

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA



Casa abierta al tiempo

“Análisis comparativo del secretoma de *Aspergillus brasiliensis* cultivado en medio sólido con diferentes concentraciones de sacarosa”

TESIS

**que para obtener el grado de
Maestra en Biotecnología**

P R E S E N T A

Q.F.B. SILVIA GUADALUPE NAVA DEL VILLAR

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesores: Dr. Jesús Antonio Córdova López

Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete

México, D.F. Junio de 2016

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, con la referencia 001465.

Para la realización de los estudios de maestría el sustentante contó con el apoyo del CONACyT a través de la beca 300609

México D.F. a 2 de Junio del 2016

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

Análisis comparativo del secretoma de *Aspergillus brasiliensis* cultivado en medio sólido con diferentes concentraciones de sacarosa.

que presentó

Q.F.B. Silvia Guadalupe Nava del Villar

COMITÉ TUTORAL

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

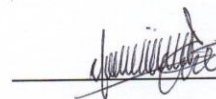
Asesor: Dr. Jesús Antonio Córdova López

Asesor: Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete

JURADO

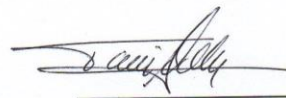
Presidente: Dr. Octavio Loera Corral

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



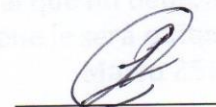
Secretario: Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



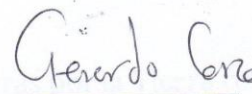
Vocal: Dr. Jesús Antonio Córdova López

Universidad de Guadalajara-CUCEI



Vocal: Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete

Universidad Nacional Autónoma de México-IBT



DEDICATORIA

A mi madre Silvia y a mi Abu Andrea, por ser mi ejemplo y mi fortaleza. Y por el apoyo incondicional en cada decisión, si mis alas han aguantado es por ustedes. Las amo.

A ti Señor, en tus designios confío.

**“Porque al que tiene, le será dado, y tendrá más; y al que no tiene, aun lo que tiene le será quitado”
Mateo 25:29.**

**"Una vez hayas probado el vuelo siempre caminarás por la Tierra con la vista mirando al Cielo, porque ya has estado allí y allí siempre desearás volver."
Leonardo da Vinci**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ernesto Favela, por la confianza y el apoyo para trabajar en este proyecto. Y por la paciencia para poder terminarlo.

Al Dr. Jesús Córdova por seguir siendo parte importante de mi desarrollo académico, y por el continuo apoyo que me ha brindado.

A los Doctores Octavio Loera y Gerardo Corzo por sus aportaciones y sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo. Y a la Dra. Tania Volke por todos los comentarios y sugerencias que fortalecieron muchas partes de este documento.

Al Dr. Gerardo Gutiérrez, por su apoyo en la identificación de las proteínas y por recibirme en el CRCC, una gran experiencia en lo personal y lo profesional.

A Ulises Carrasco por las asesorías y el apoyo en la parte experimental. A Daniel Salgado, por la compañía en los largos días de trabajo; a Gaby por escuchar todas las dudas y problemas y siempre tener un buen consejo.

A Dan, Dany tocayito, Jorge, Mimí y Vic por hacer increíble el camino de la Maestría, por las risas y el apoyo, por ser Familia. “Las huellas de los que caminan juntos, nunca se borrarán”. ¡¡Los quiero!!

A Nat, por escucharme, por reír y soñar conmigo, pero sobre todo por creer. Si siempre Luna.

A Livier, José y Victoria por recordarme la magia de la inocencia.

A todos mis compañeros de la planta piloto cuatro.

A la UAM y al posgrado en biotecnología, por darme el espacio y las herramientas para continuar con mi desarrollo académico y profesional.

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto de tres concentraciones de sacarosa inicial en el secretoma de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642 cultivado en medio sólido con agrolita como soporte inerte.

Inicialmente, se evaluó el efecto de nueve concentraciones de sacarosa, manteniendo la relación C/N en todas ellas, en el rango de 25 a 300 g/L sobre el perfil respirométrico de *A. brasiliensis* y se determinaron los siguientes parámetros para cada condición: la máxima tasa de producción de CO₂, la producción total de CO₂, la tasa específica de producción de CO₂ (μCO_2), y el tiempo de la fase *lag*. Después de un análisis de estos parámetros se seleccionaron las concentraciones de 25, 150 y 300 g/L de sacarosa inicial. El estado fisiológico para la toma de muestra, fue en el punto posterior al que el cultivo alcanzaba la máxima tasa de producción de CO₂. Las muestras de proteínas se corrieron por triplicado, para cada concentración evaluada, en geles de electroforesis bidimensional. Posteriormente, se seleccionaron 16 “spots” y se identificaron 29 proteínas.

Para la identificación y caracterización de las proteínas se emplearon varios programas bioinformáticos, los cuales proporcionaron la siguiente información: presencia de péptido señal, posibilidad de secreción no convencional, predicción de dominios transmembranales, predicción de localización subcelular, pI y PM teórico, nombre de la proteína, función de la proteína, ruta metabólica en la que está involucrada y número EC.

De las 29 proteínas identificadas, 17 se predijeron como extracelulares, 8 citoplasmáticas, 3 nucleares y 1 citoplasmática/nuclear. De estas 29 proteínas, se encontró que 5 están involucradas en la hidrólisis de carbohidratos, 7 forman parte de la respuesta al estrés oxidativo, 1 se sintetiza en respuesta al estrés osmótico, dos proteasas, 4 con función variada y 11 se determinaron como proteínas hipotéticas. La concentración de 150 g/L de sacarosa inicial fue la que mostró más diferencias, al identificarse 8 proteínas únicas para esta condición, siendo esta la mayor cantidad de proteínas únicas entre las tres condiciones estudiadas.

Finalmente, el análisis de imágenes mostró la presencia de 117 “spots”, de los cuales 22, 42 y 14 eran únicos para las concentraciones de 25, 150 y 300 g/L de sacarosa inicial, respectivamente. Una vez hecho un análisis de la variación en la cantidad normalizada de cada “spots”, se determinaron sólo 17 “spots” con baja variación (significativos) entre las tres concentraciones.

ABSTRACT

Evaluation of the effect of sucrose concentrations on the secretome profile of *Aspergillus brasiliensis* when growth on solid media.

Aspergillus brasiliensis ATCC 9642 strain was cultured on perlite, an inert solid support. The growth of *A. brasiliensis* was measured online following the production of CO₂ (%) and consumption of O₂ (%). Sucrose was the only carbon source evaluated in an interval from 25 to 300 g/L.

There was not inhibition of *A. brasiliensis* growth at any sucrose concentration tested rather this increment stimulates CO₂ production. A proteomic study was performed at three sucrose concentrations. Triplicates of extracellular proteins were run on two-dimensional gel electrophoresis from where 16 spots yielded 29 identified proteins.

For the identification and characterization of these proteins, it was used a variety of bioinformatics programs, which provided the following information: signal peptide, unconventional secretion way, prediction of transmembrane domains, subcellular location, theoretical molecular weights and isoelectric points, protein identification, metabolic pathway, and EC identification number.

The classification of those 29 proteins were: 5 glycosidases, 7 for stress oxidative response, 1 for stress osmotic response, 2 proteases, 4 with miscellaneous function and 11 hypothetical proteins. The secretome showed a considerable differences depending of sucrose concentration, with 8 unique proteins for 150 g/L of initial sucrose.

Finally, image analysis identified 117 total spots from which 22, 42 and 14 were unique spots for 25, 150 and 300 g/L of sucrose concentration, respectively. A statistical analysis of quantity normalized of each spot showed that only 17 spot were significant.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1	<i>Aspergillus</i>	2
2.2	Cultivo en medio sólido (CMS)	2
2.3	Análisis proteómico.....	6
3	JUSTIFICACIÓN	12
4	HIPÓTESIS	13
5	OBJETIVOS	13
5.1	Objetivo general	13
5.2	Objetivos específicos.....	13
6	MATERIALES Y MÉTODOS	14
6.1	Microorganismo y conservación de la cepa	15
6.2	Preparación del inóculo	15
6.3	Medio de cultivo.....	15
6.4	Condiciones del cultivo en medio sólido	16
6.5	Obtención del secretoma y separación de proteínas.....	18
6.6	Análisis de imágenes.....	20
6.7	Procesamiento y análisis de “spots”	21
6.8	Análisis estadístico	24
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
7.1	Estudio respirométrico de <i>A. brasiliensis</i> cultivado en medio sólido	25
7.2	Análisis del secretoma de <i>A. brasiliensis</i>	35
7.3	Análisis de imágenes de geles 2D del secretoma de <i>A. brasiliensis</i>	55
8	CONCLUSIONES	60
9	PERSPECTIVAS	61
10	BIBLIOGRAFÍA	62
11	ANEXOS	70

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 6.1 Estrategia experimental.....	14
Figura 6.2 Diagrama esquemático del sistema de respirometría	17
Figura 7.1 Tasas de producción de CO ₂ por <i>Aspergillus brasiliensis</i> durante 65h, en función de la concentración inicial de sacarosa (g/L) en CMS.....	26
Figura 7.2 Tasas máximas de producción de CO ₂ por <i>Aspergillus brasiliensis</i> en función de la concentración inicial de sacarosa (g/L) en CMS	27
Figura 7.3 Producción de CO ₂ por <i>Aspergillus brasiliensis</i> durante 65h, en función de la concentración inicial de sacarosa (g/L) en CMS	28
Figura 7.4 Producción total de CO ₂ por <i>Aspergillus brasiliensis</i> en función de la concentración inicial de sacarosa (g/L) en CMS	29
Figura 7.5 Geles bidimensionales de tres réplicas biológicas de <i>A. brasiliensis</i> en CMS con 30 g/L (1 a 3), 150 g/L (4 a 6) y 300 g/L (7 a 9) de sacarosa inicial	36
Figura 7.6 Imágenes representativas de los geles 2D obtenidos del secretoma de <i>A. brasiliensis</i> cultivado en medio sólido con tres diferentes concentraciones de sacarosa inicial a) 25g/L, b) 150g/L y c) 300 g/L.....	38
Figura 7.7 Predicción de la localización subcelular (WoLF PSORT) de las proteínas extracelulares identificadas en cultivos de <i>A. brasiliensis</i> ...	40
Figura 7.8 Geles maestros obtenidos de tres réplicas para las concentraciones de a) 25, b) 150 y c) 300 g/L de sacarosa inicial.	56
Figura 7.9 Diagrama de Venn del número de “spots” obtenidos de los secretomas de diferentes concentración de sacarosa.	56
Figura 7.10 Comparación del número de “spots” con CV < 20% encontrados en las tres diferentes concentraciones de sacarosa inicial	58

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 2.1 Conjunto de especies de <i>Aspergillus</i> que han sido estudiados por métodos proteómicos (Kniemeyer, 2011).....	11
Tabla 7.1 Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos para las diferentes concentraciones de sacarosa.....	30
Tabla 7.2 Resumen de los parámetros cinéticos estimados a partir de datos de producción de CO ₂ y producción de proteína en función de la concentración inicial de sacarosa.....	33
Tabla 7.3 Resumen de las características de los “spots” que se seleccionaron para su identificación por espectrometría de masas, y de los “spots” con los que coinciden en otras condiciones según el programa PDQuest.....	39
Tabla 7.4 Identificación de proteínas secretadas por <i>A. brasiliensis</i> con tres diferentes concentraciones de sacarosa inicial.....	41
Tabla 7.5 Resumen de las características de los “spots” únicos en las tres concentraciones de sacarosa inicial.....	59

1 INTRODUCCIÓN

El cultivo en medio sólido (CMS) se puede definir como el cultivo de microorganismos en un sistema que tiene una matriz compuesta de partículas sólidas, con una fase líquida unida a ellas y una fase gaseosa atrapada dentro de las partículas (Singh y Pandey, 2009). El CMS es una tecnología que presenta ventajas respecto a los cultivos líquidos, desde el punto de vista de los bajos costos de producción, la alta productividad y del menor impacto ecológico (Hölker y col. 2004). Sin embargo, el conocimiento de la fisiología microbiana en este tipo de cultivos es escaso.

El proteoma es el complemento proteico del genoma (Wilkins, 1994) y se le puede considerar como el producto final del genoma. El secretoma, estudia las proteínas secretadas por un organismo y la maquinaria celular involucrada en su secreción (Kim y col. 2007). Mientras que el genoma es relativamente estático, el proteoma es una entidad altamente dinámica, debido a que el contenido y tipo de proteína se encuentran determinados por el tipo de célula. Por lo tanto, éste varía dependiendo de las condiciones ambientales, el estado fisiológico y condiciones de estrés, entre otros factores (Rabilloud, 2000). Por lo que, la información que puede proporcionar el análisis del secretoma de un organismo, es específica para cada condición o estado que se pretende estudiar.

Las especies de *Aspergillus* juegan un papel importante en la investigación básica como modelos de estudio; varias de ellas son importantes productores de ácidos orgánicos y enzimas de aplicación industrial y farmacéutica, aunque también algunas especies son responsables de infecciones invasivas o superficiales en humanos y animales (Kniemeyer, 2011).

Tomando en cuenta lo expuesto anteriormente, resultó de interés estudiar en el presente trabajo el secretoma de una especie del género *Aspergillus* bajo condiciones de CMS, empleando diferentes concentraciones de fuente de carbono, como una manera de entender a niveles más básicos este tipo de cultivos, y aportar información para sus futuras aplicaciones. Por lo cual, se estableció la metodología para la toma de muestra y extracción de proteínas extracelulares, seguido de un análisis por electroforesis bidimensional para el estudio de perfil proteico. Posteriormente, se seleccionaron e identificaron las proteínas expresadas diferencialmente en cada condición de cultivo.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Aspergillus*

Los hongos pertenecen aun reino muy diverso de organismos eucariotas, son heterótrofos y se caracterizan principalmente por su forma filamentosa y en menor proporción presentan forman vegetativas unicelulares. Su morfología simple y sus estrategias ecológicas variables son factores que dificultan entender sus relaciones filogenéticas y su diversidad. Ciertas características que van desde la morfología y ultra estructura hasta la bioquímica y la genómica, han impulsado el conocimiento de las relaciones filogenéticas, permitiendo mejorar la clasificación pero a su vez haciéndola muy volátil (McLaughlin y col. 2009). En la actualidad el reino consta de 8 principales filum, los cuales son: Basidiomicetos, Ascomicetos, Glomeromicetos, Zigomicetos, Blastocladiomicetos, Chitriodiomicetos, Neocallimastigomicetos y Microsporidios (Blackwell y col. [Actualizado 2012]). El género *Aspergillus* se encuentra clasificado dentro del filum de los Ascomicetos.

Aspergillus se reproduce principalmente de manera asexual. La morfología del conidióforo y de sus esporas asexuales son características importantes para describir sus especies. Este género posee una amplia cantidad de especies que son importantes en los ecosistemas naturales y en actividades industriales.

Aspergillus brasiliensis es una especie que ha sido descrita y nombrada dentro de *Aspergillus* sección *Nigri*, con conidióforo biseriado (Varga y col. 2007). Se diferencia de otras especies negras de *Aspergillus*, por sus características genotípicas y por su morfología y perfiles “extrolite” (producción de metabolitos secundarios específicos) únicos (Hosseinabadi y col. 2014). La cepa empleada en este trabajo fue recientemente clasificada dentro de esta especie, siendo catalogada inicialmente como *A. niger* (Houseknecht y col. 2008).

2.2 Cultivo en medio sólido (CMS)

El cultivo en medio sólido (CMS) es un sistema que consta de una matriz compuesta por partículas sólidas, en la cual crecen los microorganismos, con una fase líquida unida a ellas y una fase gaseosa atrapada dentro de las partículas. Las propiedades físicas, como el potencial del agua y la capacidad de retención de agua o densidad

aparente, son variables que ayudan a definir las condiciones del CMS (Singh y Pandey, 2009). Los componentes microbiológicos de los CMS pueden ser cultivos puros, cultivos mixtos identificables o consorcios (Smith, 2004).

Aunque los cultivos líquidos se utilizan ampliamente en la industria de producción de enzimas y tienen ventajas en el control del proceso y buenos rendimientos, los productos de la fermentación se encuentran relativamente diluidos, dificultando los procesos de separación y liberando una gran cantidad de efluentes que impactan el ambiente. Como alternativa, los CMS han demostrado ser un método económico para producir altas concentraciones de diversas enzimas (Pandey y col. 2008). El CMS es una herramienta prometedora en el campo de la biotecnología para la producción de metabolitos microbianos, empleando medios de cultivo baratos y es particularmente adecuado para los países en vías de desarrollo (Yong y col. 2008).

2.2.1 Ventajas y desventajas de los cultivos en medio sólido

Con respecto a los cultivos líquidos, entre las principales ventajas del CMS se encuentran su simplicidad y altos rendimientos en productos. A continuación se mencionan algunas de las principales ventajas de los CMS (Singh y Pandey, 2009):

- a) Reducción del volumen del fermentador, en relación con el rendimiento del producto, ya que no hay un exceso de agua ocupando espacio.
- b) Disminución de los costos de energía para la esterilización, ya que el volumen de agua a calentar es menor.
- c) Los tanques de inoculación no son necesarios en todos los casos, debido a que los inóculos de esporas pueden usarse con éxito para inocular el medio sólido.
- d) Mejor aireación, ya que el aire puede circular fácil y libremente entre las partículas del soporte sólido, además que la película de líquido que las cubre tiene un área superficial grande en comparación con su volumen. La aireación se ve facilitada por los espacios entre las partículas de substrato y las partículas de la mezcla.
- e) Reducción de costos de operación por agitación, debido a que una agitación ocasional es suficiente.
- f) Reducción de costos de recuperación del producto y el secado; en muchos casos, el producto se puede utilizar directamente, por ejemplo, los alimentos

orientales y quesos. El producto también se puede incorporar directamente en alimento para animales.

- g) Disminución de la cantidad de solventes a utilizar cuando el producto va a ser extraído del sustrato, por ejemplo, enzimas y metabolitos.
- h) Reducción de costos de operación para el tratamiento de efluentes, debido al bajo contenido de agua en el sistema.

Sin embargo, el uso y aplicación de sistemas e CMS también presentan algunas desventajas, entre las que se incluyen las siguientes (Smith, 2004):

1. Los procesos están limitados principalmente a hongos que toleran niveles de humedad bajos.
2. Se dificulta la remoción del calor metabólico en procesos a gran escala.
3. El diseño y control de los biorreactores a escala industrial es complicado de realizar.
4. El crecimiento es difícil de monitorear, por lo que es necesario emplear métodos indirectos como la respirometría.

2.2.2 Respirometría

En los CMS, como en todo proceso que involucre el crecimiento de microorganismos y/o el aprovechamiento de sus intermediarios o productos metabólicos, es importante tener indicadores confiables que permitan registrar en línea de manera continua, el estado metabólico de un cultivo. Dependiendo de los fines que se persigan, conocer indicadores del metabolismo puede servir para seguir el consumo de un sustrato, la producción de algún metabolito o incluso la vía metabólica que está usando el microorganismo. Entre los indicadores indirectos del metabolismo microbiano, destaca la medición del oxígeno consumido y del bióxido de carbono producido, ya que los datos obtenidos pueden relacionarse con diversos aspectos del metabolismo y proporcionar información amplia y valiosa (Soto, 1993).

Un método que permite determinar el consumo biológico de oxígeno y la producción de bióxido de carbono por una población microbiana, bajo condiciones de cultivo definidas, es la respirometría (Spanjers y col. 1999). De manera general, el análisis respirométrico se reconoce como un método de balance de gases metabólicos.

Se prefiere sobre otros métodos porque evita la preparación de la muestra, daños a la biomasa, y es un método de respuesta inmediata que permite el análisis en línea. De hecho, este método se puede considerar como una medida directa del estado del proceso. El consumo de O_2 y/o la producción de CO_2 durante el proceso están relacionados linealmente con la síntesis de biomasa en un sistema aeróbico. Por lo anterior, se le considera un método indirecto para la estimación del crecimiento. En procesos anaerobios, la producción de CO_2 es un indicador directo de la síntesis de biomasa y está asociada a la formación de productos, como ocurre en la fermentación alcohólica (Rodríguez-Leon y col. 2008).

Para poder hacer uso de este método, es necesario determinar la composición de los gases de salida en un fermentador durante el cultivo microbiano, para lo cual puede utilizarse un metabolímetro. El procedimiento implica un balance para el O_2 y el CO_2 , considerando el flujo de aire a través del fermentador (Rodríguez-Leon y col. 2008).

2.2.3 Represión catabólica

Algunas investigaciones han mostrado que, a diferencia del cultivo líquido, en el CMS no se presenta la represión catabólica (RC) en presencia de altas concentraciones de azúcares (Graminha y col. 2008). Sin embargo, la ausencia de represión catabólica no es una regla general, sino que depende de las vías de síntesis de las enzimas individuales (Hölker y col. 2004).

La RC es el fenómeno en el que se inhibe la síntesis de una gran cantidad de enzimas microbianas que requieren una señal química, denominada inductor. Estas enzimas son reprimidas cuando en el medio de cultivo se encuentra en abundancia un sustrato fácilmente fermentable, como la glucosa y el glicerol, entre otros (Viniegra y Favela, 2006).

Hasta ahora, numerosos estudios han reportado una elevada producción de enzimas en CMS con altas concentraciones de glucosa. Lo anterior sugiere que los CMS son procesos donde la represión catabólica de enzimas inducibles no está presente o es mínima. Por ejemplo, Ramesh y Lonsane (1991) emplearon concentraciones de hasta 150 g/L de glucosa en la producción de α -amilasa por

Bacillus licheniformis sin observar el efecto de RC. de Souza y col. (2001) reportaron la ausencia de RC en un cultivo de *Aspergillus tamaris* para la producción de xilanas, al usar concentraciones de hasta 100 g/L de glucosa. Por otra parte, para una cepa de *A. niger* Aa-20 no se observó el efecto de RC en la producción de tanasas utilizando hasta 50 g/L de glucosa (Aguilar y col. 2001) o en la producción de invertasa empleando hasta 200 g/L de glucosa (Aranda y col. 2006). En todos los casos mencionados, además de la glucosa como fuente de carbono, estaba presente el inductor específico para cada enzima mencionada.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar estas diferencias en la producción enzimática, las cuales se relacionan con las características propias del CMS, como son el bajo contenido de agua, la difusión del sustrato en la matriz sólida y los cambios en la relación entre la tasa de consumo y el coeficiente de difusividad del sustrato. Sin embargo, aún no queda claro por qué la producción de enzimas en los CMS es significativamente más alta que en los cultivos líquidos, así como, el mínimo o nulo efecto de la adición de altas concentraciones de glucosa (Aranda y col. 2006).

2.3 Análisis proteómico

En 1994, Wilkins definió el término proteoma como “el complemento proteico de un genoma”. En la cascada de eventos reguladores que van desde la transcripción del gen hasta la síntesis de la proteína activa, el proteoma puede ser visto como el producto final del genoma. Mientras que el genoma es relativamente estático, el proteoma es una entidad altamente dinámica, debido a que la diversidad y contenido de proteínas están determinados por las condiciones celulares, y estas varían en función de las condiciones ambientales, su estado fisiológico y el estrés, entre otras (Rabilloud, 2000).

Aunque la proteómica se introdujo como concepto a mediados de los años 90, tiene profundas raíces desde la década de 1970. De manera similar a la genómica y transcriptómica, la proteómica ha evolucionado al incorporar procesos de alto rendimiento que permiten análisis más rápidos de un mayor número de proteínas (Ferreira de Oliveira y de Graaff, 2010). Un análisis proteómico se define entonces, como el análisis o valoración global de las proteínas expresadas en un estado biológico

particular, y es una poderosa herramienta que puede proporcionar una comprensión sistemática de eventos que tienen lugar a nivel molecular (Kim y col. 2007).

Por otra parte, el secretoma se ha definido como el conjunto de proteínas secretadas por un organismo y la maquinaria celular involucrada en su secreción. Los estudios relacionados con el secretoma son relevantes para el entendimiento del estilo de vida saprofito de los hongos filamentosos, dado que una gran cantidad de ellos secretan numerosas enzimas implicadas en la degradación de polímeros empleados como fuente de carbono. Además, existen numerosos estudios del secretoma fúngico, relacionados con proteínas patógenas. Un aspecto importante que facilita el estudio del secretoma es que la preparación de la muestra es más rápida y sencilla que la extracción y preparación de proteínas intracelulares (Kim y col. 2007).

Aunque la proteómica se introdujo como concepto a mediados de los 90's, tiene profundas raíces desde la década de 1970. De manera similar a la genómica y transcriptómica, la proteómica ha evolucionado al incorporar procesos de alto rendimiento que permiten análisis más rápidos de un mayor número de proteínas (Ferreira de Oliveira y de Graaff, 2011).

El análisis proteómico se define entonces, como el análisis o valoración global de las proteínas celulares expresadas en un estado biológico particular, y es una poderosa herramienta que puede proporcionar una comprensión sistemática de eventos que tienen lugar a nivel molecular (Kim y col. 2007).

2.3.1 Técnicas empleadas en el análisis proteómico

El análisis proteómico consta de una gran variedad de técnicas, y el empleo de las mismas está determinado por las características de cada proyecto de investigación y de la accesibilidad a ellas. A continuación nos enfocaremos en las técnicas empleadas cuando se trabaja con electroforesis bidimensional.

2.3.1.1. Electroforesis bidimensional (EF-2D)

La preparación de la muestra es el primer paso para llevar a cabo esta técnica, es un factor clave en el éxito de un análisis proteómico basado en la electroforesis de dos

dimensiones (EF-2D). Idealmente debería existir un método universal para la preparación de las proteínas, sin embargo, no existe un método único que pueda ser aplicado a todos los tipos de muestras, y la mayoría de las veces el procedimiento óptimo se encuentra experimentalmente. Es importante resaltar que las condiciones de crecimiento del cultivo microbiano deben estandarizarse y optimizarse. La fase o etapa de crecimiento en la cual se toma la muestra tiene un gran impacto sobre el estado bioquímico de la célula (Rabilloud, 2000)

Dependiendo de lo que se busque en la muestra, existen diferencias en los métodos empleados. Generalmente, para la electroforesis bidimensional (EF-2D) se emplean muestras sin fraccionar, dada su simplicidad y reproducibilidad, no obstante, en algunos casos se requiere fraccionar la muestra. Ejemplos típicos incluyen la reducción de la complejidad de las muestras o la eliminación de proteínas de alta abundancia que ocultan otras de menor abundancia (Weiss y Görg, 2008).

Para la obtención del secretoma, se debe remover cualquier elemento celular. Esto se realiza principalmente con lavados, centrifugación, y una concentración; se pueden remover o eliminar elementos que causan interferencias en la disolución de las proteínas o durante el isoelectroenfoque. Ejemplos de estos elementos son enzimas proteolíticas, sales, lípidos, ácidos nucleicos, polisacáridos, fenoles en plantas, material insoluble y/o proteínas de alta abundancia. La disolución de proteínas se realiza en una solución buffer que contiene agentes caotrópicos, surfactantes (detergentes), agentes reductores, anfolitos acarreadores y/o inhibidores de enzimas como fosfatasa y/o proteasas) (Weiss y Görg, 2008).

En la EF-2D, un gran número de proteínas presentes en extractos biológicos son separadas de acuerdo a su punto isoeléctrico y peso molecular (O'Farrel, 1975). En ella se emplea un gradiente de pH inmovilizado (IPG) junto con la electroforesis en geles de poliacrilamida y duodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Actualmente es el método más empleado en la tecnología de separación de proteínas para el análisis proteómico. El procedimiento es empleado para entregar un mapa intacto de proteínas, que refleje los cambios en los niveles de expresión, isoformas o modificaciones post-traduccionales de las mismas. El método es técnicamente complejo, debido no sólo al elevado dinamismo de las proteínas en los extractos de células y tejidos, sino también a la diversidad de las propiedades fisicoquímicas que poseen (Weiss y Görg, 2008).

La principal aplicación de los geles obtenidos de la EF-2D continúa siendo la obtención de perfiles de expresión de proteínas, ya que se puede comparar cualitativa y cuantitativamente los perfiles de dos diferentes muestras, y analizar la variación en una misma muestra. La aparición o desaparición de manchas (“spots”) proporciona información acerca de la expresión diferencial de proteínas, mientras que su intensidad da información cuantitativa de los niveles de expresión de proteínas (Graves y Haystead, 2002). Las imágenes digitalizadas de los geles 2D, se comparan con el uso de programas informáticos que facilitan tanto la identificación como la cuantificación de los “spots” de proteínas entre diferentes muestras (Yan y col. 1999).

Sin embargo, a pesar de sus múltiples ventajas, la técnica aún presenta algunos problemas. Entre ellos, que invierte una gran cantidad de tiempo y que está limitada por el número y tipo de proteínas que pueden resolverse en el gel. Por ejemplo, ciertas proteínas hidrofóbicas muy grandes no pueden entrar en el gel durante la primera dimensión (Celis y Gromov, 1999), y las proteínas con una acidez o alcalinidad extrema no tienen buena resolución al estar en los extremos del gel (Gorg y col. 2000). Otra limitación es la incapacidad para detectar proteínas presentes en muy baja concentración, o bien que tienden a formar complejos estables con otras proteínas o péptidos presentes en la muestra.

2.3.1.2. Espectrometría de masas (EM)

Una vez que se obtienen los geles 2D, la espectrometría de masas (EM) permite obtener información estructural de la proteína, como la masa y la secuencia de aminoácidos. Esta información se usa para identificar las proteínas a través de una búsqueda en bases de datos de proteínas. La EM también se puede emplear para determinar el tipo de modificaciones en una proteína. La recolección de información por EM se puede dividir en tres etapas: preparación de la muestra, ionización y análisis de masas (Graves y Haystead, 2002).

Previo a la EM, la digestión “in-gel” de muestras proteicas es más eficiente para la recuperación de proteínas que otros métodos (Courchesne y col. 1997). En la digestión, la proteína es cortada en enlaces específicos por una tripsina, degradándola a los péptidos que la constituyen. La información que se obtiene al analizar los péptidos es más completa que si se analizara la proteína sin “digerir”. Para

muchas aplicaciones, los péptidos obtenidos después de la digestión “in-gel” necesitan ser purificados para remover impurezas como sales, amortiguadores y detergentes, provenientes de la electroforesis; ya que estos compuestos pueden interferir con la EM (Yates, 1998).

Para que una muestra de proteínas pueda analizarse por EM, las moléculas deben estar cargadas eléctricamente y secas; esto se logra al desolvatar los iones. Los métodos más comunes para conseguirlo son la ionización por “electrospray” (ESI) y la ionización/ desorción en matriz asistida por láser (MALDI). En ambos métodos, los péptidos son convertidos en iones por la adición o pérdida de uno o más protones. Ambas técnicas son métodos “suaves” de ionización que permiten la formación de iones sin una pérdida significativa de la integridad de la muestra. Esto es importante, ya que se puede obtener una información más precisa de la masa de las proteínas y péptidos en su estado nativo (Graves y Haystead, 2002). En ESI, las muestras líquidas fluyen por un tubo microcapilar dentro de un orificio en el EM, donde una diferencia de potencial entre el capilar y la entrada al equipo, genera una nube de gotas cargadas (Yates, 1998; Fenn y col. 1989). Como el solvente se evapora, el tamaño de las gotas disminuye, lo que resulta en la formación de iones desolvatados (Fenn y col. 1989).

El análisis por EM permite la conversión de péptidos o proteínas en iones moleculares. Esto es posible por el analizador de masas del EM, el cual resuelve los iones moleculares con base en su masa y su carga, en condiciones de vacío. La mayoría de los EM consiste en cuatro elementos básicos: fuente de ionización, uno o más analizadores de masas, un espejo de iones y un detector (Graves y Haystead, 2002). El análisis de proteínas o péptidos por EM se puede dividir en dos categorías generales: huella peptídica y secuenciación de aminoácidos. En el análisis de la huella peptídica, se mide la masa de un péptido individual en una mezcla, y se usa para crear un espectro de masas (Henzel y col. 1993). En la secuenciación de aminoácidos, un procedimiento conocido como espectrometría de masas en tándem (MS/MS) se usa para fragmentar un péptido específico en péptidos más pequeños, los cuales se usan para deducir la secuencia de aminoácidos (Graves y Haystead, 2002).

Finalmente, las bases de datos permiten obtener información estructural de la proteína, ya sea por secuenciación de Edman o por EM, para usarla en la identificación

de proteínas. El objetivo de la búsqueda en base de datos es permitir una identificación rápida y precisa de una gran cantidad de proteínas (Quadroni y James, 1999). El éxito de la búsqueda en las bases de datos depende de la calidad de los datos obtenidos en la EM, de la base de datos empleada y del método usado en la búsqueda.

2.3.2 Perspectivas del estudio proteómico en *Aspergillus* y los CMS

La secuenciación de diversos genomas de especies de *Aspergillus* (Galagan y col. 2005; Machida y col. 2005, Pel y col. 2007) ha abierto el camino para el análisis global de la expresión de proteínas para este género, incluyendo la caracterización de proteínas sin función asignada. Con la aplicación de diferentes métodos de análisis proteico, se pueden dar los primeros pasos para estudios proteómicos de *Aspergillus* bajo diferentes condiciones de crecimiento y estrés (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Especies de *Aspergillus* que han sido estudiadas por métodos proteómicos (Kniemeyer, 2011).

Especie	Tamaño del genoma (Mb)	Modelos de genes	Proteoma intracelular	Secretoma	Proteoma de pared o membrana	Subproteoma	Condiciones de estrés
<i>A. fumigatus</i>	29.4 29.2	9 887 10 099	X	X	X	Mitocondria	ERO, hipoxia, calor
<i>A. niger</i>	33.9 34.9	14165 11 200	X	X	-	Microsomas	-
<i>A. flavus</i>	36.3	13 071	X	X	-	-	Calor
<i>A. oryzae</i>	37	12 074	-	X	-	-	-
<i>A. nidulans</i>	30.1	10 701	X	-	X	-	ERO, estrés osmótico, hipoxia
<i>A. terreus</i>	29.3	10 406	-	X	-	-	-

ERO: especies reactivas de oxígeno, X: estudios realizados, -: estudios que no se han realizado.

Los avances en la comprensión de la proteómica de los CMS pueden ser aplicados a nuevos tipos de cultivo, sistemas híbridos de cultivo sólido y líquido, o en algunos novedosos sistemas de fermentación líquida que incluirían algunos estímulos de los cultivos sólidos (Barrios-González, 2010). Este conocimiento puede tener impacto en otras aplicaciones del CMS, tales como la producción de alimentos, combustibles, productos químicos y biorremediación (Singhania y col. 2009).

3 JUSTIFICACIÓN

Existen abundantes estudios que respaldan la serie de ventajas que ofrecen los cultivos sólidos sobre los líquidos; sin embargo, son escasos los estudios que profundizan en la fisiología de los cultivos sólidos. Ampliar dicha información ayudaría a entender mejor el origen de las numerosas ventajas del CMS.

Los hongos filamentosos son los principales microorganismos empleados en los CMS y son organismos muy importantes para diversas aplicaciones en la industria biotecnológica. De hecho, el incremento en el número de genomas secuenciados resalta la importancia de su estudio (Kim y col. 2007). La integración de los análisis proteómicos a estudios genómicos y transcriptómicos, puede ayudar a mejorar e incrementar el entendimiento de varios aspectos de la fisiología y bioquímica de hongos. Dado que, estos organismos secretan una gran cantidad de proteínas para adaptarse al estilo de vida saprófito, los estudios enfocados hacia el secretoma son de particular relevancia (Han y col. 2010). Al ser *Aspergillus* uno de los géneros de hongos filamentosos más estudiado y una especie de gran importancia industrial, se tomó el secretoma de *A. brasiliensis* como modelo de estudio, empleando diferentes concentraciones de sacarosa, con el fin de profundizar en la comprensión de su fisiología durante el crecimiento en CMS. Dicho conocimiento puede tener un impacto importante en futuras aplicaciones de los cultivos sólidos.

Aunado a lo anterior, es importante resaltar que a la fecha, no hay investigaciones que hayan descrito el secretoma de este hongo, y que los estudios proteómicos relacionados con el cultivo sólido son escasos.

4 HIPÓTESIS

La comparación de los secretomas de *Aspergillus brasiliensis*, cultivado en medio sólido con diferentes concentraciones de sacarosa inicial, revelará la presencia de al menos una proteína diferente entre las diversas condiciones.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la concentración de sacarosa en el secretoma de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642 cultivado en medio sólido.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la concentración de sacarosa sobre la producción de CO₂ en cultivos sólidos de *A. brasiliensis*.
2. Obtener el perfil electroforético en dos dimensiones de extractos proteicos extracelulares de cultivos sólidos de *A. brasiliensis* con diferentes concentraciones de sacarosa.
3. Analizar e identificar las proteínas expresadas diferencialmente en el secretoma de *A. brasiliensis* por efecto de diferentes concentraciones de sacarosa.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se revisarán las metodologías y los materiales utilizados para alcanzar los objetivos propuestos en este trabajo. Comenzaremos por la cepa empleada, el medio de cultivo y las condiciones para realizar el CMS. Posteriormente, se hace referencia a los métodos utilizados para la extracción de proteínas y análisis del secretoma, el análisis de imágenes y finalmente la identificación de las proteínas.

La estrategia experimental de este trabajo consistió de cinco etapas (Figura 6.1). Primero, se evaluó el efecto del medio de cultivo con concentraciones crecientes de sacarosa sobre los perfiles respirométricos del hongo. A partir de estos resultados, se seleccionaron tres concentraciones para obtener el secretoma. Posteriormente, se realizó el estudio del secretoma hasta la identificación de proteínas.

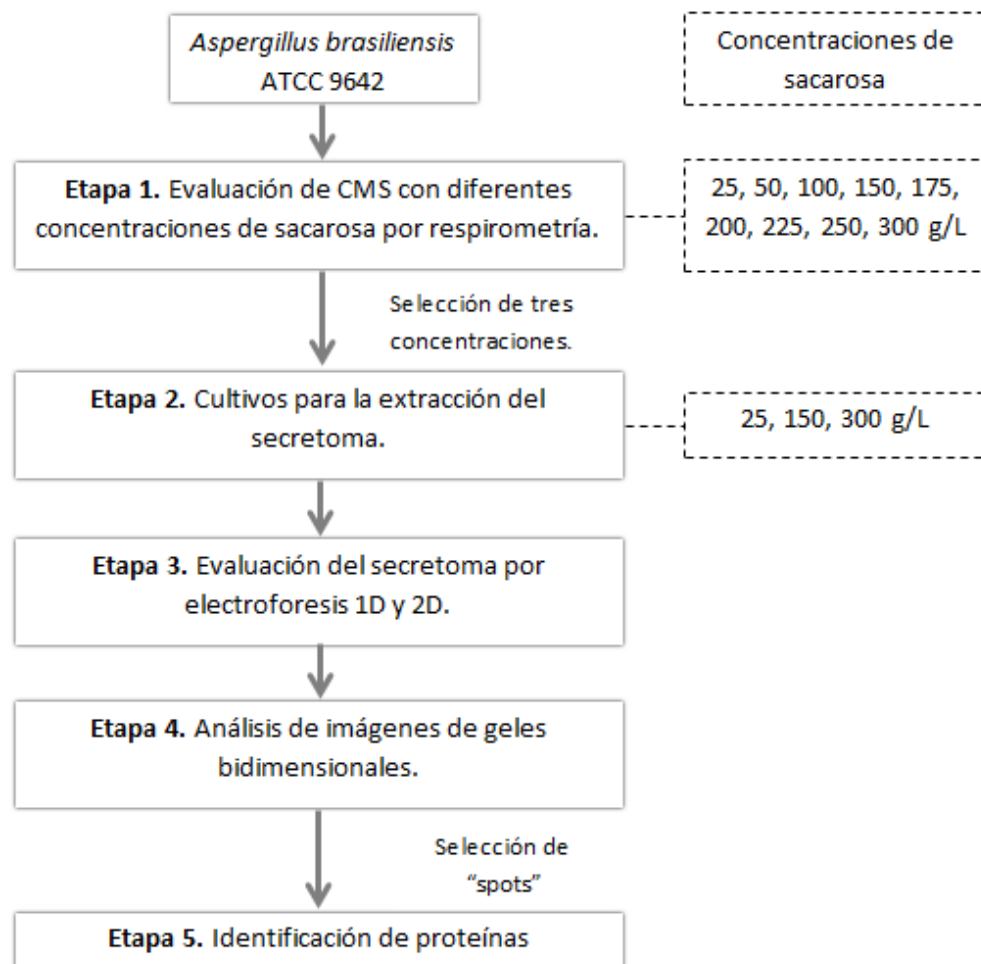


Figura 6.1 Estrategia experimental

6.1 Microorganismo y conservación de la cepa

Se utilizó la cepa de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642. A partir de un vial con la cepa liofilizada se inocularon dos tubos inclinados con medio agar papa-dextrosa (PDA). Se incubaron a 30°C por 7 días, posteriormente, se seleccionó un tubo, al que se adicionaron 5 ml de Tween 80 (0.05%, v/v) para suspender las esporas. Se inocularon dos matraces Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de PDA con 1 mL de la suspensión de esporas y se incubaron a 30°C por 7 d. Al final del cultivo, las esporas se suspendieron con 30 mL de la solución de Tween 80. La suspensión de esporas se centrifugó a 3750 rpm durante 30 min. Finalmente, las esporas se suspendieron en 6 mL de una solución de glicerol al 40% (v/v) y se almacenaron en criotubos a -20°C.

6.2 Preparación del inóculo

La propagación de la cepa se realizó transfiriendo esporas de los criotubos a tubos inclinados con medio PDA. Los tubos inclinados se incubaron a 30°C por 7 d. Para preparar el inóculo, se adicionaron 5 mL de Tween 80 (0.05%) a los tubos inclinados. El contenido de los tubos se homogenizó con vórtex y se tomaron alícuotas de 1 mL con las que se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de PDA, los matraces se incubaron a 30°C por 7 d.

Las esporas se cosecharon con 30 mL de Tween 80 (0.05%). Esta mezcla se agitó utilizando un agitador magnético para desprender las esporas de la superficie del medio. Se tomó 1 mL de la suspensión y el número de esporas por mL de solución, se determinó con el uso de una cámara de Neubauer.

6.3 Medio de cultivo

Para los ensayos en medio sólido, se utilizó el medio mínimo Hill y Kafer (2001) modificado. Se prepararon dos soluciones de sales y una solución de oligoelementos de Hutner, cuya composición fue la siguiente:

- 1) Mezcla de sales 20x (g/L): NaNO₃, 120; KCl, 10.4; KH₂PO₄, 16.3; K₂HPO₄, 20.9.
- 2) Solución de MgSO₄ 200x (g/L): MgSO₄·7H₂O, 104.

- 3) Solución de oligoelementos (g/100mL): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.2; H_3BO_3 , 1.1; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.16; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.16; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.11; $\text{Na}_4\text{EDTA} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

El medio mínimo, que contenía 20 g/L de sacarosa, se preparó mezclando 50 mL de la solución de sales, 5 mL de la solución de MgSO_4 y un mL de la solución de oligoelementos, por litro de medio.

Se realizaron cultivos con concentraciones iniciales de sacarosa de 25, 50, 100, 150, 175, 200, 225, 250 y 300 g/L. El resto de los nutrientes se aumentó en la misma proporción que la sacarosa.

6.4 Condiciones del cultivo en medio sólido

6.4.1 Preparación del soporte

Se utilizó agrolita como soporte inerte. Se tamizó la agrolita durante 10 min utilizando tamices del número 6, 12, 16 y 20. Se recolectó el contenido retenido en los tamices 16 y 20, obteniendo el soporte con un tamaño de partícula entre 0.85 y 1.70 mm. Posteriormente, la agrolita se lavó dos veces con agua destilada a temperatura ambiente y una vez con agua caliente, se escurrió y colocó en charolas de aluminio para secarla en una estufa a 60°C durante 48 h. Finalmente, se almacenó en bolsas de plástico cerradas hasta su uso.

6.4.2 Condiciones del cultivo

Como condición inicial para los cultivos, se estableció una relación de 11 mL de medio de cultivo por cada 6 g de agrolita. Dadas las concentraciones elevadas de sacarosa que se evaluaron, se añadió un exceso de agua a los medios en proporción al aumento de sacarosa, por lo que a los 11 mL iniciales (para 25 g/L de sacarosa), se añadieron 0.35, 1, 1.7, 2, 2.5, 2.9, 3.4 y 4.4 mL adicionales de agua destilada para los cultivos con 50, 100, 150, 175, 200, 225, 250 y 300 g/L de sacarosa inicial, respectivamente.

Para realizar los cultivos, se colocaron 6 g de agrolita seca en matraces Erlenmeyer de 250 mL, a cada matraz se adicionaron 9 mL del medio de cultivo y se

homogenizó dándole tres golpes por cada cuarto de vuelta, durante 5 vueltas. El resto del medio de cultivo se conservó en tubos. Los matraces con agrolita y los tubos con los medios de cultivo se esterilizaron a 95°C durante 10 min.

Los matraces se inocularon utilizando una relación de 1×10^7 esporas/ml de medio. Para ello, se adicionaron entre 0.5 y 2.5 mL de inóculo a los medios de cultivo en los tubos, se agitaron en vórtex y se adicionaron al matraz correspondiente. El contenido de cada matraz se homogeneizó de la misma manera descrita en el párrafo anterior.

Cada matraz se conectó a un metabolímetro (Figura 6.2), para monitorear la producción de CO_2 y el consumo de O_2 durante el CMS. Los matraces se incubaron a 30°C con un flujo de aire de 20 a 40 mL/min. Los cultivos para estudios respirométricos se realizaron por duplicado y se incubaron hasta alcanzar la máxima producción de CO_2 . Los cultivos para estudio del secretoma, se realizaron por triplicado y se incubaron hasta alcanzar la máxima tasa de producción de CO_2 .

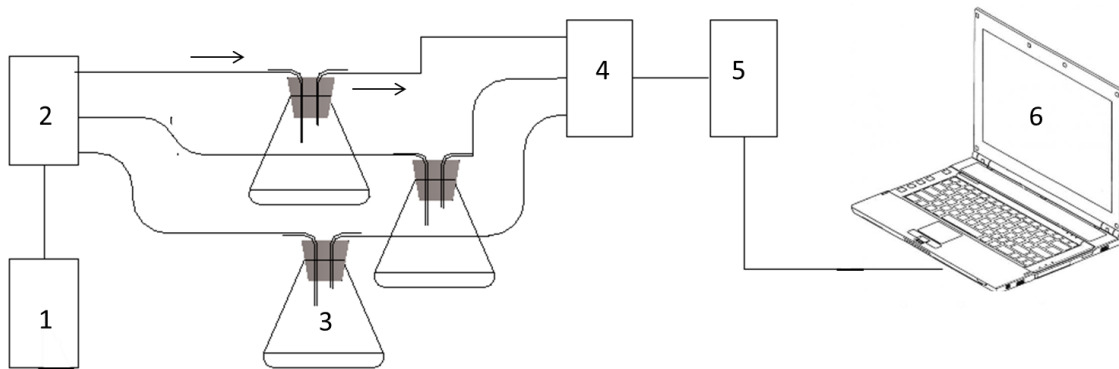


Figura 6.2 Diagrama esquemático del sistema de respirometría. 1: Compresor de aire, 2: Válvulas reguladoras del flujo de aire, 3: Matraces con agrolita, 4: Columnas con sílica, 5: Detectores de CO_2 , O_2 y flujo de aire, 6: Computadora.

El metabolímetro es un sistema de monitoreo y análisis automático de la composición de la corriente gaseosa que sale de los biorreactores, este sistema se desarrolló en la planta piloto de Fermentación en Medio Sólido de la Universidad Autónoma Metropolitana. Este equipo consta de un sistema de válvulas solenoides (ASCO, USA) controladas por un PLC (Programmable Logic Controller) que permiten el análisis de una corriente gaseosa por válvula. El flujo de aire pasa a través de un medidor de flujo, un analizador infrarrojo de CO_2 (United Phosphorous, LTD, USA), y

un detector dispersivo de O₂ (United Phosphorous, LTD, USA). Los datos obtenidos son almacenados en un registrador automático (Data Logger) y procesados a través de un software analizador de datos (LabView 2009) que genera una hoja de Excel (Torres-Mancera, 2013; Juárez-Luna, 2014).

Los datos se obtienen en un archivo de Excel generado por el LabView. Como resultado del análisis de la fase gaseosa se obtiene el flujo volumétrico de aire (mL/min) y la composición volumétrica de CO₂ y O₂ (mL/100 mL aire). Estos datos se transforman en tasas de producción de CO₂ y consumo de O₂ mediante la ley general de los gases ideales, haciendo correcciones por presión (debidas a la altura de la ciudad de México) y temperatura (debidas a la incubación). A partir de los datos de la tasa de producción de CO₂ se estimó la producción de CO₂ por medio de la integración con un método numérico, en este caso empleando la regla del trapecio (Juárez-Luna, 2014). Una vez obtenidos estos datos, se pueden asociar los parámetros cinéticos a la respiración del microorganismo y relacionarlo de manera indirecta con el crecimiento (Raimbault, 1980), a través del ajuste de los datos experimentales al modelo exponencial, utilizando la función Solver de Excel.

6.5 Obtención del secretoma y separación de proteínas

6.5.1 Preparación de muestras para electroforesis

Los extractos extracelulares para el análisis del secretoma se tomaron en el punto inmediato después de alcanzar la máxima tasa de producción de CO₂ (en promedio 50 min después). Las muestras se refrigeraron durante 30 min para detener el metabolismo. A continuación, se adicionaron 60 mL de agua destilada fría (4°C) con 20 µL de un coctel inhibidor de proteasas (P8215, Sigma). Los matraces se agitaron a 200 rpm durante 30 min a 4°C. La muestra se filtró a través de un papel Whatman No. 41 para remover el material sólido. Posteriormente, el filtrado se centrifugó dos veces a 7000 rpm durante 20 min a 4°C, para remover todo el material celular restante.

El extracto extracelular se concentró por ultrafiltración empleando filtros Amicon Ultra-15 (Marca), con tamaño de corte de 10 kDa. Las muestras kDa. La muestra se concentró centrifugando a 3750 rpm durante 15 min a 4°C. Posteriormente, se

diafiltraron con un amortiguador Tris-HCl 20 mM con un pH de 7.2, bajo las mismas condiciones de centrifugación que la ultrafiltración.

Se cuantificó proteína en el extracto crudo, y en el extracto concentrado, empleando el ensayo de proteína de Bio-Rad, basado en el método de Bradford (1976). Se siguieron los procedimientos estándar y de micro-ensayo como los recomienda el fabricante. La curva patrón se realizó con seroalbúmina bovina como estándar (Anexo 1). Después de medir proteína, las muestras se repartieron en alícuotas con la concentración necesaria de proteína para la electroforesis y se liofilizaron. Las muestras liofilizadas se conservaron a -20°C hasta el momento de su uso.

6.5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación electroforética de proteínas, se realizó utilizando geles verticales de poliacrilamida en presencia del detergente aniónico dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE), utilizando el sistema de amortiguador discontinuo de Laemmli (1970). En el Anexo 2 se presenta la composición de soluciones y amortiguadores usados en la separación de proteínas. La electroforesis se llevó a cabo en un sistema Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad). Los reactivos fueron suministrados por Bio-Rad.

Se emplearon geles de resolución con una concentración de poliacrilamida del 10 y 12 %, en un amortiguador Tris-HCl 0.375 M y pH de 8.8 (Anexo 2). El gel de compactación se preparó con una concentración de poliacrilamida al 4% y amortiguador Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8 (Anexo 2). La electroforesis se realizó por duplicado para cada muestra.

Los geles se prepararon con un grosor de 1 mm y 10 pozos. Las muestras con 30 µg de proteína se solubilizaron en 40 µL de amortiguador de muestra Laemmli (Bio-Rad), se agitaron en vórtex y se calentaron a 95°C durante 5 min. Posteriormente, se cargaron a los pozos del gel. La electroforesis se realizaron a un voltaje constante de 150 V durante aproximadamente 1h. Transcurrido este tiempo, los geles se retiraron del equipo y se cubrieron con solución fijadora (Anexo 2) durante 30 min en agitación lenta. Se cambió la solución por Azul de Coomassie coloidal G-250 (Candiano y col. 2004) (Anexo 2) y se tiñeron en agitación suave durante toda la noche. Posteriormente,

los geles se destiñeron con varios lavados en agua destilada y se digitalizaron en un fotodocumentador (Bio-Rad).

6.5.3 Electroforesis bidimensional

El isoelectroenfoque (IEF) se llevó a cabo empleando tiras de gradiente de pH inmovilizado de 7 cm (IPG, ReadyStrips, BioRad), con un rango de pH de 3 a 10 en un equipo para IEF PROTEAN i12 (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Sobre la tira IPG, se colocaron 100 µg de proteína solubilizada en 125 µL de amortiguador de solubilización (Anexo 2), y se rehidrató 14h a 50V. Tras la rehidratación, se realizó el IEF utilizando un programa que consistió en los siguientes pasos:

1. Aumento de voltaje rápido de 0 a 250 V durante 15 min,
2. Aumento de voltaje gradual de 500 a 4000 V durante 1h,
3. Aumento de voltaje rápido de 4000 V hasta alcanzar los 15 000 V

Al concluir el IEF, cada tira se equilibró cubriéndola con 2 mL de amortiguador de equilibrio con DTT (Anexo 2), la incubación se realizó en un lugar oscuro a temperatura ambiente durante 15 min, después de los cuales se eliminó la solución. Se realizó una segunda incubación con 2 mL de amortiguador de equilibrio con iodoacetamida (Anexo 2) e incubando en las mismas condiciones descritas. Una vez transcurrido el tiempo de la incubación se desechó la solución y la tira se sumergió durante 5 segundos en el amortiguador de electrodo (Anexo 2) para electroforesis.

La segunda dimensión se realizó mediante electroforesis en SDS-PAGE utilizando geles de resolución con concentraciones de acrilamida del 10 y 12%. Las tiras IPG procedentes de la primera dimensión (IEF) se colocaron directamente sobre los geles, rellenando el espacio sobrante con agarosa tibia fundida (Bio-Rad). La electroforesis se realizó a 150V durante aproximadamente 1h; después de ello, los geles se trataron como en el apartado anterior.

6.6 Análisis de imágenes

Los geles se digitalizaron utilizando el Gel Doc EZ system (Bio-Rad). Las imágenes fueron analizadas y cuantificadas empleando el programa PDQuest versión 8.0.1 de Bio-Rad. Este mismo software se empleó para automatizar el proceso de

identificación de “spots” en las imágenes, y para cuantificar su intensidad. Cada gel se “limpió” de artefactos. Los geles maestros se obtuvieron utilizando triplicados provenientes de las réplicas biológicas de cada concentración de sacarosa (25, 150 y 300 g/L). Para que un “spot” se considerara válido debía estar presente en al menos dos geles réplica; aquellos que sólo aparecían en un gel, se eliminaron del análisis. Los “spots” se normalizaron con el modelo de regresión local del programa, y se calculó el promedio y la desviación estándar para cada “spot”. Se realizó un experimento de alto nivel, para comparar los geles maestros de las tres condiciones, para poder realizar análisis de perfiles de expresión y abundancia.

Para la determinación de los pesos moleculares y el punto isoelectrico (pI), para cada condición, se seleccionaron los “spots” localizados en los extremos de los geles, es decir el de mayor y menor peso molecular, así como el de mayor y menor pI . Los pesos moleculares se extrapolaron en la curva de calibración del marcador de peso molecular (MPM) (Anexo 3), y el pI se determinó manualmente en cada imagen del gel. Se promediaron los resultados para cada réplica y se realizó la anotación en PDQuest, de esta manera el programa asignó para cada “spot” el peso molecular y pI .

6.7 Procesamiento y análisis de “spots”

6.7.1 Digestión triptica

Los “spots” relevantes (expresados diferencialmente) se cortaron manualmente de los geles bidimensionales, empleando puntas para pipeta estériles, las cuales se cortaron para obtener diámetros similares a cada “spot”. A cada “spot” recuperado, se le colocó en un tubo Eppendorf (1.5 mL) y se le realizó digestión triptica (Shevchenko y col. 1997), la cual se describe en los siguientes párrafos.

Los “spots” fueron desteñidos con una solución que contenía metanol:ácido acético:agua (50-5-45%), y deshidratados con tres lavados con acetonitrilo (ACN), el ACN residual se eliminó en una centrifuga de vacío (Heto CT110). Posteriormente, para reducir las proteínas, los “spots” se cubrieron con DTT 10 mM disuelto en NH_4HCO_3 100 mM durante 1h a 56°C. Esta solución se eliminó y para alquilar las proteínas, se añadió un volumen igual de iodoacetamida 55 mM disuelto en NH_4HCO_3 100 mM y se incubó durante 45 min a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Se desechó esta solución y se hizo un lavado con NH_4HCO_3 100 mM, y posteriormente se

deshidrató con ACN realizando tres lavados. El ACN residual se eliminó, centrifugando al vacío. Los “spots” se rehidrataron con una solución de NH_4HCO_3 (100 mM) y las proteínas se hidrolizaron añadiendo 5-10 μL de tripsina (Promega; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solución). A continuación, se incubaron 10 min en hielo, se añadieron 15 μL de la solución de bicarbonato de amonio y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Para la extracción de los péptidos, a cada tubo Eppendorf se le agregó 20 μL de NH_4HCO_3 100 mM, se agitó con vórtex y se incubó durante 10 min. Después se centrifugaron a 5000 rpm por 2 min y se tomó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió 3 veces. El volumen de sobrenadante final se evaporó centrifugando al vacío. Los péptidos se resuspendieron en una solución de ácido fórmico (Anexo 2) y se microfiltraron en dispositivos centrífugos (Nanosep, Pall) con tamaño de poro de 0.2 μm , centrifugando a 12000 rpm durante 5 min. Las muestras filtradas se evaporaron por centrifugación al vacío, y finalmente se almacenaron a -20°C,

6.7.2 Espectrometría de masas

Las muestras digeridas con tripsina, se resuspendieron en 20 μL de una solución acuosa con 0.1% de ácido fórmico-agua-de acetonitrilo (0.1-94.9-5%), se disolvieron y se depositaron en insertos. Para evitar la presencia de burbujas, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 10s. Posteriormente, las muestras se llevaron al LC-MS/MS. Se utilizó un equipo LC Agilent 1100 (Palo Alto, CA, USA) conectado a un espectrómetro de masas (EM) a través de un divisor T para permitir la alimentación de muestras a flujos bajos. Para la separación de los péptidos, se usó una columna C18 con perlas de 5 μm de diámetro (Rainin Woburn, MA, USA), que fueron empaquetadas en un capilar de sílice fundido (10.5 cm x 100 μm ID) a una presión de 1000 psi, utilizando gas nitrógeno. Las muestras de péptidos se cargaron en la columna por 45 minutos bajo la misma presión. Los péptidos se eluyeron con gradiente, usando como solvente A una solución acuosa con 0.1% de ácido fórmico y solvente B Acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico. Tras el lavado inicial con 95 % de solvente A durante 10 minutos; los péptidos se eluyeron de la columna con un gradiente lineal de 5-60% de solvente B durante 90 minutos a una velocidad de flujo aproximadamente de 200 nL/min, directamente dentro de una trampa de iones lineal de espectrometría de masas (LTQ), a través de un electrospray (Thermo Fisher, San Jose, Ca, USA) con voltaje de

2500 V. El equipo se ajustó para adquirir espectros EM/EM de los nueve iones precursores más abundantes de cada escaneo MS con una serie de tres repeticiones; cada repetición se realizó cada 5s. La exclusión dinámica se habilitó a los 160s. Los algoritmos de los EM en RAW tándem se convirtieron en una lista de picos usando ReAdW, seguido por bymzXML2O. Los datos de la lista de picos fueron investigados usando Mascot 1.9 (Matrix Science, Boston, MA, USA).

6.7.3 Identificación de proteínas

Las proteínas contenidas en los “spots” fueron identificadas mediante un análisis por cromatografía líquida (LC) - espectrometría de masas (EM/EM). Las secuencias resultantes se compararon con las contenidas en las bases de datos utilizando el programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Con la identificación, se realizó el análisis de cada proteína, consultando las siguientes bases de datos:

- BLAST P (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>), se utilizó para obtener el nombre, número de acceso, superfamilia y homología. La información de su posible función proviene de la proteína con mayor coincidencia contra secuencia de proteínas no redundantes (nr) en la base de datos del NCBI.
- Base de datos del genoma de *Aspergillus* (<http://aspgd.org/>), de donde se obtuvo información más específica de las proteínas y características particulares.
- Servidor TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), se utilizó para predecir la probabilidad de dominio(s) transmembranales en la proteína.
- Servidor SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), se utilizó para predecir la probabilidad de que existiera un péptido señal.
- Servidor SecretomeP 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>), se utilizó para predecir la probabilidad de secreción por vías no convencionales en las proteínas.
- WoLF PSORT (http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html), se utilizó para predecir la localización subcelular de las proteínas.
- Uniprot (<http://www.uniprot.org>), se usó para obtener la función biológica y molecular de las proteínas.

- KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), se usó para obtener el número E.C. de proteínas con función enzimática, así como la clase y ruta metabólica en la que se encuentran involucradas las proteínas.
- Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), a través de la alineación de secuencias identifica dominios de las proteínas, relacionando dichos dominios con familias o clanes de proteínas dentro de la base de datos de la página.

6.8 Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y en los casos necesarios se empleó la prueba LSD de Fisher para las comparaciones múltiples. Para ambas pruebas el nivel de significancia fue de $\alpha=0.05$. Se utilizó el programa Excel (2010, Microsoft) para realizar los análisis.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la primera parte se presentan los resultados obtenidos de los estudios respirométricos, a partir de los cuales se seleccionaron las concentraciones de sacarosa usadas para obtener y analizar el secretoma, así como para establecer el tiempo para la toma de la muestra. En la segunda parte, se presentan los resultados obtenidos de las técnicas de separación de proteínas, observándose los perfiles proteicos en una y dos dimensiones, y aquellos resultados obtenidos del análisis de imágenes para seleccionar los “spots” más relevantes. Finalmente, se describen los resultados de la identificación de las proteínas después de su análisis por EM y consulta en bases de datos.

7.1 Estudio respirométrico de *A. brasiliensis* cultivado en medio sólido

En una primera etapa se obtuvieron cinéticas de producción de CO₂ en medios de cultivo con diferentes concentraciones de sacarosa. El análisis de las curvas de producción de CO₂ permitió definir la concentración inicial de sacarosa y el tiempo de muestreo de los cultivos para el análisis de secretoma.

7.1.1 Efecto de la concentración de sacarosa en el perfil respirométrico de *A. brasiliensis*

El crecimiento de la cepa de *A. brasiliensis* ATCC 9642 cultivada en medios con concentraciones de sacarosa de 25 a 300 g/L, se evaluó indirectamente, midiendo su tasa de producción de CO₂. Este parámetro es un indicador del estado fisiológico de la cepa, ya que la tasa de producción de CO₂ es un reflejo de la actividad metabólica del microorganismo.

La alta concentración de nutrientes en un medio tiene efectos negativos en el metabolismo microbiano, debido al aumento en la fuerza iónica del medio, a la alta presión osmótica o a la represión catabólica durante la síntesis de algunas enzimas. Por ello, en este trabajo se evaluó un rango de concentraciones de sustrato inicial (25 a 300 g/L de sacarosa), para determinar el efecto de esta condición sobre la fisiología del cultivo y la composición del secretoma. No se evaluaron concentraciones mayores

debido a los problemas asociados a la solubilidad de algunos nutrientes en concentraciones elevadas.

En la Figura 7.1 se presentan las curvas de la tasa de producción de CO₂ (mg de CO₂/h.gramo de soporte inicial (g.s.i)) en los medios con diferentes concentraciones de sacarosa inicial. El tiempo de cultivo aproximado para todas las concentraciones fue de 65 h. Se observa cómo el aumento en la tasa de producción de CO₂ es proporcional al aumento en la concentración inicial de sacarosa. Este comportamiento se observa más claramente en la Figura 7.2, donde se grafica la tasa máxima de producción de CO₂ en función de la concentración inicial de sacarosa. Se observa una tendencia lineal de este parámetro, al aumentar la concentración de sacarosa. Por lo anterior, se puede concluir que, en el rango de concentraciones evaluado, no hubo un efecto negativo de la concentración inicial de sacarosa sobre la tasa de producción de CO₂. El tiempo en el que se obtuvo la tasa máxima de producción de CO₂ aumentó en función del aumento en la concentración de sacarosa, encontrando que las tasas máximas se obtuvieron en un rango de 29 a 53 h de cultivo (Figura 7.1).

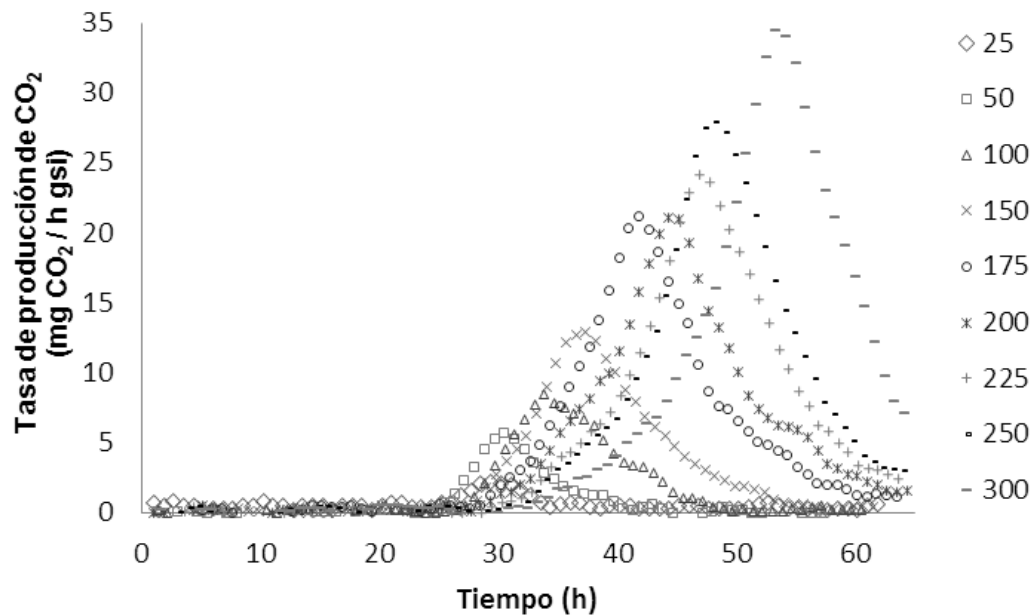


Figura 7.1 Tasas de producción de CO₂ por *Aspergillus brasiliensis* durante 65h, en función de la concentración inicial de sacarosa (g/L) en CMS. Se presentan los promedios de dos réplicas independientes de cada concentración. gsi: gramos de soporte inicial.

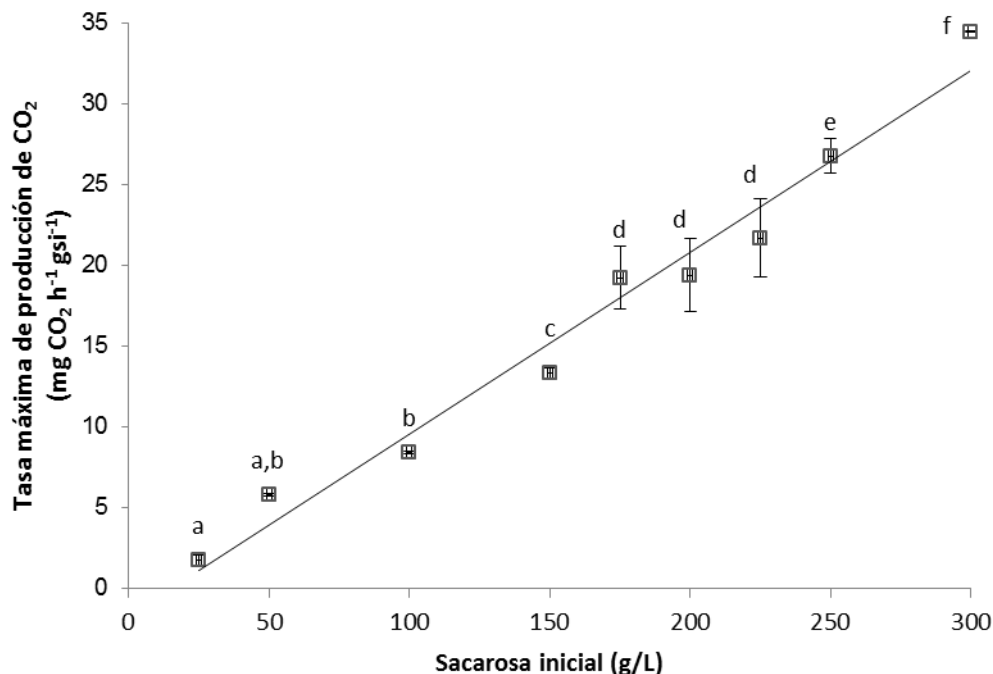


Figura 7.2 Tasas máximas de producción de CO₂ por *Aspergillus brasiliensis* en función de la concentración inicial de sacarosa (g/L) en CMS. Los puntos en la gráfica representan el promedio y la desviación estándar de duplicados de cada condición, Los promedios de las tasas máximas con letras diferentes son significativamente diferentes, según la prueba LSD ($\alpha=0.05$).

Se realizó una prueba de ANOVA, la cual dio como resultado diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$) en las tasas máximas de producción de CO₂ en función de la concentración de sacarosa. Una prueba LSD mostró diferencias en las concentraciones de 150, 250 y 300 g/L de sacarosa con respecto a todas las demás, y las concentraciones de 25-50, 50-100 y 175-200-225 g/L de sacarosa no mostraron diferencias entre sí. Los datos de esta prueba y de los demás análisis estadísticos del trabajo se encuentran en el Anexo 4.

Al integrar los datos que se muestran en la Figura 7.1, se obtiene la Figura 7.3, la cual muestra los datos acumulados de producción de CO₂ a través del tiempo de cultivo. El total de CO₂ producido fue proporcional a la concentración de sacarosa inicial (Figura 7.4). Se observó un comportamiento con tendencia lineal, aunque menos marcado que con la tasa máxima de producción de CO₂.

Auria y col. (1995) evaluaron la producción de CO₂ por *A. niger* en cultivo sólido con concentraciones de 100 a 400 g/L de sacarosa inicial, presentando la producción

de CO₂ para las concentraciones de 100 y 300 g/L. Estos autores observaron que los cultivos alcanzan el inicio de la fase estacionaria en tiempos menores a las 30h de cultivo, lo cual difiere considerablemente con nuestros resultados, en los que para las mismas concentraciones de sacarosa inicial, esta etapa se alcanza pasadas las 50h de cultivo. Lo anterior se puede atribuir al aumento en 10 veces del tamaño del inóculo o al cambio de la relación C/N, con respecto al trabajo de Auria y col. en el cual, la relación C/N fue de 12 y en el presente trabajo fue de 8.5. Comparando con el mismo trabajo se observó que la producción de CO₂ al inicio de la fase estacionaria de *A. brasiliensis* fue aproximadamente tres veces superior en la concentración de 300 g/L de sacarosa y del doble en la concentración de 100 g/L de sacarosa. Esto puede deberse a las diferencias entre las dos especies de *Aspergillus*, y a las diferentes condiciones de cultivo entre los trabajos.

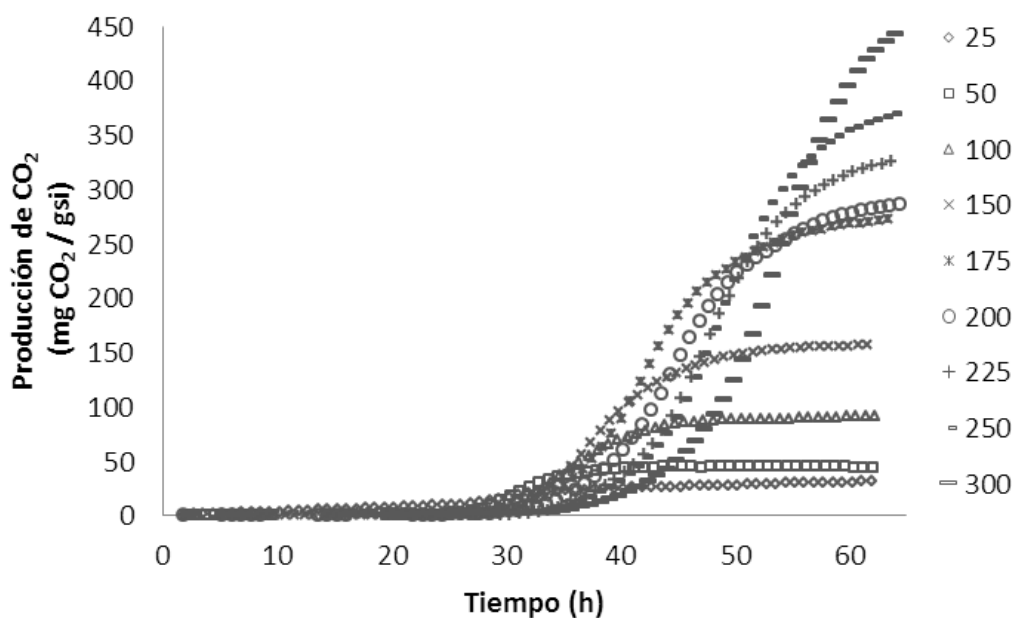


Figura 7.3 Producción de CO₂ por *Aspergillus brasiliensis* durante 65h, en función de la concentración inicial de sacarosa (g/L) en CMS. Se presentan los promedios de dos réplicas independientes de cada concentración.

A partir de los datos de producción de CO₂ se estimaron varios parámetros cinéticos asociados (Tabla 7.1). Se estimaron los valores de la tasa específica de producción de CO₂ (μ_{CO_2}) usando el modelo exponencial. El valor de μ_{CO_2} disminuye conforme aumenta la concentración inicial de sacarosa (Tabla 7.1); sin embargo, con altas concentraciones de sacarosa inicial (>150 g/L), los valores de μ_{CO_2} mostraron una gran similitud entre sí; dichos valores de μ_{CO_2} son similares a los reportados por Auria y

col. (1995) al aumentar la concentración de sacarosa con *A. niger*. La μ_{CO_2} para la concentración más baja de sacarosa no se determinó, al no poder realizar un ajuste óptimo de los datos al modelo.

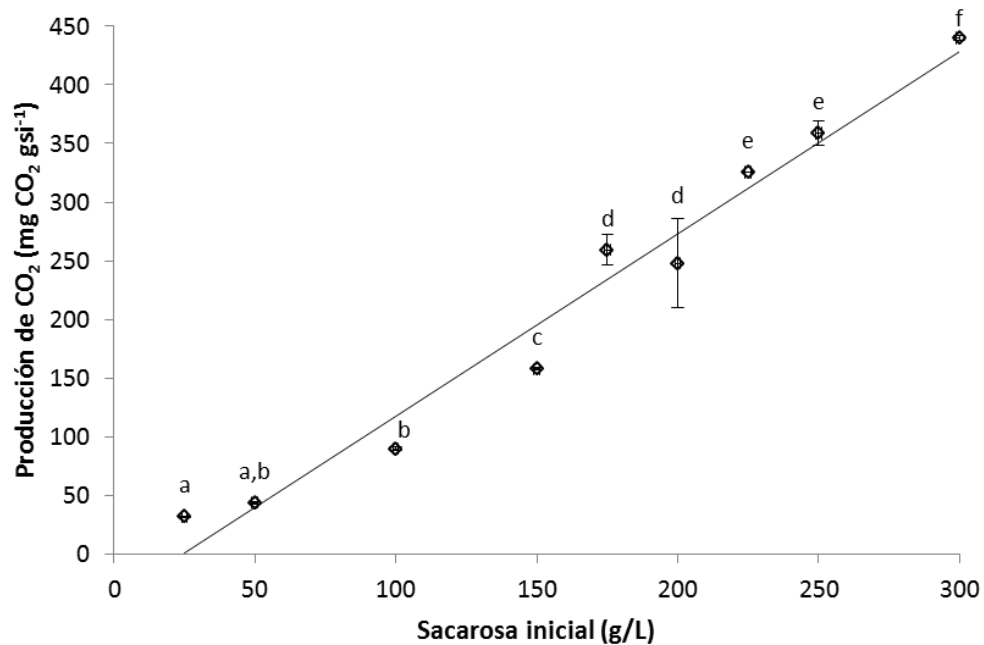


Figura 7.4. Producción total de CO₂ por *Aspergillus brasiliensis* en función de la concentración inicial de sacarosa (g/L) en CMS. Los puntos en la figura representan el promedio y la desviación estándar de duplicados de cada condición. Los promedios de producción de CO₂ con letras diferentes son significativamente diferentes, según la prueba LSD ($\alpha=0.05$).

Una prueba de ANOVA determinó que existían diferencias significativas entre los valores de μ_{CO_2} , y una prueba LSD mostró que la concentración de 50 g/L es diferente al resto de las concentraciones. La comparación de las concentraciones de 100 y 150 g/L de sacarosa no mostró diferencias significativas entre sí, pero si fueron diferentes significativamente con respecto al resto de las concentraciones. En cuanto al rango de concentraciones de 175 a 300 g/L, la única comparación que mostró diferencias significativas fue la de 200-300 g/L de sacarosa. Con base en esta serie de resultados, se puede concluir que, empleando elevadas concentraciones de sacarosa (> 175g/L), el valor de μ_{CO_2} no se modifica, aunque variables como la tasa máxima de producción de CO₂ sí muestran diferencias significativas.

Tabla 7.1 Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos para las diferentes concentraciones de sacarosa*.

Concentración inicial de sacarosa (g/L)	Tasa máxima de producción de CO ₂ (mg/h gsi)	Producción de CO ₂ (mg/gsi)	μ _{CO2} (1/h)	Tiempo lag (h)
25	1.76 (0.32) ^a	31.86 (0.43) ^a	ND	ND
50	5.82 (0.06) ^{ab}	44.03 (1.29) ^{ab}	0.554 (0.001) ^a	25.49 (0.58)
100	8.44 (0.05) ^b	89.96 (1.26) ^b	0.371 (0.009) ^b	25.69 (1.41)
150	13.32 (0.37) ^c	157.89 (1.28) ^c	0.338 (0.002) ^b	25.91 (0.39)
175	19.27 (1.93) ^d	259.31 (12.73) ^d	0.249 (0.012) ^{c,d}	25.08 (2.69)
200	19.43 (2.26) ^d	248.02 (38.05) ^d	0.275 (0.050) ^c	26.56 (2.10)
225	21.71 (2.41) ^d	325.70 (ND) ^e	0.214 (ND) ^{c,d}	27.62 (0.52)
250	26.81 (1.07) ^e	358.66 (10.10) ^e	0.212 (0.001) ^{c,d}	25.98 (0.32)
300	34.50 (0.04) ^f	440.03 (2.01) ^f	0.181 (0.003) ^d	24.36 (2.26)

*Parámetros promedios de dos replicas (desviación estándar). Letras diferentes son diferentes significativamente ($\alpha=0.05$), según una prueba LSD.

El tiempo de la fase Lag (Tabla 7.1) se determinó a partir del logaritmo natural de los datos de producción de CO₂, obteniéndose una función lineal al graficar contra el tiempo. La intersección en el eje de las abscisas correspondió al tiempo lag del cultivo (Juárez-Luna, 2014). Al igual que en la determinación de la μ_{CO2}, el valor para la concentración más baja de sacarosa no se pudo determinar por este método. De acuerdo con la prueba de ANOVA, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos lag de las diferentes concentraciones de sacarosa. Algunos factores que se han reportado, que podrían influir en la fase lag son la humedad inicial y el tamaño de inóculo (Rodríguez-Leon y col. 2008). A diferencia de los resultados de este estudio, Nuñez-Gaona (2004) observó un aumento en el tiempo lag en función del aumento en la concentración de sacarosa. Nuñez-Gaona atribuyó este efecto en la fase lag a que, al aumentar la concentración de sacarosa, la cantidad de agua disponible en solución es menor, lo que afecta el acceso del microorganismo al sustrato, haciendo más lento su consumo.

Los diferentes parámetros cinéticos obtenidos por el análisis respirométrico, demuestran la relevancia y la utilidad de este método de monitoreo en línea. Dado que, se querían establecer las concentraciones para el estudio comparativo del secretoma, se seleccionaron tres concentraciones de sacarosa. El principal criterio de selección fue la tasa máxima de producción de CO₂, por ser reflejo del metabolismo en un punto en específico y por la sensibilidad de dicha variable al aumento de la concentración de sacarosa.

La concentración de sacarosa mínima y máxima evaluadas tuvieron un efecto significativo en los parámetros cinéticos estimados. La concentración intermedia que más diferencias mostró fue la de 150 g/L. Por lo que, los estudios del secretoma se realizaron con 25, 150 y 300 g/L.

Además de brindar un parámetro de selección, los datos obtenidos de los estudios respirométricos, también aportaron información acerca de los tiempos aproximados en los que se debía tomar la muestra, y sobre los flujos adecuados de aire a emplear en los cultivos. Esto último, debido a que en este experimento, el flujo de aire en la concentración más baja fue muy elevado y los datos de CO₂ no tuvieron la calidad adecuada para hacer el ajuste al modelo exponencial, lo cual se resolvió en los cultivos realizados para la extracción del secretoma.

7.1.2 Determinación del estado fisiológico para la obtención del secretoma

En la búsqueda de caracterizar el proteoma de un cultivo, se debe considerar que el proteoma es dinámico. El proteoma de un cultivo es el resultado de su estado fisiológico. En respuesta a señales externas o internas, las proteínas pueden sufrir modificaciones postraduccionales, translocaciones dentro de la célula, o ser sintetizadas o degradadas. Así, examinar el proteoma de una célula es como tomar una foto de la expresión de proteínas en un tiempo dado. Considerando todas las posibilidades, cualquier genoma puede dar lugar a un infinito número de proteomas (Graves y Haystead, 2002).

Considerando lo anterior, fue necesario establecer una condición para la toma de muestras, tal que correspondiera a un estado fisiológico definido, y que fuera repetible. Esta fue la principal razón por la que se utilizó el monitoreo en línea de CO₂ y O₂ de los cultivos fúngicos, con el uso de un metabolímetro. Se estableció como criterio

para la toma de muestra, aquel tiempo en el que se observó el decaimiento en la tasa de producción de CO₂, inmediatamente después de haber alcanzado el máximo. Es decir, en el que se observa la parte final de la fase de aceleración de producción de CO₂ y el inicio de la fase de mantenimiento.

Esta estrategia permitió que el perfil proteico de los triplicados de las muestras de 25, 150 y 300 g/L de sacarosa inicial, tomados bajo este criterio, tuviera una gran similitud entre ellos, por lo que sirvió para confirmar que el criterio era útil para los objetivos de este trabajo.

En la Figura 7.1 se observan los tiempos de máxima tasa de producción de CO₂ para todas las concentraciones evaluadas; en el caso de los medios de cultivo con 25, 150 y 300 g/L de sacarosa estos tiempos fueron de 29, 37 y 52 horas de cultivo, respectivamente. Así, las muestras para el análisis de los secretomas se tomaron de en el punto inmediato posterior al registro del máximo valor de la tasa de producción de CO₂. Para cada medio de cultivo se realizaron tres réplicas, lo que permitió obtener tres extractos proteicos y, por consiguiente, tres geles de electroforesis 2D para cada concentración de sacarosa.

7.1.3 Estimación de parámetros cinéticos

A partir del registro de CO₂ es posible monitorear la actividad metabólica de un cultivo microbiano (Bellon-Maurel y col. 2003), y permite estimar datos como la tasa máxima de producción de CO₂, tasa específica de producción de CO₂, producción total de CO₂ y tiempo *lag*. La relevancia de calcular estos parámetros surge de la necesidad de determinar un criterio para el muestreo de los proteomas, tal que permita obtener reproducibilidad y repetitividad biológica y técnica, y que permita hacer una comparación confiable entre diferentes condiciones. A partir de las curvas de producción de CO₂ se realizó el cálculo de todos los parámetros mencionados. Estos datos se presentan en la Tabla 7.2, en donde se muestran los promedios obtenidos de las réplicas biológicas de tres cultivos con su desviación estándar.

Tabla 7.2 Resumen de los parámetros cinéticos estimados a partir de datos de producción de CO₂ y producción de proteína en función de la concentración inicial de sacarosa*.

Concentración inicial de sacarosa (g/L)	Producción de CO ₂			μ_{CO_2} (h ⁻¹)	Tiempo lag (h)	Proteína extracelular (μg/gsi)
	Tasa máxima (mg/h gsi)	Tiempo de la tasa máxima (h)	Total (mg/gsi)			
25	3.4 (0.3) ^a	32.6 (0.6) ^a	15.2 (2.4) ^a	0.377 (0.06) ^a	26.9 (0.7) ^a	26.2 (13.9) ^a
150	15.1 (1.1) ^b	43.3 (0.6) ^b	106.8 (9) ^b	0.239 (0.01) ^b	26.4 (0.8) ^a	281.1 (76) ^b
300	29.5 (2.5) ^c	55.5 (1.8) ^c	220.9 (18.8) ^c	0.185 (0.01) ^c	30.1 (2.1) ^b	699.7 (196.4) ^c

*Parámetros promedios de las réplicas (desviación estándar). Letras diferentes son diferentes significativamente ($\alpha=0.05$), según una prueba LSD. gsi:gramo de soporte inicial.

Se realizó un ANOVA para todos los parámetros presentados en la Tabla 7.2, y se determinaron diferencias significativas entre las tres concentraciones de sacarosa inicial evaluadas. Para determinar qué condiciones eran diferentes se realizó una prueba LSD a todos los parámetros, en todos los casos excepto en el tiempo lag, las tres condiciones fueron significativamente diferentes entre sí. En el tiempo lag, la concentración de 300 g/L mostro diferencias significativas con respecto a las otras dos concentraciones, y las concentraciones de 25 y 150g/L de sacarosa no mostraron diferencias significativas entre sí.

En la Tabla 7.2 se observa que para los parámetros de tasa máxima de producción de CO₂, producción total de CO₂ y concentración de proteína, los valores se incrementaron conforme aumenta el contenido de sacarosa. Lo anterior indica que el metabolismo es más activo conforme se aumenta el sustrato, y que no existe efecto negativo en las condiciones evaluadas. En cuanto a la μ_{CO_2} , se observó un comportamiento inverso, es decir, conforme aumenta la cantidad de sacarosa el valor disminuye. Este resultado es consistente con lo observado por Romero-Gómez (2001), en donde se encontró que el mayor valor se obtuvo en la concentración de 25 g/L de sacarosa y disminuyó en las concentraciones de 50 y 100 g/L; dichos resultados se obtuvieron para una cepa de *A. niger* cultivada en PUF (espuma de poliuretano). El valor de μ_{CO_2} para la concentración de 25 g/L (Tabla 7.2) fue mayor al reportado por Romero-Gómez (2001) para la misma concentración y es similar al reportado por Montiel-González y col. (2004) para una concentración de 100 g/L de sacarosa inicial

para una cepa de *A. niger*. Estas diferencias se pueden deber a las diferencias en las condiciones de cultivo y de la cepa entre los diferentes trabajos.

Existen pocos estudios que han evaluado el comportamiento de los cultivos sólidos con elevadas concentraciones de sustrato. Solis-Pereira y col. (1996) evaluaron concentraciones de 100 a 450 g/L de glucosa; Gutiérrez-Rojas y col. (1995) evaluaron concentraciones de 300 y 400 g/L de glucosa, ambos estudios se realizaron con una cepa de *A. niger*. Si bien estos estudios no proporcionan valores cinéticos, para compararlos con los resultados aquí mostrados, muestran que no hubo efecto negativo en el metabolismo del hongo debido a las elevadas concentraciones de sustrato inicial.

Núñez-Gaona (2004) evaluó el crecimiento de *A. niger* cultivado en PUF con concentraciones de 100, 200, 300 y 400 mg sacarosa/gramo de soporte seco (g.s.s). Para fines comparativos, las concentraciones que se evaluaron en el presente trabajo se pueden expresar como 46, 275 y 550 mg sacarosa/g.s.s. Núñez-Gaona observaron que la tasa específica de crecimiento aumentó al aumentar la concentración de 100 mg/g.s.s a 200 y 300 mg /g.s.s y disminuyó en 400 mg/g.s.s. Dicho comportamiento difiere de lo observado en este trabajo, pues la μ_{CO_2} siguió un patrón inverso a la concentración de sacarosa. Las diferencias en los valores de μ_{CO_2} se pueden atribuir a las características de los soportes empleados (PUF y agrolita).

Por otra parte, la determinación de proteína extracelular es de gran utilidad en este trabajo dado que, para los experimentos de electroforesis se estimó que sería necesario tener entre 1 y 1.5 mg de proteína por cada condición. En la Tabla 7.2 se puede observar que la concentración de proteína extracelular para la concentración de 25 g/L de sacarosa es muy baja, por lo que se realizaron 9 repeticiones de dicha condición. Así, una réplica biológica consistía en la proteína total de 3 cultivos independientes, para obtener una concentración de proteína con la que se pudiera trabajar. El análisis de proteína en los extractos presentó gran variación entre las réplicas, la cual se atribuye a posibles interferencias de los componentes del extracto proteico que no se removieron por la diafiltración.

A pesar de la variación entre replicas, existen diferencias significativas en la concentración de proteína extracelular para cada concentración de sacarosa inicial. Por lo anterior, es posible concluir que, al aumentar la concentración de sacarosa aumenta

la concentración de proteína secretada, lo cual difiere a lo observado en los cultivos líquidos. Por ejemplo, Han y col. (2010) observaron que en cultivos líquidos, la secreción de proteínas es altamente suprimida en presencia de altas concentraciones de fuente de carbono (glucosa y sacarosa).

7.2 Análisis del secretoma de *A. brasiliensis*

7.2.1 Electroforesis 2D

Para el análisis del secretoma por geles de dos dimensiones (2D), con el fin de observar la reproducibilidad, primero se realizaron geles SDS-PAGE de una dimensión (1D) por duplicado para cada réplica biológica (Anexo 5). Posteriormente, las muestras se corrieron en geles bidimensionales.

En una primera etapa, se realizó la separación por electroforesis bidimensional, empleando geles con 10% de acrilamida. El uso de estos geles no permitió la resolución de proteínas de bajo peso molecular por lo que se decidió hacer la separación electroforética en geles 2D con 12% de acrilamida. A los geles con 10% de acrilamida no se les realizó análisis de imagen, ni corte de “spots”, por la razón antes descrita y porque además presentaban una curvatura en el frente del gel. Sin embargo, dichos geles aportaron información sobre la distribución del pI de las proteínas, mostrando una mayor abundancia en un rango de pH de 4 a 7, indicando que las proteínas secretadas por *A. brasiliensis* bajo estas condiciones son principalmente ácidas. Esto coincide con lo reportado por Han y col. (2010), pues observaron que el secretoma de *A. terreus* tenía una mayor cantidad de proteínas en un rango de pH de 4 a 7, cuando se cultivó con sacarosa como fuente de carbono en concentraciones de 30 y 100 g/L en cultivo líquido. Han y col. también observaron esta abundancia de proteínas en ese rango de pH al emplear glucosa y almidón, como únicas fuentes de carbono en concentraciones de 30 g/L. Jun y col. (2013) observaron este mismo comportamiento en el secretoma de *Trichoderma reesei* con concentraciones moderadas de xilosa y lactosa.

En la Figura 7.5 se presentan los geles 2D con 12% de poli(acrilamida) correspondientes a tres réplicas biológicas de los cultivos con 25, 150 y 300 g/L de sacarosa inicial. Para cada concentración, las réplicas presentaron patrones similares,

en cuanto a su punto isoeléctrico (pI) y peso molecular. El análisis de imágenes de los geles 2D permitió demostrar diferencias importantes entre las tres condiciones. La concentración intermedia presentó una mayor abundancia de proteínas en todo el rango de pesos moleculares, en cambio, los geles de 25 g/L de sacarosa presentaron escasas proteínas en el rango de 25 a 75 kDa. Los geles de 300 g/L mostraron abundancia sólo en las proteínas de bajo peso molecular (<25 kDa). En todos los casos, predominaron las proteínas de bajo peso molecular y pI ácido y, aunque las proteínas con pI básico son de baja abundancia, se observó en todos los geles, la ausencia de proteínas con pI en el rango de pH de 8 a 9.

Una vez que se obtuvieron geles con patrones similares entre réplicas y, a falta del programa PDQuest en esta etapa del trabajo, se procedió a seleccionar los “spots” con criterios visuales. En la siguiente sección se presentan los criterios utilizados para seleccionar los “spots” para su análisis por LC-MS/MS.

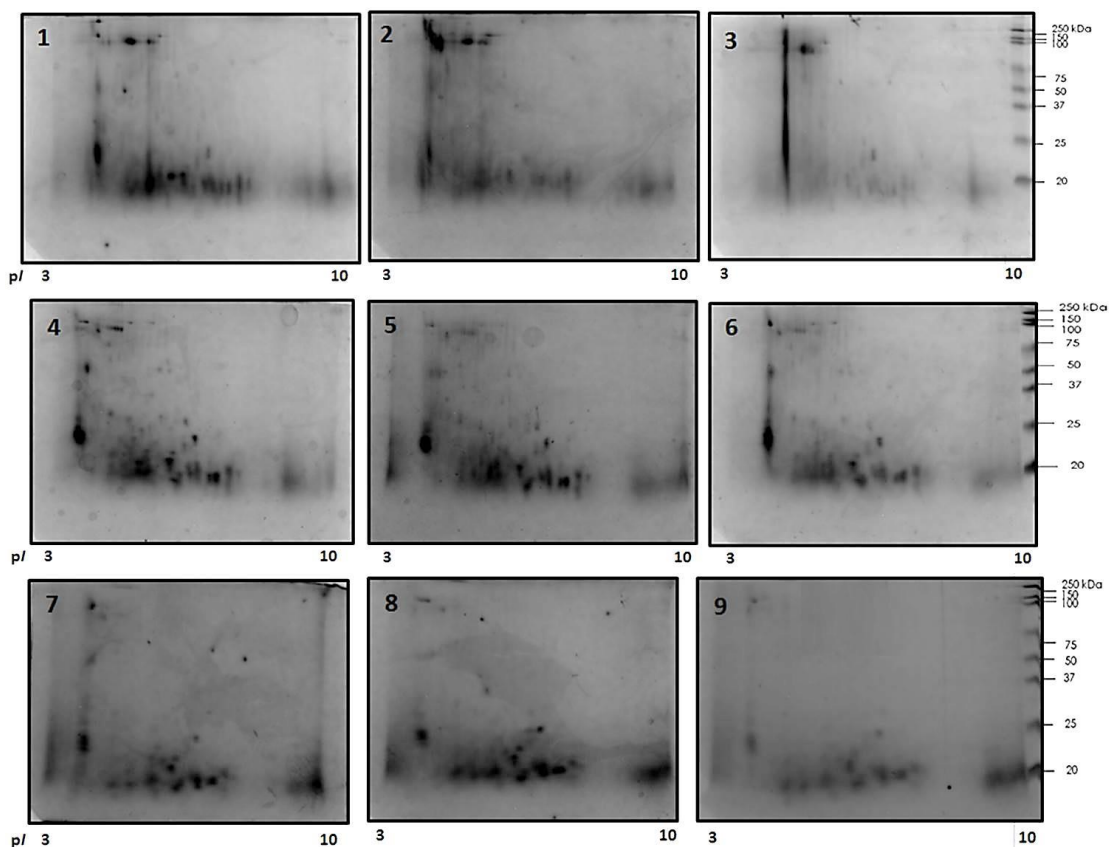


Figura 7.5 Geles bidimensionales de tres réplicas biológicas de *A. brasiliensis* en CMS con 30 g/L (1 a 3), 150 g/L (4 a 6) y 300 g/L (7 a 9) de sacarosa inicial. En cada gel se cargaron 100 μ g de proteína. El isoelectroenfoque se realizó en un rango de pH de 3 a 10 y la separación y electroforética con geles de poliacrilamida al 12%.

7.2.2 Selección de “spots” e identificación de proteínas por LC-MS/MS

Los criterios para seleccionar los “spots” para su análisis por LC-MS/MS fueron los siguientes: 1) cambio de intensidad de un “spot” entre las tres condiciones, 2) presencia de “spots” únicos en una o dos de las tres condiciones estudiadas. Se analizó también un “spot” que se encontraba presente en las tres condiciones y en la misma posición, como “spot” de referencia. Bajo estos criterios, se seleccionaron, cortaron y analizaron por LC-MS/MS 16 “spots”, cuya ubicación en los geles se presenta en la Figura 7.6

Una vez que se procesaron las imágenes de los geles en el software PDQuest, se determinaron las características de cada “spot” previamente cortados y analizados. Esta información se resume en la Tabla 7.3. Se muestran también las características de los “spots” con los que el programa determinó que había coincidencias en las otras condiciones estudiadas. Esto es importante debido a que se puede inferir la posible presencia de la misma proteína en las otras condiciones, aunque no se hayan analizado esos “spots”, además de que se puede realizar un análisis de abundancia, a través del número de veces que cambia la intensidad del “spot” en las diferentes condiciones.

En la Tabla 7.3 se observan los “spots” a24, b70 y c23, los cuales se consideraron el “spot” de referencia debido a que están presentes en las tres condiciones en las mismas coordenadas de *pI* y *PM*. Este “spot” de referencia resultó de gran interés, pues al hacer la identificación de proteínas en cada “spot”, sólo una se encontraba presente en las tres condiciones. El resto de “spots” solo se encuentran presentes en una o dos, de las condiciones evaluadas.

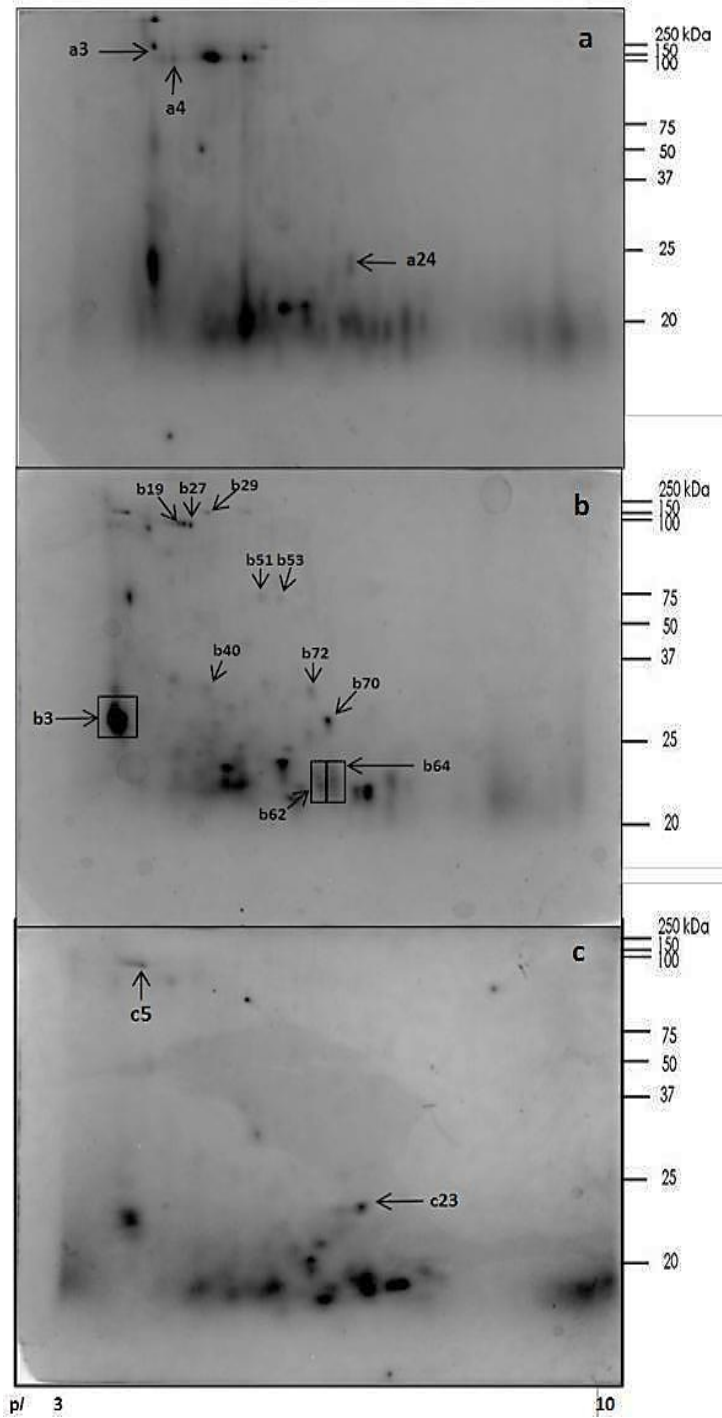


Figura 7.6 Imágenes representativas de los geles 2D obtenidos del secretoma de *A. brasiliensis* cultivado en medio sólido con tres diferentes concentraciones de sacarosa inicial a) 25g/L, b) 150g/L y c) 300 g/L. Se encuentran marcados los “spots” que se identificaron por espectrometría de masas.

Tabla 7.3 Resumen de las características de los “spots” que se seleccionaron para su identificación por espectrometría de masas, y de los “spots” con los que coinciden en otras condiciones según el programa PDQuest.

Concentración inicial de sacarosa (g/L)	“Spots” identificados por LC-MS/MS					“Match” con otras condiciones									
	Spot	X	% C.V.	PM	pI	Spot	X	% C.V.	PM	pI	Spot	X	% C.V.	PM	pI
25	a3	169.2	43.3	144.6	4	b12	77.2	29.5	117.9	4.0					
	a4	96.2	36.3	120.7	4.3	b18	51.1	47.4	103.3	4.3	c6	7.6	88.2	116.1	4.4
	a24	91.1	1.2	23.7	6.6	b70	198.6	17.7	22.1	6.6	c23	34.4	44.9	23.5	6.8
150	b3	939.3	10.4	21.7	3.9	a1	164.8	60.4	22.7	4.0	c2	28.3	74.9	23.3	4.0
	b19	42.1	11.7	109.2	4.5										
	b27	36.1	13.7	107	4.8	a8	124.6	35.2	120.3	4.8					
	b29	36.4	23.9	118.9	5										
	b40	40.8	1.6	28.7	5										
	b51	35.9	22.3	59.8	5.7										
	b53	25.6	0.3	59.1	5.9										
	b62	100.1	13.3	13.8	6.4	a18	55.8	49.5	14.2	6.5	c18	2.9	96.4	14.5	6.5
	b64	191.4	40	13.7	6.7	a16	41.4	32.1	14.4	6.7	c16	48	53.7	13.1	6.7
	b70	198.6	17.7	22.1	6.6	a24					c23				
b72	78.9	34.2	28	6.4											
300	c5	87.2	47	131.5	4.1	a34	51.9	84.9	169.2	3.9	b11	51.2	39.5	118.7	3.8
	c23	34.4	44.9	23.5	6.8	a24					b70				

Estos “spots” fueron seleccionados por observación directa de los geles sin análisis previo del programa PDQuest

X: promedio de la intensidad normalizada del “spot” (x 1000), **%C.V.**: porcentaje del coeficiente de variación, **PM**: peso molecular aproximado en kDa, **pI**: punto isoeléctrico aproximado. La letra en el nombre de cada “spot” corresponde a una concentración de sacarosa: **a=25 g/L**, **b=150 g/L** y **c=300g/L**.

De los 16 “spots” analizados se identificaron 29 proteínas (Tabla 7.4); la diferencia entre el número de “spots” y las proteínas identificadas se debe a la presencia de varias proteínas en un solo “spot”, lo cual ocurre generalmente en los análisis de “spots”. Con el propósito de confirmar la localización subcelular de las proteínas identificadas, se predijo su localización por programas bioinformáticos (WoLF PSORT). De las 29 proteínas, se predijo que el 58.8% son extracelulares, 27.6% citoplasmáticas, 10.3% de origen nuclear y 3.3% de origen citoplasmático y nuclear (Figura 7.7).

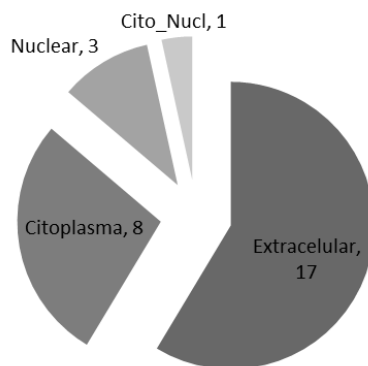


Figura 7.7 Predicción de la localización subcelular (WoLF PSORT) de las proteínas extracelulares identificadas en cultivos de *A. brasiliensis*.

Debido al hecho de que muchas de las proteínas secretadas que están bien caracterizadas pertenecen a las especies del género *Aspergillus*, éstas se examinaron para identificar la presencia de péptido señal, usando el programa SignalP. También, se usó el programa Secretome P, para que, en caso de que no haya péptido señal, predecir si la proteína es secretada por vías no convencionales. Como complemento, se usó el programa TMHMM para predecir la presencia de dominios transmembranales. De las 17 proteínas extracelulares predichas, solo en 10 se predijo la presencia de péptido señal, 4 presentaron evidencias de secreción por mecanismos no convencionales, dos proteínas presentaron dominios transmembranales y una no se logró caracterizar.

El uso de todas estas predicciones es el tener la certeza de que las proteínas identificadas realmente pertenezcan al secretoma del microorganismo, empleando vías convencionales o no convencionales de secreción; y también identificar aquellas que pueden estar presentes por problemas de lisis celular

Tabla 7.4 Identificación de proteínas secretadas por *A. brasiliensis* en cultivos en medio sólido empleando tres concentraciones de sacarosa inicial

GI	Descripción de la proteína ^a	"Spots" ^b			Score ^c	E. T. ^c	% C. S. ^c	Teórico ^c		Loc. Predicha ^d	P.S.	S.N.C.	
		25	150	300				PM (KDa)	pI				
Glucosidasas													
78172198	β-glucosidasa (EC 3.2.1.21)	1.8	b62	34.5	54	2	2	93.14	4.50	Extra	Si	No	
39842191	Exoinulinasa (91%) (EC 3.2.1.7)	a3	2.2		118	11	6	59.11	4.77	Extra	Si	No	
		a4	1.9	12.7	708	311	20	59.11	4.77	Extra	Si	No	
						191	14	9	59.11	4.77	Extra	Si	No
		0.3	b27			85	16	4	59.11	4.77	Extra	Si	No
						75	8	4	59.11	4.77	Extra	Si	No
		1.8	b62	34.5		163	24	6	59.11	4.77	Extra	Si	No
		0.4	0.2	c23	84	9	4	59.11	4.77	Extra	Si	No	
145251567	Manano endo-1,4-beta-mannosidasa E (EC 3.2.1.78)		b51		44	4	4	37.66	5.81	Extra	Si	No	
134077738	Precursor β-fructofuranosidasa suc-1 (EC 3.2.1.26)	1.8	b62	34.5	77	2	2	63.58	4.74	Extra	No	Si	
145235523	Glucano endo-1,3-beta-glucosidasa (92%) (EC 3.2.1.39)		b29		71	1	3	46.09	4.23	Extra	Si	No	
		0.4	0.2	c23	120	5	3	46.09	4.23	Extra	Si	No	
Oxidoreductasas													
317028203	Glutación reductasa (99%) (EC 1.8.1.7)		b29		184	5	8	51.59	5.74	Cito	No	No	
		0.4	0.2	c23	261	7	8	51.59	5.74	Cito	No	No	
145242664	Sulfidril oxidasa (EC 1.8.3.2)		b29		59	2	3	43.45	5.35	Extra	Si	No	
			b51		63	2	3	43.45	5.35	Extra	Si	No	

Tabla 7.4 Identificación de proteínas secretadas por *A. brasiliensis* en cultivos en medio sólido empleando tres diferentes concentraciones de sacarosa inicial (Cont.)

GI	Descripción de la proteína ^a	"Spots" ^b			Score ^c	E. T. ^c	% C. S. ^c	Teórico ^c		Loc. Predicha ^d	P.S.	S.N.C.
		25	150	300				PM (KDa)	pI			
350637824	Proteína hipotética ASPNIDRAFT_55494 (catalasa, 96%) (EC 1.11.1.6)	a3	2.2		2185	544	37	79.87	5.11	Extra	Si	No
				b29	228	9	7	79.87	5.11	Extra	Si	No
		1.7	1.7	c5	910	165	19	79.87	5.11	Extra	Si	No
145228573	Catalasa R (EC 1.11.1.6)	a3	2.2		1916	400	31	80.15	4.97	Extra	No	Si
		a4	1.9	12.7	48	10	2	80.15	4.97	Extra	No	Si
				b19	52	3	2	80.15	4.97	Extra	No	Si
		0.3		b27	59	4	2	80.15	4.97	Extra	No	Si
				b29	245	10	7	80.15	4.97	Extra	No	Si
		0.4	0.2	c23	188	9	5	80.15	4.97	Extra	No	Si
		1.7	1.7	c5	921	71	17	80.15	4.97	Extra	No	Si
350637847	Proteína hipotética ASPNIDRAFT_206342 (catalasa, 98%) (EC 1.11.1.6)			b29	96	4	3	80.42	5.48	Extra	Si	No
358366984	Glicerol deshidrogenasa (ref. <i>A. kawachii</i> IFO 4308, 95%) (EC 1.1.1.6)			b72	317	15	23	36.58	5.80	Extra	No	Si
350637237	Proteína hipotética ASPINDRAFT_42038 (92%)*	a3	2.2		47	27	3	57.20	8.65	Extra	No	No

Tabla 7.4 Identificación de proteínas secretadas por *A. brasiliensis* en cultivos en medio sólido empleando tres diferentes concentraciones de sacarosa inicial (Cont.)

GI	Descripción de la proteína ^a	"Spots" ^b			Score ^c	E. T. ^c	% C. S. ^c	Teórico ^c		Loc. Predicha ^d	P.S.	S.N.C.
		25	150	300				PM (KDa)	pI			
145237624	Supero oxido dismutasa (Cu-Zn) (EC 1.15.1.1)	a3	2.2		97	2	14	15.93	5.95	Cito	No	Si
		a24	0.5		604	54	42	15.93	5.95	Cito	No	Si
		b19			253	9	38	15.93	5.95	Cito	No	Si
		0.3	b27		158	6	31	15.93	5.95	Cito	No	Si
			b29		179	12	21	15.93	5.95	Cito	No	Si
		2.1	b70	5.8	608	57	56	15.93	5.95	Cito	No	Si
			b72		86	3	15	15.93	5.95	Cito	No	Si
0.4	0.2	c23	424	33	49	15.93	5.95	Cito	No	Si		
Proteasas												
145257217	Aminopeptidasa C (94%) (EC 3.4.22.4)	b19			105	4	7	72.51	5.45	Cito	No	Si
		0.3	b27		162	5	6	72.51	5.45	Cito	No	Si
145257217	Aminopeptidasa C (100%)	0.4	0.2	c23	203	10	5	72.36	5.50	Cito	No	Si
Función miscelánea												
145256130	1, 3-β-glucanosiltransferasa* (EC 2.4.1.-)	b51			94	1	3	48.42	4.58	Extra	Si	No
		1.8	b62	34.5	98	3	7	48.42	4.58	Extra	Si	No
			b40		92	2	3	48.42	4.58	Extra	Si	No
134077286	Producto proteico sin nombrar (espermina sintasa, 100%) (EC 2.5.1.16)	0.4	0.2	c23	127	6	13	33.22	5.14	Cito_Nucl	No	No

Tabla 7.4 Identificación de proteínas secretadas por *A. brasiliensis* en cultivos en medio sólido empleando tres diferentes concentraciones de sacarosa inicial (Cont.)

GI	Descripción de la proteína ^a	"Spots" ^b			Score ^c	E. T. ^c	% C. S. ^c	Teórico ^c		Loc. Predicha ^d	P.S.	S.N.C.
		25	150	300				PM (KDa)	pI			
145243458	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa [ATP] (EC 4.1.49)		b51		96	4	2	66.24	5.81	Cito	No	Si
			b53		104	4	2	66.24	5.81	Cito	No	Si
		2.1	b70	5.8	94	2	2	66.24	5.81	Cito	No	Si
			b40		54	2	2	66.24	5.81	Cito	No	Si
		0.4	0.2	c23	96	6	2	66.24	5.81	Cito	No	Si
358369598	Transaldolasa (ref. <i>A.kawachi</i> IFO 4308 (GAA86212.1), identidad=98%) (EC 2.2.1.2)		b51		1020	87	46	35.42	5.66	Cito	No	No
			b53		484	35	37	35.42	5.66	Cito	No	No
Sin familia												
134055281	Producto proteico sin nombrar	1.7	1.7	c5	44	1	4	33.14	6.90	Cito	No	Si
145256696	Proteína ecm33		b51		47	2	2	41.01	4.15	Extra	Si	No
134055991	Producto proteico sin nombrar (93%)		b51		87	3	11	40.73	5.49	Extra	No	Si
134082151	Producto proteico sin nombrar (97%)		b27		43	8	2	84.15	6.58	Nucl	No	Si
145232002	Proteína de transferencia fosfatidilglicerol/fosfatidilinositol (93%)		b40		126	11	20	19.42	4.93	Extra	Si	No
145229423	N-cianovirina (85%)	5.7	b3	33.2	87	5	9	12.23	3.90	Cito	No	No
350631613	Proteína hipotética ASPNIDRAFT_199489 (sin caracterizar)	4.6	b64	4	69	3	18	38.83	5.08	Nucl	No	Si
545670272	Proteína hipotética (ref. <i>Alpha proteobacterium</i> (WP_021776426.1), identidad=35%)*	1.7	1.7	c5	47	1	8	12.65	10.10	Extra	No	No

Tabla 7.4 Identificación de proteínas secretadas por *A. brasiliensis* en cultivos en medio sólido empleando tres diferentes concentraciones de sacarosa inicial (Cont.)

GI	Descripción de la proteína ^a	"spots" ^b			Score ^c	E. T. ^c	% C. S. ^c	Teórico ^c		Loc. Predicha ^d	P.S.	S.N.C.
		25	150	300				PM (kDa)	pI			
487823458	Endonucleasa de restricción (ref. <i>H. pylori</i> (WP_001896924.1), identidad=28%)	a4	1.9	12.7	51	7	7	13.55	11.03	Nucl	No	Si
350631390	Proteína hipotética ASPNIDRAFT_39189	a3	2.2		49	1	4	37.88	5.52	Extra	No	No
		a24	0.5	2.6	58	4	4	37.88	5.52	Extra	No	No

ET: Espectros totales; **%C.S:** Porcentaje de cobertura de secuencia; **PM:** Peso molecular, **pI:** punto isoeléctrico; **P.S:** Péptido señal; **S.N.C:** Secreción no convencional

^a Todos los nombres de las proteínas corresponden a *A. niger* CBS 513.88, excepto las que se indican. La función putativa de las proteínas descritas como hipotéticas o proteínas putativas de la base de datos de *A. brasiliensis*, fueron además examinadas en el buscador BLASTP, se indica entre paréntesis la función de la proteína, organismo de referencia y el porcentaje de identidad. (*) Proteínas con dominio transmembranal.

^b "spots" en los que se encontró la proteína en las diferentes condiciones: **25, 150, 300** g/L de sacarosa y número de cambio de la intensidad del "spot" respecto a los de otras condiciones en la misma posición. Los espacios en blanco significan que no se encontró relación con otros "spots" en las otras condiciones.

^c El score, espectros totales, % de cobertura, PM y pI teórico; provienen de la búsqueda en MASCOT basados en la información del genoma.

^d La localización subcelular predicha se presenta como: *Extr* extracelular, *Nuc* Nuclear, *Cito* Citoplasmática, *Cito_nuc* Citoplasmática y nuclear.

Una de las características que permite que la técnica de electroforesis 2D se mantenga vigente en los estudios proteómicos, es que permite la identificación de isoformas de una enzima. En nuestro análisis encontramos la presencia de posibles isoformas de las siguientes proteínas: exoinulinasa, 1,3-B-glucanolsiltransferasa, catalasa R, sulfidril oxidasa, aminopeptidasa C, superóxido dismutasa, PEP carboxiquinasa, transaldolasa, y de la proteína hipotética ASPINDRAFT_39189. Lo que representa un 31% de las proteínas identificadas, dicho porcentaje es menor al 47% reportado para *A. terreus* (Han y col., 2010), en el cual se utilizó almidón como fuente de carbono en cultivo líquido. Lo anterior sugiere que la complejidad de la fuente de carbono induce la presencia de isoformas en las proteínas secretadas.

Finalmente, como parte del análisis bioinformático, se identificaron las familias de las proteínas por medio del programa Pfam. De esta información surge la clasificación propuesta en la Tabla 7.4, con base en su función general. Se encontraron cinco glucosidasas, ocho oxidoreductasas, dos proteasas, cuatro con función variada y se encontraron 10 proteínas sin clasificación.

Basándonos en el análisis de imágenes, de un total de 29 proteínas, 18 se expresaron posiblemente en las tres condiciones, por lo que se puede decir que son las proteínas que el microorganismo secreta de forma basal en presencia de sacarosa en un rango de 25 a 300 g/L. Aproximadamente, 38% de las proteínas fueron clasificadas como hipotéticas o productos proteicos sin nombrar. Esto puede deberse a la escasa anotación del genoma de *A. brasiliensis* (JGI, [Actualizado 2012]). La concentración de 150 g/L de sacarosa fue la única condición en la que se identificaron “spots” y proteínas únicos, seleccionándose seis “spots” e identificando ocho proteínas. En las siguientes secciones se presenta el análisis de las proteínas identificadas, las cuales se agruparon principalmente por su función biológica, al igual que en la Tabla 7.4.

7.2.3 Glucosidasas

Como parte de la clasificación de las proteínas, las glucosidasas por su importancia y abundancia se presentan como primer grupo de proteínas identificadas.

La beta-glucosidasa se reporta en diversos estudios de proteómica de hongos filamentosos producida en diversas fuentes de carbono como la xilosa, maltosa, lactosa, almidón, glucosa y sacarosa (Jun y col. 2013, Han y col. 2010, Lu y col. 2010). Oda y col. (2006) la reportan cómo una enzima que se secreta en CMS y que se retiene en la pared del hongo en cultivo sumergido, con salvado de trigo como fuente de carbono. Otros estudios la consideran una enzima de interés por ser parte del grupo de celulasas producidas por hongos: *T. reesei*, *T. asperellum* y *A. niger*, que ayudan a degradar fuentes complejas de carbono, como el bagazo de caña (Marx y col. 2013, Borin y col. 2015). Esto la coloca como una enzima de importancia para la degradación de fuentes complejas de carbono y además está presente en el metabolismo de carbohidratos menos complejos.

Por su parte la exoinulinasa, es una enzima hidrolítica que, junto con la invertasa, ataca el enlace β -2,1 de polisacáridos con residuos de fructosa (Dilipkumar y col. 2011, Songpim y col. 2011). Estas enzimas muestran actividad hidrolítica hacia la sacarosa, pero difieren en su especificidad por oligosacáridos de alto peso molecular y fructanos del tipo inulina (Rouwenhorst y col. 1990).

Los diferentes medios de cultivo tienen diversos efectos en la producción de inulinasa e invertasa, basado en la fisiología o rutas bioquímicas del hongo (Dinarvand y col. 2013). En el presente trabajo, se identificó a la exoinulinasa en siete diferentes "spots", en las tres concentraciones de sacarosa evaluadas. Las isoenzimas o patrones variables de glicosilación pueden explicar pequeños cambios en el peso molecular o punto isoeléctrico, sin embargo, variaciones muy grandes en las propiedades de las proteínas observadas en los geles 2D sugiere una degradación proteolítica severa, la cual pudo presentarse durante el cultivo, la preparación de la muestra y el almacenamiento de la misma (Vinzant y col. 2001). Sin embargo, una degradación proteolítica no explicaría completamente las dos condiciones encontradas en este trabajo: la presencia de una misma proteína en diferentes "spots" con un PM y pI muy diferente, y la presencia de proteínas con un amplio rango de PM y pI teóricos en un mismo "spot". Por lo que a la degradación proteolítica se le puede sumar la posibilidad de que exista una agregación de proteínas durante el procesamiento de la muestra previo al isoelectroenfoque. Por otra parte, la presencia de la exoinulinasa en los "spots" a3, a4, b19 y b27, al tener un pI experimental cercano al teórico y el PM del

doble se podría considerar como un agregado dimérico, por lo que resulta de interés saber cuál es el perfil electroforético de esta enzima en condiciones nativas.

En el “spot” b62, se identificó un precursor de la β -fructofuranosidasa, el cual se puede considerar que estuvo presente en las tres condiciones al tener “spots” coincidentes en el análisis de imagen. Resultó de interés que se identificara una exo-inulinasa y no una invertasa en las proteínas hidrolíticas de este trabajo, lo que sugiere la importancia de profundizar en el estudio de la producción de estas dos enzimas por *A. brasiliensis*. Generalmente la actividad inulinasa (I) es acompañada por actividad invertasa (S), y el complejo enzimático es caracterizado por una relación catalítica I/S. Cuando la relación I/S es mayor que 10^{-2} , el complejo enzimático tiene una actividad inulinasa preponderante, mientras que para la actividad invertasa la relación I/S es menor que 10^{-4} (Sharma y col. 2006).

Otra de las enzimas identificadas fue la manano endo-1,4-beta-manosidasa E, la cual forma parte de las enzimas β -mananasas, que degradan polisacáridos de manano. Éstos son polímeros complejos que se encuentran comúnmente en las paredes celulares de las plantas, y están estrechamente asociados con la celulosa y la lignina (Chahuan y col. 2012). La presencia de una β -mananasa se reporta en el secretoma de *A. terreus* (Han y col. 2010), en este estudio el microorganismo creció en medios con glucosa, sacarosa y almidón como fuentes únicas de carbono, y la β -mananasa se identificó como parte de un “spot” que los autores consideraron relevante en el secretoma del cultivo con sacarosa. Aunque es una enzima asociada principalmente a la degradación de carbohidratos complejos, la página de KEGG relaciona a la manosidasa con la ruta metabólica de la fructosa, dicho monosacárido forma parte de la sacarosa, lo cual podría explicar su presencia en ambos secretomas.

Otra glucosidasa identificada fue la glucano endo-1,3-beta-glucosidasa. Esta enzima se encuentra involucrada en la ruta metabólica de la sacarosa (KEGG) y también se ha reportado como una enzima de autólisis en la pared celular de *A. nidulans*, en cultivos con baja cantidad de fuente de carbono (Szilagyi y col. 2010). En el presente trabajo, aunque se desconoce la cantidad de fuente de carbono al final de tiempo cultivo, parece poco probable que esta sea la razón de la presencia de esta enzima en el secretoma de *A. brasiliensis*, ya que los extractos para el análisis del secretoma corresponden a cultivos jóvenes en fase de crecimiento exponencial. Por lo

anterior, el papel de esta proteína en la ruta metabólica de la sacarosa (KEGG) puede explicar su presencia en los “spots” seleccionados.

7.2.4 Oxidoreductasas

En general, una gran cantidad de estudios revela que las proteínas con actividad específica antioxidante, como las superóxido dismutasas y las catalasas, forman parte de la respuesta general al estrés, siendo la limitación de oxígeno y aminoácidos, así como el estrés provocado por la presencia de peróxido de hidrógeno y superóxido, entre muchos otros factores, lo que induce la presencia de las superóxido dismutasas. Mientras que para las catalasas, los factores que las inducen son la limitación de nitrógeno y la presencia de H₂O₂ (Kroll y col. 2014).

En el presente trabajo, en un mismo “spot” se identificaron tres tipos de catalasas. Una identificada como catalasa R y las otras dos que son proteínas hipotéticas, cuya función se determinó por su comparación con la base de datos de BLASTP. La proteína hipotética ASPINDRAFT_55494 se identificó en las tres concentraciones de sacarosa inicial. La catalasa R se identificó de igual manera en las tres condiciones, con la diferencia de que se encontraron isoformas (2 y 3, respectivamente) en las concentraciones de 25 y 150 g/L de sacarosa. La proteína hipotética ASPINDRAFT_206342 se identificó sólo en la condición de 150 g/L.

Lu y col. (2010) también encontraron catalasas en el proteoma de *A. niger* cultivado en medio líquido con maltosa y xilosa. Ese grupo atribuyó la presencia de catalasas como resultado de una elevada concentración de glucosa. La presencia de glucosa estimula la síntesis de la glucosa-oxidasa, con una consecuente oxidación de la glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Con base en lo anterior, a mayor cantidad de glucosa oxidada, mayor necesidad de catalasas para remover el peróxido de hidrógeno producido. En nuestro trabajo, la presencia de catalasas puede explicarse de forma similar, la degradación de la sacarosa a glucosa y fructosa, contribuye a aumentar los niveles de los monosacáridos y tendría como consecuencia todo el mecanismo descrito.

Las oxidoreductasas juegan un papel importante en la respuesta al estrés oxidativo y a las altas temperaturas. La glutatión reductasa, como parte del sistema

antioxidante del glutatión, regenera el glutatión oxidado a su forma reducida, manteniendo de esta manera el balance redox (Kroll y col. 2014). La glutatión reductasa es una enzima que ha demostrado ser un factor importante de patogenicidad en *C. neoformans* (Misall y col. 2006), la cual se encontró sobre regulada en respuesta al estrés inducido por peróxido de hidrógeno en *C. albicans* (Urban y col. 2005). En un estudio con *A. nidulans* en CML con glucosa como fuente de carbono (Sato y col. 2009), se demostró la relación entre el sistema del glutatión, el sistema de la tiorredoxina y los mecanismos de defensa para el H₂O₂. Lo anterior, corrobora la relación entre las catalasas y la glutatión reductasa encontrada también en el presente trabajo.

La sulfidril oxidasa (SoX) identificada en el secretoma de *A. brasiliensis*, a través de WoLF PSORT se clasificó como una enzima extracelular. Estas enzimas se han aislado en los compartimentos intracelulares de muchos microorganismos, y también se conocen SoX que se secretan. Las SoX secretadas son generalmente activas en compuestos pequeños y su papel en la fisiología de los microorganismos es desconocida; mientras que las SoX intracelulares prefieren como sustrato a las proteínas y están involucradas en el plegamiento de las mismas (Faccio y col. 2011). Las SoX se consideran parte de las enzimas que generan las especies reactivas de oxígeno (ERO), dicha enzima cataliza la conversión del glutatión reducido a su forma disulfuro, con consumo de oxígeno y liberación de peróxido de hidrógeno (de la Motte y Wagner, 1987). Lu y col. (2010) identificaron una SoX en el secretoma de *A. niger* cultivado en medio líquido y se produjo tanto en xilosa como en maltosa como fuentes de carbono; su localización predicha fue en membrana y extracelular.

También, se identificó la superóxido dismutasa (Cu-Zn). El crecimiento aeróbico genera grandes cantidades de ERO (Fridovich, 1998). Los sistemas enzimáticos para la defensa antioxidante de ERO incluyen enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión reductasa, las catalasas y varias peroxidasas (Abrashv y col. 2008). Esta enzima cataliza la conversión de radicales superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Se presenta principalmente como enzima citoplasmática (Lu y col. 2010, Jun y col. 2013), sin embargo, su presencia en el secretoma puede deberse a mecanismos de secreción no convencionales.

Esta enzima se consideró de mayor interés, debido a que es la única enzima que se identificó en las tres condiciones en el “spot” de referencia (a24, b70 y c23), presentando una mayor abundancia en la concentración de 150 g/L de sacarosa inicial. En el estudio de Lu y col. (2010) con *A. nidulans* cultivado en medio líquido con maltosa y xilosa, encontraron diferencias en la cantidad de proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo, siendo en maltosa donde claramente se presentaban mayores niveles de enzimas involucradas en la remoción de ERO, indicando un alto estrés oxidativo durante la degradación de la maltosa y la glucosa. Tomando en cuenta esto, si existe una mayor abundancia de estas enzimas en las condiciones evaluadas no indica que hubo un mayor estrés oxidativo en dicha condición, tal es el caso de la SOD en la condición de 150 g/L de sacarosa.

Además se identificó la enzima glicerol deshidrogenasa, presente en un solo “spot” de la concentración de 150 g/L. Aunque se ha descrito principalmente como una enzima citoplasmática, el análisis por WoLF PSORT indicó que la proteína es extracelular y que tiene un mecanismo de secreción no convencional. La glicerol deshidrogenasa tiene un papel importante en la respuesta al estrés osmótico, ya que el glicerol es uno de los principales solutos compatibles, encontrado en diversos estudios que evalúan esta condición (de Vries y col. 2003, Camacho-Morales y col. 2010). Tomando en cuenta las condiciones estudiadas en este trabajo, la presencia de esta proteína se esperaría en las dos concentraciones más elevadas de sacarosa, y no sólo en la concentración intermedia, por lo que la presencia en una única condición no aporta información relevante con respecto al estrés osmótico generado por las elevadas concentraciones de sacarosa.

Finalmente, en este grupo también se incluyó a la proteína hipotética ASPINDRAFT _42038. Esta proteína no dio un nombre específico al realizar la comparación en BLASTP, sin embargo al realizar su análisis en Pfam este programa identificó que contenía dominios de la familia de los citocromos P450. Y aunque esta identificación es muy general, permite hacer al menos la clasificación como otra enzima involucrada en los procesos de óxido-reducción en el hongo.

7.2.5 Proteasas

En el presente trabajo se identificó a la aminopeptidasa C en diferentes “spots” y también con diferentes porcentajes de identidad. Esta enzima fue descrita como una nueva enzima del grupo de las aminopeptidasas en 2003 (Basten y col. 2003), la cual posee una especificidad por aminoácidos con cadenas aromáticas. El estudio de Basten y col. indicó que aunque no hubo una señal de secreción, la aminopeptidasa se encontró tanto extra como intracelular en la cepa de *A. niger* NRRL 3112 cultivado en medio líquido con harina de papa. Esta caracterización de la enzima junto con análisis de secreción no convencional, indica que es muy probable que la SNC sea la razón de que haya encontrado en el secretoma.

7.2.6 Funciones diversas

Dentro de este grupo se clasificaron cuatro proteínas. La 1, 3-β-glucanosiltransferasa, divide internamente una molécula de 1,3-beta-glucano y transfiere el recién generado extremo reductor (el donante) al extremo no reductor de otra molécula 1,3-beta-glucano (el aceptor) formando un enlace 1,3-beta, dando como resultado el alargamiento de las cadenas 1,3-beta-glucano en la pared celular (UniProt). Por esta razón, la proteína es predicha con un dominio transmembranal, pues su función es la formación o reacomodo de la pared celular del hongo. Esta enzima ha sido identificada en el secretoma de *A. niger* (Lu y col. 2010) empleando xilosa como fuente de carbono, con localización en la pared celular, y en el secretoma de *A. terreus* (Han y col. 2010) con glucosa y almidón como fuentes de carbono, a la cual se le predijo localización extracelular con la presencia de péptido señal.

La espermidina sintasa es una poliamina que cataliza los últimos cinco pasos en la biosíntesis de espermidina a partir de la arginina, la espermidina modula la actividad enzimática de la lisozima y la fosfatasa alcalina. Fue predicha como una enzima de localización citoplasmática y nuclear, sin péptido señal o mecanismo de secreción no convencional; lo anterior sugiere que su presencia en el secretoma puede deberse a lisis celular o por otro medio, como el transporte de vesículas extracelulares (Rodriguez y col 2014). Esta misma proteína fue reportada en el secretoma de *A. terreus* (Han y col. 2010), la cual se expresó solamente en presencia de sacarosa

como fuente de carbono; dicho grupo hizo un análisis para detectar ácidos nucleicos en su extracto proteico y resultó negativo. Con base en lo anterior, la presencia de esta enzima en ambos secretomas resulta de interés, debido a la probabilidad de un mecanismo de secreción no convencional desconocido. En el presente trabajo, esta enzima se identificó sólo en el “spot” c23 que corresponde a la concentración de 300 g/L de los “spots” de referencia (a24, b70 y c23).

Por otra parte, se identificó la fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa, principalmente para la condición de 150 g/L de sacarosa, en la que se encontró presente en 4 “spots”. Dos de ellos (b51 y b53), por su similitud en PM y *pI* con los valores teóricos de la enzima, se pueden considerar isoformas. En el caso de los otros dos “spots”, su distribución en el gel puede deberse a las mismas razones expuestas para la exoinulina, es decir consecuencia de una posible degradación y/o agregación de la proteína. La PEP carboxiquinasa está involucrada en las rutas metabólicas de la gluconeogénesis, glicólisis, ciclo de ácidos tricarbóxicos y en el metabolismo del piruvato (KEGG). Lleva a cabo la transformación del oxaloacetato a fosfoenolpiruvato, empleando ATP en la reacción. Al ser una enzima intracelular, su presencia en el secretoma se puede explicar por lisis celular al realizar la extracción de proteínas. Al no encontrarse en las otras concentraciones de sacarosa, no se puede concluir si la concentración de sacarosa afecta positiva o negativamente la producción de esta enzima.

La transaldolasa (EC 2.2.1.2) se identificó únicamente en la condición de 150 g/L, y se encontraron dos isoformas de esta enzima. Se predijo como una proteína citoplasmática, por lo que su presencia en el secretoma puede deberse a lisis o a su secreción por mecanismos no convencionales. La transaldolasa es una enzima clave de la rama oxidativa no reversible de la vía de las pentosas fosfato, que es responsable de la formación de NADPH. El NADPH ayuda a mantener el glutatión en su forma reducida, y por tanto, la integridad celular contra las ERO, además de que influye en la sensibilidad a las señales de muerte celular (Banki y col. 1996). Dada su importancia, esta enzima complementa el trabajo realizado por las catalasas, la superóxido dismutasa y la glutatión reductasa en la respuesta al estrés oxidativo.

7.2.7 Sin clasificación

Del grupo de las proteínas sin clasificar, debido a que no se pudo identificar una función o a que tienen porcentajes de homología muy bajos, la proteína Ecm33 será la única a la que nos enfocaremos de este grupo.

Un importante grupo de proteínas de la membrana plasmática y de la pared celular en *C. albicans* son las proteínas ancladas a glucosil fosfatidil-inositol (GPI), a las cuales pertenece la Ecm33 (Martínez-López y col. 2004, Cabezón y col. 2009). En general, es una proteína encontrada en eucariotas, es un componente esencial de la pared celular y tiene gran importancia en la integridad de la misma (Pardo y col. 2004). Recientemente, se identificó en vesículas extracelulares de *C. albicans*, las cuales se consideran como una forma de secreción de ciertas proteínas citoplasmáticas (Gil-Bona y col. 2015). Esta proteína se ha encontrado en el secretoma de *A. terreus*, en presencia de glucosa como fuente de carbono (Han y col. 2010). La proteína resulta de gran interés, ya que de estar involucrada como en *C. albicans* en la formación de vesículas extracelulares ayudaría a explicar la presencia de proteínas citoplasmáticas en el secretoma de *A. brasiliensis* y quizá de otros hongos filamentosos.

De toda la información mostrada en la Tabla 7.4, se observa que en la concentración de 150 g/L de sacarosa inicial se presenta la mayor cantidad de proteínas únicas, con ocho: manan endo-1,4-beta-manosidasa E, Sulfidril oxidasa, catalasa, glicerol deshidrogenasa, transaldolasa, proteína de transferencia de fosfatidilinositol/ fosfatidilglicerol, proteína Ecm 33 y un producto proteico no identificado. Lo anterior indica que la mitad de las proteínas únicas en esta condición están involucradas como respuesta al estrés osmótico y oxidativo.

Se identificaron en las diversas condiciones, aunque en mayor proporción en la condición de 150 g/L de sacarosa, cinco proteínas implicadas en la hidrólisis de carbohidratos, de las cuales la de mayor interés fue la exoinulinasa. La abundancia de la exoinulinasa se contrasta con la ausencia de la invertasa, la cual se esperaba que fuera más relevante al emplear sacarosa como fuente de carbono. Por lo que, a reserva de realizar la medición de actividades enzimáticas, los resultados sugieren que *A. brasiliensis* es un hongo que tiene una actividad preponderante de inulinasa, con respecto a la invertasa.

Otro punto importante que arroja el análisis de las proteínas, es la presencia de un gran número de enzimas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo, tanto intra como extracelularmente, en las tres concentraciones de sacarosa evaluada. En contraste, sólo se identificó una proteína involucrada en la respuesta al estrés osmótico y sólo en la condición de 150 g/L.

También se identificaron dos proteasas, las cuales se relacionan con la degradación proteolítica que podría explicar la identificación de proteínas en “spots” con pI y PM muy diferentes a sus parámetros teóricos.

Se identificó una proteína que podría ser secretada a través de un mecanismo no convencional, a través de vesículas extracelulares. Finalmente, a siete proteínas no se les identificó función alguna y permanecieron como proteínas hipotéticas, debido a la escasa anotación con el genoma de *A. brasiliensis*.

Este estudio representa una primera aproximación para entender la fisiología de *A. brasiliensis* cultivado en medio sólido, empleando sacarosa como fuente de carbono, estudios posteriores del proteoma intracelular, complementado con la medición de las actividades enzimáticas, dará una información global sobre este microorganismo en estas condiciones de cultivo.

7.3 Análisis de imágenes de geles 2D del secretoma de *A. brasiliensis*

Durante la realización del trabajo experimental, como ya se mencionó en secciones anteriores, se seleccionaron e identificaron los spots antes de realizar un análisis de imágenes, por ello, a continuación, se presenta el resultado del análisis de imágenes.

Para el análisis de imágenes se tomaron en cuenta tres replicas biológicas para cada condición evaluada. En la Figura 7.8 se muestran los geles maestros obtenidos por el programa PDQuest, para las tres concentraciones de sacarosa.

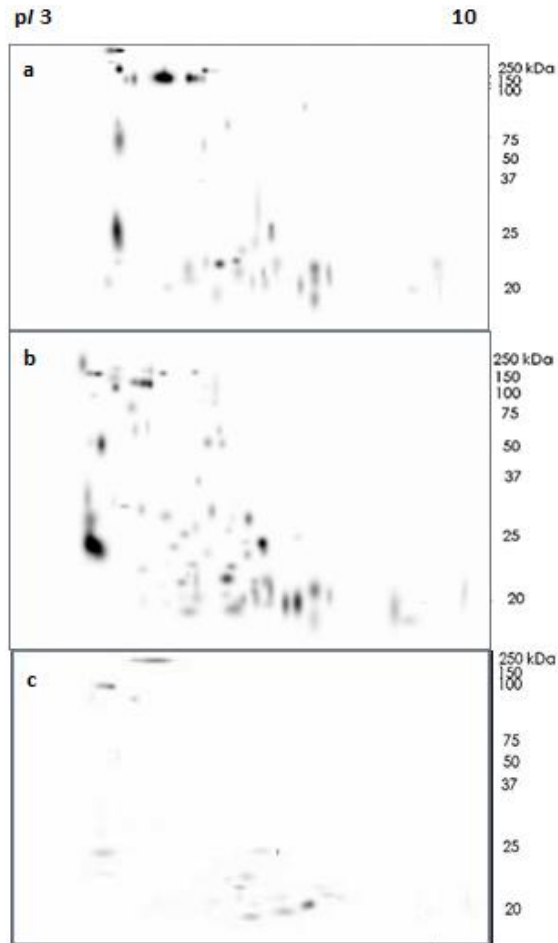


Figura 7.8 Geles maestros obtenidos de tres réplicas para las concentraciones de **a) 25, b) 150 y c) 300** g/L de sacarosa inicial.

El número de total de “spots” fue de 52, 78 y 42 para las concentraciones de 25, 150 y 300 g/L de sacarosa respectivamente (Figura 7.9).

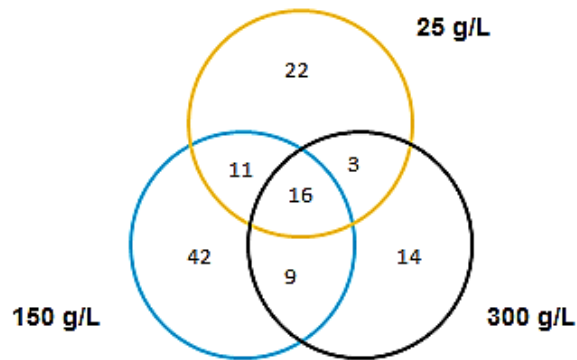


Figura 7.9 Diagrama de Venn del número de “spots” obtenidos de los secretomas de diferentes concentración de sacarosa.

Al realizar la comparación entre las tres condiciones, se observó (Figura 7.9) que en la condición de 150 g/L existe la mayor cantidad de “spots” únicos, y la menor fue para 300 g/L. Los análisis de los perfiles de expresión y de cambio de abundancia ayudan a identificar “spots” significativos, que pueden ser marcados para su posterior análisis e identificación (Berth y col. 2007). Para cada “spot”, se calculó el promedio de la intensidad normalizada, la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación (C.V.).

Hunt y col. (2005) resaltan la importancia de tener un bajo C.V. en los valores de intensidad normalizada de cada spot, y refieren que son aceptables C.V menores a 31.2%. Los valores promedio de C.V. para los cultivos fue de 48.4% para 25 g/L, 36.8% para 150 g/L y 60.4% para 300 g/L. Al tener esta elevada variación, se tomaron como criterios de selección para considerar significativos a los “spots” que tuvieron las siguientes características:

- coeficiente de variación menor al 20%,
- detección en una sola concentración
- detección en dos concentraciones, con relación de abundancia mayor a 1.5.
- presentes en tres concentraciones, con relación de abundancia mayor a 1.5

En la Figura 7.6 se muestra el número de “spots” que presentaron un C.V. menor al 20%. Se puede observar que son “spots” únicos para cada condición, por lo que, siguiendo los criterios del análisis de imágenes para determinar los “spots” de interés, sólo fue posible hacer un análisis de perfiles de expresión, descartando el análisis de abundancia. Las características de los “spots” significativos se presentan en la tabla 7.5).

Además de brindar información para hacer un análisis estadístico de la presencia e importancia de los “spots”, el análisis de imágenes también permite obtener una información general de las proteínas de cada muestra. De aquí se desprende que, la distribución de proteínas está cargada mayormente en la parte ácida y en la parte de bajo peso molecular. En las tres concentraciones, entre el 81 y 87% de los “spots” identificados se encuentran en el rango de pH de 4 a 7; mientras que en la

distribución del peso molecular, entre el 65 y 80% de los “spots” se encuentran en el rango de 10 a 50 kDa.



Figura 7.10 Comparación del número de “spots” con CV < 20% encontrados en las tres diferentes concentraciones de sacarosa inicial.

El uso de programas especializados es de gran utilidad cuando se trabaja con geles 2D, pues la cantidad de “spots” seleccionados empíricamente que se analizaron y que cumplieron con los criterios de selección, fue baja. De los “spots” identificados, sólo el 50% cumplió con el criterio de un CV < 20%, y de estos, sólo tres “spots” estaban presentes en una condición única, los otros 5 coincidieron con “spots” de otras concentraciones de sacarosa que tenían un CV elevado. En la Figura 7.10 se observa que hay una coincidencia entre la condición de 25 y 150 g/L de sacarosa inicial. Este “spot” es el que se menciona en el apartado anterior como “spot” de referencia en las tres concentraciones de sacarosa analizados (a24, b70, c23), pero sólo tiene un CV aceptable en la concentración baja y en la intermedia. Por lo que, un análisis de abundancia sólo sería posible entre estas condiciones sin considerar el “spot” de la concentración de 300 g/L de sacarosa.

Además de brindar información para hacer un análisis estadístico de la presencia e importancia de los “spots”, el análisis de imágenes también permite obtener información general acerca de las proteínas de cada muestra. De aquí se desprende que la distribución de proteínas está cargada mayormente hacia valores bajos de pH y en la parte de bajo peso molecular. En las tres concentraciones, entre el 81 y 87% de los “spots” identificados se encontraron en el rango de pH de 4 a 7; mientras que en la distribución del peso molecular, entre el 65 y 80% de los “spots” se encontraron en el rango de 10 a 50 kDa.

Tabla 7.5 Resumen de las características de los “spots” únicos en las tres concentraciones de sacarosa.

Concentración de sacarosa	Spot	X	D. E.	C.V (%)	PM (kDa)	pI
25 g/L	a40	69.8	5.9	8.5	210.1	4.0
	a42	16.0	0.1	0.6	12.6	4.8
	a43	76.4	6.2	8.1	122.5	5.1
	a47	14.0	2.4	17.5	58.2	5.4
	a50	49.5	7.4	14.9	28.2	6.4
150 g/L	<u>b19</u>	42.1	4.9	11.7	109.2	4.5
	b28	18.3	0.8	4.5	121.6	4.8
	b39	26.8	2.7	10.1	24.1	5.3
	<u>b40</u>	40.8	0.6	1.6	28.7	5.0
	b47	8.9	1.5	16.9	25.0	6.0
	b48	19.6	0.6	2.9	40.9	5.6
	b50	8.3	1.6	19.4	28.2	6.1
	<u>b53</u>	25.6	0.1	0.3	59.1	5.9
	b66	32.3	4.7	14.5	15.0	6.5
	b82	1.5	0.2	11.2	12.5	9.2
	b84	23.2	0.9	3.7	13.7	9.9
300 g/L	c44	4.7	0.1	2.7	15.2	7.5

X: promedio de la cantidad normalizada del “spot” (x1000), D.E: desviación estándar, C.V.: coeficiente de variación, PM: peso molecular aproximado, pI: punto isoeléctrico aproximado. Se presentan subrayados los spots que se analizaron por MS/MS.

La cantidad de información aportada por el análisis de imágenes resalta claramente la importancia del uso de programas especializados en el trabajo proteómico, y proteómico a que no sólo se mejora la precisión durante la comparación de imágenes, sino que permite darle un valor estadístico a los “spots” identificados. Lo anterior permite hacer una selección adecuada de “spots” y, de esta manera, mejorar el análisis y discusión de las proteínas identificadas.

8 CONCLUSIONES

1. El aumento de la concentración inicial de sacarosa en el cultivo de *A. brasiliensis* en medio sólido, incrementó la actividad metabólica e indujo cambios en el secretoma del hongo
2. El aumento en la concentración inicial de sustrato incrementó la producción de proteína extracelular por *A. brasiliensis* en CMS.
3. El criterio para la toma de muestra del secretoma de *A. brasiliensis*, basado en el análisis respirométrico, permitió la reproducibilidad de las proteínas contenidas en las réplicas de las tres concentraciones de sacarosa estudiadas.
4. El análisis de imágenes de los geles 2D es de gran importancia, ya que proporciona un soporte estadístico a los criterios de selección de “spots”.
5. Los resultados sugieren que la sacarosa induce la expresión de exoinulinasa en mayor cantidad que la invertasa, cuando *A. brasiliensis* es cultivado en medio sólido.
6. La mayoría de las proteínas expresadas diferencialmente en la concentración de 150 g/L de sacarosa forma parte de la respuesta al estrés oxidativo y fue la única condición en la que se encontró una proteína de respuesta al estrés osmótico.

9 PERSPECTIVAS

Para un mejor desarrollo de las ideas planteadas en este trabajo, se propone el análisis de proteoma intracelular de *A. brasiliensis* bajo las mismas condiciones de cultivo. Con el fin de obtener una información global del efecto de la concentración de sacarosa inicial, en la expresión de las proteínas.

Además, se propone la medición de las actividades enzimáticas de la exoinulinasa y la invertasa, para determinar la relación I/S en *A. brasiliensis*, y determinar un posible efecto de represión catabólica al aumentar la concentración de sacarosa.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Abrashev RI, Pashova SB, Stefanova LN, Vassilev SV, Dolashka-Angelova PA, Angelova MB. 2008. Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. *Can. J. Microbiol.* 54: 977–983.
2. Aguilar CN, Augur C, Favela-Torres E, Viniegra-González G. 2001. Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochem.* 36: 565-570.
3. Aranda C, Robledo A, Loera O, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez R, Aguilar CN. 2006. Fungal Invertase Expression in Solid-State. *Fermentation Food Technol. Biotechnol.* 44(2): 229–233
4. Auria R, Ortiz I, Villegas E, Revah S. 1995. Influence of growth and high mould concentration on the pressure drop in solid state fermentations. *Process Biochem.* 30 (8):751-756.
5. Barrios-González J. 2010. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochem.* 47 (2012): 175–185.
6. Banki K, Hutter E, Colombo E, Gonchoroff NJ, Perl A. 1996. Glutathione levels and sensitivity to apoptosis are regulated by changes in transaldolase expression. *J. of Biol Chem.* 271 (51): 32994-33001.
7. Basten DEJW, Dekker PJT, Schaap PJ. 2003. Aminopeptidase C of *Aspergillus niger* is a novel phenylalanine aminopeptidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2):1246-1250.
8. Bellon-Maurel V, Orliac O, Christen P. 2003. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochem.* 38:881-896.
9. Berth M, Moser FM, Kolbe M, Bernhardt J. 2007. The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76:1223–1243.
10. Blackwell M, Vilgalys R, James TY, Taylor JW. [Internet] [Actualizado 30 Jun 2012]. Fungi. Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc. in The Tree of Life Web Project. [Consultado el 17 May 2016] Disponible en: <http://tolweb.org/Fungi/2377/2012.01.30>
11. Borin GP, Sanchez CC, de Souza AP, de Santana ES, de Souza AT, Leme AFP, et al. 2015 Comparative Secretome Analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during Growth on Sugarcane Biomass. *PLoS ONE* 10(6): e0129275.

12. Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of protein Utilizing The Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
13. Cabezón V, Llama-Palacios A, Nombela C, Monteoliva L, Gil C. 2009. Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. *Proteomics.* 9 (20), 4770–4786.
14. Cadena MM, Cornejo CJM, Prieto NJM, Gaitan GJ, Carasco SS, González CR, Favela TE, Gutiérrez RM y Saucedo CG. 1993. Características de medición de un metabolímetro para fermentadores en sustrato sólido. *REV MEX ING QUIM.* 14(2): 311-319.
15. Camacho-Morales RL, Castellanos AD, Zazueta-Sandoval R. 2010. Analysis of glicerol dehydrogenase activities present in *Mucor circinelloides* YR-1. *A van Leeuw J Microb* 98:437–445,
16. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. 2004. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electroph.* 25:1327-1333.
17. Celis JE, Gromov P. 1999. 2D protein electrophoresis: can it be perfected?. *Curr Opin Biotechnol.* 10:16-21.
18. Chauhan PS, Puri N, Sharma P, Gupta N. 2012. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93:1817–1830.
19. Courchesne PL, Luethy R, Patterson SD. 1997. Comparison of in-gel and on-membrane digestion methods at low to sub-pmol level for subsequent peptide and fragment-ion mass analysis using matriz-assisted-laser-desorption/ionization mass spectrometry. *Electroph.* 18:369-381
20. de la Motte RS, Wagner FW. 1987. *Aspergillus niger* sulfhydryl oxidase. *Biochem,* 26:7363-7371.
21. de Vries RP, Flitter SJ, van de Vondervoort PJI, Chaverroche MK, Fontaine T, Fillinger S, et al. 2003. Glycerol dehydrogenase, encoded by *gldB* is essential for osmotolerance in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 49 (1):131-141.
22. de Souza, DF; de Souza, CGM; Peralta, RM. 2001. Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamaritii* in solid-state fermentation. *Process Biochem.* 36(8-9):835-838.

23. Dilipkumar M, Rajasimman M, Rajamohan N. 2011. Optimization of inulinase production from garlic by *Streptomyces* sp. In solid state fermentation using statistical design. *Biotechnol. Res. Int.* 43:85-95.
24. Dinarvand M, Rezaee M, Masomian M, Jazayeri SD, Zareian M, Abbasi S, Ariff AB. 2013. Effect of C/N Ratio and media optimization through response surface methodology on simultaneous productions of intra- and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *BioMed Research International*. Article ID 508968, 13 pages.
25. Faccio G, Nivala O, Kruus K, Buchert J, Saloheimo M. 2011. Sulfhydryl oxidases: sources, properties, production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 91:957–966
26. Ferreira de Oliveira JMP, de Graaff LH. 2011. Proteomics of industrial fungi: trends and insights for biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 89:225-237.
27. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 246:64-71.
28. Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp.Biol.* 201: 1203–1209.
29. Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L.-J. et al.2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 2005, 438,1105–1115.
30. Gil-Bona A, Monteoliva L, Gil C. 2015. Global proteomic profiling of the secretome of *Candida albicans ecm33* cell wall mutant reveals the involvement of Ecm33 in Sap2 secretion. *J. Proteome Res.* 14, 4270–4281.
31. Graminha EBN, Gonçalves AZL, Pirota RDBP, Balsalobre MMA, Da Silva R, Gomes E. 2008. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Anim Feed Sci Tech.* 144 (1-2):1-22.
32. Graves PR, Haystead TAJ. 2002. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(1):39-63.
33. Gorg A, Obermaier C, Bough G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electroph.* 21:1037-1053
34. Gutiérrez-Rojas M, Córdova J, Auria R, Revah S, Favela-Torres E. 1995. Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support. *Biotechnol lett.* 17(2):219-224.

35. Han MJ, Kim NJ, Lee SY, Chang HN. 2010. Extracellular proteome of *Aspergillus terreus* grown on different carbon sources. *Curr Genet*. 56:369-382.
36. Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC. 1993. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:5011-5015.
37. Hill TW, Kafer E. 2001. Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. 48: 20-21.
38. Hölker U, Höfer M, Lenz J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. *Fungal Genet Newl*. 64: 75–186.
39. Houseknecht ES, Suh SO, Beck B, McKee M, Zhou J. 2008. Reclassification of ATCC 16404 and ATCC 9642 as *Aspergillus brasiliensis*. *Pharma Microbiol F Newsl*. 14(10):2-8.
40. Hosseinabadi T, Vahidi H, Nickavar B, Kobarfard F. 2014. *DARU J Pharm Sci*. 22:71.
41. Hunt SMN, Thomas MR, Sebastian LT, Pedersen SK, Harcourt RL, Sloane AJ, Wilkins MR. 2005. Optimal replication and the importance of experimental design for gel-based quantitative proteomics. *J Proteome Research*. 2005, 4, 809-819.
42. Joint Genome Institute (JGI). [Internet] [Actualizado 23 Jul 2012]. United States Department of Energy. [Consultado el 21 May 2016]. Disponible en: <http://genome.jgi.doe.gov/Aspbr1/Aspbr1.home.html>
43. Juárez-Luna G. 2014. Efecto de la agitación sobre la producción de CO₂ por hongos septados (*Aspergillus versicolor*) y no septados (*Rhizopus microsporus*) en cultivo en medio sólido. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. p.22, 48-50.
44. Jun H, Guangye H, Daiwen C. 2013. Insights into enzyme secretion by filamentous fungi: Comparative proteome analysis of *Trichoderma reesei* grown on different carbon source. *J Proteomic*. 191-201.
45. Kim Y, Nandakumar MP, Marten RM. 2007. Proteomics of filamentous fungi. *Trends in Biotech*. 25(9):396-401.
46. Kniemeyer O. 2011. Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. *Proteomics*. 11:3232-3243.

47. Kroll K, Pätz V, Kniemeyer O. 2014. Elucidating the fungal stress response by proteomics. *J of Proteomics*. 97:151-163.
48. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-685.
49. Lu X, Sun J, Nimtz M, Wissing J, Zeng AP, Rinas U. 2010. The intra-and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined médium with xylose or maltose as carbon substrate. *Microbial Cell Factories*. 9:23.
50. Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T. et al. 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438, 1157–1161.
51. Martínez-Lopez, R, Monteoliva, L, Diez-Orejas R, Nombela C, Gil C. 2004. The GPI-anchored protein CaEcm33p is required for cell wall integrity, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *Microbiol*. 150 (Pt 10), 3341–3354.
52. Marx IJ, van Wyk N, Smit S, Jacobson D, Viljoen-Bloom M, Volschenk H. 2013. Comparative secretome analysis of *Trichoderma asperellum*S4F8 and *Trichoderma reesei* Rut C30 during solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Biotechnol for Biofuels*. 6:172.
53. Missall TA, Pusateri ME, Donlin MJ, Chambers KT, Corbett JA, Lodge JK. 2006. Posttranslational, translational, and transcriptional responses to nitric oxide stress in *Cryptococcus neoformans*: implications for virulence. *Eukaryot Cell* (5)518–29.
54. Montiel-González AM, Viniegra-González G, Fernández FJ, Loera O. 2004. Effect of water activity on invertase production in solid state fermentation by improved diploid strain of *Aspergillus niger*. *Process Biochem*. 39:2085–2090.
55. Nuñez-Gaona, O. 2004. Producción de invertasa por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
56. Oda, K., Kakizono, D., Yamada, O., Iefuji, H., Akita, O., & Iwashita, K. 2006. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl Environ Microb*, 72(5), 3448-3457.
57. O´Farrel PJ. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 250:4007-4021

58. Pandey A; Soccol CR; Larroche C. 2008. Current developments in solid-state fermentation. 1a. Ed. Delhi. Springer. p. 58
59. Pel, H. J., de Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S. et al. 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat. Biotechnol.* 25, 221–231.
60. Pardo M, Monteoliva L, Vazquez P, Martínez R, Molero G, Nombela C, Gil C. 2004. PST1 and ECM33 encode two yeast cell surface GPI proteins important for cell wall integrity. *Microbiol.* 150:4157-4170.
61. Quadroni M, James P. 1999. Proteomics and automation. *Electroph.* 20:664-677
62. Rabilloud T. 2000. Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods. 1a. ed. Berlin: Springer. p. 1-3, 197-198.
63. Raimbault M. and Alazard D. 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European J Appl Microb Biotechnol.* 9, 199-209.
64. Ramesh, M. V., & Lonsane, B. K. 1991. Regulation of alpha-amylase production in *Bacillus-licheniformis* m27 by enzyme end-products in submerged fermentation and its overcoming in solid-state fermentation system. *Biotechnol Lett*, 13(5), 355-360.
65. Rodrigues, M. L.; Nakayasu, E. S.; Almeida, I. C.; Nimrichter, L. 2014. The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicles. *J. Proteomics.* 97, 177-186.
66. Rodriguez-Leon JA, Soccol CR, Pandey A, Rodriguez D. 2008. Factors affecting solid state Fermentation. En: Pandey A, Soccol C, Larroche C, editors. Current Developments in solid-state fermentation. 1st ed. New Delhi: Springer Asiatech Publisher. p. 26-47.
67. Romero-Gómez SJ. 2001. Producción de invertasa por *aspergillus niger* en fermentación líquida y sólida. Universidad Autónoma Metropolitana. Tesis de Doctorado.
68. Rouwenhorst RJ, Hensing M, Verbakel J, Scheffers WA, van Dijken JP. 1990. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl Environ Microb.* 56(11):3337-3345.
69. Sato I, Shimizu M, Hoshino T, Takaya N. 2009. The glutathione system of *Aspergillus niger* involves a fungus-specific glutathione S-transferase. *J of Biol Chem.* 284 (12):8042-8053.

70. Sharma A.D., Kainth S., Gill P.K. 2006. Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp., *J Food Eng.* 77, 486-491.
71. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. 1997. Mass spectrometric sequencing of proteins silver stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 68:850-858.
72. Singh P, Pandey A. 2009. Solid-State Fermentation Technology for Bioconversion of Biomass and Agricultural Residues. En: Pandey A, Nigam P. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Dordrecht: Springer Netherlands. p. 198–216.
73. Singhanian RR, Patel AK, Soccol CR, Pandey A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem Eng J.* 44(1):13-18.
74. Smith JE. 2004. *Biología. 4ta. ed.* Zaragoza (España): Editorial Acribia. p. 64-66.
75. Solís-Pereyra, S., Favela-Torres, E., Gutiérrez-Rojas, M., Roussos, S., Saucedo-Castañeda, G., Gunasekaran, P., Viniegra-González, G. (1996). Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations. *World J Microb Biot*, 12: 257-260.
76. Songpim M, Vaithanomsat P, Vanichsritatana W, Sirisansaneeyakul. 2011. Enhancement of inulinase and invertase production from a newly isolated *Candida guilliermondii* TISTR 5844. *Ksetsart J.* 45(4):675-685.
77. Soto N.O. 1993. Puesta en marcha y verificación de funcionamiento de un metabolímetro diseñado para medir gases provenientes de cultivos de fermentación sólida. Informe final de servicio social. Universidad Autónoma Metropolitana. p. 4-5.
78. Spanjers H, Takacs I, Brouwer H. 1999. Direct parameter extraction from respirograms for wastewater and biomass characterization. *Wat Sci Tech* 39 4: 137-145.
79. Szilagyi, M.; Kwon, N.J.; Dorogi, C.; Pocsi, I.; Yu, J.H.; Emri, T. 2010. The extracellular beta-1,3-endoglucanase EngA is involved in autolysis of *Aspergillus nidulans*. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1498-1508.
80. Torres-Mancera M. T. 2013. Obtención de ácido clorogénico de la pulpa de café a partir de extractos enzimáticos producidos por fermentación en medio sólido. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.

81. Urban C, Xiong X, Sohn K, Schroppel K, Brunner H, Rupp S. 2005. The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*; 57:1318–41.
82. Varga J, Kocsube S, Toth B, Frisvad JC, Perrone G, Susca A, Meijer M, Samson RA. 2007. *Aspergillus brasiliensis* sp.nov., a biseriate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *Int J Syst Evol Micr*. 57:1925-1932.
83. Viniestra-González G, Favela-Torres E. 2006. Why Solid-State Fermentation Seems to be Resistant to Catabolite Repression? *Food Tech Biotech*, 44(3), 397–406.
84. Vinzant TB, Adney WS, Decker SR, Baker JO, Kinter MT, Sherman NE, Fox JW, Himmel ME. 2001. Fingerprinting *Trichoderma reesei* hydrolases in a commercial cellulase preparation. *Appl Biochem Biotechnol*. 91:99–107.
85. Weiss W, Görg A. 2008. Electrophoresis. En: von Hagen J, ed. *Proteomic Sample Preparation*. Weinheim. Wiley-VCH. p. 129-143
86. Wilkins MR. 1994 2D electrophoresis: from protein maps to Genomes. proceedings of the International Meeting. Siena, Italy, September 5–7, 1994. *Electroph*. 16:1077–1322
87. Yan JX, Sanchez C, Tonella L, Williams KL, Hochstrasser DF. 1999. Studies of quantitative analysis of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Electroph*. 20:738-742.
88. Yates JR III. 1998. Mass spectrometry and the age of proteome. *J Mass Spectrom*. 33:1-19.
89. Yong Y, Bai YX, Li YF, Lin L, Cui YJ, Xia CG. 2008. Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity. *Process Biochem*, 43(11), 1179–1185.

11 ANEXOS

ANEXO 1

Curva estándar de proteína

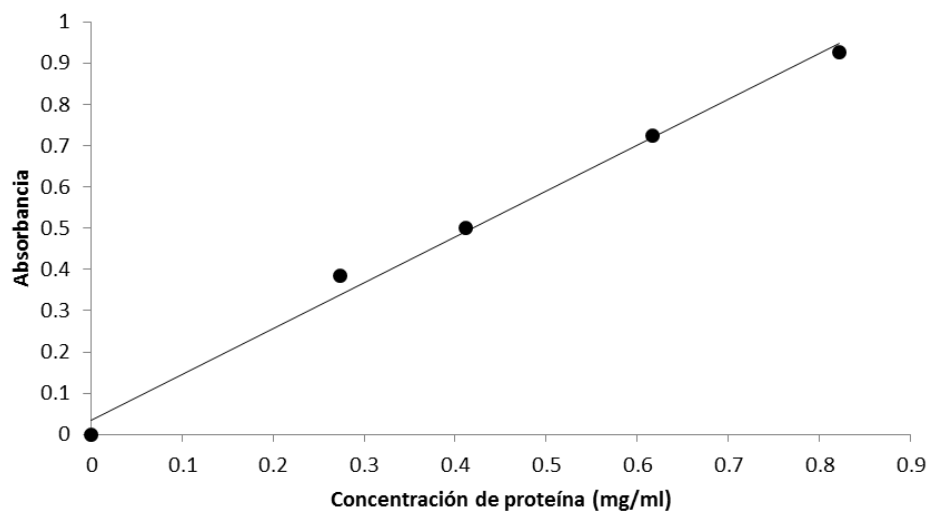


Figura A.1 Curva estándar de proteína (mg/mL) cuantificada por el procedimiento estándar de Bio-Rad por el método de Bradford (1976). Con una $R^2=0.992$ y con la cual se obtiene la siguiente ecuación:

$$Abs = 1.104C + 0.0351$$

ANEXO 2

Geles de resolución y compactación (Manual Bio-Rad)

Formulación 10 mL

Preparar y mezclar los reactivos excepto el TEMED y el persulfato de amonio (APS) al 10%, sonicar la mezcla durante 5 min.

Porcentaje de gel	H ₂ O dest. (mL)	Acrilamida/Bis (mL)	Amortiguador de gel (mL)	SDS 10% (mL)
4	6.1	1.3	2.5	0.1
10	4.1	3.3	2.5	0.1
12	3.4	4.0	2.5	0.1

El amortiguador de gel es de Tris-HCl 1.5 M y pH 8.8 para los geles de resolución, y de Tris-HCl 0.5 M y pH de 6.8 para el gel de compactación.

Previamente a elaborar el gel se añaden 50 µL de APS al 10% y 5 µL de TEMED al gel de resolución y 50 µL de APS al 10% y 10 µL de TEMED al gel de compactación.

Solución fijadora

Contiene etanol al 40% y ácido acético al 10%, disuelto en agua destilada.

Azul de coomassie coloidal (Candiano, 2004)

Contenido de la solución en g/L: Sulfato de amonio, 100; Azul de Coomassie G-250, 1.2; H₃PO₄ al 85%, 117.5 ml; etanol, 200 mL.

Un litro de solución se prepara añadiendo a 100 mL de H₂O destilada, 117.5 mL de H₃PO₄ al 85 % en agitación constante, posteriormente se adicionan lentamente 100 g de sulfato de amonio hasta que se disuelve completamente. Después se añaden 1.2 g de azul de coomassie y se mantiene en agitación hasta que se disuelvan todos los sólidos. Se añade agua destilada hasta alcanzar un volumen de 800 mL y finalmente se añaden 200 mL el etanol. Esta solución se elabora en un frasco ámbar, y se conserva a temperatura ambiente. Es estable durante seis meses. Se debe agitar al menos 15 min previo a su uso.

Amortiguador de disolución y solubilización (Manual Bio-Rad)

La solución estándar contiene:

Reactivo	Concentración
Urea	8M
CHAPS	2%
DTT	50 mM
Anfolitos	0.2%
Azul de Bromofenol	0.001%

Amortiguador de equilibrio (Bio-Rad)

Reactivo	Concentración
Urea	6M
SDS	2%
Tris-HCl, pH 8.8	0.375 M
Glicerol	20%

A este buffer solo se le agrega el DTT o la Iodoacetamida, dependiendo del paso de equilibrio que se vaya a realizar. EL DTT lleva una concentración del 2% y la Iodoacetamida del 3%.

Amortiguador de electrodo (10X)

Reactivo	g/L
Tris	30.3
Glicina	144
SDS	10
pH	8.3

Solución de ácido fórmico

Se prepara en una proporción de: 95% H₂O, 5% ACN y 0.1% ácido fórmico.

ANEXO 3

Curvas para determinación del PM de las proteínas a las 3 diferentes concentraciones.

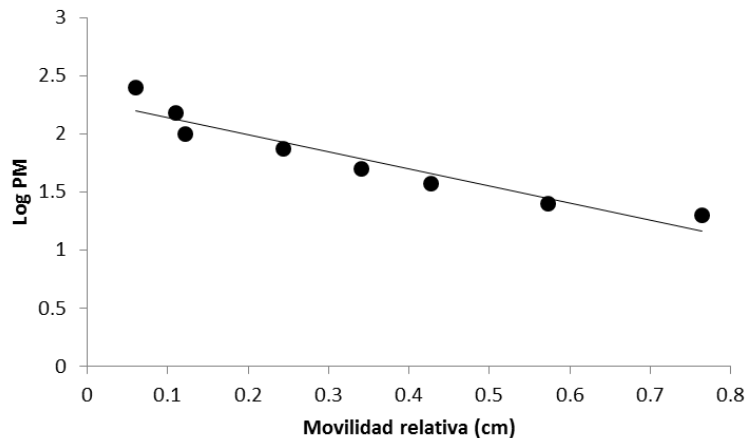


Figura A.2 Curva para la determinación del PM por movilidad relativa de la concentración de 25 g/L de sacarosa inicial. Con una $R^2=0.909$ y con la cual se obtiene la siguiente ecuación:

$$\text{Log PM} = -1.4692\text{Mov} + 2.2871$$

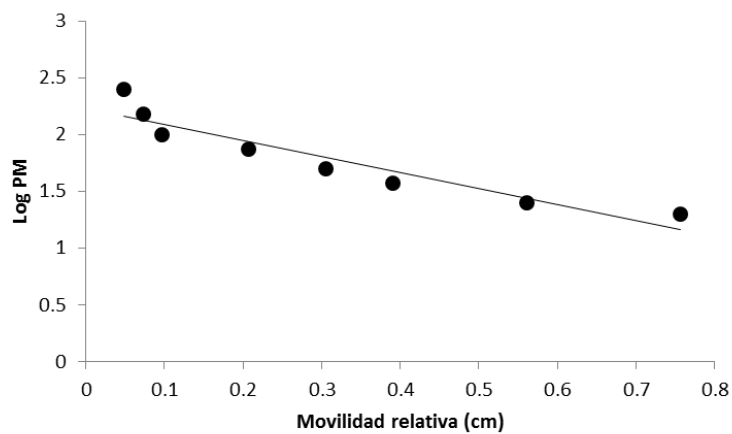


Figura A.3 Curva para la determinación del PM por movilidad relativa de la concentración de 150 g/L de sacarosa inicial. Con una $R^2=0.888$ y con la cual se obtiene la siguiente ecuación:

$$\text{Log PM} = -1.421\text{Mov} + 2.2351$$

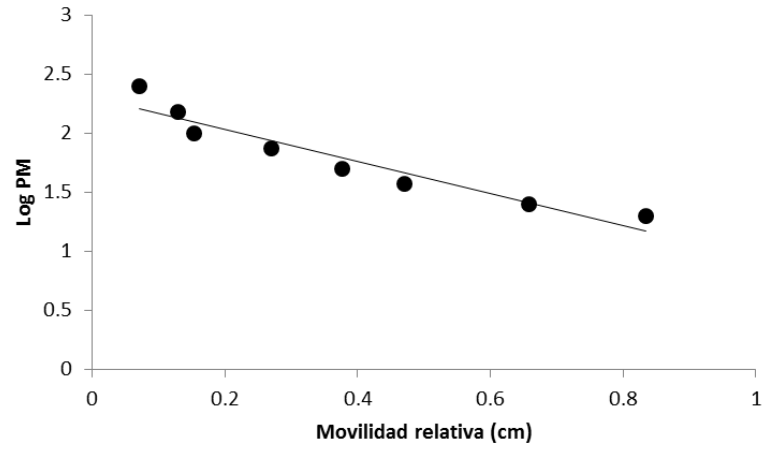


Figura A.4 Curva para la determinación del PM por movilidad relativa de la concentración de 300 g/L de sacarosa inicial. Con una $R^2=0.915$ y con la cual se obtiene la siguiente ecuación:

$$\text{Log PM} = -1.346\text{Mov} + 2.3007$$

ANEXO 4

Tablas de los análisis estadísticos desarrollados en el presente trabajo.

Los análisis se realizaron empleando las herramientas estadísticas de Excel, con un $p=0.01$ y $\alpha=0.05$.

Tabla A.1 ANOVA de las máximas tasas de producción de CO₂ para las concentraciones de 25 a 300 g/L de sacarosa inicial.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>g.l.</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1770.857	8	221.357	57.551	6.874E-08	2.948
Dentro de los grupos	42.309	11	3.846			
Total	1813.167	19				

Tabla A.2 Comparación entre grupos por la prueba LSD de las máximas tasas de producción de CO₂ para las concentraciones de 25 a 300 g/L. (x = grupos homogéneos).

Concentración (g/L)	25	50	100	150	175	200	225	250	300
25		x							
50			x						
100				x					
150					x				
175						X	x		
200							x		
225								x	
250									x
300									

Tabla A.3 ANOVA de las tasas específicas de producción de CO₂ para las concentraciones de 25 a 300 g/L de sacarosa inicial.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>g.l.</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.208	7	0.030	28.502	7.876E-06	3.135
Dentro de los grupos	0.0104	10	0.001			
Total	0.219	17				

Tabla A.4 Comparación entre grupos por la prueba LSD de tasas específicas de producción de CO₂ para las concentraciones de 25 a 300 g/L. (x = grupos homogéneos).

Concentración (g/L)	50	100	150	175	200	225	250	300
50								
100		x						
150								
175					X	X	X	X
200						X	X	
225							X	X
250								X
300								

Tabla A.5 ANOVA de los tiempos /ag para las concentraciones de 25 a 300 g/L de sacarosa inicial.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	g.l.	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	18.191018	7	2.59871686	0.54867654	0.780752189	3.1354648
Dentro de los grupos	47.3633675	10	4.73633675			
Total	65.5543855	17				

Tabla A.6 ANOVA de las máximas tasas de producción de CO₂ para las concentraciones de 25, 150 y 300 g/L de sacarosa inicial.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	g.l.	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2780.48253	2	1390.24127	630.98639	1.76612E-19	3.46680011
Dentro de los grupos	46.2689323	21	2.20328249			
Total	2826.75147	23				

Tabla A.7 Comparación entre grupos por la prueba LSD de las máximas tasas de producción de CO₂ para las concentraciones de 25, 150 y 300 g/L. (x = grupos heterogéneos).

Concentración de sacarosa (g/L)	25	150	300
25		x	X
150			X
300			

Tabla A.8 ANOVA de las tasas específicas de producción de CO₂ para las concentraciones de 25, 150 y 300 g/L de sacarosa inicial.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>g.l.</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.17165746	2	0.08582873	43.1928902	3.61711E-08	3.46680011
Dentro de los grupos	0.04172917	21	0.0019871			
Total	0.21338663	23				

Tabla A.9 Comparación entre grupos por la prueba LSD de las tasas específicas de producción de CO₂ para las concentraciones de 25, 150 y 300 g/L. (x = grupos heterogéneos).

Concentración de sacarosa (g/L)	25	150	300
25		x	X
150			X
300			

Tabla A.10 ANOVA de la concentración de proteína extracelular para las concentraciones de 25, 150 y 300 g/L de sacarosa inicial.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>g.l.</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1.61485932	2	0.80742966	70.2250852	9.0552E-10	3.49282848
Dentro de los grupos	0.22995477	20	0.01149774			
Total	1.84481409	22				

Tabla A.11 Comparación entre grupos por la prueba LSD de la concentración de proteína extracelular para las concentraciones de 25, 150 y 300 g/L. (x = grupos heterogéneos).

Concentración de sacarosa (g/L)	25	150	300
25		X	X
150			X
300			

Tabla A.12 ANOVA de los tiempos para las máximas tasas de producción de CO₂ para las concentraciones de 25, 150 y 300 g/L de sacarosa inicial.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>g.l.</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1129.13241	2	564.566204	298.461269	5.85754E-11	3.88529383
Dentro de los grupos	22.6990741	12	1.89158951			
Total	1151.83148	14				

Tabla A.13 Comparación entre grupos por la prueba LSD de los tiempos para las máximas tasas de producción para las concentraciones de 25, 150 y 300 g/L. (x= grupos heterogéneos).

Concentración de sacarosa (g/L)	25	150	300
25		X	X
150			X
300			

Tabla A.14 ANOVA de los tiempos *lag* para las concentraciones de 25, 150 y 300 g/L de sacarosa inicial.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>g.l.</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	45.6616169	2	22.8308085	8.47363586	0.005075065	3.88529383
Dentro de los grupos	32.3320126	12	2.69433438			
Total	77.9936296	14				

Tabla A.15 Comparación entre grupos por la prueba LSD de los tiempos *lag* para las concentraciones de 25, 150 y 300 g/L. (x = grupos homogéneos).

Concentración de sacarosa (g/L)	25	150	300
25		X	
150			
300			

ANEXO 5

Imágenes de los diferentes geles del secretoma

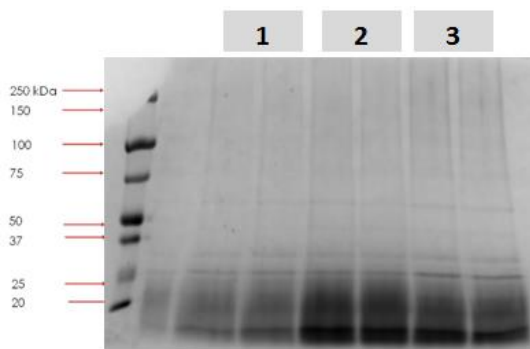


Figura A.5 Gel SDS-PAGE al 10 % de acrilamida con réplicas de las UE (1, 2 y 3) de la concentración de 300 g/L de sacarosa inicial, en cada carril se cargaron 30 μ g de proteína.

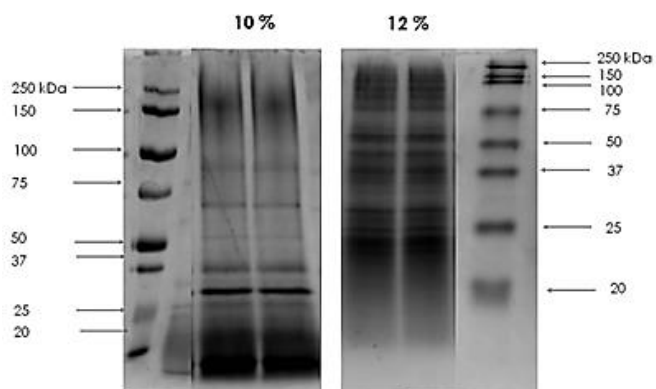


Figura A.6 Bandas de réplicas técnicas de UE de 150 g/L de sacarosa inicial, corridas en geles de 10 y 12 % de acrilamida y 30 μ g de proteína por carril.

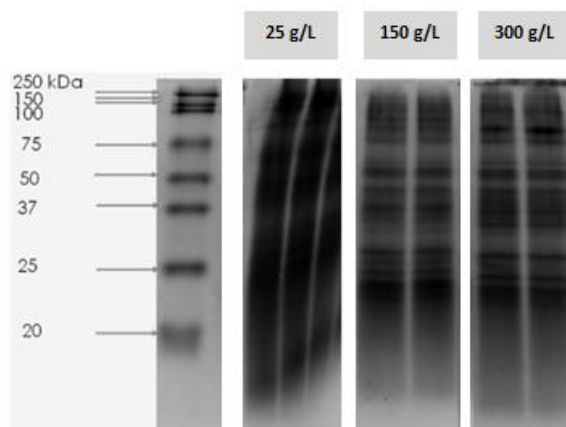


Figura A.7. Comparación de los perfiles del secretoma de *A. brasiliensis* cultivado en medio sólido con diferentes concentraciones de sacarosa inicial (25, 150 y 300 g/L), en geles SDS-PAGE al 12% de acrilamida, con 30 μ g de proteína por carril.