21 (Fig. 21).

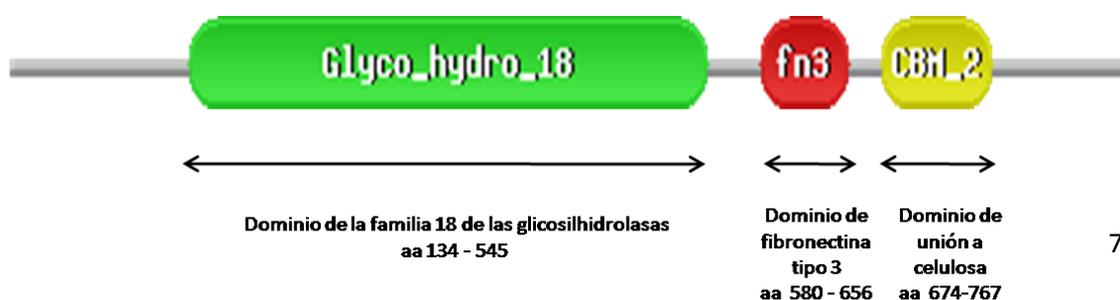


Fig. 21. Dominios presentes en la endoquitinasa de la cepa MR21. Dominio de la familia 18 de las glicosilhidrolasas (glyco_hidro_18), dominio de fibronectina (fn3) y dominio de unión a la celulosa (CBM_2).

Secuencia gen que codifica una endoquitinasa proveniente de la cepa MR33

```
TTTTTCTCAAATTTATTTATAATGAGCTATTTCTCCCATACCGATCTTTCGTTTTCATATATAGTTTGTAT  
TCAAGCCTTTTTGTATTGAGAAGTCTTTTACAACJGAATAAAGCGTTTACACTAAATCTTACATTTGTTA  
CGATTTAATCACCCCCAGCTCCCTTGTATAGACTTCGTGATGTCTGATCATTTTATCTAGACGTTTCATAC  
GTCTAGATTCATTTGATTTATTGGCGTATGCCTTTAAATATATCTTTATTTTGAAGGAGAAATGGCTA  
TGAGGTCTCAAAAATTCACACTGCTATTACTATCTCTACTACTTTTTCTTACCTCTTTTTCTCACAAATTTTA  
TTACTCCAAATCTCGCATTAGCAGATTCACCAAAGCAAAAATCAAAAAATTGTTGGGTACTTTCCTTCGTG  
GGGCGTTTACGGACGTAATTATCAAGTTGCTGACATTGATGCATCAAACTTACTCACCTTAACTATGCT  
TTCGCGGATATTTGTTGGAATGGAAAACATGGAAACCCTTCTACTCATCCTGATAATCCAATAAACAA
```

ACGTGGAAGTGTAAAGAATCTGGTGTACCATTGCAAATAAAGAGGTTCTAATGGTACTCTCGTACTC
GGGGAACCATGGGCTGATGTTACCAAATCGTATCCTGGCTCAGGGACAACCTGGGAAGATTGCGATAA
ATATGCCCGTTGCGGAAATTCGGGGAATAAACGATTAAGCTAAATATCCTCACTTAAAAACAAT
TATTTCCGTTGGTGGCTGGACTTGGTCTAACCGCTTTTCTGATATGGCCGCTGATGAAAAACAAGAAA
AGTATTTGCTGAATCTACAGTAGCTTTTCTTCGCGCATATGGGTTGATGGCGTAGATTTAGACTGGGA
ATATCCGGGCGTTGAAACGATTCCTGGTGGTAGTTATCGTCCTGAAGATAAACAAAATTTCACTCTCCTT
CTTCAAGACGTCCGAAATGCTTTGAATAAAGCAGGTAAGATGGCAAACAATTTACTAACAATC
GCTTCAGGTGCAAGCCAACGCTACGCTGACCATACAGAGCTAAAGAAAATTTCTCAAATACTCGATTGG
ATTAATATTATGACATATGATTTCCACGGCGGATGGGAAGCTACTTCTAATCATAATGCAGCTCTATATA
AGGATCAAATGACCCAGCAGCAAATACGAATTTTTACGTAGATGGTGCTATAAATGTTTATACAAATG
AAGGTGTTCCAGTCGATAAACTAGTATTAGGCGTACCCTTTTACGGACGTGGCTGGAAAAGTTGTGGC
AAAGAAAATAACGGACAATATCAACCTTGCAAACCAGGTAGCGATGGGAAAATTTGCTTCTAAAGGTAC
TTGGGATGATTATTCTACCGGTGACACAGGTGTGTATGATTACGGTGATTTAGCAGCCAATTACGTTAA
TAAAAATGGTTTTGTACGCTACTGGAATGACACGGCTAAAGTACCTTACTTATATAATGCGACTACAGG
CACATTTATTAGCTACGATGACAATGAATCTGTGAAATATAAACAGACTATATAAAGACGAAGGGTTT
AAGTGGAGCAATGTTTTGGGAACTAAGCGGGGATTGCCGTACAAGTCCAAAATATAGTTGTAGTGGTC
CAAATTACTTGATACGCTAGTAAAAGAATTACTTGGTGGACCTATTAGTCAAAAAGATACTGAGCCAC
CAACGAATGTTAAAAATATTGTAGTTACGAATAAAAATTCAAACCTCAGTTCAATTAACCTGGACTGCATC
TACTGATAACGTAGGAGTTACGGAATATGAAATTACTGCTGGAGAAGAGAAATGGAGTACAACAATAA
ATAGCATTACAATAAAAACTTAAACCTAATACAGAATACACATTTTTCAGTAATTGCCAAAGATGCTGC
TGGAATAAATCACAACCTACCGCTCTTACTGTCAAACCGGATGAAACTAATACGACACCTCCTGATGG
AAATGGCACTGCTACATTTTCAGTCACTTCGAATTGGGGCAGCGTTATAACTTCTCGATTATAATCAA
ATAATGGAACGACTCCTATTAATAAATTGGAAATTAGAATTTGATTATAGCGGCAATTTAACACAAGTT
TGGGATTCTAAAATTAGTAGTAAAACAAATAATCATTATGTAATTACAAACGCAGGATGGAATGGCGA
AATTCCTCCTGGTGGATCTATTACAATTGGTGGTGCAGGAACAGGTAATCCTGCCGAACCTTTTAAATGC
CGTCATTAGCGAAAACCTAGACGTAATATCCATTAATTTTCACTAAAGTTTGAATTTAGGTTTGGAGCAA
GACCTCCTAAATTCAACTTTTATTTTTATGAAAAATCAAAAATATCACAATAACCTATTATGATTATATT
TAGTTTCTAATATGAAGTTTATATGAAGTTTCAATTTGAATTTTACATGAATTTCTTTAATTTCTATTGTCTT
CCTATAATATCCACATTATCCTTTATATATAGGAATTATTTTCATTCCGTTTTGAACTATCTATATATAA
AGAAAGATAGTCACCTGTTAGGGAAAGGCTTTC

El análisis de la secuencia nucleotídica nos indica un promotor hipotético (-35 TTGAGA y -10 TTAATA) en rojo y una secuencia Shine-Dalgarno (5'-AGGAGA- 3') en azul río arriba del marco de lectura abierto. El péptido hipotético se compone de 688 aminoácidos y una masa molecular de 77.4 kDa y un punto isoeléctrico predicho de 6.58. Para el análisis anterior se utilizó el

software ORF finder del sitio del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y el software Protein CalculatorV3.3 (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>). El análisis realizado por medio del software SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), reveló un péptido señal hipotético entre las posiciones Ala-59 y Asp-60, tanto para las bacterias Gram-negativas como para las Gram-positivas. No se encontró coincidencia para células eucariotas. El análisis del gen de MR33 revela tres dominios: el dominio de la familia 18 de las glicosilhidrolasas, se encuentra entre el aminoácido 134 y el 545; el dominio de unión a fibronectina, el cual se encuentra entre los aminoácidos 580 y 656 y el dominio de unión a celulosa que se encuentra entre los aminoácidos 674 y 767. El análisis se realizó mediante la búsqueda de dominios en diversas familias de proteínas en <http://pfam.sanger.ac.uk/> (Fig. 22).

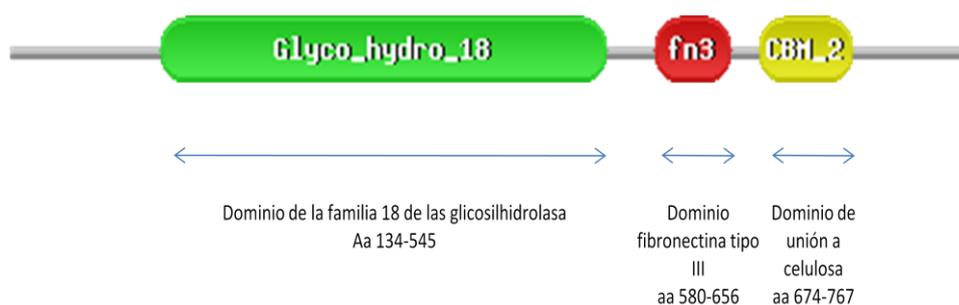


Fig. 22. Dominios presentes en la endoquitinasa de la cepa MR33. Dominio de la familia 18 de las glicosilhidrolasas (glyco_hidro_18), dominio de fibronectina (fn3) y dominio de unión a la celulosa (CBM_2).

Secuencia gen que codifica una endoquitinasa proveniente de la cepa RN52

TTTTTCTCAAATTTATTTATAATGAGCTATTTCTCCATACCGATCTTTTCGTTTTTCATATAT
AGTTTGTATTCAAGCCTTTTTGTA **TTGAGA**AAAGTCTTTTACAAC **TTAATA**AAGCGTTTACACT
AAATCTTACATTTGTTACGATTTAATCACCCCCAGCTCCCTTGTATAGACTTCGTGATGTCT
GATCATTATCTAGACGTTTCATACGTCTAGATTCATTTTGATTTATTGGCGTATGCCTTTA
AATATATCTTTATTTT **GAAAGGAGAA**ATGGCTATGAGGTCTCAAAAATTCACACTGCTATTA
CTATCTACTACTTTTCTTACCTCTTTTTCTCACAAATTTTATTACTCCAATCTCGCATTAG
CAGATTCACCAAAGCAAAATCAAAAATGTTGGGACTTTTCCTTCGTGGGGCGTTTACGG
ACGTAATTATCAAGTTGCTGACATTGATGCATCAAACTTACTCACCTTAACTATGCTTTTCG
CGGATATTTGTTGGAATGGAAAACATGGAAACCCTTCTACTCATCCTGATAATCCAATAAA
CAAACGTGGAAGTGTAAAGAATCTGGTGTACCATTGCAAATAAAGAGGTTCCATAATGGTA
CTCTCGTACTCGGGGAACCATGGGCTGATGTTACCAAATCGTATCCTGGCTCAGTACAACT
TGGGAAGATTGCGATAAATATGCCCGTTGCGGAAATTTTCGGGGAAGTAAACGATTA
GCTAAATATCCTCACTTAAAAACAATTATTTCCGTTGGTGGCTGGACTTGGTCTAACCGCTT
TTCTGATATGGCCGCTGATGAAAAACAAGAAAAGTATTTGCTGAATCTACAGTAGCTTTTC
TTCGCGCATATGGGTTTGATGGCGTAGATTTAGACTGGGAATATCCGGGCGTTGAAACGAT
TCCTGGTGGTAGTTATCGTCCTGAAGATAAACAAAATTTCACTCTCCTTCTTCAAGACGTCC
GAAATGCTTTGAATAAAGCAGGTAAGATGGCAAACAATATTTACTAACAATCGCTTCA
GGTGAAGCCAACGCTACGCTGACCATACAGAGCTAAAGAAAATTTCTCAAATACTCGATT
GGATTAATATTATGACATATGATTTCCACGGCGGATGGGAAGCTACTTCTAATCATAATGCA
GCTCTATATAAGGACCCAAATGATCCAGCAGCAAATACGAATTTTACGTAGATGGTGTCTAT
AAATGTTTATACAAATGAAGGTGTTCCAGTCGATAAACTAGTATTAGGCGTACCCTTTTACG
GACGTGGCTGGAAAAGTTGTGGCAAAGAAAATAACGGACAATATCAACCTTGCAAACCAGG
TAGCGATGGGAAACTTGCTTCTAAAGGTAAGTGGGATGATTATCCTACCGGTGGCACAGGT
GTGTATGATTACGGTGATTTAGCAGCCAATTACGTTAATAAAAAATGGTTTTGTACGCTACTG
GAATGACACAGCTAAAGTACCTTACTTATATAATGCGACTACAGGCACATTTATTAGCTACG
ATGACAATGAATCTATGAAATATAAACAGACTATATAAAGACGAAGGGTTTAAAGTGGAGCA
ATGTTTTGGGAACTAAGCGGGGATTGCCGTACAAGTCCAAAATATAGTTGTAGTGGTCCAA
AATTACTTGATACGCTAGTAAAAGAATTACTTGGTGGACCTATTAGTCAAAAAGATACTGAG
CCACCAACGAATGTTAAAAATATTGTAGTTACGAATAAAAAATCCAACTCAGTTCAATTAAC
TGGACTGCATCTACTGATAACGTAGGAGTTACGGAATATGAAATTACTGCTGGAGAAGAGA
AATGGAGTACAACAATAAATAGCATTACAATTAACCTTAAACCTAATACGGAATACAAAT
TTTCAATAATTGCCAAAGATGCTGCTGGAAATAAATCACAACCTACCGCTTACTGTCAAAA
ACGGATGAARCTAATACGACACCTCCTGATGGAAATGGCACTGCTACATTTTCAGTCACTT
CGAATTGGGGCAGCGGTTATAACTTCTCGATTATAATCAAAAATAATGGAACGACTCCTATT
AAAAATTGGAAATTAGAATTTGATTATAGCGGCAATTTAACACAAGTTTGGGATTCTAAAATT
AGTAGTAAAACAAATAATCATTATGTAATTACAAACGCAGGATGGAATGGCGAAATTCCTCC
TGGTGGATCTATTACAATTGGTGGTGCAGGAACAGGTAATCCTGCCGAACTTTTAAATGCC
GTCATTAGCGAAAAGTACGTAATATCCATTAATTATTTCACTAAAGTTTGAATTTAGGTTCC
GAGCAAGACTTCTAAATTCAACTTTTTAATTTTATGAAAAATCAAAAAYATCACAATAACCT
ATTATGATTATATTTAGTTTCTAATATGAAGTTTATATGAAGTTCATTTGAATTTTACATGAAT
TTCCTTTAATTTCTATTGTCTTCTATAATATCCACATTATCCTTTATATATAGGAATTTTTC
ATTCCGTTTTGAACTATCTATATATAAAGAAAGATAGTCACCTGTTAGGGAAAGGCTTTC
GCTGCAGCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAAT
CGCCCTATATATCTG

El análisis de la secuencia nucleotídica nos indica un promotor hipotético (-35 TTGAGA y -10 TTAATA) en rojo y una secuencia Shine - Dalgarno (5'-

AGGAGA- 3´) en azul río arriba del marco de lectura abierto. El péptido hipotético se compone de 688 aminoácidos y una masa molecular de 77.3 kDa y un punto isoelectrico predicho de 7.00. Para el análisis anterior se utilizó el software ORF finder del sitio del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y el software Protein CalculatorV3.3 (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>). El análisis realizado por medio del software SignalIP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), reveló un péptido señal hipotético entre las posiciones Ala-59 y Asp-60, tanto para las bacterias Gram-negativas como para las Gram-positivas. No se encontró coincidencia para células eucariotas.

El análisis del gen que codifica una endoquitinasa de RN52 revela tres dominios: el dominio de la familia 18 de las glicosilhidrolasas, se encuentra entre el aminoácido 138 y el 549; el dominio de unión a fibronectina, el cual se encuentra entre los aminoácidos 584 y 660 y el dominio de unión a celulosa que se encuentra entre los aminoácidos 678 y 771. El análisis se realizó mediante la búsqueda de dominios en diversas familias de proteínas en <http://pfam.sanger.ac.uk/>. A continuación se presenta un esquema de los diversos dominios que tiene el péptido RN52 (Fig. 23)

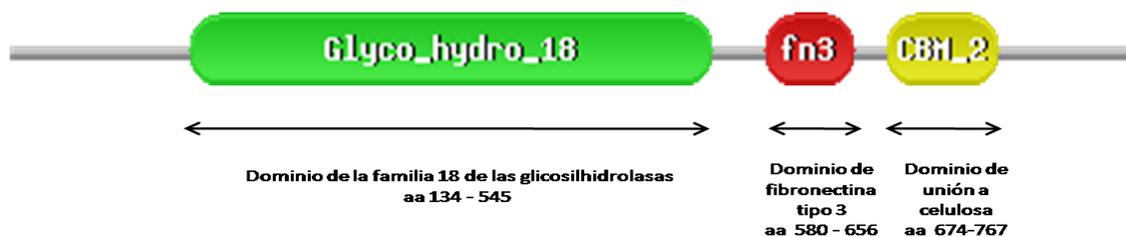


Fig. 23. Dominios presentes en la endoquitinasa proveniente de la cepa RN52. Dominio de la familia 18 de las glicosilhidrolasas (glyco_hidro_18), dominio de fibronectina (fn3) y dominio de unión a la celulosa (CBM_2).

El alineamiento mediante Blast (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) de las secuencia nucleotídica de la quitinasa MR10 contra MR11, MR21, MR33 y RN52 reveló una similitud del 97% al 99 %. Las 5 cepas analizadas presentan residuos conservados del sitio catalítico de la familia 18 de las glicosilhidrolasas (SXGG y DXXDXDXE) así como también los residuos esenciales del sitio de unión a quitina (W, Y, W).

Cuando las secuencias deducidas de aminoácidos de los genes clonados en este trabajo fueron comparados con la de otras quitinasas de *B. thuringiensis* reportadas en el Banco de genes (www.ncbi.nlm.nih.gov), se encontró que 15 de ellas presentaron una similitud cercana al 100%. Además de los genes que reportamos, también se secuenció parte de otro gen proveniente de una cepa nativa de *B. thuringiensis*, el cual mostró una similitud cercana al 78% comparada con los genes de MR10 contra MR11, MR21, MR33 y RN52.

DISCUSIÓN

El total de las cepas analizadas fue de 85. Tan solo el 9.41 % presentaron una actividad quitinolítica capaz de degradar el sustrato y formar un halo igual o mayor a 1 mm en las placas de agar-quitina. El resto de las cepas fue capaz de crecer en el medio, sin embargo, no se lograba identificar un halo definido. En 2002, Liu, *et al.* reportaron el análisis quitinolítico de 70 cepas de *B. thuringiensis*, de las cuales sólo 38 tuvieron actividad quitinolítica y de ellas, sólo tres fueron seleccionadas como buenas productoras. Driss *et al.* en 2005 reportaron un análisis de 256 cepas silvestres de *B. thuringiensis*, de las cuales un 87% presentaba algún tipo de actividad quitinolítica, sin embargo, sólo una cepa fue seleccionada, la cual obtuvo el mayor halo de degradación. En nuestro estudio obtuvimos 8 cepas silvestres capaces de formar un halo de degradación definido. Lo anterior nos muestra que la mayoría de las cepas de *B. thuringiensis* producen quitinasas a un bajo nivel y son pocas aquellas que tienen una alta actividad quitinolítica.

Existe evidencia que indica que *B. thuringiensis* no produce niveles altos de quitinasas al ser crecida en medios enriquecidos con quitina, a diferencia de lo que ocurre con organismos altamente quitinolíticos tales como *Serratia marcescens* Nima. (Casique-Arroyo *et al.* 2007). En nuestros ensayos utilizamos dos medios de cultivo para la producción de las quitinasas, el medio NB y el medio Castañeda-quitina. De acuerdo con los resultados, no existe una diferencia entre alguno de estos medios para la producción de las quitinasas en las cepas analizadas. Es conveniente señalar que al medio NB no se le

adicionó glucosa ya que al parecer inhibe la expresión de los genes de quitinasa por represión catabólica (Felse y Panda 1999). Este resultado es interesante ya que indica que *B. thuringiensis* es capaz de producir quitinasas en estado basal sin la presencia de un inductor como la quitina. Por otro lado, *Serratia marcescens* Nima, que se utilizó como testigo en los ensayos, presentó una elevada actividad con tetrámero y del trímero, más no en contra del dímero, al ser cultivada en el medio Castañeda-quitina.

En el análisis con los zimogramas, las cepas de *B. thuringiensis* MR19, RN47 Y RN48 no presentaron actividad quitinolítica contra ninguno de los tres sustratos análogos. En 2006, Morales *et al.* realizaron un ensayo de termoestabilidad de una quitinasa en rangos de temperatura de 30°C, 40°C, 50°C y 60°C encontrando una actividad de 90%, 95% y 100% respectivamente, sin embargo a 60°C su actividad es de 0% indicando que es termosensible. El proceso para llevar a cabo los zimogramas implica en uno de los pasos exponer las quitinasas a temperaturas de 90° C. De acuerdo a los resultados, es muy posible que las quitinasas que no presentaron actividad en estos ensayos sean termosensibles. Ya que además del calentamiento de las quitinasas a temperaturas elevadas previo a su separación en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), estas fueron tratadas con un agente reductor como el beta mercaptoetanol también es probable que la ausencia de actividad y detección en los zimogramas sea debido a que pudieran existir puentes disulfuros que participen en el sitio catalítico de las enzimas (Barboza-Corona *et al.* 2003).

En 2003, Barboza-Corona *et al.*, reportó la actividad de la cepa recombinante *E. coli* DH α F'/pCHIBT y la de *B. thuringiensis* LBIT-82. La cepa

recombinante contenía la quitinasa de *B. thuringiensis* LBIT-82 y se utilizó el plásmido pBluescript ks II para expresar en *E. coli* la quitinasa. Los resultados muestran una mayor actividad en la cepa silvestre con respecto a su recombinante. El análisis de la actividad entre las cepas silvestres y recombinantes de *E. coli* con genes de quitinasas de MR10, MR11, MR21, MR33 y RN52 arrojaron como resultado mayor actividad en las cepas silvestres, el cual puede ser debido a que la actividad de estas últimas es el resultado de la acción no solamente de las endoquitinasas sino también de otras quitinasas presentes en las cepas silvestres. Podemos observar que los datos obtenidos son congruentes con lo reportado en análisis anteriores. Es importante comentar que es posible incrementar la producción de quitinasas en *B. thuringiensis*. Para lograrlo será necesario transformar esta bacteria con genes de quitinasas insertados en vectores con un origen de replicación para *B. thuringiensis* y en algunos casos emplear regiones estabilizadores del mRNA. Con esta estrategia se ha logrado incrementar la producción de quitinasas en valores de hasta 300 veces comparada con una cepa silvestre (Barboza-Corona *et al.* 2007; Casique-Arroyo *et al.* 2007; Barboza-Corona *et al.* 2009).

El pH óptimo para la actividad de las quitinasas de las cepas nativas fluctúa en un rango de 6.5 a 8.5, lo que indica un comportamiento similar al de las quitinasas reportadas por Barboza-Corona *et al.* (2007), sin embargo estas enzimas muestran un comportamiento diferente al reportado por Morales de la Vega *et al.* (2006) quienes indican que a valores de pH de 4.0 y 9.0 las enzimas ya no tienen actividad. En las quitinasas estudiadas se observó una significativa reducción de la actividad a pH 10.5. A valores entre 3.5 a 5.5 se observó una disminución de la actividad en todas las quitinasas de las cepas

nativas y este mismo efecto se observó a valores de 8.5 y 9.5 sólo en algunas cepas.

Respecto a la temperatura de actividad de las quitinasas de las cepas nativas se observó que el rango óptimo está en 50°C y 60°C, y en todas ellas se observa una disminución significativa de la actividad a los 70°C. Estos resultados difieren de los reportados por Morales de la Vega et al. (2006) donde se mostró que las quitinasas perdieron completamente su actividad a los 60°C. Así mismo difieren de los reportados por Barboza-Corona et al. 2003, en donde una quitinasa de *B. thuringiensis* mostró una actividad máxima a una temperatura de 57.2°C.

Debido al rango de pH y de temperatura con el que las enzimas nativas pueden trabajar, es posible que estas moléculas presenten cambios conformacionales en su estructura (Barboza-Corona et al. 2003).

Respecto al análisis de las secuencias nucleotídicas de las quitinasas estudiadas tanto en cepas nativas como reportadas, se observó que las quitinasas de *B. thuringiensis* muestran que esta secuencia está altamente conservada. De las cepas reportadas, se encontró que 15 presentaron una similitud cercana al 100% en la secuencia aminoacídica de las quitinasas con respecto a las de las cepas nativas lo que concuerda con los resultados obtenidos por Barboza-Corona et al. (2007). Una cepa de *B. thuringiensis* que no fue completamente caracterizada mostró una similitud menor cuando fue comparada con las cepas nativas y *S. marcescens* Nima presentó una mayor variación de sus aminoácidos lo que muestra que se trata de una quitinasa completamente diferente a las que posee *B. thuringiensis*.

CONCLUSIONES

- Es bajo porcentaje de cepas de *Bacillus thuringiensis* productoras de quitinasas

- Es baja la producción de quitinasas en las cepas analizadas al comparar con *Serratia marcescens*.

- El medio NB y el Castañeda-quitina son igualmente efectivos para llevar a cabo la producción de quitinasas por *Bacillus thuringiensis*.

- Los valores óptimos obtenidos de pH (6.5 a 8.5) y de temperatura (50 a 60°C) de las quitinasas de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* analizadas son similares a los valores de las quitinasas reportadas.

- Las quitinasas estudiadas tienen una similitud cercana al 100% entre ellas, en relación con otras secuencias de endoquitinasas de *Bacillus thuringiensis* el análisis reveló una similitud que oscila desde el 94% al 99%, lo que indica que están altamente conservadas.

RECOMENDACIONES

En estudios posteriores se tendrá que ver la conveniencia de sobreexpresar estas endoquitinasas en *B. thuringiensis* y emplearlas como agentes sinérgicos de las proteínas Cry en el control biológico de insectos o de hongos fitopatógenos, o bien tratar de darles un uso para generar compuestos derivados de quitina que puedan tener diversos usos biotecnológicos.

LITERATURA CITADA

Barboza-Corona J.E, Ortiz-Rodríguez T, de la Fuente-Salcido N, Bideshi DK, Ibarra JE and Salcedo-Hernández R. 2009. Hyperproduction of chitinase influences crystal toxin synthesis and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 96: 31-42.

Barboza-Corona, J.E., Gutierrez-Acosta OB, Imperial-Cervantes M, Bideshi DK, Fuente-Salcido N, Bautista-Justo M, and R. Salcedo-Hernández. 2008. Generation of antibacterial oligosaccharides derived from chitin using heterologous endochitinase synthesized in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 105: 1511-1520.

Barboza-Corona, J.E., Nieto-Mazzoco, E., Velázquez-Robledo, R., Salcedo-Hernández, R., Bautista, M., Jiménez, B and Ibarra, J.E. 2003. Cloning, sequencing and expression of the chitinase gene *chiA74* from *B. thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:1023-1029.

Barboza-Corona, J. E., Reyes-Rios, D. M., Salcedo-Hernández, R., and Bideshi, D. K. (2007). Molecular and Biochemical Characterization of an Endochitinase (*ChiA-HD73*) from *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki* HD-73. *Molecular Biotechnology*.39:29-27

- Bierstedt, A., Stankiewicz, B.A., Briggs, D.E.G., and Evershed, R.P. 1998. Quantitative and qualitative analysis of chitin in fossil arthropods using a combination of colorimetric assay and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst* 123:139-145
- Bolar, J. P., Norelli, J. M., Wong, K. W., Hayes, C. K., Harman, G. E., and Aldwinckle, H. S. 2000. Expression of endochitinase of *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology*. 90:72-77
- Brameld, K. A., Goddard III, W. A. 1998. The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:4276-4281
- Caballero, P. and Ferré, J. Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *B. thuringiensis* en el control integrado de plagas. 2001. Phytoma, España – Universidad Pública de Navarra p 90-91.
- Cagigas-Reigh, A. L. and Anest, J. B. 2002. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Rev. Cub. Aliment. Nutr.*16(1):63-8

- Carstens, M., Vivier, M. A., and Pretorius, I. S. 2003. The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the CTS1-2 gen, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to transgenic tobacco. *Transgenic. Res.* 12:497-508
- Casique-Arroyo G, Bideshi D, Salcedo-Hernández R, and Barboza-Corona J.E. 2007. Development of a recombinant strain of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 that produces the endochitinase ChiA74. *Antonie van Leeuwenhoek.* 92(1):1-9.
- Castañeda-Agulló, M. 1955. Studies on the biosynthesis of extracellular proteases by bacteria. *The Journal of General Physiology.* 369-375.
- Chernin, L. S., De la Fuente, L., Sobolev, V., Haran, S., Vorgias, C. E., Oppenheim, A. B., and Chet, I. 1997. Molecular cloning, structural analysis and expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*. *Applied and Environmental Microbiology.* 63(3): 834-839 .
- Dahiya, N., Tewari, R., and Hoondal, G. S. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:773-782.

Driss, F., Kallasi-Awad, M., Zouari, N., & Jaova, S. 2005. Molecular characterization of a novel chitinase from *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki*. J. Appl. Microbiol. 99:945-953.

Felse, P. A., and Panda, T. 1999. Regulation and cloning of microbial chitinases genes. Appl. Microbial Biotechnol. 51:141-151.

Grimont, F. and Grimont, P. A. D. 2006. The genus *Serratia*. Prokaryotes 6:219:244

Lárez-Velázquez, C. 2006. Quitina y Quitosano: Materiales del pasado para el presente y el futuro. Avances en química 1(2):15-21.

Lehninger, A. L. 1995. Bioquímica las bases moleculares de la estructura y función celular. España. Ediciones Omega pp 661-667.

Lertcanawanichakul, M., Wiwat, Ch., Bhumiratana, A., and Donald, D. H. 2004. Expression of chitinase-encoding genes in *B. thuringiensis* and toxicity of engineered *B. thuringiensis* subsp. *Aizawai* toward *lymantria dispar* larvae. Curr. Microbiol. 48:175-181

Liu, M., Cai, H.Z., Liu, B. H., Yan, J. P., and Yuan, Z. M. 2002. Chitinolytic activities in *B. thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *J. Appl. Microbiol.* 93:374-379.

Lorito, M., Woo, S. L., Fernández, I, G., Colucci, G. Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, E. B., Zoina, A., Tuzun, S., and Scala, F. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* USA 95:7860-7865.

Merzendorfer, H. 2006. Insect chitin synthases: a review. *Journal of Comparative Physiology.* 176:1-15

Morales de la Vega L, Barboza-Corona, J.E., Aguilar-Uscanga MG, and Ramírez-Lepe M. 2006. Purification and characterization of an exochitinase from *B. thuringiensis* ssp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi. *Canadian Journal of Microbiology.* 52(7):651-657.

Polaina, J., 2004. Estructura, Función e ingeniería molecular de enzimas implicadas en la digestión de carbohidratos. *Mensaje Bioquímico* Vol. XVIII.

Rojas-Avelizapa, L. I., Cruz-Camarillo, R., Guerrero, M. I., Rodríguez-Vázquez, R., and Ibarra, J. E. 1999. Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *B. thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 15:299-308.

Ruiz-Sanchez A, Cruz-Camarillo R, Salcedo-Hernández R, and Barboza-Corona JE. 2005. Chitinases from *Serratia marcescens* Nima. *Biotechnology Letters*. 27(9): 649-653. (a)

Ruiz-Sanchez A, Cruz-Camarillo R, Salcedo-Hernández R, Ibarra J, and Barboza-Corona JE. 2005. Molecular cloning and purification of an endochitinase from *Serratia marcescens* (Nima). *Molecular Biotechnology*. 31(2): 103-112. ISSN: 1073-6085 (Print), 1559-0305 (Online). (b)

Sambrock, J., and Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press Volume 3 A1.2

Sampson, M. N. and Gooday, G. W. 1998. Involvement of chitinases of *B. thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology+* 144:2189-2194

Smirnof, W. A. 1974. Three years of aerial field experiments with *B. thuringiensis* plus chitinase formulation against the spruce budworm. *Journal of Invertebrate Pathology*. 24:344-348.

Sneh, B., Schuster, S. and Gross, S. 1983. Improvement of the insecticidal activity of *B. thuringiensis* var. *entomocidus* on larvae of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae) by addition of chitinolytic bacteria, a phagostimulant and UV protectant. *Z. Angew. Entomol.* 96:77-83

Soberón, M., Bravo A. *B. thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. México. [Web en línea]. Disponible desde internet en:

http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_16/Capitulo16.pdf [con acceso el 7 de mayo de 2008].

Wiwat, C., Lertcanawanichacul, M., Siwayapram, P., Pantuwatana, S., and Bhumiratana, A. (1996). Expression of chitinase encoding genes from *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas maltophilia* in *B. thuringiensis* subsp. *Israelensis*. *Gene* 179:119-126.

Yong-Seok, L., In-Hye, P., Ju-Soon, Y., Soo-Yeol, Ch., Young-Choon, L., Young-Su, Ch., Soon-Cheo, A., Cheol-Min, .K., and Yong-Lark, Ch.

2006. Cloning, purification, and characterization of chitinase from *B. sp.* DAU101. *Bioresource Technology*. 98:2734-2741.

Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller 2000, "A greedy algorithm for aligning DNA sequences". *Journal of Computational Biology*. 7(1-2):203-14.

ANEXOS

Anexo 1

Alineamiento múltiple de las quitinasas recombinante de las cepas MR10 y de MR11, MR21, MR33 y RN52.

“Caracterización bioquímica y molecular de quitinasas en cepas mexicanas de *B. thuringiensis*”

Secuenciamr10 TTTTGGCTCCATACAATTTTTCTCAAATCAAAA-ATGGTGAGCTTTTTCTTCCCATACC 59
Secuenciamr11 ----GGCTCCATACAATTTTTCTCAAATTTATTTATAATGAGCTTTTTCTTCCCATACC 56
Secuenciamr21 -----TTTTTCTCAAATTTATTTATAATGAGCTTTTTCTTCCCATACC 44
Secuenciamr33 -----TTTTTCTCAAATTTATTTATAATGAGCTATTTCTTCCCATACC 44
Secuenciamr52 -----TTTTTCTCAAATTTATTTATAATGAGCTATTTCTTCCCATACC 44
***** * ** ***** **

Secuenciamr10 AATCTTTAGTTTTTCATATATAGTTTGTATTCAAGCCTTTTTGTATTGAGAAAGTCTTTTT 119
Secuenciamr11 AATCTTTAGTTTTTCATATATAGTTTGTATTCAAGCCTTTTTGTATTGAGAAAGTCTTTTT 116
Secuenciamr21 AATCTTTAGTTTTTCATATATAGTTTGTATTCAAGCCTTTTTGTATTGAGAAAGTCTTTTT 104
Secuenciamr33 GATCTTTTCGTTTTTCATATATAGTTTGTATTCAAGCCTTTTTGTATTGAGAAAGTCTTTTA 104
Secuenciamr52 GATCTTTTCGTTTTTCATATATAGTTTGTATTCAAGCCTTTTTGTATTGAGAAAGTCTTTTA 104

Secuenciamr10 CAACTTAATAAAGCGTTTACACTAAATCTTACATTTGTTACGATTTAATCACCACCAGCT 179
Secuenciamr11 CAACTTAATAAAGCGTTTACACTAAATCTTACATTTGTTACGATTTAATCACCACCAGCT 176
Secuenciamr21 CAACTTAATAAAGCGTTTACACTAAATCTTACATTTGTTACGATTTAATCACCACCAGCT 164
Secuenciamr33 CAACTGAATAAAGCGTTTACACTAAATCTTACATTTGTTACGATTTAATCACCACCAGCT 164
Secuenciamr52 CAACTGAATAAAGCGTTTACACTAAATCTTACATTTGTTACGATTTAATCACCACCAGCT 164

Secuenciamr10 CCCTTGATAGACTTCGTGATGTCTGATCATTATCTAGATGTTTCATACGCTAGATT 239
Secuenciamr11 CCCTTGATAGACTTCGTGATGTCTGATCATTATCTAGATGTTTCATACGCTAGATT 236
Secuenciamr21 CCCTTGATAGACTTCGTGATGTCTGATCATTATCTAGATGTTTCATACGCTAGATT 224
Secuenciamr33 CCCTTGATAGACTTCGTGATGTCTGATCATTATCTAGACGTTTCATACGCTAGATT 224
Secuenciamr52 CCCTTGATAGACTTCGTGATGTCTGATCATTATCTAGACGTTTCATACGCTAGATT 224

Secuenciamr10 CATTTTGGTTTATTTGGCGTATGCCTTTAAATATATCTTTTATTTTGAAGGAGAAATGGC 299
Secuenciamr11 CATTTTGGTTTATTTGGCGTATGCCTTTAAATATATCTTTTATTTTGAAGGAGAAATGGC 296
Secuenciamr21 CATTTTGGTTTATTTGGCGTATGCCTTTAAATATATCTTTTATTTTGAAGGAGAAATGGC 284
Secuenciamr33 CATTTTGGATTTATTTGGCGTATGCCTTTAAATATATCTTTTATTTTGAAGGAGAAATGGC 284
Secuenciamr52 CATTTTGGATTTATTTGGCGTATGCCTTTAAATATATCTTTTATTTTGAAGGAGAAATGGC 284

Secuenciamr10 TATGAGGTCTCAAAAATTCACACTGCTATTACTATCTCTACTACTTTTCTTACCTCTTTT 359
Secuenciamr11 TATGAGGTCTCAAAAATTCACACTGCTATTACTATCTCTACTACTTTTCTTACCTCTTTT 356
Secuenciamr21 TATGAGGTCTCAAAAATTCACACTGCTATTACTATCTCTACTACTTTTCTTACCTCTTTT 344
Secuenciamr33 TATGAGGTCTCAAAAATTCACACTGCTATTACTATCTCTACTACTTTTCTTACCTCTTTT 344
Secuenciamr52 TATGAGGTCTCAAAAATTCACACTGCTATTACTATCTCTACTACTTTTCTTACCTCTTTT 344

Secuenciamr10 TCTCACAATTTTATTACTCCAATCTCGCATTAGCAGATTCACCAAAGCAAAGTCAAAA 419
Secuenciamr11 TCTCACAATTTTATTACTCCAATCTCGCATTAGCAGATTCACCAAAGCAAAGTCAAAA 416
Secuenciamr21 TCTCACAATTTTATTACTCCAATCTCGCATTAGCAGATTCACCAAAGCAAAGTCAAAA 404
Secuenciamr33 TCTCACAATTTTATTACTCCAATCTCGCATTAGCAGATTCACCAAAGCAAATCAAAA 404
Secuenciamr52 TCTCACAATTTTATTACTCCAATCTCGCATTAGCAGATTCACCAAAGCAAATCAAAA 404

Secuenciamr10 AATTGTTGGGTACTTTCCTTCGTGGGGCGTTTACGGACGTAATTATCAAGTTGCTGACAT 479
Secuenciamr11 AATTGTTGGGTACTTTCCTTCGTGGGGCGTTTACGGACGTAATTATCAAGTTGCTGACAT 476
Secuenciamr21 AATTGTTGGGTACTTTCCTTCGTGGGGCGTTTACGGACGTAATTATCAAGTTGCTGACAT 464
Secuenciamr33 AATTGTTGGGTACTTTCCTTCGTGGGGCGTTTACGGACGTAATTATCAAGTTGCTGACAT 464
Secuenciamr52 AATTGTTGGGTACTTTCCTTCGTGGGGCGTTTACGGACGTAATTATCAAGTTGCTGACAT 464

Secuenciamr10 TGATGCATCAAAGCTTACTCHCCTTAACATATGCTTTCGCGGATATTTGTTGGAATGGAAA 539
Secuenciamr11 TGATGCATCAAAGCTTACTCACCTTAACATATGCTTTCGCGGATATTTGTTGGAATGGAAA 536
Secuenciamr21 TGATGCATCAAAGCTTACTCACCTTAACATATGCTTTCGCGGATATTTGTTGGAATGGAAA 524
Secuenciamr33 TGATGCATCAAAACTTACTCACCTTAACATATGCTTTCGCGGATATTTGTTGGAATGGAAA 524
Secuenciamr52 TGATGCATCAAAACTTACTCACCTTAACATATGCTTTCGCGGATATTTGTTGGAATGGAAA 524

Secuenciamr10 ACATGGAAACCCCTTCTACTCATCTGATAATCCAATAAACAACGTTGGAAGTGTAAAGA 599
Secuenciamr11 ACATGGAAACCCCTTCTACTCATCTGATAATCCAATAAACAACGTTGGAAGTGTAAAGA 596
Secuenciamr21 ACATGGAAACCCCTTCTACTCATCTGATAATCCAATAAACAACGTTGGAAGTGTAAAGA 584
Secuenciamr33 ACATGGAAACCCCTTCTACTCATCTGATAATCCAATAAACAACGTTGGAAGTGTAAAGA 584
Secuenciamr52 ACATGGAAACCCCTTCTACTCATCTGATAATCCAATAAACAACGTTGGAAGTGTAAAGA 584

Secuenciamr10 ATCTGGTGTACCATTGCAAAAATAAAGAGGTTCCATGTTACTCTCGTACTCGGTGAACC 659
Secuenciamr11 ATCTGGTGTACCATTGCAAAAATAAAGAGGTTCCATGTTACTCTCGTACTCGGTGAACC 656
Secuenciamr21 ATCTGGTGTACCATTGCAAAAATAAAGAGGTTCCATGTTACTCTCGTACTCGGTGAACC 644

“Caracterización bioquímica y molecular de quitinasas en cepas mexicanas de *B. thuringiensis*”

Secuenciamr33	ATCTGGTGTACCATTGCAAATAAAGAGGTTCCATAATGGTACTCTCGTACTCGGGGAACC	644
Secuenciamr52	ATCTGGTGTACCATTGCAAATAAAGAGGTTCCATAATGGTACTCTCGTACTCGGGGAACC	644

Secuenciamr10	ATGGGCTGATGTTACCAATCGTATCCTGGCCAGGGACAACCTGGGAAGATTGCGATAA	719
Secuenciamr11	ATGGGCTGATGTTACCAATCGTATCCTGGCTCAGGGACAACCTGGGAAGATTGCGATAA	716
Secuenciamr21	ATGGGCTGATGTTACCAATCGTATCCTGGCTCAGGGACAACCTGGGAAGATTGCGATAA	704
Secuenciamr33	ATGGGCTGATGTTACCAATCGTATCCTGGCTCAGGGACAACCTGGGAAGATTGCGATAA	704
Secuenciamr52	ATGGGCTGATGTTACCAATCGTATCCTGGCTCAGT-ACAACCTGGGAAGATTGCGATAA	703

Secuenciamr10	ATATGCCCGTTGCGGAAATTT-CGGGGAACATAAACGATTAAGCTAAATATCCTCACT	778
Secuenciamr11	ATATGCCCGTTGCGGAAATTT-CGGGGAACATAAACGATTAAGCTAAATATCCTCACT	775
Secuenciamr21	ATATGCCCGTTGCGGAAATTT-CGGGGAACATAAACGATTAAGCTAAATATCCTCACT	763
Secuenciamr33	ATATGCCCGTTGCGGAAATTT-CGGGGAACATAAACGATTAAGCTAAATATCCTCACT	763
Secuenciamr52	ATATGCCCGTTGCGGAAATTTTCGGGGAACATAAACGATTAAGCTAAATATCCTCACT	763

Secuenciamr10	TAAAAACAATTATTTCCGTTGGTGGCTGGACTTGGTCTAACCGCTTTTCTGATATGGCCG	838
Secuenciamr11	TAAAAACAATTATTTCCGTTGGTGGCTGGACTTGGTCTAACCGCTTTTCTGATATGGCCG	835
Secuenciamr21	TAAAAACAATTATTTCCGTTGGTGGCTGGACTTGGTCTAACCGCTTTTCTGATATGGCCG	823
Secuenciamr33	TAAAAACAATTATTTCCGTTGGTGGCTGGACTTGGTCTAACCGCTTTTCTGATATGGCCG	823
Secuenciamr52	TAAAAACAATTATTTCCGTTGGTGGCTGGACTTGGTCTAACCGCTTTTCTGATATGGCCG	823

Secuenciamr10	CTGATGAAAAACAAGAAAAGTATTTGCTGAATCTACAGTAGCTTTTCTTCGCGCATATG	898
Secuenciamr11	CTGATGAAAAACAAGAAAAGTATTTGCTGAATCTACAGTAGCTTTTCTTCGCGCATATG	895
Secuenciamr21	CTGATGAAAAACAAGAAAAGTATTTGCTGAATCTACAGTAGCTTTTCTTCGCGCATATG	883
Secuenciamr33	CTGATGAAAAACAAGAAAAGTATTTGCTGAATCTACAGTAGCTTTTCTTCGCGCATATG	883
Secuenciamr52	CTGATGAAAAACAAGAAAAGTATTTGCTGAATCTACAGTAGCTTTTCTTCGCGCATATG	883

Secuenciamr10	GGTTTGATGGCGTAGATTTAGACTGGGAATATCCGGGCGTTGAAACGATTCTGGTGGTA	958
Secuenciamr11	GGTTTGATGGCGTAGATTTAGACTGGGAATATCCGGGCGTTGAAACGATTCTGGTGGTA	955
Secuenciamr21	GGTTTGATGGCGTAGATTTAGACTGGGAATATCCGGGCGTTGAAACGATTCTGGTGGTA	943
Secuenciamr33	GGTTTGATGGCGTAGATTTAGACTGGGAATATCCGGGCGTTGAAACGATTCTGGTGGTA	943
Secuenciamr52	GGTTTGATGGCGTAGATTTAGACTGGGAATATCCGGGCGTTGAAACGATTCTGGTGGTA	943

Secuenciamr10	GTTATCGTCTGAAGATAAACAAAATTTCACTCTCCTTCTTCAAGATGTCGGAATGCTT	1018
Secuenciamr11	GTTATCGTCTGAAGATAAACAAAATTTCACTCTCCTTCTTCAAGATGTCGGAATGCTT	1015
Secuenciamr21	GTTATCGTCTGAAGATAAACAAAATTTCACTCTCCTTCTTCAAGATGTCGGAARTGCTT	1003
Secuenciamr33	GTTATCGTCTGAAGATAAACAAAATTTCACTCTCCTTCTTCAAGACGTCGGAATGCTT	1003
Secuenciamr52	GTTATCGTCTGAAGATAAACAAAATTTCACTCTCCTTCTTCAAGACGTCGGAATGCTT	1003

Secuenciamr10	TGAATAAAGCAGGTGCTGAAGATGGCAAACAATATTTACTAACAATCGCTTCAGGCGCAA	1078
Secuenciamr11	TGAATAAAGCAGGTGCTGAAGATGGCAAACAATATTTACTAACAATCGCTTCAGGCGCAA	1075
Secuenciamr21	TGAATAAAGCAGGTGCTGAAGATGGCAAACAATATTTACTAACAATCGCTTCAGGCGCAA	1063
Secuenciamr33	TGAATAAAGCAGGTACTGAAGATGGCAAACAATATTTACTAACAATCGCTTCAGGTGCAA	1063
Secuenciamr52	TGAATAAAGCAGGTACTGAAGATGGCAAACAATATTTACTAACAATCGCTTCAGGTGCAA	1063

Secuenciamr10	GCCAACGCTACGCTGATCATAACAGAGCTAAAGAAAATTTCTCAAATACCGATTGGATTA	1138
Secuenciamr11	GCCAACGCTACGCTGATCATAACAGAGCTAAAGAAAATTTCTCAAATACCGATTGGATTA	1135
Secuenciamr21	GCCAACGCTACGCTGATCATAACAGAGCTAAAGAAAATTTCTCAAATACCGATTGGATTA	1123
Secuenciamr33	GCCAACGCTACGCTGACCATAACAGAGCTAAAGAAAATTTCTCAAATACCGATTGGATTA	1123
Secuenciamr52	GCCAACGCTACGCTGACCATAACAGAGCTAAAGAAAATTTCTCAAATACCGATTGGATTA	1123

Secuenciamr10	ATATTATGACATATGATTTCCACGGCGGATGGGAAGCTACTTCTAATCATAATGCAGCTC	1198
Secuenciamr11	ATATTATGACATATGATTTCCACGGCGGATGGGAAGCTACTTCTAATCATAATGCAGCTC	1195
Secuenciamr21	ATATTATGACATATGATTTCCACGGCGGATGGGAAGCTACTTCTAATCATAATGCAGCTC	1183
Secuenciamr33	ATATTATGACATATGATTTCCACGGCGGATGGGAAGCTACTTCTAATCATAATGCAGCTC	1183
Secuenciamr52	ATATTATGACATATGATTTCCACGGCGGATGGGAAGCTACTTCTAATCATAATGCAGCTC	1183

Secuenciamr10	TATATAAGGATCCAAATGACCCAGCAGCAAATACGAATTTTACGTAGATGGTGTATAA	1258
Secuenciamr11	TATATAAGGATCCAAATGACCCAGCAGCAAATACGAATTTTACGTAGATGGTGTATAA	1255
Secuenciamr21	TATATAAGGATCCAAATGACCCAGCAGCAAATACGAATTTTACGTAGATGGTGTATAA	1243
Secuenciamr33	TATATAAGGATCCAAATGACCCAGCAGCAAATACGAATTTTACGTAGATGGTGTATAA	1243

“Caracterización bioquímica y molecular de quitinasas en cepas mexicanas de *B. thuringiensis*”

Secuenciamr52	TATATAAGGACCCAAATGATCCAGCAGCAAATACGAATTTTACGTAGATGGTGCTATAA *****	1243
Secuenciamr10	ATGTTTATACAAATGAAGGTGTTCCAGTCGATAAACTAGTATTAGGCGTACCCTTTTACG	1318
Secuenciamr11	ATGTTTATACAAATGAAGGTGTTCCAGTCGATAAACTAGTATTAGGCGTACCCTTTTACG	1315
Secuenciamr21	ATGTTTATACAAATGAAGGTGTTCCAGTCGATAAACTAGTATTAGGCGTACCCTTTTACG	1303
Secuenciamr33	ATGTTTATACAAATGAAGGTGTTCCAGTCGATAAACTAGTATTAGGCGTACCCTTTTACG	1303
Secuenciamr52	ATGTTTATACAAATGAAGGTGTTCCAGTCGATAAACTAGTATTAGGCGTACCCTTTTACG *****	1303
Secuenciamr10	GACGTGGCTGGAAAAGTTGTGGCAAAGAAAATAACGGACAATATCAACCTTGCAAACCAG	1378
Secuenciamr11	GACGTGGCTGGAAAAGTTGTGGCAAAGAAAATAACGGACAATATCAACCTTGCAAACCAG	1375
Secuenciamr21	GACGTGGCTGGAAAAGTTGTGGCAAAGAAAATAACGGACAATATCAACCTTGCAAACCAG	1363
Secuenciamr33	GACGTGGCTGGAAAAGTTGTGGCAAAGAAAATAACGGACAATATCAACCTTGCAAACCAG	1363
Secuenciamr52	GACGTGGCTGGAAAAGTTGTGGCAAAGAAAATAACGGACAATATCAACCTTGCAAACCAG *****	1363
Secuenciamr10	GTAGTGATGGGAAACTTGCTTCTAAAGGTAAGTACTTGGGATGATTATTTCTACCGGTGACACAG	1438
Secuenciamr11	GTAGTGATGGGAAACTTGCTTCTAAAGGTAAGTACTTGGGATGATTATTTCTACCGGTGACACAG	1435
Secuenciamr21	GTAGTGATGGGAAACTTGCTTCTAAAGGTAAGTACTTGGGATGATTATTTCTACCGGTGACACAG	1423
Secuenciamr33	GTAGTGATGGGAAACTTGCTTCTAAAGGTAAGTACTTGGGATGATTATTTCTACCGGTGACACAG	1423
Secuenciamr52	GTAGTGATGGGAAACTTGCTTCTAAAGGTAAGTACTTGGGATGATTATTTCTACCGGTGACACAG ****	1423
Secuenciamr10	GTGTGTATGATTACGGTGATTTAGCAGCCAATTACGTTAATAAAAAATGGTTTTGTACGCT	1498
Secuenciamr11	GTGTGTATGATTACGGTGATTTAGCAGCCAATTACGTTAATAAAAAATGGTTTTGTACGCT	1495
Secuenciamr21	GTGTGTATGATTACGGTGATTTAGCAGCCAATTACGTTAATAAAAAATGGTTTTGTACGCT	1483
Secuenciamr33	GTGTGTATGATTACGGTGATTTAGCAGCCAATTACGTTAATAAAAAATGGTTTTGTACGCT	1483
Secuenciamr52	GTGTGTATGATTACGGTGATTTAGCAGCCAATTACGTTAATAAAAAATGGTTTTGTACGCT *****	1483
Secuenciamr10	ACTGGAATGACACAGCTAAAGTACCTTATTTATATAATGCAACTACAGGCACATTTATTA	1558
Secuenciamr11	ACTGGAATGACACAGCTAAAGTACCTTATTTATATAATGCAACTACAGGCACATTTATTA	1555
Secuenciamr21	ACTGGAATGACACAGCTAAAGTACCTTATTTATATAATGCAACTACAGGCACATTTATTA	1543
Secuenciamr33	ACTGGAATGACACAGCTAAAGTACCTTATTTATATAATGCAACTACAGGCACATTTATTA	1543
Secuenciamr52	ACTGGAATGACACAGCTAAAGTACCTTATTTATATAATGCAACTACAGGCACATTTATTA *****	1543
Secuenciamr10	GCTACGATGACAATGAATCTATGAAATACAAAACAGACTATATAAAGACGAAAGGTTTAA	1618
Secuenciamr11	GCTACGATGACAATGAATCTATGAAATACAAAACAGACTATATAAAGACGAAAGGTTTAA	1615
Secuenciamr21	GCTACGATGACAATGAATCTATGAAATACAAAACAGACTATATAAAGACGAAAGGTTTAA	1603
Secuenciamr33	GCTACGATGACAATGAATCTATGAAATACAAAACAGACTATATAAAGACGAAAGGTTTAA	1603
Secuenciamr52	GCTACGATGACAATGAATCTATGAAATACAAAACAGACTATATAAAGACGAAAGGTTTAA *****	1603
Secuenciamr10	GTGGAGCAATAAAATGGGAAGTAAAGCGGAGATTGCCGTACAAGTCCAAAATATAGTTGCA	1678
Secuenciamr11	GTGGAGCAATGTTTTGGGAAGTAAAGCGGAGATTGCCGTACAAGTCCAAAATATAGTTGCA	1675
Secuenciamr21	GTGGAGCAATGTTTTGGGAAGTAAAGCGGAGATTGCCGTACAAGTCCAAAATATAGTTGCA	1663
Secuenciamr33	GTGGAGCAATGTTTTGGGAAGTAAAGCGGAGATTGCCGTACAAGTCCAAAATATAGTTGCA	1663
Secuenciamr52	GTGGAGCAATGTTTTGGGAAGTAAAGCGGAGATTGCCGTACAAGTCCAAAATATAGTTGCA *****	1663
Secuenciamr10	GTGGTCCAAAATTAAGTACTTGATACGCTAGTAAAAGAATTACTTGGTGGACCTATTAGTCAA	1738
Secuenciamr11	GTGGTCCAAAATTAAGTACTTGATACGCTAGTAAAAGAATTACTTGGTGGACCTATTAGTCAA	1735
Secuenciamr21	GTGGTCCAAAATTAAGTACTTGATACGCTAGTAAAAGAATTACTTGGTGGACCTATTAGTCAA	1723
Secuenciamr33	GTGGTCCAAAATTAAGTACTTGATACGCTAGTAAAAGAATTACTTGGTGGACCTATTAGTCAA	1723
Secuenciamr52	GTGGTCCAAAATTAAGTACTTGATACGCTAGTAAAAGAATTACTTGGTGGACCTATTAGTCAA *****	1723
Secuenciamr10	AAGATACTGAGCCACCAACGAATGTTAAAAACGTTGTAGTTACGAATAAAAAATCAAACCT	1798
Secuenciamr11	AAGATACTGAGCCACCAACGAATGTTAAAAACGTTGTAGTTACGAATAAAAAATCAAACCT	1795
Secuenciamr21	AAGATACTGAGCCACCAACGAATGTTAAAAACATGTAGTTACGAATAAAAAATCAAACCT	1783
Secuenciamr33	AAGATACTGAGCCACCAACGAATGTTAAAAATATGTAGTTACGAATAAAAAATCAAACCT	1783
Secuenciamr52	AAGATACTGAGCCACCAACGAATGTTAAAAATATGTAGTTACGAATAAAAAATCAAACCT *****	1783
Secuenciamr10	CAGTTCAATTAAGTACTGGACTGCATCTACTGATAACGTAGGAGTTATGGAATATGAAATTA	1858
Secuenciamr11	CAGTTCAATTAAGTACTGGACTGCATCTACTGATAACGTAGGAGTTATGGAATATGAAATTA	1855
Secuenciamr21	CAGTTCAATTAAGTACTGGACTGCATCTACTGATAACGTAGGAGTTACGGAATATGAAATTA	1843
Secuenciamr33	CAGTTCAATTAAGTACTGGACTGCATCTACTGATAACGTAGGAGTTACGGAATATGAAATTA	1843
Secuenciamr52	CAGTTCAATTAAGTACTGGACTGCATCTACTGATAACGTAGGAGTTACGGAATATGAAATTA	1843

```

*****

Secuenciamr10      CTGCTGGAGAAGAGAAAATGGAGTACAACAACAAATAGCATTACAATTA AAAA ACTTAAAC 1918
Secuenciamr11      CTGCTGGAGAAGAGAAAATGGAGTACAACAACAAATAGCATTACAATTA AAAA ACTTAAAC 1915
Secuenciamr21      CTGCTGGAGAAGAGAAAATGGAGTACAACAACAAATAGCATTACAATTA AAAA ACTTAAAC 1903
Secuenciamr33      CTGCTGGAGAAGAGAAAATGGAGTACAACAACAAATAGCATTACAATTA AAAA ACTTAAAC 1903
Secuenciamr52      CTGCTGGAGAAGAGAAAATGGAGTACAACAACAAATAGCATTACAATTA AAAA ACTTAAAC 1903
*****

Secuenciamr10      CTAATACGGAATACACATTTTCAATAATGGCCAAAGATGCTGCTGGAAAATAAATCACAAC 1978
Secuenciamr11      CTAATACGGAATACACATTTTCAATAATGGCCAAAGATGCTGCTGGAAAATAAATCACAAC 1975
Secuenciamr21      CTAATACGGAATACACATTTTCAATAATGGCCAAAGATGCTGCTGGAAAATAAATCACAAC 1963
Secuenciamr33      CTAATACGGAATACACATTTTCAATAATGGCCAAAGATGCTGCTGGAAAATAAATCACAAC 1963
Secuenciamr52      CTAATACGGAATACACATTTTCAATAATGGCCAAAGATGCTGCTGGAAAATAAATCACAAC 1963
*****

Secuenciamr10      CTACCGCTCTTACTGTCAAAACGGATGAAGCTAATACGACACCCCTGATGGAAATGGTA 2038
Secuenciamr11      CTACCGCTCTTACTGTCAAAACGGATGAAGCTAATACGACACCCCTGATGGAAATGGTA 2035
Secuenciamr21      CTACCGCTCTTACTGTCAAAACGGATGAAGCTAATACGACACCCCTGATGGAAATGGTA 2023
Secuenciamr33      CTACCGCTCTTACTGTCAAAACGGATGAAGCTAATACGACACCCCTGATGGAAATGGTA 2023
Secuenciamr52      CTACCGCTCTTACTGTCAAAACGGATGAAGCTAATACGACACCCCTGATGGAAATGGTA 2023
*****

Secuenciamr10      CTGCTACATTTTCAGTCACTTCGAATGGGGCAGCGGTTATAACTTCTCGATTATAATCA 2098
Secuenciamr11      CTGCTACATTTTCAGTCACTTCGAATGGGGCAGCGGTTATAACTTCTCGATTATAATCA 2095
Secuenciamr21      CTGCTACATTTTCAGTCACTTCGAATGGGGCAGCGGTTATAACTTCTCGATTATAATCA 2083
Secuenciamr33      CTGCTACATTTTCAGTCACTTCGAATGGGGCAGCGGTTATAACTTCTCGATTATAATCA 2083
Secuenciamr52      CTGCTACATTTTCAGTCACTTCGAATGGGGCAGCGGTTATAACTTCTCGATTATAATCA 2083
*****

Secuenciamr10      AAAATAATGGAACGACTCCTATTA AAAA ATGGAAATTAGAATTTGATTATAGCGGTAATT 2158
Secuenciamr11      AAAATAATGGAACGACTCCTATTA AAAA ATGGAAATTAGAATTTGATTATAGCGGTAATT 2155
Secuenciamr21      AAAATAATGGAACGACTCCTATTA AAAA ATGGAAATTAGAATTTGATTATAGCGGTAATT 2143
Secuenciamr33      AAAATAATGGAACGACTCCTATTA AAAA ATGGAAATTAGAATTTGATTATAGCGGTAATT 2143
Secuenciamr52      AAAATAATGGAACGACTCCTATTA AAAA ATGGAAATTAGAATTTGATTATAGCGGTAATT 2143
*****

Secuenciamr10      TAACACAAGTTTGGGATTTCTAAAATTAGTAGTAAAACAATAATCATTATGTAATTACGA 2218
Secuenciamr11      TAACACAAGTTTGGGATTTCTAAAATTAGTAGTAAAACAATAATCATTATGTAATTACGA 2215
Secuenciamr21      TAACACAAGTTTGGGATTTCTAAAATTAGTAGTAAAACAATAATCATTATGTAATTACGA 2203
Secuenciamr33      TAACACAAGTTTGGGATTTCTAAAATTAGTAGTAAAACAATAATCATTATGTAATTACGA 2203
Secuenciamr52      TAACACAAGTTTGGGATTTCTAAAATTAGTAGTAAAACAATAATCATTATGTAATTACGA 2203
*****

Secuenciamr10      ACGCAGGATGGAATGGTGA AATTCCTCCTGGTGGATCTATTACAATTGGCGGTGCAGGAA 2278
Secuenciamr11      ACGCAGGATGGAATGGTGA AATTCCTCCTGGTGGATCTATTACAATTGGCGGTGCAGGAA 2275
Secuenciamr21      ACGCAGGATGGAATGGTGA AATTCCTCCTGGTGGATCTATTACAATTGGCGGTGCAGGAA 2263
Secuenciamr33      ACGCAGGATGGAATGGTGA AATTCCTCCTGGTGGATCTATTACAATTGGTGGTGCAGGAA 2263
Secuenciamr52      ACGCAGGATGGAATGGTGA AATTCCTCCTGGTGGATCTATTACAATTGGTGGTGCAGGAA 2263
*****

Secuenciamr10      CAGGTAATCCTGCCGAAC TTTTAAATACCGTCATTAGCGAAAAC TAGACGTAATATCCAT 2338
Secuenciamr11      CAGGTAATCCTGCCGAAC TTTTAAATACCGTCATTAGCGAAAAC TAGACGTAATATCCAT 2335
Secuenciamr21      CAGGTAATCCTGCCGAAC TTTTAAATACCGTCATTAGCGAAAAC TAGACGTAATATCCAT 2323
Secuenciamr33      CAGGTAATCCTGCCGAAC TTTTAAATACCGTCATTAGCGAAAAC TAGACGTAATATCCAT 2323
Secuenciamr52      CAGGTAATCCTGCCGAAC TTTTAAATACCGTCATTAGCGAAAAC TAGACGTAATATCCAT 2323
*****

Secuenciamr10      TAATTAATTCAC TAAAGTTTGAATTTAGGTTTGAGCAATACCTCCTAAATTC AA ACTTTT 2398
Secuenciamr11      TAATTAATTCAC TAAAGTTTGAATTTAGGTTTGAGCAATACCTCCTAAATTC AA ACTTTT 2395
Secuenciamr21      TAATTAATTCAC TAAAGTTTGAATTTAGGTTTGAGCAATACCTCCTAAATTC AA ACTTTT 2383
Secuenciamr33      TAATTAATTCAC TAAAGTTTGAATTTAGGTTTGAGCAAGACTCCTAAATTC AA ACTTTT 2383
Secuenciamr52      TAATTAATTCAC TAAAGTTTGAATTTAGGTTTGAGCAAGACTCCTAAATTC AA ACTTTT 2383
*****

Secuenciamr10      AATTTTACGAAAATCAAAAATATCATAATAACCTATTATAATATATTTAATTTCTAAT 2458
Secuenciamr11      AATTTTACGAAAATCAAAAATATCATAATAACCTATTATAATATATTTAATTTCTAAT 2455
Secuenciamr21      AATTTTACGAAAATCAAAAATATCATAATAACCTATTATAATATATTTAATTTCTAAT 2443
Secuenciamr33      AATTTTACGAAAATCAAAAATATCACAATAACCTATTATGATTATATTTAGTTTCTAAT 2443
Secuenciamr52      AATTTTACGAAAATCAAAAATATCACAATAACCTATTATGATTATATTTAGTTTCTAAT 2443
*****

```

```

Secuenciamr10      ATGAAGTTTATATGAAGTTCATTTGAATTTACATGAATTTCCTTAATTTCTATTGTCT 2518
Secuenciamr11      ATGAAGTTTATATGAAGTTCATTTGAATTTACATGAATTTCCTTAATTTCTATTGTCT 2515
Secuenciamr21      ATGAAGTTTATATGAAGTTCATTTGAATTTACATGAATTTCCTTAATTTCTATTGTCT 2503
Secuenciamr33      ATGAAGTTTATATGAAGTTCATTTGAATTTACATGAATTTCCTTAATTTCTATTGTCT 2503
Secuenciamr52      ATGAAGTTTATATGAAGTTCATTTGAATTTACATGAATTTCCTTAATTTCTATTGTCT 2503
                    *****

Secuenciamr10      TCCTATAATATCCATATTATCCTTTACATAAAGGAATTATCTTCATTCATTTTGAACTA 2578
Secuenciamr11      TCCTATAATATCCATATTATCCTTTACATAAAGGAATTATTTTCATTCATTTTGAACTA 2575
Secuenciamr21      TCCTATAATATCCATATTATCCTTTACATAAAGGAATTATTTTCATTCATTTTGAACTA 2563
Secuenciamr33      TCCTATAATATCCACATTATCCTTTATATATAGGAATTATTTTCATTCGGTTTTGAACTA 2563
Secuenciamr52      TCCTATAATATCCACATTATCCTTTATATATAGGAATTATTTTCATTCGGTTTTGAACTA 2563
                    *****

Secuenciamr10      TCTATATATTTCT-GAAAGATAGTCACCTGTTAGGGAAAGGCTTTTA----- 2624
Secuenciamr11      TCTATATATATAAAGAAAGATAGTCACCTGTTAGGGAAAGGCTTTCG----- 2622
Secuenciamr21      TCTATATWTATA--GGAAGATAGTCACCTGTTAGGAAAAGGCTT----- 2605
Secuenciamr33      TCTATATATATAAAGAAAGATAGTCACCTGTTAGGGAAAGGCTTTC----- 2609
Secuenciamr52      TCTATATATATAAAGAAAGATAGTCACCTGTTAGGGAAAGGCTTTCGCTGCAGCCGGGG 2623
                    ***** * * * *****

Secuenciamr10      -----
Secuenciamr11      -----
Secuenciamr21      -----
Secuenciamr33      -----
Secuenciamr52      GATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAATCGCCCTATATATCTG 2683
    
```

Identidad entre las quitinasas recombinante de las cepas MR10 y de MR11, MR21, MR33 y RN52.

Tabla 22. Identidad entre quitinasas recombinantes de las cepas MR10, MR11, MR21, MR33 Y RN52

		Porcentaje de identidad							
d i v e r g e c i a		1	2	3	4	5			
	1			99.1	98.3	96.8	93.9	1	Secuencia MR10
	2	0.7		99.0	97.7	94.8	2	Secuencia MR11	
	3	0.9	0.3		97.8	94.9	3	Secuencia MR21	
	4	2.6	1.9	2.0		96.6	4	Secuencia MR33	
	5	2.7	2.0	2.0	0.6		5	Secuencia RN52	
		1	2	3	4	5			

Anexo 2

Alineamiento de los sitios catalíticos de las endoquitinasas provenientes de las cepas MR10, MR11, MR21, MR33, RN52 con otras quitinasas

Alineamiento del sitio catalítico (mostrado en rojo) de la secuencia deducida de las quitinasa de MR10, MR11, MR21, MR33, RN52 con otras cepas de *B. thuringiensis* y *Serratia marcescens* nima mostrando los residuos típicos de la familia 18 de las glicosilhidrolasas (**SXGG** y **DXDXDXE** mostrado en amarillo).

AAL17867.1chitinase/1-676	DVTKSYPVSGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	171
CAG25670.1chitinase/1-676	MLPNRYPGSGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	171
AAR21234.1chitinase/1-676	DVTKSYPGSGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	171
ABO63962.1chitinase/1-674	DVTKSYPGSGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	169
<u>SECUENCIARN52/1-701</u>	DVTKSYPGSVQLGKIAINMPVAE IFGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	196
YP_034712.1chitinase/1-674	DVTKSYPGSGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	169
YP_893291.1Bacillus/1-701	DVTKSYPGSGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	196
ABQ65137.2chitinase/1-676	DVTKSYPGSGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	171
AAM88400.1chitinase/1-688	DVTKSYPGSGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	183
AAR19226.1chitinase/1-676	DVTKSYPGSGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	171
AAL71886.2chitinase/1-674	DVTKSYPGSGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	169
<u>SECUENCIAMR10/1-701</u>	DVTKSYPGPGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	196
<u>SECUENCIAMR33/1-701</u>	DVTKSYPGSGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	196
<u>SECUENCIAMR11/1-701</u>	DVTKSYPGSGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	196
AAR19092.1chitinase/1-676	DVTKSYPGSGTTWEDCDRYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	171
AAO34713.1chitinase/1-688	DVTKSYPGSGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	183
AAR19091.1chitinase/1-676	DVTKSYPGSGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	171
ABO21095.1ChiAC/1-676	DVTKSYPVSGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	171
ABM66446.1chitinase/1-688	DVTKSYPGSGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	183
<u>SECUENCIAMR21/1-701</u>	DVTKSYPGSGTTWEDCDKYARCGN FGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	196
AAB58579.1chitinase/1-635	MLPNRILAQGTWEDCDKYAR- GNFGELKRLKAKY PHLKTII SVGG ---W	169
AAS68517.1endochitinase/1-563	NADGCTASDATEIVVADTDGSH LPLKPELLEKNKPYKQNSGKVVGSYFV	165
	. : * : * : * : . * *	

AAL17867.1chitinase/1-676	TWSNRFSDMAA DEKTRKVF AE STVAF FLRAYGFDGVDLDWEY PGVETIPGG	221
CAG25670.1chitinase/1-676	TWSNRFSDMAA DEKTRKVF AE STVAF FLRAYGFDGVDLDWEY PGVETIPGG	221
AAR21234.1chitinase/1-676	TWSNRFSDMAA DEKTRKVF AE STVAF FLRAYGFDGVDLDWEY PGVETIPGG	221
ABO63962.1chitinase/1-674	TWSNRFSDMAA DEKTRKVF AE STVAF FLRAYGFDGVDLDWEY PGVETIPGG	219
<u>SECUENCIARN52/1-701</u>	TWSNRFSDMAA DEKTRKVF AE STVAF FLRAYGFDGVDLDWEY PGVETIPGG	246
YP_034712.1chitinase/1-674	TWSNRFSDMAA DEKTRKVF ADSTVDFLREYGF GDGVDLDWEY PGVETIPGG	219
YP_893291.1Bacillus/1-701	TWSNRFSDMAA DEKTRKVF ADSTVDFLREYGF GDGVDLDWEY PGVETIPGG	246
ABQ65137.2chitinase/1-676	TWSNRFSDMAA DEKTRKVF AE STVAF FLRAYGFDGVDLDWEY PGVETIPGG	221
AAM88400.1chitinase/1-688	TWSNRFSDMAA DEKTRKVF AE STVAF FLRAYGFDGVDLDWEY PGVETIPGG	233
AAR19226.1chitinase/1-676	TWSNRFSDMAA DEKTRKVF AE STVAF FLRAYGFDGVDLDWEY PGVETIPGG	221
AAL71886.2chitinase/1-674	TWSNRFSDMAA DEKTRKVF AE STVAF FLRAYGFDGVDLDWEY PGVETIPGG	219
<u>SECUENCIAMR10/1-701</u>	TWSNRFSDMAA DEKTRKVF AE STVAF FLRAYGFDGVDLDWEY PGVETIPGG	246

<u>SECUENCIAMR33/1-701</u>	TWSNRFSDMAADEKTRKVFVFAESTVAFRLRAYGFDGVDLDWEYPGVETIPGG	246
<u>SECUENCIAMR11/1-701</u>	TWSNRFSDMAADEKTRKVFVFAESTVAFRLRAYGFDGVDLDWEYPGVETIPGG	246
AAR19092.1chitinase/1-676	TWSNRFSDMAADEKTRKVFVFAESTVAFRLRAYGFDGVDLDWEYPGVETIPGG	221
AAO34713.1chitinase/1-688	TWSNRFSDMAADEKTRKVFVFAESTVAFRLRAYGFDGVDLDWEYPGVETIPGG	233
AAR19091.1chitinase/1-676	TWSNRFSDMAADEKTRKVFVFAESTVAFRLRAYGFDGADLDWEYPGVETIPGG	221
ABO21095.1ChiAC/1-676	TWSNRFSDMAADEKTRKVFVFAESTVAFRLRAYGFDGVDLDWEYPGVETIPGG	221
ABM66446.1chitinase/1-688	TWSNRFSDMAADEKTRKVFVFAESTVAFRLRAYGFDGVDLDWEYPGVETIPGG	233
<u>SECUENCIAMR21/1-701</u>	TWSNRFSDMAADEKTRKVFVFAESTVAFRLRAYGFDGVDLDWEYPGVETIPGG	246
AAB58579.1chitinase/1-635	TWSNRFSDMAADEKTRKVFVFAESTVAFRLPAYGFDGVDLDWEYPGVETIPGG	219
AAS68517.1endochitinase/1-563	EWGVYGRNFTVDKIPAQNLTHLLYGFIPICGGNGIN-DSLKEIEGSPQAL	214
	*. : : : * : . : : . * : * : * : * : : .	
AAL17867.1chitinase/1-676	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGAEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	269
CAG25670.1chitinase/1-676	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGAEDGKQYLLTVASGASQRYADHT	269
AAR21234.1chitinase/1-676	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGTEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	269
ABO63962.1chitinase/1-674	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGAEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	267
<u>SECUENCIARN52/1-701</u>	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGTEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	294
YP_034712.1chitinase/1-674	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGAEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	267
YP_893291.1Bacillus/1-701	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGAEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	294
ABQ65137.2chitinase/1-676	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGAEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	269
AAM88400.1chitinase/1-688	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGAEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	281
AAR19226.1chitinase/1-676	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGAEDGRQYLLTIASGASQRYADHT	269
AAL71886.2chitinase/1-674	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGAEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	267
<u>SECUENCIAMR10/1-701</u>	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGAEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	294
<u>SECUENCIAMR33/1-701</u>	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGTEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	294
<u>SECUENCIAMR11/1-701</u>	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGAEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	294
AAR19092.1chitinase/1-676	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGAEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	269
AAO34713.1chitinase/1-688	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGAEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	281
AAR19091.1chitinase/1-676	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGAEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	269
ABO21095.1ChiAC/1-676	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGAEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	269
ABM66446.1chitinase/1-688	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGAEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	281
<u>SECUENCIAMR21/1-701</u>	SYRPEDKQNFNTLLQLQDVRNALN--KAGAEDGKQYLLTIASGASQRYADHT	294
AAB58579.1chitinase/1-635	SYRPEDKQNFNTLLQLQELRNALN--KAGAEDCKQYLLTIASGASQRYADHT	267
AAS68517.1endochitinase/1-563	QRSCQGREDFKISIRDPFAALQKAQKGVTAWDDPYKGNFQMLMALKQAH	264
	. : : : * : : : ** : * . . . *	

Alineamiento del sitio de unión a quitina de las cepas recombinantes provenientes de MR10, MR11, MR21, MR33, RN52 con otras cepas de *B. thuringiensis* y *Serratia marcescens* nima mostrando los residuos fundamentales para la unión a quitina.

AAL17867.1chitinase/1-676	DEANTTTPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTTPIK	610
CAG25670.1chitinase/1-676	DEANTTTPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTNP	610
AAR21234.1chitinase/1-676	DETNTTTPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTTPIK	610
ABO63962.1chitinase/1-674	DEANTTTPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTNP	608
<u>SECUENCIARN52/1-701</u>	DEXNTTTPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTTPIK	635
YP_034712.1chitinase/1-674	DDANTTTPGGN-----SNATFSVTSNWGSGYNFSSIVIKNSGTTPIK	608
YP_893291.1Bacillus/1-701	DDANTTTPGGN-----SNATFSVTSNWGSGYNFSSIVIKNSGTTPIK	635
ABQ65137.2chitinase/1-676	DEANTTTPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTNP	610
AAM88400.1chitinase/1-688	DEANTTTPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTTPIK	622
AAR19226.1chitinase/1-676	DEANTTTPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTTPIK	610
AAL71886.2chitinase/1-674	DEANTTTPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTTPIK	608
<u>SECUENCIAMR10/1-701</u>	DEANTTTPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTTPIK	635
<u>SECUENCIAMR33/1-701</u>	DETNTTTPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTTPIK	635
<u>SECUENCIAMR11/1-701</u>	DEANTTTPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTTPIK	635
AAR19092.1chitinase/1-676	DEANTTTPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTTPIK	610
AAO34713.1chitinase/1-688	DEANTTTPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTNP	622
AAR19091.1chitinase/1-676	DEANTTTPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTTPIK	610
ABO21095.1ChiAC/1-676	DEANTTPLDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTTPIK	610
ABM66446.1chitinase/1-688	DEANTTTPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTTPIK	622
<u>SECUENCIAMR21/1-701</u>	DEANTTTPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTTPIK	635
AAB58579.1chitinase/1-635	-RSSNATPDGN-----GTATFSVTSNWGSGYNFSSIIKKNNGTTPIK	476
AAS68517.1endochitinase/1-563	AMYGRGWTGVNGYQNNIPFTGTATGPKVGTWENGIVDYRQIASQFMS--G	489
	. . . * . . . * . . . * . . . * . . . *	
AAL17867.1chitinase/1-676	NWKLEFDYSGNLTQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	657
CAG25670.1chitinase/1-676	NWKLEFDYSGNLTQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	657
AAR21234.1chitinase/1-676	NWKLEFDYSGNLTQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	657
ABO63962.1chitinase/1-674	NWKLEFDYSGNLTQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	655
<u>SECUENCIARN52/1-701</u>	NWKLEFDYSGNLTQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	682
YP_034712.1chitinase/1-674	NWKLEFDYNGNLTQVWDS---KISSKINNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	655
YP_893291.1Bacillus/1-701	NWKLEFDYNGNLTQVWDS---KISSKINNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	682
ABQ65137.2chitinase/1-676	NWKLEFDYSGNLTQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	657
AAM88400.1chitinase/1-688	NWKLEFDYSGNLTQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	669
AAR19226.1chitinase/1-676	NWKLEFDYSGNLTQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	657
AAL71886.2chitinase/1-674	NWKLEFDYSGNLTQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	655
<u>SECUENCIAMR10/1-701</u>	NWKLEFDYSGNLTQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	682
<u>SECUENCIAMR33/1-701</u>	NWKLEFDYSGNLTQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	682
<u>SECUENCIAMR11/1-701</u>	NWKLEFDYSGNLTQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	682
AAR19092.1chitinase/1-676	NWKLEFDYSGNLTQVWDS---KINSKTNNHYVITNAGWNGEIPSGGSITI	657
AAO34713.1chitinase/1-688	NWKLEFDYSGNLTQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	669
AAR19091.1chitinase/1-676	NWKLEFDYSGNLAQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	657
ABO21095.1ChiAC/1-676	NWKLEFDYSGNLTQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPSGGSITI	657
ABM66446.1chitinase/1-688	NWKLEFDYSGNLTQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	669
<u>SECUENCIAMR21/1-701</u>	NWKLEFDYSGNLTQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	682
AAB58579.1chitinase/1-635	KWKLEFDYSGNLTQVWDS---KISSKTNNHYVITNAGWNGEIPPGGSITI	523
AAS68517.1endochitinase/1-563	EWQYTYDATAEAPYVFKPSTGDLITFDARSVQAKGYVLDKQLGGLFSW	539
	:* : * . . : . * . . . : : : : * . . : : * * :	

Anexo 3

Identidades de las quitinasas de las secuencias aminoacídicas de quitinasas recombinantes provenientes de las cepas MR10, MR11, MR21, MR33 Y RN52

Tabla 23. Porcentaje de similitud entre las secuencias deducidas de aminoácidos de las quitinasas recombinantes obtenidas a partir de MR10, MR11, MR21, MR33 y RN52 y diversas secuencias de quitinasas de otras cepas *B. thuringiensis* y *Serratia marcescens* Nima.

No. de acceso	Organismo	% de similitud				
		MR10	MR11	MR21	MR33	RN52
ABQ65137.2	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	98	98	99	98	96
AAL17867.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98	99	99	98	96
ABO63962.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98	98	99	98	96
AAL71886.2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98	99	98	98	96
AAR21234.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>canadensis</i>	97	98	98	98	96
AAR19092.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>alesti</i>	97	97	97	97	94
AAR19226.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>entomocidus</i>	98	99	98	97	95
CAG25670.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	96	97	97	97	94
YP_034712.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>konkukian</i> str. 97-27	93	93	93	93	91
AAR19091.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>toumanoffi</i>	97	97	97	97	94
ABO21095.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98	98	98	98	95
ABM66446.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98	99	99	98	96
AAM88400.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i>	96	97	97	97	94
AAO34713.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	98	99	99	98	96
YP_893291.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> str. Al Hakam	93	93	93	93	91
AAB58579.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	78	79	78	78	72
AAS68517.1	Endoquitinasa <i>Serratia marcescens</i>	33	34	34	34	33