

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

**Efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la
producción de amilasas y análisis del secretoma de
Aspergillus niger en cultivo en medio sólido**

T E S I S

Para obtener el grado de Doctora en Biotecnología

P R E S E N T A

Gabriela Carrillo Sancén

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesores: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Dr. Gerardo A. Corzo Burguete

23 de febrero del 2017

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”

México D.F. a 23 de febrero del 2017

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

**Efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la producción de amilasas y análisis del
secretoma de *Aspergillus niger* en cultivo en medio sólido**

que presentó

Gabriela Carrillo Sancén

Comité de Tutores:

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Asesor: Dr. Gerardo A. Corzo Burguete

Jurado:

Presidente: Dr. Gerardo A. Corzo Burguete



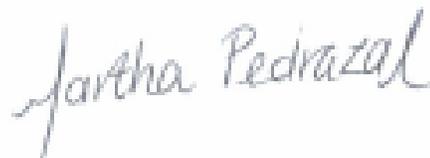
Secretario: Dr. Francisco Fierro Fierro



Vocal: Dra. Araceli Tomasini Campocosio



Vocal: Dra. María Martha Pedraza Escalona



RESUMEN

Las amilasas son enzimas de importancia industrial que llevan a cabo la hidrólisis del almidón. Las amilasas producidas por cultivo sumergido (CS) están sujetas a la represión catabólica por carbono en presencia de glucosa en el medio de cultivo. En cambio, el cultivo en medio sólido (CMS) ha mostrado ventajas en la producción de enzimas; entre ellas: reducir los efectos de la represión catabólica por carbono y mayores rendimientos de producción de enzimas. En el presente trabajo se evaluó el efecto de altas concentraciones de glucosa, como posible fuente represora de carbono, sobre la producción de amilasas y sobre el secretoma de *Aspergillus niger* cultivado en medio sólido.

El presente trabajo se dividió en tres etapas. En la primera sección de resultados empleando el medio A20G0, los valores máximos de actividad glucoamilasa obtenidos al tercer día de cultivo para *A. niger* 10 son de 2.0 U/mL medio y de 0.38 U/mL medio para el CMS y CS respectivamente, y para *A. nidulans* FGCS26 son de 1.0 U/mL medio y 0.11 U/mL medio para el CMS y CS respectivamente. Debido a que con la cepa *A. niger* 10 se obtuvo la máxima actividad glucoamilasa se seleccionó para los análisis del secretoma. Además, en esta sección de resultados se determinó la importancia de concentrar toda la fracción mineral del medio Hill y Kafer (2001) y mantener fija la relación carbono/sales minerales al evaluar altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo para evitar la reducción de actividad amilasa.

En la segunda sección de resultados se empleó respirometría para seguir de manera indirecta el crecimiento de *A. niger* 10 en CMS y seleccionar tres medios de cultivo para los análisis del secretoma. De los medios de cultivo evaluados, se seleccionó el medio A20G120 por tener la máxima tasa de producción de CO₂ más alta (14.1 mg/h/g_{ss}), el medio A20G60 con la μ_{CO_2} más rápida (0.35 h⁻¹) y el medio A20G0 se seleccionó ya que solo tiene almidón como fuente de carbono e inductor de la producción de amilasas.

En la tercera sección de resultados con el fin de obtener muestras para el secretoma de *A. niger* 10 en CMS en estados fisiológicos similares, se decidió tomar muestras cuando se alcanzó la máxima tasa de producción de CO₂ empleando los medios seleccionados. Los resultados mostraron que proteínas sin péptido señal amino terminal, el cual es necesario para la secreción a través de un mecanismo convencional, se detectaron en los medios con altas

concentraciones de glucosa; algunas de estas proteínas son proteínas “moonlighting” asociadas con patogénesis. Altas concentraciones de glucosa también produjeron mejores actividades amilasa. La actividad α -amilasa fue ocho veces mayor en los medios de cultivo con glucosa (A20G60 y A20G120) en comparación con el medio que solo contenía almidón. La actividad glucoamilasa era 29 y 20 veces mayor con las concentraciones de glucosa de 60 y 120 g/L, respectivamente, comparado con el medio que solo contenía almidón. Además, la presencia de glucosa tuvo un efecto variable en la abundancia de las isoformas de amilasas producidas por *A. niger* 10.

Se ha reportado en diversas ocasiones que en CMS se reduce el efecto de represión catabólica por carbono en la producción de enzimas de interés industrial, aunque no se conocen las causas de esto. Pero por primera vez, se reporta el efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la producción de enzimas de interés industrial, tal como las amilasas, mediante la descripción del secretoma. Se encontró que, un aumento en la actividad volumétrica de las amilasas producidas por *A. niger* 10 en CMS en presencia de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo se asoció con una variación en la abundancia de las isoformas de las amilasas identificadas y la aparición de isoformas de GlaA.

ABSTRACT

Amylases are enzymes of industrial importance that carry out the hydrolysis of starch. Amylases produced by submerged culture (SC) are subject to carbon catabolite repression in the presence of glucose in the culture medium. In contrast, solid state cultivation (SSC) has shown advantages in the production of enzymes; among them: to reduce the effects of carbon catabolite repression and greater yields of enzymes production. In the present work the effect of high glucose concentrations, as a possible carbon repressor, on the production of amylases and on the secretome of *Aspergillus niger* cultivated in solid medium was evaluated.

The present work was divided in three stages. In the first section of results using the A20G0 medium, the maximum values of glucoamylase activity obtained on the third day of culture for *A. niger* 10 are 2.0 U/mL of culture medium and 0.38 U/mL of culture medium for SSC and SC respectively, and for *A. nidulans* FGCS26 are 1.0 U/mL of culture medium and 0.11 U/mL of culture medium for SSC and SC respectively. Because with the strain *A. niger* 10 was obtained the maximum glucoamylase activity it was selected for the analysis of the secretome. In addition, in this section of results it was determined the importance of concentrating the entire mineral fraction of the Hill and Kafer medium (2001) and maintaining constant the carbon/mineral salts ratio when evaluating high concentrations of glucose in the culture medium to avoid the reduction of amylase activity.

In the second section of results, respirometry was used to indirectly follow the growth of *A. niger* 10 in SSC and to select three culture media for the analysis of the secretome. From the culture media evaluated, the A20G120 medium was selected for having the highest maximum CO₂ production rate (14.1 mg /hr./gss), the A20G60 medium with the fastest μ_{CO_2} (0.35 h⁻¹) and A20G0 medium was selected as it only has starch as a carbon source and inducer of the production of amylases.

In the third section of results in order to obtain samples for the secretome of *A. niger* 10 in SSC in similar physiological states, it was decided to take samples when the maximum CO₂ production rate was reached using the selected media. The results showed that proteins without an amino terminal signal peptide, which is necessary for secretion through a conventional mechanism, were detected in media with high glucose concentrations; some of these proteins are moonlighting proteins associated with pathogenesis. High glucose

concentrations also resulted in increased amylase activities. The α -amylase activity was eight times higher in the glucose culture media (A20G60 and A20G120) as compared to the medium containing only starch. The glucoamylase activity was 29 and 20 times higher at glucose concentrations of 60 and 120 g/L, respectively, compared to the medium containing only starch. In addition, the presence of glucose had a variable effect on the abundance of the amylase isoforms produced by *A. niger* 10.

It has been reported on several occasions that SSC reduces the effect of carbon catabolite repression in the production of enzymes of industrial interest, although the causes of this are not known. Here is reported, for the first time, the effect of high glucose concentrations on the production of enzymes of industrial interest, such as amylases, by the description of the secretome. Finding that an increase in the volumetric activity of the amylases produced by *A. niger* 10 in SSC in the presence of high concentrations of glucose in the culture medium was associated with a variation in the abundance of the isoforms of the identified amylases and the appearance of isoforms of GlaA.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 <i>Aspergillus</i>	3
2.1.1 <i>Aspergillus niger</i>	3
2.1.2 <i>Aspergillus nidulans</i>	4
2.2 Amilasas.....	4
2.2.1 Aplicaciones de las amilasas	5
2.2.2 Fuentes de amilasas	7
2.2.3 Producción de amilasas	9
2.2.4 Isoformas de α -amilasa y glucoamilasa	11
2.2 Cultivo en medio sólido	14
2.3 Secreción de proteínas en hongos	14
2.3.1 Mecanismo convencional.....	15
2.3.2 Mecanismo no convencional	15
2.3.3 Proteínas “moonlighting”	16
2.4 Análisis proteómico.....	16
2.4.1 Proteómica basada en geles de 2 dimensiones	17
2.4.2 Análisis proteómico de hongos filamentosos	18
2.4.3 Análisis del secretoma de hongos filamentosos	21
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	27
5.1 Objetivo general	27
5.2 Objetivos específicos.....	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1 Reactivos	28
6.2 Microorganismos.....	28
6.2.1 Conservación.....	29
6.2.2 Propagación.....	29
6.3 Cultivos	30

6.3.1 Producción de inóculo	30
6.3.2 Medios de cultivo	30
6.3.3 Cultivos	31
6.4 Obtención de extractos de proteína extracelular	32
6.4.1 Obtención de extractos crudos de proteína extracelular	32
6.4.2 Preparación de proteína extracelular para análisis del secretoma	33
6.5 Técnicas analíticas.....	34
6.5.1 Biomasa.....	34
6.5.2 Respirimetría	34
6.5.3 Proteína	35
6.5.4 Humedad	35
6.5.5 Actividad de agua.....	36
6.6 Determinación de actividades enzimáticas.....	36
6.6.1 Glucoamilasa.....	36
6.6.2 α -Amilasa	37
6.6.3 Zimograma de actividad amilasa.....	37
6.7 Electroforesis.....	40
6.7.1 Electroforesis SDS-PAGE.....	40
6.7.2 Electroforesis en 2 dimensiones	42
6.7.3 Fijación y tinción de los geles de electroforesis.....	45
6.8 Adquisición y análisis de imágenes, e identificación de proteínas con cambio de abundancia en geles de 2 dimensiones.....	46
6.8.1 Adquisición de imágenes	46
6.8.2 Análisis de imágenes.....	46
6.8.3 Identificación de proteínas	48
6.9 Análisis de proteínas por MALDI-TOF MS	48
6.10 Análisis bio-informático.....	50
6.11 Análisis estadístico.....	50
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
7.1. Producción de amilasas por dos cepas de <i>Aspergillus</i> en cultivos en medio sólido y sumergido.....	51
7.1.1 Producción de amilasas por <i>A. niger</i> 10 y <i>A. nidulans</i> FGCS26 en CMS Y CS.....	51
7.1.2 Producción de glucoamilasa por <i>A. niger</i> 10 en CMS con medios con C/N variable	56

7.1.3 Producción de amilasas por <i>A. niger</i> 10 en CMS y CS con medios con C/N constante	59
7.1.4 Conclusiones del capítulo.....	67
7.2 Análisis de respirometría del CMS y CS de <i>A. niger</i> 10.....	68
7.2.1 Análisis de respirometría del CMS y CS de <i>A. niger</i> 10.....	68
7.2.2 Efecto de 5 medios de cultivo en el análisis de respirometría del CMS de <i>A. niger</i> 10.....	72
7.2.3 Producción de extractos extracelulares para el análisis del secretoma del CMS de <i>A. niger</i> 10	77
7.2.4 Conclusiones del capítulo.....	80
7.3 Análisis del secretoma de <i>A. niger</i> 10 cultivado en medio sólido con diferentes concentraciones de nutrientes.	81
7.3.1 Actividades glucoamilasa y α -amilasa	89
7.3.2 Zimogramas de actividad amilasa	90
7.3.3 Análisis proteómico de proteínas extracelulares de <i>A. niger</i> 10 en CMS	92
7.3.4 Conclusiones del capítulo.....	105
8. CONCLUSIONES GENERALES	106
9. PERSPECTIVAS	107
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
11. ANEXOS.....	124
ANEXO A. Características de los cultivos evaluados	124
ANEXO B. Macronutrientes y elementos traza de los medios de cultivo evaluados	126
ANEXO C. Agrolita y su preparación para el CMS	127
ANEXO D. Análisis de respirometría de los cultivos del Capítulo 2 de Resultados	129
ANEXO E. Ajuste de modelos a la curva de producción de CO ₂	134
ANEXO F. Resumen del análisis de cambio de abundancia.....	138
ANEXO G. Información de las proteínas extracelulares identificadas por MALDI-TOF MS	143
ANEXO H. Búsqueda de proteínas analizadas mediante MALDI-TOF MS en Mascot que no tuvieron un “score” global valido.....	144
ANEXO I. Espectros de masa de los “spots” de proteínas analizadas mediante MALDI-TOF MS	145

1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas amilolíticas pertenecen al grupo de enzimas más estudiado y son las encargadas de llevar a cabo la hidrólisis de almidón (van der Maarel y col. 2002; Gupta y col. 2003). Representan un grupo de enzimas cuya síntesis es afectada por la represión catabólica por carbono en presencia de glucosa en CS (Ramesh y Lonsane 1991; Ertan y col. 2014).

Los *Aspergilli* pertenecen a un grupo de hongos filamentosos; entre ellos, hay varias especies que tienen un impacto en la salud humana como agentes patógenos; así como especies benéficas utilizadas para producir alimentos y enzimas industriales (Galagan y col. 2005). Dentro del género *Aspergillus*, el hongo *A. nidulans* tiene un papel central como organismo modelo (Galagan y col. 2005). *A. niger* se ha convertido en uno de los principales hongos de la biotecnología industrial ya que es muy eficiente en la producción de enzimas degradadores de polisacáridos (principalmente amilasas, pectinasas y xilanasas) y de producción de ácidos orgánicos (principalmente ácido cítrico) (Andersen y col. 2011). Estos productos de interés industrial son secretados por el hongo.

A pesar de la importancia de la secreción de productos biotecnológicos, hay pocos estudios del secretoma de estos hongos filamentosos. Análisis proteómicos han mostrado que la composición de proteínas extracelulares producidas por hongos filamentosos es susceptible a estímulos del ambiente (Callegari y Navarrete 2012). Por ejemplo, se ha reportado que la fuente de carbono afecta fuertemente la composición del secretoma pero tiene menor influencia en la composición del proteoma intracelular de *A. niger* (Lu y col. 2010). También se ha reportado que otros factores, tales como pH (Aday y col. 2010), temperatura (Aday y col. 2013) y tipo de cultivo (Oda y col. 2006) afectan la composición de proteínas extracelulares producidas por hongos filamentosos.

El cultivo en medio sólido (CMS) tiene gran potencial en la producción de enzimas microbianas de interés industrial, incluyendo enzimas hidrolíticas tales como celulasas, xilanasas, pectinasas y amilasas (Pandey y col. 1999), las cuales son producidas y secretadas por cultivos fúngicos. Se han reportado ventajas de la producción de enzimas en CMS con respecto a cultivo sumergido (CS). Entre ellas están: mayores rendimientos de producción de enzimas en CMS (Pandey y col. 1999; Viniegra-González y Favela-Torres 2006) y mayor resistencia a la represión catabólica por carbono (Viniegra-González y Favela-Torres 2006).

La resistencia del CMS a la represión catabólica por carbono se ha reportado para enzimas de interés industrial tales como pectinasas (Díaz-Godínez y col. 2001; Solis-Pereira y col. 1993), invertasas (Giraldo y col. 2012), lacasas (Téllez-Jurado y col. 2006), tanasas (Aguilar y col. 2001) y amilasas (Nandakumar y col. 1999; Ramesh y Lonsane 1991; Ertan y col. 2014). Sin embargo, el efecto de un represor de carbono en el secretoma durante la producción de enzimas de interés industrial no se ha reportado. Este efecto se podría analizar mediante un análisis proteómico.

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la producción de amilasas y la composición del secretoma durante el CMS de *A. niger*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la siguiente revisión bibliográfica primero se hace una breve descripción de los hongos *A. niger* y *A. nidulans*. Posteriormente, se hace una descripción de tipos de amilasas, sus aplicaciones y reportes de la producción de isoformas de estas enzimas. Además se tratan los temas de cultivo en medio sólido y secreción de proteínas en hongos. Finalmente, se aborda el tema de análisis proteómicos de hongos filamentosos.

2.1 *Aspergillus*

Por su impacto en la salud humana y en la industria es que se ha secuenciado el genoma de diversas especies de *Aspergillus*, entre ellas están: *A. clavatus*, *A. fischeri*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. niger*, *A. parasiticus* y *A. terreus* (Andersen y Nielsen 2009).

Los Aspergilli son hongos ascomicetos filamentosos saprótrofos que en la naturaleza crecen predominantemente en material vegetal muerto o en decaimiento. Este material vegetal consiste principalmente de polisacáridos, que necesitan ser degradados antes de ser utilizados como fuente de carbono (Coutinho y col. 2009). Es por ello que los Aspergilli presentan un amplio espectro de enzimas para la degradación de polisacáridos, proteínas y lípidos (Pel y col. 2007). Razón por la cual son ampliamente utilizados para la producción industrial de enzimas incluyendo amilasas, xilanasas, celulasas y lipasas (Murakoshi y col. 2012). A continuación se hace una breve descripción de la importancia de dos hongos del género *Aspergillus*.

2.1.1 *Aspergillus niger*

Por su importancia a nivel industrial, se ha secuenciado el genoma de tres cepas de *A. niger*. *A. niger* CBS 513.88 fue la primer cepa a la que se secuenció su genoma; es una progenitora de cepas productoras de glucoamilasa a nivel industrial que actualmente están en uso (Pel y col. 2007). Andersen y Nielsen (2009) mencionan que la segunda cepa en ser secuenciado su genoma fue *A. niger* ATCC 9029; se trata de una cepa comúnmente utilizada en laboratorios en estudios de producción de enzimas (Thygesen y col. 2003), ácido cítrico (Xie y West 2006) y producción de etanol en CMS (Rocha y col. 2013). La tercer cepa cuyo

genoma fue secuenciado es *A. niger* ATCC 1015. Esta cepa es utilizada para la producción de ácido cítrico (Andersen y col. 2011). El análisis comparativo de los genomas de varias especies de *Aspergillus* demuestran que *A. niger* y *A. oryzae* producen el porcentaje más alto de enzimas extracelulares (Pel y col. 2007).

2.1.2 *Aspergillus nidulans*

En contraste con la mayoría de los Aspergilli, *A. nidulans* presenta un ciclo sexual bien caracterizado y, por lo tanto, un sistema genético bien desarrollado. La investigación de *A. nidulans* ha avanzado en el estudio de la fisiología celular eucariota, que contribuye a nuestra comprensión de la regulación metabólica, el control del ciclo celular, la estructura de la cromatina, la función del citoesqueleto, la reparación del DNA, el control de pH, la morfogénesis, la estructura de ADN mitocondrial y enfermedades genéticas humanas (Galagan y col. 2005). La secuenciación del genoma de *A. nidulans* FGSC A4 se publicó en el 2005 (Galagan y col. 2005) siendo de los primeros hongos del género Aspergilli en ser secuenciados.

2.2 Amilasas

Como se mencionó previamente los Aspergilli crecen principalmente en material vegetal. Los polisacáridos de plantas se pueden dividir en dos grandes grupos de acuerdo a su localización en polisacáridos de pared celular y de almacenamiento, siendo el almidón y la inulina los polisacáridos de almacenamiento más comunes en plantas (Coutinho y col. 2009). El almidón contiene dos tipos de polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina. La amilosa es un polímero lineal de moléculas de glucosa unidas con enlaces glucosídicos $\alpha,1-4$; por su parte, la amilopectina consiste de cadenas cortas de unidades de glucosa con unión $\alpha,1-4$ y cadenas laterales de glucosa unidas con enlace $\alpha,1-6$ (van der Maarel y col. 2002).

Las enzimas amilolíticas llevan a cabo la hidrólisis del almidón, produciendo una gran diversidad de productos incluyendo dextrinas y progresivamente polímeros más pequeños compuestos de unidades de glucosa (van der Maarel y col. 2002; Gupta y col. 2003). Se conoce un gran número de enzimas que hidrolizan el almidón en diferentes productos y una acción combinada de varias enzimas es requerido para hidrolizar el almidón completamente

(Gupta y col. 2003). van der Maarel y col. (2002) mencionan que hay básicamente cuatro grupos de enzimas que convierten almidón: endoamilasas, exoamilasas, enzimas desramificantes y transferasas. A continuación se describe cada grupo.

Endoamilasas. Catalizan la hidrólisis de forma aleatoria del enlace α ,1-4 glucosídico presente en la parte interna (endo-) de la cadena de amilosa y amilopectina. La α -amilasa (EC 3.2.1.1) es una endoamilasa bien conocida. El producto de la acción de las α -amilasas son oligosacáridos de longitud variable con una configuración α y dextrinas de límite- α , que constituyen oligosacáridos ramificados (van der Maarel y col. 2002; Gupta y col. 2003).

Exoamilasas. Actúan en residuos externos de glucosa de la amilosa y amilopectina y solo producen glucosa (glucoamilasa o α -glucosidasa), o maltosa y dextrina de límite β (β -amilasa) (van der Maarel y col. 2002; James y Lee 1997). Las exoamilasas hidrolizan desde el extremo no reductor (Gupta y col. 2003). La glucoamilasa (EC 3.2.1.3) y α -glucosidasa (EC 3.2.1.20) rompen los enlaces glucosídicos α ,1-4 y α ,1-6 y difieren en su preferencia por sustratos. La α -glucosidasa actúa mejor en maltooligosacáridos cortos y libera glucosa con una configuración α , mientras que la glucoamilasa hidroliza mejor polisacáridos de cadena larga y convierte la configuración de la glucosa de α a β (van der Maarel y col. 2002).

Enzimas desramificantes. Solo hidrolizan enlaces glucosídicos α ,1-6. Ejemplos de ellas son la isoamilasa (EC 3.2.1.68) y la pululanasa tipo I (EC 3.2.1.41) (van der Maarel y col. 2002).

Transferasas. Rompen el enlace glucosídico α ,1-4 de la molécula donadora y transfieren a un aceptor glucosídico con la formación de un nuevo enlace glucosídico. Algunos ejemplos de ellas son la amilomaltasa (EC 2.4.1.25) y la ciclodextrina glicosiltransferasa (EC 2.4.1.19) (van der Maarel y col. 2002).

Los hongos del género *Aspergillus* producen principalmente amilasas de los dos primeros grupos.

2.2.1 Aplicaciones de las amilasas

A continuación se describen algunas aplicaciones de las amilasas, en particular de α -amilasas y glucoamilasas.

Producción industrial de glucosa y fructosa a partir de almidón

El método de producción de glucosa con hidrólisis ácida se ha reemplazado recientemente por un tratamiento enzimático debido a que se generan menos productos secundarios en comparación con la hidrólisis ácida (Spier y col. 2007; van der Maarel y col. 2002). En la revisión de van der Maarel y col. (2002) se describe el procesamiento industrial del almidón para la obtención de glucosa, a continuación se resume este proceso. Para una conversión completa en jarabes de glucosa, el primer paso es la licuefacción del almidón en dextrinas solubles de cadena corta, esto por medio de α -amilasa. El siguiente paso es la sacarificación del jarabe de hidrolizados de almidón en un jarabe de alta concentración de glucosa, esto se realiza por medio de glucoamilasa. Un problema en este paso es que la glucoamilasa hidroliza lentamente enlaces glucosídicos $\alpha,1-6$. Esto representa un problema en la acumulación de isomaltosa. Una solución a este problema es usar pululanasa, que eficientemente hidroliza enlaces $\alpha,1-6$. Un tercer paso en el procesamiento industrial del almidón es la conversión del jarabe de alta glucosa en un jarabe de alta fructosa, esto por medio de glucosa isomerasa (EC 5.3.1.5). Este último paso se realiza porque el poder edulcorante de la fructosa es casi el doble que el de la glucosa.

Otras aplicaciones

En diversas aplicaciones se adicionan en conjunto α -amilasas y glucoamilasas para la degradación de almidón en azúcares fermentables que, posteriormente, son utilizados por levaduras. A continuación se describen algunos ejemplos. En la industria de elaboración de pan se adicionan glucoamilasas y α -amilasas a la harina para asistir en la conversión del almidón en maltosa y azúcares fermentables. Los azúcares fermentables son utilizados por la levadura para generar dióxido de carbono que hace que la masa suba (van der Maarel y col. 2002; James y Lee 1997). En el proceso de elaboración de cerveza son adicionadas α -amilasas y glucoamilasas para degradar el almidón del grano malteado en azúcares simples que pueden ser fermentados por la levadura de cerveza (James y Lee 1997). Además, en conjunto α -amilasas y glucoamilasas se pueden emplear como pretratamiento para la producción de bioetanol a partir de granos de baja calidad y materiales de desecho que son excedentes de productos agrícolas que contienen almidón (James y Lee 1997).

Las α -amilasas también se emplean en la clarificación de cervezas y jugos de frutas, pretratamiento de alimento para animales para mejorar la digestibilidad y en detergentes de lavandería y lavavajillas (van der Maarel y col. 2002).

2.2.2 Fuentes de amilasas

Las amilasas son producidas por plantas, animales y microorganismos; sin embargo, las producidas a nivel industrial son de origen microbiano (Pandey y col. 2000; Gupta y col. 2003). Las principales ventajas de la producción de amilasas usando microorganismos es que su producción a granel es económica y además, los microorganismos son fáciles de manipular para obtener enzimas con las características deseadas (Gupta y col. 2003).

α -Amilasa

Se ha realizado la producción de α -amilasa a partir de varios hongos, levaduras, bacterias y actinomicetos, aunque las α -amilasas de hongos y bacterias han dominado aplicaciones a nivel industrial (Pandey y col. 2000; Gupta y col. 2003). Algunas especies de *Bacillus* son las fuentes más importantes de α -amilasa, principalmente *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis*, que son empleadas en aplicaciones comerciales en la producción de α -amilasa (Pandey y col. 2000). Algunos ejemplos de industrias que producen α -amilasa a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis* son: Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA; Shandong Sukahan Bio-technology Co., Shandong, China; Megazyme, Bray, Ireland. Entre los hongos que se han empleado en la producción de glucoamilasa están *Rhizopus* sp., *Thermomyces lanuginosus*, *Penicillium brunneum*, *Mucor pusillus*, *Trichoderma viride* y varias especies de *Aspergillus* sp. (Pandey y col. 2000; Gupta y col. 2003). *A. niger* es muy utilizado para la producción de α -amilasa en CMS (Spier y col. 2006; Spier y col. 2007) y en CS (Li y col. 1984; Rezaei y col. 2009).

Glucoamilasa

La producción industrial de glucoamilasa generalmente es a partir de fuentes microbianas. Los hongos filamentosos constituyen la fuente principal de glucoamilasa (Pandey y col. 2000); algunas de ellas son: *A. awamori*, *A. candidus*, *A. foetidus*, *A. oryzae*, *A. phoenicus*, *A. saitari*, *A. terreus* y *A. niger* (Pandey y col. 2000; Norouzian y col. 2006). La gran cantidad de estudios de la producción de glucoamilasa por *A. niger* en CMS (Li y col. 1984; Pandey 1990;

Pandey 1991; Pandey y Radhakrishnan 1993; Pandey y col. 1994; Spier y col. 2006; Spier y col. 2007) y en CS (Amirul y col. 1996; Withers y col. 1998; Metwally 1998; Pedersen y col. 2000; Kelly y col. 2004; Rajoka y Yasmeen 2005) y la producción de glucoamilasa a nivel industrial a partir de este hongo (por ejemplo: Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA; Megazyme, Bray, Ireland) destaca la importancia de *A. niger* como fuente importante de la producción de glucoamilasa.

A. nidulans no se ha empleado para la producción de α -amilasa o glucoamilasa comercial, la importancia de este hongo en la producción de amilasas radica en los estudios básicos a nivel molecular de la producción de estas enzimas (Agger y col. 2001; Murakoshi y col. 2012; Nakamura y col. 2006).

Producción de amilasas por especies de *Aspergillus*

Pel y col. (2007) reportaron que la familia de hidrolasas involucradas en la degradación de almidón es más grande en *Aspergilli* que en otros hongos. En la Tabla 2.1 se muestra el número de genes codificantes de enzimas involucradas en la degradación del almidón presentes en el genoma de cuatro especies de *Aspergillus*.

Tabla 2.1 Tipos de amilasas producidas por diferentes especies de *Aspergillus* y número de genes presentes en sus genomas que codifican cada una de ellas (Pel y col. 2007).

Enzima	<i>A. niger</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. oryzae</i>
α -amilasa	4	3	2	3
α -1,6-glicosidasa	2	2	5	5
α -1,3-glucano sintasa	5	2	3	3
Similar a α -amilasa anclada-GPI*	3	3	3	2
Similar a α -amilasa intracelular	2	1	1	2
Enzima desramificante de glucógeno	2	2	1	2
Glucoamilasa	2	2	5	3

*GPI: glicosil fosfatidilinositol.

A continuación se describe la producción, inducción y secreción de α -amilasa y glucoamilasa por *Aspergilli*.

2.2.3 Producción de amilasas

La mayoría de los procesos de producción de glucoamilasas son en CS; sin embargo, su producción por CMS también ha ganado interés (Pandey y col. 2000; James y Lee 1997). Entre los factores más importantes que afectan la producción de amilasas están la composición del medio de cultivo, pH del medio, temperatura, aireación, fuente de carbono y nitrógeno y control de contaminantes (Gupta y col. 2003; James y Lee 1997).

La fuente de carbono es uno de los factores importantes en la producción de amilasas. A continuación se describe el efecto del tipo de fuente de carbono y su concentración para la producción de amilasas en CS y en CMS.

Para la producción de glucoamilasa en CS se ha empleado almidón soluble (15 g/L) con *Thermomyces lanuginosus* (Haasum y col. 1991), maltosa o glucosa (20 g/L) con *A. niger* (Pedersen y col. 2000), harina de yuca o maltosa (20 g/L) con *A. awamori* (Chiquetto y col. 1992). Para la producción de α -amilasa en CS se ha empleado glucosa (25 g/L) con *A. oryzae* (Carlsen y col. 1996), maltosa (20 g/L) con *A. oryzae* (Santerre Henriksen y col. 1999) y almidón (hasta 40 g/L) con *A. niger* (Rezaei y col. 2009). En reportes de la producción de ambas amilasas, α -amilasa y glucoamilasa, en CS han empleado almidón de trigo (20 g/L) con *Aspergillus* sp. (Abe y col. 1988) y cebada cruda (20 g/L) con *A. kawachii* (Shoji y col. 2007).

Para la producción de amilasas en CMS generalmente se emplea un soporte sustrato el cual es el inductor y fuente de carbono; algunos ejemplos de ellos son: salvado de trigo, salvado de arroz (Pandey y Radhakrishnan 1993; Pandey y col. 1994) y bagazo de caña de azúcar impregnado con almidón de yuca (Spier y col. 2006) con *A. niger*, cáscara de papa con *Bacillus subtilis* (Mukherjee y col. 2009) y salvado de trigo con *Brevibacterium linens* (Shabbiri y col. 2012).

En los medios de cultivo descritos empleados en la producción de amilasas tanto en CS como en CMS la fuente carbono es el inductor de la producción de estas enzimas. A continuación se hace una descripción de la inducción de la producción de amilasas.

Inducción de la producción de amilasas

Las amilasas son enzimas inducibles en especies de *Aspergillus*; generalmente se inducen en presencia de almidón o de sus productos de hidrólisis (Gupta y col. 2003; Murakoshi y col.

2012). Sin embargo, se ha reportado un nivel basal de glucoamilasa constitutiva en *Aspergillus* (Rajoka y Yasmeen 2005; Chiquetto y col. 1992).

Estudios previos han mostrado que la producción de α -amilasa y glucoamilasa en *A. oryzae* y *A. nidulans* es inducida por glucobiosas y glucotriosas incluyendo kojibiosa, maltosa, isomaltosa y panosa (Gupta y col. 2003; Murakoshi y col. 2012; Nakamura y col. 2006; Kato y col. 2002). La isomaltosa ha sido reportada como inductor de la síntesis de α -amilasa en *A. nidulans* (Murakoshi y col. (2012), Kato y col. (2002) y Makita y col. (2009). Estos autores describieron a la isomaltosa como inductor fisiológico debido a que no requiere de conversión enzimática para exhibir su actividad de inducción ; además, ha mostrado tener la actividad de inducción más fuerte que se ha examinado hasta la fecha (Murakoshi y col. 2012; Kato y col. 2002; Makita y col. 2009).

AmyR es el activador transcripcional responsable de la inducción de genes amilolíticos en las especies de *Aspergillus* (Nakamura y col. 2006; Murakoshi y col. 2012). AmyR tiene un motivo de unión a ADN $Zn(II)_2Cys_6$ en su extremo N terminal y se une a la secuencia $CGGN_8(C/A)GG$ en varios promotores de amilasa para activar la transcripción (Nakamura y col. 2006; Murakoshi y col. 2012). La transcripción de los genes de amilasas es regulada por la localización nuclear de AmyR; la isomaltosa provoca la acumulación nuclear de AmyR (Murakoshi y col. 2012). Los genes amilolíticos regulados por AmyR en *A. nidulans* son *agdA*, *agdB*, *agdE*, *agdF*, *amyA*, *amyB*, *amyF* y *glaB* (Nakamura y col. 2006; Kojima y col. 2016). También se ha demostrado que la expresión de enzimas amilolíticas (glucoamilasa, amilasa ácida A y α -amilasa A) disminuye a nivel transcripcional y traduccional en *A. niger* CICC2462 al eliminar el factor de transcripción *amyR* en ese hongo (Zhang y col. 2016).

La glucosa es generalmente reconocida como una fuente de carbono represora de la síntesis de amilasas en *Aspergillus* sp. Sin embargo, en algunas cepas de *A. oryzae* y *A. niger* actúa como represor y como inductor de la síntesis de α -amilasa (Gupta y col. 2003; Murakoshi y col. 2012). Esto plantea la posibilidad de que la glucosa por sí misma puede inducir la expresión de genes amilolíticos. Aunque la glucosa tiene la capacidad de inducir la producción de α -amilasa, esta actividad generalmente se enmascara por la represión catabólica de carbono dependiente de CreA (Murakoshi y col. 2012).

2.2.4 Isoformas de α -amilasa y glucoamilasa

Glucoamilasa

La mayoría de las glucoamilasas fúngicas son glicoproteínas (Vandersall y col. 1995; James y Lee 1997). La unión del carbohidrato a la proteína es principalmente por enlaces glucosídicos del grupo hidroxilo de los residuos L-serina y L-treonina a N-acetilgalactosamina (O-linked) y enlaces glucosídicos del grupo $-NH_2$ de residuos L-asparagina y L-glutamina a N-acetilglucosamina (N-linked) (Pazur y col. 1971). Pazur y col. (1971) reportaron la producción de dos isoenzimas de glucoamilasas por *A. niger*, una de peso molecular de 99 y otra de 112 kDa. Ambas contienen carbohidratos unidos covalentemente (residuos de D-manosa D-glucosa, D-galactosa). La composición de aminoácidos de las glucoamilasas I y II es idéntica, la diferencia entre ellas es por el contenido de carbohidratos. La glucoamilasa II tiene el doble de residuos de carbohidratos por molécula que la glucoamilasa I.

En la Tabla 2.2 se muestran otros ejemplos de isoformas de glucoamilasas de *Aspergillus* tanto en CMS como en CS. Por la diferencia en el contenido de carbohidratos hay una variación en el peso molecular de estas enzimas.

Por el diferente contenido de carbohidratos, además de modificarse el peso molecular y punto isoelectrico se observó modificación en algunas propiedades de las glucoamilasas tales como temperatura óptima, pH óptimo o especificidad por sustrato. Tal es el caso del reporte de (Amirul y col. 1996) donde *A. niger* produjo una α -glucosidasa, una α -amilasa y dos formas de glucoamilasa en CS. Las dos glucoamilasas (GA1 y GA2) mostraron diferencia en peso molecular, punto isoelectrico, temperatura óptima, pH óptimo y en especificidad por sustratos. Por otro lado, *A. niger* en CS secreta dos glucoamilasas de 70 y 89 kDa con un contenido de carbohidratos de 17 y 25 % respectivamente, lo que ocasiona diferentes temperatura óptima de 65 y 60 °C y pH óptimo de 4.7 y 3.5 respectivamente (Ramasesh y col. 1982).

También se han observado isoformas de glucoamilasas en análisis del secretoma de hongos. El secretoma de *A. niger* crecido con maltosa como fuente de carbono presentó múltiples “spots” de isoformas de glucoamilasa en geles de 2 dimensiones (Lu y col. 2010).

α -Amilasa

A. oryzae en CS produce dos α -amilasa, AmyA y AmyB, con peso molecular de 50 y 42 kDa respectivamente (Sahnoun y col. 2012). A pesar de que AmyB probablemente era el

producto de la proteólisis de AmyA los autores las denominaron isoformas, ambas isoformas tenían características similares ya que la máxima actividad se obtuvo a pH 5.6 y 50 °C (Sahnoun y col. 2012).

También se encontraron reportes de la secreción de isoformas de α -amilasas en *Aspergillus* en análisis de secretomas. Se detectaron tres isoformas de α -amilasa en geles de dos dimensiones del secretoma de *A. flavus* en CS crecido con glucosa como fuente de carbono (Medina y col. 2005). Además, Oda y col. (2006) compararon el secretoma de *A. oryzae* en CS y CMS, la α -amilasa era una de las proteínas que estaba atrapada en la pared celular del micelio en CS, mientras que fue liberada al medio en CMS. Un análisis de imagen realizado mediante PDQuest reveló que las α -amilasas representaban alrededor del 50% de la cantidad visible de proteínas en los geles de 2-dimensiones del CMS. Los autores asocian la detección de múltiples “spots” de α -amilasa a productos proteolíticos, no a isoformas, asociando una posible degradación a la digestión por proteasas durante las 40 horas de incubación o a una degradación durante la preparación de las muestras, esto a pesar de que incluyeron inhibidores de proteasas en sus extractos.

Tabla 2.2 Reportes de detección de isoformas de glucoamilasa en *Aspergillus*. ND, no determinado.

Microorganismo	Tipo de cultivo	Sustrato	Isoformas de glucoamilasa (kDa)	Método de determinación de peso molecular	Punto Isoeléctrico	Temperatura óptima (°C)	pH óptimo	Detección de glicoproteína (contenido carbohidrato)	Referencia
<i>A. awamori</i>	CMS	Salvado de trigo y solución mineral	I-110 II-87 III-59	SDS-PAGE y Cromatografía de filtración en gel	ND	ND	ND	ND	Negi y Banerjee 2009
<i>A. niger</i>	CMS	Salvado de trigo + Harina de maíz y solución mineral	I-112 II-104 III-74 IV-61	SDS-PAGE	ND	60	4.4	16% contenido carbohidrato	Selvakumar y col. 1996
<i>A. niger</i>	CS	Harina de trigo + melaza y solución mineral	I-263 II-209 III-136 IV-70	SDS-PAGE	ND	ND	ND	ND	Paszczynski y col. 1982
<i>A. niger</i>	CS	Almidón de tapioca crudo	I-74 II-96	SDS-PAGE	I-3.95 II-3.8	I-60 II-65	I-4.2 II-4.5	Ambos son glicoproteínas, electroforesis no desnaturizante y teñidas con ácido peryódico de Schiff	Amirul y col. 1996
<i>A. niger</i>	CS	Almidón de maíz	Isoforma con dif. PM 1) 90.6 2) 91.6 3) 73.6	1) SDS-PAGE 2) Cromatografía de filtración en gel 3) PAGE-no desnaturizante y zimograma	3.4	60	5	Glicoproteína, kit de detección de glucano (inmunoensayo)	Vandersall y col. 1995

2.2 Cultivo en medio sólido

El cultivo en medio sólido (CMS) se define como el cultivo de microorganismos en soportes sólidos húmedos, ya sea en soportes inertes o en sustratos insolubles que además pueden ser utilizados como fuente de nutrientes y energía (Hölker y col. 2004). El cultivo es en presencia de un bajo contenido de agua libre, aunque el sustrato debe poseer suficiente humedad para soportar el crecimiento y metabolismo del microorganismo. Esto se acerca al ambiente natural al cual los microorganismos están adaptados (Pandey 2003).

El CMS tiene potencial en la producción de enzimas microbianas de interés industrial, entre ellas, enzimas hidrolíticas como celulasas, xilanasas, pectinasas, amilasas, etc. (Pandey y col. 1999) que son producidas y secretadas por hongos filamentosos. Se han reportado ventajas de la producción de enzimas en CMS sobre cultivo sumergido (CS). Entre ellas, mayores rendimientos de producción de enzimas (Pandey y col. 1999; Viniegra-González y Favela-Torres, 2006) y presenta mayor resistencia a represión catabólica por carbono (Viniegra-González y Favela-Torres, 2006).

La resistencia del CMS a represión catabólica por carbono se ha reportado para enzimas de interés industrial tales como pectinasas (Díaz-Godínez y col. 2001; Solis-Pereira y col. 1993), invertasas (Giraldo y col. 2012), lacasas (Téllez-Jurado y col. 2006), tanasas (Aguilar y col. 2001) y amilasas (Nandakumar y col. 1999; Ramesh y Lonsane 1991; Ertan y col. 2014).

La resistencia del CMS a la represión por carbono se puede atribuir a la posible existencia de gradientes microscópicos entre los agregados de masa celular o un cambio en la permeabilidad celular a los azúcares (Viniegra-González y Favela-Torres 2006). Sin embargo no se ha reportado cómo es la regulación de las enzimas cuando en CMS hay una resistencia a la represión catabólica por carbono en presencia de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo.

2.3 Secreción de proteínas en hongos

En el transcurso de la revisión se ha resaltado la importancia de la secreción de proteínas en hongos filamentosos, ya que muchas de las enzimas secretadas por hongos se han incorporado en procesos comerciales y usado en diversas industrias (Peberdy 1994). Es por ello que es

importante conocer el mecanismo de secreción de proteínas, el cual se describe a continuación.

2.3.1 Mecanismo convencional

Los péptidos señal amino terminal son responsables de introducir a las proteínas en la ruta de secreción. En la ruta de secreción convencional, la secreción de proteínas empieza en el retículo endoplásmico, después, las proteínas empacadas en vesículas de transporte se dirigen al aparato de Golgi. Finalmente, se vuelven a empacar en vesículas de transporte y son dirigidas a la membrana plasmática donde son secretadas (Conesa y col. 2001; Pel y col. 2007; Shoji y col. 2014). En esta vía el crecimiento de la célula se da a través del depósito de proteínas en sitios para la expansión de la célula (por ejemplo puntas de las hifas). A través de esta vía se incluyen proteínas que tienen un papel en la interacción de la célula con el ambiente extracelular, tales como enzimas hidrolíticas para la digestión extracelular de nutrientes, transportadores transmembrana para el transporte de nutrientes a través de la membrana plasmática y proteínas para la transducción de señales para detectar el ambiente extracelular. Igualmente a través de esta vía se da el transporte de proteínas relacionadas con la patogenicidad que se encuentran en la superficie de la célula, que tienen que ver con reconocimiento mutuo, adhesión de patógenos y penetración, y degradación de sustratos de los huéspedes. (Shoji y col. 2014).

2.3.2 Mecanismo no convencional

Se ha reportado la secreción no convencional de proteínas en hongos. Se sugiere que la secreción no convencional de proteínas en hongos regula aspectos fisiológicos que no están acoplados al crecimiento de hifas, como por ejemplo la patogénesis de hongos (Shoji y col. 2014).

La secreción de proteínas por vesículas extracelulares es un mecanismo no convencional de secreción de proteínas en el cual se transportan proteínas intracelulares a través de la pared celular en hongos (Gil-Bona y col. 2015; Shoji y col. 2014). Análisis proteómicos de vesículas extracelulares de *A. fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Saccharomyces cerevisiae* revelaron la presencia de proteínas

involucradas en diversos procesos incluyendo metabolismo, arquitectura de pared celular, señalización y virulencia (Gil-Bona y col. 2015). Las vesículas extracelulares consisten en bicapas lipídicas de 50-400 nm de tamaño (Shoji y col. 2014). Shoji y col. (2014) mencionan que se ha mostrado que el mecanismo de secreción de proteínas por vesículas extracelulares depende de proteínas relacionadas con el aparato de Golgi y endosomas aunque todavía no se entiende completamente este mecanismo. En la secreción de vesículas extracelulares se incluye a las proteínas “moonlighting”, que han sido reportadas en varios hongos asociados con la patogénesis (Shoji y col. 2014; Gil-Bona y col. 2015).

2.3.3 Proteínas “moonlighting”

Proteínas “moonlighting” son “proteínas multifuncionales en donde una misma proteína lleva a cabo múltiples funciones fisiológicas, bioquímicas o biofísicas relevantes que no son debidas a fusión de genes, múltiples variantes de empalme de RNA o efectos pleiotrópicos” según la definición de Jeffery (1999). La segunda función de la proteína puede ser en la superficie de la célula o en el espacio extracelular. Muchas de las proteínas “moonlighting” están implicadas en enfermedades (Jeffery 2015).

2.4 Análisis proteómico

La proteómica como el análisis de los componentes proteicos de los organismos (Barreiro y col. 2012), es una herramienta que nos permite evaluar sistemas complejos de proteínas y nos ayuda a comprender eventos a un nivel molecular (Kim y col. 2007). La cuantificación de la expresión de proteínas en un proteoma provee la primer pista de como la célula responde a cambios del ambiente que le rodea. Se considera que la expresión de las proteínas juega un rol importante en la regulación precisa de las actividades celulares que están directamente relacionadas a estímulos exógenos (Chevalier 2010).

Los estudios de proteómica se pueden realizar de dos maneras, sin geles o con geles. En el primer enfoque la separación de una mezcla compleja de proteínas previamente digeridas se lleva a cabo mediante uno o dos tipos diferentes de separaciones cromatográficas. En el segundo enfoque implica una separación inicial de una mezcla compleja de proteínas utilizando por ejemplo SDS-PAGE (por sus siglas en inglés, Sodium Dodecyl Sulfate

Polyacrylamide Gel Electrophoresis, en español, Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico) o geles de 2-dimensiones (Soares y col. 2012).

El estudio del proteoma mediante geles de 2-dimensiones es adecuado para análisis globales de expresión de proteínas en un organismo (Chevalier 2010), a continuación se hace una descripción de esta técnica.

2.4.1 Proteómica basada en geles de 2 dimensiones

La proteómica basada en geles de 2 dimensiones es el método más popular para la separación global de proteínas y su cuantificación. La electroforesis en dos dimensiones combina dos técnicas que hacen uso de dos características bioquímicas independientes de las proteínas; el enfoque isoelectrico, en el cual se separan proteínas de acuerdo a su punto isoelectrico, y la SDS-PAGE, que separa a las proteínas de acuerdo a su peso molecular. Después de la separación en 2D se visualizan los “spots”, se analiza la expresión de los “spots” y finalmente, se identifican las proteínas mediante espectrometría de masas (Chevalier 2010).

La proteómica basada en geles de 2 dimensiones tiene varios beneficios. Rabilloud y col. (2010) mencionan tres principales ventajas de esta técnica: su robustez, paralelismo y su capacidad única para analizar proteínas completas a alta resolución. Se describe a continuación estas ventajas mencionadas en la revisión de Rabilloud y col. (2010). La primera ventaja es su robustez, la cual ha sido probada a fondo, incluso se ha investigado en comparaciones interlaboratorios y la influencia de varios parámetros en la reproducibilidad intralaboratorio. Es por ello que la principal fuente de variabilidad radica en la propia muestra biológica y no en el proceso de geles de 2 dimensiones. La segunda ventaja mencionada es el paralelismo, correr los geles de réplicas biológicas de manera paralela es una práctica común con la ventaja de ser la única manera de obtener confianza estadística en análisis complejos. La tercera ventaja es el análisis de proteínas completas mediante geles de 2 dimensiones que sirve como una herramienta micropreparativa y como método de alta resolución al separar proteínas completas con todas sus modificaciones, esto último es importante en estudios cuando se requiere saber: qué péptidos pertenecen a determinada proteína, conocer la degradación de proteínas bajo ciertas condiciones y estudiar la distribución de modificaciones

post-traduccionales en proteínas seleccionadas (Rabilloud y col. 2010). Otra ventaja importante es que es una técnica accesible en comparación con proteómica sin geles (Chevalier 2010; Rabilloud y Lelong 2011).

Algunas de las limitaciones de la proteómica basada en geles de 2 dimensiones mencionadas por Chevalier (2010) son descritas a continuación. La dificultad de detección de proteínas de membrana. También mediante la electroforesis en 2-D convencional, usando SDS-PAGE como segunda dimensión, se dificulta visualizar proteínas de alto peso molecular. Además se dificulta ver proteínas de baja abundancia en mapas de 2-D tradicionales ya que grandes cantidades de proteínas abundantes interfieren en su detección. Entre las estrategias para solucionar la limitación de detectar proteínas de baja abundancia están: la remoción de proteínas abundantes y emplear rangos de pH estrechos para resolver mejor las proteínas (Chevalier 2010).

2.4.2 Análisis proteómico de hongos filamentosos

La proteómica de hongos se está desarrollando rápidamente. Se esperan avances significativos en esta área para la mejora de la producción de enzimas y metabolitos que puede contribuir a procesos biotecnológicos existentes o el desarrollo de nuevos (Ferreira de Oliveira y de Graaff 2011). En la Tabla 2.3 se muestran estudios de proteómica de hongos filamentosos de interés industrial incluidos todos los estudios de proteómica encontrados hasta el momento para los hongos *A. niger* y *A. nidulans*. En la Tabla se muestra el tipo de proteoma, la técnica de proteómica empleada y los factores que se evaluaron en cada estudio.

Tabla 2.3 Estudios de proteoma de hongos filamentosos.

Hongo	Tipo de proteoma	Técnica	Factores evaluados	Referencia
<i>A. niger</i> N402	Intracelular	SDS-PAGE LC-MS/MS	Anotación de genes de <i>A. niger</i> y validación de modelos de genes.	Wright y col. 2009
<i>A. niger</i> IBT 28144	Intracelular	Electroforesis de 2-dimensiones MALDI-TOF/TOF	Efecto de lactato en un medio con almidón en la producción de la micotoxina fumonisina B ₂	Sørensen y col. 2009

<i>A. nidulans</i> R21	Intracelular	DIGE MALDI-TOF/TOF	Efecto de farnesol	Wartenberg y col. 2012
<i>A. nidulans</i> FGSC A4	Intracelular	Electroforesis de 2- dimensiones MALDI-TOF	Proteínas involucradas en la fase temprana de la germinación de conidios	Oh y col. 2010
<i>A. nidulans</i> A26	Intracelular	Electroforesis de 2- dimensiones MALDI-TOF	Respuesta a condiciones hipóxicas	Shimizu y col. 2009
<i>A. nidulans</i> FGSC A4	Intracelular	Electroforesis de 2- dimensiones MALDI-TOF	Osmoadaptación del hongo	Kim y col. 2007
<i>A. flavus</i> NRRL3357	Intracelular	iTRAQ LC-MS/MS	Efecto de actividad de agua (0.99 y 0.93)	Zhang y col. 2015
<i>A. fumigatus</i> ATCC 46645	Intracelular	Electroforesis de 2- dimensiones MALDI-TOF/TOF	Optimización de geles de 2dimensiones	Kniemeyer y col. 2006
<i>A. ochraceus</i> NRRL 5175	Intracelular	Electroforesis de 2- dimensiones MALDI-TOF/TOF	Desarrollo de protocolo de lisis celular	Rizwan y col. 2010
<i>Tyromyces palustris</i> IFO 30339	Intracelular	Electroforesis de 2- dimensiones MALDI-TOF	Desarrollo de método de preparación de muestras de proteína intracelular	Shimizu y Wariishi 2005
<i>A. niger</i> 10	Secretoma	Electroforesis de 2- dimensiones MALDI-TOF	Efecto de glucosa (60 y 120 g/L) en la producción de amilasas	Carrillo-Sancen y col. 2016
<i>A. niger</i> N402	Secretoma	SDS-PAGE LC-MS/MS	Liberación espacial de proteínas en el micelio	Krijgsheld y col. 2012
<i>A. niger</i> N402	Secretoma	LC-MS/MS	Condiciones severas de limitación de carbono	Nitsche y col. 2012
<i>A. niger</i> N400	Secretoma y Proteoma microsomal (fracción secretoria de organelos)	LC-MS/MS	Efecto de D-maltosa y D-xilosa y D- sorbitol como fuentes de carbono	Ferreira de Oliveira y col. 2011
<i>A. niger</i> AB1.13	Secretoma y Proteoma intracelular	Nano-HPLC MS/MS (secretoma) Electroforesis de 2- dimensiones/MALDI- TOF y MALDI- TOF/TOF (Proteoma intracelular)	Efecto de D-maltosa y D-xilosa como fuentes de carbono	Lu y col. 2010
<i>A. niger</i> N402	Secretoma	SDS-PAGE LC-MS/MS	Efecto de D-sorbitol ácido D- galacturónico como fuentes de	Braaksma y col. 2010

			carbón y el agotamiento de la fuente de carbón	
<i>A. niger</i> N402 y <i>A. niger</i> D15	Secretoma	iTRAQ LC-MS/MS	pH del medio de cultivo (pH de 2,3,4,5,6 y 7)	Adav y col. 2010
<i>A. niger</i> ATCC 1015	Secretoma	LC-MS/MS	Fuentes de carbón: glucosa, glicerol, sorbitol, goma de algarrobo, pectina y xilano de madera de abedul	Tsang y col. 2009
<i>A. nidulans</i> A78	Secretoma	SDS-PAGE LC-MS/MS	Cinética de proteínas extracelulares (1, 3, 7, y 14 días) empleando como sustrato rastrojo de sorgo.	Saykhedkar y col. 2012
<i>A. nidulans</i> MA5366 y <i>Pectobacterium carotovorum</i> ATCC 39048	Secretoma	SDS-PAGE LC-MS/MS	Descomposición de hojarasca con cultivos puros y en co-cultivo.	Schneider y col. 2010
<i>A. brasiliensis</i> ATCC9642	Secretoma	SDS-PAGE LC-MS/MS	Efecto de altas concentraciones de glucosa (30, 100 y 180)	Volke-Sepulveda y col. 2016
<i>A. oryzae</i> AS 3.951 y <i>A. oryzae</i> RIB40	Secretoma	SDS-PAGE MALDI-TOF/TOF MS	Producción de koji de soya	Liang y col. 2009
<i>A. oryzae</i> RIB40	Secretoma	Electroforesis de 2-dimensiones MALDI-TOF	Comparación de CMS con CS	Oda y col. 2006
<i>A. fumigatus</i>	Secretoma	label free HPLC, LTQFT	Temperaturas de 20, 30, 40 y 50 °C	Adav y col. 2013
<i>A. terreus</i> NRRL 1960	Secretoma	Electroforesis de 2-dimensiones Nano-LC-MS/MS	Fuentes de carbón: sacarosa 30 y 100 g/L, glucosa 30 y 100 g/L y almidón 30 g/L	Han y col. 2010
<i>A. flavus</i> PRL 1805	Secretoma	SDS-PAGE Electroforesis de 2-dimensiones LC-MS/MS	Fuentes de carbón glucosa, rutina y caldo papa dextrosa	Medina y col. 2005
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Secretoma	LC-MS/MS	Modificación post-traducciona de proteínas secretadas con los sustratos glucosa, celulosa y lignina	Adav y col. 2014
<i>Trichoderma reesei</i> QM6a y Rut C30	Secretoma	SDS-PAGE iTRAQ	Sustratos: carboximetilcelulosa,	Adav y col. 2012

		LC-MS/MS	celulosa fibrosa, rastrojo de maíz y aserrín	
<i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 1951, Wis 54-1255 y AS-P-78	Secretoma	Electroforesis de 2-dimensiones MALDI-TOF MS y MALDI-TOF MS/MS	Comparación del secretoma de la cepa silvestre y dos cepas mejoradas	Jami y col. 2010
<i>Penicillium chrysogenum</i> Wis 54-1255	Intracelular	Electroforesis de 2 dimensiones LC-MS/MS (LTQ-Orbitrap)	Análisis de la vía de transducción de señal de las proteínas G heterotriméricas	Carrasco-Navarro y col. 2016

2.4.3 Análisis del secretoma de hongos filamentosos

El análisis proteómico se puede dividir en un subconjunto de proteínas: proteómica intracelular (proteínas intracelulares), subproteómica (proteínas de organelos), proteómica de proteínas de membrana y secretómica (proteínas extracelulares) (Kim y col. 2007; Barreiro y col. 2012).

Ferreira de Oliveira y de Graaff (2011) mencionan que los estudios del secretoma muestran la riqueza de las enzimas secretadas por hongos filamentosos, esto proporcionará una contribución importante en la comprensión de los mecanismos de los procesos metabólicos que son de importancia en la biotecnología (Ferreira de Oliveira y de Graaff 2011).

Aunque se han reportado varias ventajas de la producción de enzimas en CMS sobre CS hay pocos reportes de secretomas del CMS. Adav y col. (2013) evaluaron el efecto de la temperatura en el análisis proteómico de proteínas extracelulares de *A. fumigatus*. Saykhedkar y col. (2012) realizaron una cinética del CMS de *A. nidulans* crecido en rastrojo de sorgo. Oda y col. (2006) compararon el CMS y CS de *A. oryzae*.

En la Tabla 2.4 se muestran estudios de secretomas de hongos filamentosos, incluidos *A. niger* y *A. nidulans*. En la Tabla 2.4 se observa la producción de amilasas por hongos filamentosos empleando diversas fuentes de carbono. Además se observa en el secretoma de algunos hongos la detección de varias proteínas sin péptido señal amino-terminal.

Tabla 2.4 Detección de amilasas y proteínas sin péptido señal amino-terminal en análisis del secretoma de hongos filamentosos.

Hongo	Factores evaluados	Tipo de cultivo/Fuente de Carbono/Tiempo de toma de muestras	Detección de amilasas	Detección de proteínas sin péptido señal amino-terminal	Referencia
<i>A. niger</i> N402	Liberación espacial de proteínas en el micelio	Cultivos en agar 25 mM xilosa o 25 mM maltosa 7 días de crecimiento	Con las dos fuentes de carbono: 1,4- α -glucosidasa α -amilasa ácida	Proteínas con fuerte similitud a: α -galactosidasa, citidina deaminasa, acetiltransferasa hipotética, quinasa SAK-b y 2 proteínas hipotéticas	Krijgsheld y col. 2012
<i>A. niger</i> N402	Condiciones severas de limitación de carbono	CS 8g de maltosa en 1 Kg de medio de cultivo mínimo En la fase exponencial y 1, 3 y 6 días después del agotamiento de la fuente de carbono	No detectadas	No detectadas	Nitsche y col. 2012
<i>A. niger</i> N400	Efecto de D-maltosa y D-xilosa y D-sorbitol como fuentes de carbono	CS D- sorbitol 100 mM (14 horas cultivo) Luego adicionaron: D-sorbitol 10 mM D-maltosa 10 mM D-xilosa 10 mM (2 horas cultivo y toma de muestra)	Detectadas en todas las condiciones: glucoamilasa A α -amilasa ácida α -glucosidasa A α -glucosidasa B	No detectadas	Ferreira de Oliveira y col. 2011
<i>A. niger</i> AB1.13	Efecto de D-maltosa y D-xilosa como fuentes de carbono	CS D-maltosa 20 g/L D-xilosa 20 g/L Final de la fase	Crecido con maltosa aparecieron glucoamilasas como "spots" múltiples y representaron alrededor del 50% del proteoma	Crecido con xilosa: D-arabinosa deshidrogenasa Ara1 y aldehído reductasa dependiente de NADPH Crecido con maltosa:	Lu y col. 2010

		exponencial e inicio de la fase estacionaria	extracelular.	Peroxiredoxin PrxII tipo 2	
<i>A. niger</i> N402	Efecto de D-sorbitol ácido D-galacturónico como fuentes de carbono y el agotamiento de la fuente de carbono	CS D-sorbitol 50 mM y ácido D-galacturónico 50 mM 24 y 48 horas	No detectadas	En condiciones de agotamiento de fuente de carbono: An01g09980 (fuerte similitud a Asp-hemolisina de <i>A. fumigatus</i>) y An01g00370 (fuerte similitud a aspergillopepsin ApnS de <i>A. phoenicis</i>)	Braaksma y col. 2010
<i>A. niger</i> N402 y <i>A. niger</i> D15	pH del medio de cultivo (pH de 2,3,4,5,6 y 7)	CS Glucosa 50 g/L En el día 6	glucoamilasa α -glucosidasa α -amilasa	Se identificaron: peptidasas, peroxidases y oxidoreductasas y proteínas de transporte. Estas con y sin péptido señal.	Adav y col. 2010
<i>A. niger</i> ATCC 1015	Fuentes de carbono: glucosa, glicerol, sorbitol, goma de algarrobo, pectina y xilano de madera de abedul	CS Glucosa 15% Glicerol 15% Sorbitol 5% Goma de algarrobo 5 % Pectina cítrica 5% Xilano de madera de abedul 5% 2 días de incubación	Con todas las fuentes de carbono: α -amilasa α -glucosidasa glucoamilasa	Superóxido dismutasa [Cu-Zn] en medio de cultivo con 150 g/L glucosa	Tsang y col. 2009
<i>A. nidulans</i> A78	Cinética de proteínas extracelulares empleando como sustrato rastrojo de sorgo.	CMS Rastrojo de sorgo Cinética de 1, 3, 7, y 14 días	2 α -amilasa, una glucoamilasa, 2 α -glucosidasas y una α -glucosidasa B Presencia y abundancia de estas enzimas era dependiente del tiempo de cultivo.	No detectadas	Saykhedkar y col. 2012
<i>A. nidulans</i>	Descomposición de hojarasca	CS	Entre las amilasas	No detectadas	Schneider y

MA5366 y <i>Pectobacterium carotovorum</i> ATCC 39048	con cultivos puros y en co-cultivo.	Glucosa 0.2% Hojarasca de haya estéril 1% Glucosa: 1 y 3 días. Hojarasca: 3, 9 y 17 días	detectadas en hojarasca en cultivo de <i>A. nidulans</i> y en co-cultivo fueron 2 α -amilasa, 1 α -glucosidasa, 1 α -glucosidasa B y 2 glucoamilasas.		col. 2010
<i>A. oryzae</i> AS 3.951 y <i>A. oryzae</i> RIB40	Producción de koji de soya	CMS Haba de soya + harina 24 horas, mayor número de bandas en el SDS-PAGE	Precursor de Taka-amilasa A	Espermidina sintasa Spe3 además de: MepB metalopeptidasa, X-prolil aminopeptidasa, fosfoglucosa isomerasa, proteína hipotética An3112.2, glutamato deshidrogenasa específica de NADP	Liang y col. 2009
<i>A. oryzae</i> RIB40	Comparación de CMS con CS	CMS y CS Salvado de trigo 40 horas	CMS: Glucoamilasa GlaB, CS: Glucoamilasa GlaA y α -glucosidasa Ambos: α -amilasa	Transaldolasa Tal1 en CMS	Oda y col. 2006
<i>A. fumigatus</i>	Temperaturas de 20, 30, 40 y 50 °C	CMS Aserrín Fase exponencial (5 días de cultivo)	4 α -amilasas, 1 glucoamilasa, 1 α -glucosidasa y 1 α -glucosidasa B	Superóxido dismutasa [Cu-Zn] era abundante a las elevadas temperaturas de 40 y 50 °C	Adav y col. 2013
<i>A. terreus</i> NRRL 1960	Fuentes de carbono y su concentración	CS Sacarosa 30 g/L Sacarosa 100 g/L Glucosa 30 g/L Glucosa 100 g/L Almidón 30 g/L 3.5 días	Con almidón 30 g/L se detectó: α -amilasa y α -glucosidasa	Con sacarosa: Espermidina sintasa Spe3	Han y col. 2010
<i>A. flavus</i> PRL 1805	Fuentes de carbono	CS	En las tres fuentes de carbono: α -amilasa y	Con rutina: Malato deshidrogenasa Mdh1	Medina y col. 2005

		Glucosa 5mM Rutina 5 mM Caldo papa dextrosa 3, 7, 10 y 14 días	glucoamilasa		
<i>Trichoderma reesei</i> QM6a y Rut C30	Fuentes de carbono	CS Carboximetilcelulosa 1.5 g/L Celulosa fibrosa 10 g/L Rastrojo de maíz 10 g/L Aserrín 10 g/L 120 h	En todos los medios de cultivo: α -amilasa y α -glucosidasa	En todos los medios de cultivo: Transaldolasa, Superóxido dismutasa Cu/Zn y Superóxido dismutasa Mn	Adav y col. 2012
<i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 1951, Wis 54-1255 y AS-P-78	Comparación del secretoma de la cepa silvestre y dos cepas mejoradas	CS 40 g/L glucosa 68 horas, final de la fase lineal de crecimiento y entrada a la fase estacionaria	glucoamilasa y α -glucosidasa	D-arabinosa deshidrogenasa Ara1 y transaldolasa Tal1	Jami y col. 2010

3. JUSTIFICACIÓN

Los hongos del género *Aspergillus* tienen un impacto tanto en la salud humana como en la producción de enzimas y metabolitos de interés industrial; siendo *A. niger* un hongo de interés industrial por su capacidad natural de secretar grandes cantidades de enzimas, entre ellas enzimas hidrolíticas como las amilasas.

A pesar de la importancia de la secreción de enzimas en *A. niger* hay pocos reportes del secretoma de este hongo. Un análisis del secretoma de este hongo puede aportar información acerca del tipo de enzimas que secreta para el aprovechamiento de sustratos, así como de proteínas involucradas en la adaptación del hongo a las condiciones del ambiente, tales como altas concentraciones de fuente de carbono, que pueden afectar su crecimiento.

El CMS presenta ventajas en procesos de producción de enzimas sobre el CS; en particular, en CMS la productividad y el rendimiento de producción de enzimas son mayores. Adicionalmente, el umbral de represión catabólica es menor en CMS que en CS. Sin embargo, se desconocen las causas por las que ocurren estas diferencias entre ambos tipos de cultivo. El secretoma de un hongo en CMS en la producción de enzimas de interés industrial en presencia de un represor de carbono puede contribuir al conocimiento de la resistencia de este tipo de cultivo a la represión por carbono y no se ha reportado.

Las amilasas son enzimas empleadas en la industria para la hidrólisis de almidón y la obtención de glucosa. La producción de amilasas en CS está sujeta a represión catabólica por la presencia de glucosa en el medio de cultivo. Por ello, se requiere usar bajas concentraciones de fuente de carbono en la producción de estas enzimas, ya que a concentraciones tan bajas como 10 g/L de glucosa se puede ocasionar una inhibición total de la producción de amilasas.

Por ello, se propuso analizar el efecto de altas concentraciones de glucosa en el secretoma y producción de amilasas de un *Aspergillus* en CMS.

4. HIPÓTESIS

La presencia de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo con almidón modificará el secretoma y favorecerá la producción de amilasas en el CMS de *A. niger* 10.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la producción de amilasas y sobre el secretoma de *A. niger* cultivado en medio sólido.

5.2 Objetivos específicos

- 1) Seleccionar una cepa de *Aspergillus* sp. para estudios de producción de amilasas y descripción del secretoma.
- 2) Establecer las condiciones de cultivo para la producción de amilasas con altas concentraciones de glucosa.
- 3) Seleccionar el estado fisiológico del cultivo y la concentración de glucosa en el medio de cultivo para el análisis del secretoma.
- 4) Obtener el secretoma de *A. niger* en medios con diferente concentración de glucosa.
- 5) Proponer un mecanismo del efecto de altas concentraciones de glucosa en la secreción de amilasas en *A. niger*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

A continuación se describen los reactivos empleados:

- Almidón soluble, maltosa, glicerol, glucosa, NaNO_3 , KCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , H_3BO_3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Na_4EDTA , KI , I_2 , acetato de sodio, metanol, ácido acético y ácido fosfórico son de JT Baker[®] (Center Valley, PA, Estados Unidos).
- Bacto[™] agar y PDA (agar-papa-dextrosa) son de BD-Bioxon[®] (East Rutherford, NJ, Estados Unidos).
- TCA (ácido tricloroacético), *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido, *p*-nitrofenol, biotina y cóctel inhibidor de proteasas para uso en extractos fúngicos y de levaduras son de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, Estados Unidos).
- Tris, urea, SDS (dodecilsulfato sódico), CHAPS (3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato), azul de bromofenol, DTT (ditiotreitól), iodoacetamida, solución acrilamida/bis 30% (37.5:1), β -mercaptoetanol, TEMED (tetrametiletilendiamina), persulfato de amonio, anfólitos pH 3-10, estándares Precision Plus Protein[™], estándares de peso molecular SDS-PAGE de amplio rango, tiras IPG 7 cm con gradiente lineal pH 3-10, azul de Coomassie G-250 y el kit Silver Stain Plus son de Bio-Rad (Hercules, CA, Estados Unidos).

6.2 Microorganismos

Se emplearon dos cepas de hongos del género *Aspergillus*:

➤ *Aspergillus niger* 10

De la colección de cepas de la UAM-IRD. Esta cepa fue aislada de tubérculos de yuca en descomposición y se ha utilizado en la producción de amilasas en cultivo en medio sólido (Alazard y Raimbault 1981).

➤ *Aspergillus nidulans* FGCS26 (biA1, VeA1)

Proporcionada por el Dr. Jesús Aguirre Linares del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Este hongo requiere biotina para crecer.

6.2.1 Conservación

La conservación de las cepas se realizó en criotubos con chaquiras impregnadas con solución de glicerol al 20%. Para ello se tomó una asada de las esporas de los hongos y se esparció en las chaquiras con glicerol contenidas en el criotubo. Éstas se conservaron a -20°C.

6.2.2 Propagación

A continuación se describen las metodologías de la propagación de los hongos para la obtención del inóculo para los cultivos realizados.

Pre-inóculo

Para la preparación del pre-inóculo se adicionó una chaquiras empleada para la conservación de los hongos a un tubo con 2 mL de Tween 80 0.1 % (v/v) estéril y se agitó durante 20 segundos. Se adicionaron 0.5 mL de esta suspensión de esporas a un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio definido reportado por Hill y Kafer (2001) con agar con modificación (Tablas 6.1 y 6.2). La modificación consistió en la adición de biotina (requerimiento nutricional de la cepa *A. nidulans* FGCS26). La relación C/N del medio de cultivo es de 4.04. Se incubó a 30°C por 7 días.

Las esporas empleadas para el inóculo de los cultivos del Capítulo I de Resultados parten directamente del pre-inóculo. A partir de los cultivos del Capítulo II de Resultados se sembró el pre-inóculo para la obtención del inóculo.

Inóculo

A un matraz Erlenmeyer de 250 mL con pre-inóculo se le adicionaron 30 mL de Tween 80 al 0.1% (v/v) estéril y un agitador magnético mediano (8x30 mm) y se agitó en una parrilla hasta desprender las esporas de la superficie del agar. Se adicionaron 0.5 mL de la suspensión obtenida a un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio Hill y Kafer (2001) modificado y con agar (Tablas 6.1 y 6.2) y se esparció en toda la superficie. Se incubó a 30°C por 5 días.

Tabla 6.1 Macronutrientes del medio Hill y Kafer (2001).

Componente	g/L
Glucosa	10
NaNO ₃	6
KCl	0.52
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.52
KH ₂ PO ₄	0.815
K ₂ HPO ₄	1.045
Agar	15

Tabla 6.2 Elementos traza del medio Hill y Kafer (2001).

Componente	mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22
H ₃ BO ₃	11
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5
CoCl ₂ ·5H ₂ O	1.6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.6
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1.1
Na ₄ EDTA	50
Biotina	0.25

Nota: Se adiciona 1 mL de una solución 1000 veces concentrada de los elementos traza en la preparación del medio de cultivo.

6.3 Cultivos

Se evaluaron dos tipos de cultivos: cultivo en medio sólido (CMS) y cultivo sumergido (CS). A continuación se describe la metodología para ambos tipos de cultivos.

6.3.1 Producción de inóculo

El tamaño de inóculo empleado en cada cultivo se muestra en el Anexo A (Tabla A.1). Para la cosecha de esporas el procedimiento fue el siguiente:

Se adicionaron 50 mL de Tween 80 al 0.1% (v/v) y un agitador magnético estériles a un matraz Erlenmeyer de 250 mL con esporas (sección 6.2.2 Propagación de inóculo). Se agitó en una parrilla hasta desprender las esporas de la superficie del agar. Una vez desprendidas las esporas se pasó la suspensión con esporas y el agitador magnético a un segundo matraz con esporas y se realizó lo mismo. Este paso se repitió para cuatro matraces con inóculo para obtener una suspensión de esporas concentrada.

6.3.2 Medios de cultivo

El medio base para la producción de amilasas se le denominó A20G0 (A: almidón; G: glucosa), es el medio de cultivo Hill y Kafer (2001) con modificaciones. Una modificación es la fuente de carbono que en este caso es almidón como inductor de la producción de amilasas

a una concentración de 20 g/L. El medio de cultivo con esa concentración de fuente de carbono tiene una C/N de 8.08.

En el transcurso del trabajo se evaluaron diferentes concentraciones del medio de cultivo en los cuales se mantuvo fija la concentración del almidón (20 g/L) y se adicionó glucosa como segunda fuente de carbono. Para mantener constante la relación C/N del medio de cultivo la concentración de la fracción mineral del medio de cultivo Hill y Kafer (2001) se modificó (Tablas A.2 y A.3 del Anexo B).

Esterilización

Los medios de cultivo del Capítulo I de Resultados se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos. Los medios de cultivo de los Capítulos II y III de Resultados se esterilizaron a 96°C durante 15 minutos.

6.3.3 Cultivos

Las características generales de los dos tipos de cultivos evaluados se describen a continuación.

Cultivo sumergido

Los sistemas empleados fueron matraces Erlenmeyer de diferentes volúmenes (125 y 250 mL). Los CS se agitaron en agitador orbital a 150 rpm.

Cultivo en medio sólido

Los sistemas empleados fueron matraces Erlenmeyer de diferentes volúmenes (125, 250 y 500 mL) y columnas de vidrio. Se utilizó agrolita como soporte sólido inerte. Las características de la agrolita y su preparación para el CMS se muestran en el Anexo C.

Los cultivos se llevaron a cabo a 30°C. En el Anexo A (Tabla A.1) se muestran las características de los cultivos evaluados en los tres capítulos de resultados.

6.4 Obtención de extractos de proteína extracelular

Se describe la metodología de la obtención de extractos crudos de proteína extracelular y luego el tratamiento que se le dio a estos extractos para prepararlos para el análisis del secretoma.

6.4.1 Obtención de extractos crudos de proteína extracelular

Se siguieron dos procedimientos de obtención de extractos extracelulares. En caso de haberse adicionado cóctel inhibidor de proteasas (para uso en extractos fúngicos y de levaduras) se adicionaron 10 μ L de éste por cada 30 mL de agua (4°C) usada para la extracción en CMS o cada 30 mL de extracto del CS. Se describen los procedimientos a continuación.

PROCEDIMIENTO A

Este procedimiento se utilizó para la obtención del extracto extracelular de los CMS y CS que se presentan en el Capítulo I de Resultados.

Extracto extracelular del CS

Se filtró al vacío el contenido de cada unidad experimental con papel Whatman No. 41 para retirar la biomasa. Se dividió el extracto para análisis posteriores y se almacenó a -20°C.

Extracto extracelular del CMS

A cada unidad experimental se adicionaron 10 mL de agua destilada por cada gramo de soporte inerte (manteniendo una relación de 1:10 de soporte inerte con agua de extracción) y se agitaron los matraces a 200 rpm durante 5 minutos a 30°C. La suspensión se filtró al vacío con papel Whatman No. 41. Se dividió el extracto para análisis posteriores y se almacenó a -20°C.

A partir del cultivo de la sección 7.1.2 de Resultados se adicionó cóctel inhibidor de proteasas en los extractos del CMS y CS.

PROCEDIMIENTO B

Este procedimiento se utilizó para la obtención de extractos extracelulares de los cultivos presentados en los Capítulos II y III de Resultados. Al obtener la máxima tasa de producción de CO₂, se desconectaron los matraces del metabolimetro y se metieron en la cámara fría

(4°C) por 1 hora. A cada unidad experimental se adicionaron 10 mL de agua destilada (4°C) con cóctel inhibidor de proteasas por cada gramo de soporte inerte. Se agitaron los matraces a 200 rpm durante 30 minutos a 4°C. La suspensión se filtró al vacío con papel Whatman No. 41, manteniendo el filtrado a menos de 10°C, para obtener un extracto libre de biomasa y agrolita. El filtrado se centrifugó a 7,000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se dividió el extracto para los análisis posteriores y se almacenó a -20°C.

6.4.2 Preparación de proteína extracelular para análisis del secretoma

En la Fig. 6.1 se describe de manera general la preparación de muestras proteicas para el análisis del secretoma mediante tres procedimientos (A, B y C).

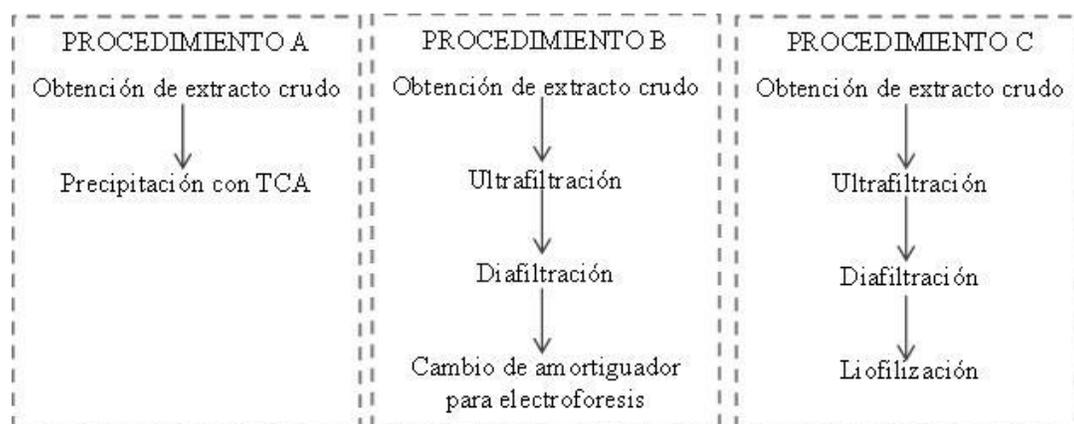


Figura 6.1 Preparación de muestras proteicas para el análisis del secretoma.

PROCEDIMIENTO A

Este procedimiento se empleó en el Capítulo I de Resultados. El extracto crudo de proteína extracelular se concentró precipitando con ácido tricloroacético (TCA). Los extractos concentrados se emplearon para los geles de 2 dimensiones. Se empleó la metodología reportada por Jami y col. (2010). Se adicionó un volumen de TCA 20% (p/v) en acetona con ditiotreitól 0.14% (p/v) a un volumen de extracto crudo extracelular. Se incubó a -20°C durante dos horas. Después se centrifugó a 7,000 rpm durante 20 minutos a 0°C, se eliminó el sobrenadante. El “pellet” se lavó dos veces con acetona fría con ditiotreitól 0.14% (p/v) centrifugando entre cada lavado a 7,000 rpm durante 20 minutos. Finalmente, el “pellet” se resuspendió en amortiguador de muestra para electroforesis de 2 dimensiones.

PROCEDIMIENTO B

Este procedimiento se empleó en el Capítulo II de Resultados. Los extractos crudos de proteína extracelular se ultrafiltraron y diafiltraron (10 kDa Amicon Ultra 15, Millipore, County Cork, Irlanda) con un amortiguador Tris-HCl 20 mM (pH 7.4). Se cambió el amortiguador Tris-HCl 20 mM (pH 7.4) por amortiguador de muestra para la electroforesis SDS-PAGE (10 kDa MicrosepTM, Pall Corporation, NY, Estados Unidos). Se determinó el contenido de proteína de los extractos mediante el método de Bradford.

PROCEDIMIENTO C

Este procedimiento se empleó en el Capítulo III de Resultados. Los extractos crudos de proteína extracelular se ultrafiltraron y diafiltraron (10 kDa Amicon Ultra 15, Millipore, County Cork, Irlanda) con un amortiguador Tris-HCl 20 mM (pH 7.4). Se determinó el contenido de proteína de los extractos mediante el método de Bradford. Se dividió el extracto para los análisis posteriores por cantidad de proteína. Finalmente, los extractos de proteína se liofilizaron.

6.5 Técnicas analíticas

Las técnicas analíticas empleadas se describen a continuación.

6.5.1 Biomasa

La biomasa se determinó por gravimetría. Para ello, el papel filtro (Whatman 41) se puso a peso constante en una estufa a 60°C. La biomasa obtenida se filtró al vacío y se lavó con 100 mL agua destilada; posteriormente, se secó a 60°C hasta peso constante.

6.5.2 Respirimetría

La concentración de CO₂ y O₂ en la corriente de aire de salida de cada unidad experimental se monitoreó en línea como una medida indirecta del crecimiento. Para ello, se utilizó un sistema de respirometría que se describe a continuación (Martínez-Valdez y col. 2015). El flujo de aire se analizó usando un sensor de flujo másico (Honeywell, USA). El sistema tiene

un sensor infrarrojo para el análisis del CO₂ (United Phosphorus Ltd, India) y un detector electroquímico para el análisis del O₂ (United Phosphorus Ltd, India). El sistema está acoplado a un sistema de adquisición de datos y una plataforma LabView (National Instruments, USA).

Los valores obtenidos del análisis del CO₂, O₂ y del flujo de aire se utilizaron para estimar la tasa de producción de CO₂ por gramo de soporte sólido (ss) (mg/h/g_{ss}), la producción de CO₂ (mg/g_{ss}), la tasa de consumo de O₂ (mg/h/g_{ss}), el consumo de O₂ (mg/g_{ss}) y el coeficiente respiratorio (mol/mol).

De las curvas de producción de CO₂ se obtuvieron la fase lag y la tasa específica de producción de CO₂ (μ_{CO_2}) y a menos que se especifique otra cosa la determinación de ambos parámetros de crecimiento fue de la siguiente manera. La fase lag se obtuvo siguiendo el procedimiento reportado por Pirt (1975). Se graficó el logaritmo natural de la producción de CO₂ en función del tiempo de cultivo. Siendo el tiempo de la fase lag el tiempo en el cual se da la intersección de la curva en el eje de las abscisas. La tasa específica de producción de CO₂ (μ_{CO_2}) se obtuvo ajustando el modelo exponencial a los datos de producción de CO₂ obtenidos entre el final de la fase lag y el tiempo en el que se observó la máxima tasa de producción de CO₂.

$$\text{Modelo exponencial } CO_2 = CO_{20}e^{\mu t}$$

6.5.3 Proteína

Se utilizaron dos métodos de determinación de proteína. Una versión modificada del método de Lowry con el kit “DC Protein Assay” (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), utilizada en los resultados que se presentan en el Capítulo I de Resultados. También se utilizó el método de Bradford con el kit “Bio-Rad Protein Assay” (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), utilizada en los resultados que se presentan en los Capítulos II y III de Resultados. En ambos métodos se utilizó albúmina de suero bovino como estándar (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

6.5.4 Humedad

Para determinar el contenido de humedad se utilizó una termobalanza Ohaus[®] (Parsippany, NJ, Estados Unidos).

6.5.5 Actividad de agua

Para determinar la actividad de agua (a_w) se utilizó el equipo AquaLab (Pullman, WA, Estados Unidos).

6.6 Determinación de actividades enzimáticas

Se hizo la determinación de dos actividades enzimáticas, actividad glucoamilasa y actividad α -amilasa. Además, se realizaron zimogramas de actividad amilasa.

6.6.1 Glucoamilasa

Se evaluaron dos metodologías para la determinación de actividad glucoamilasa, una de las variantes principales es el sustrato.

Sustrato: *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido

Se empleó la metodología de Withers y col. (1998) en la cual se determinó la liberación de *p*-nitrofenol por la hidrólisis de *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido por la acción de la glucoamilasa. La reacción se llevó a cabo con 250 μ L de extracto más 500 μ L de *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido 0.1% (p/v) en amortiguador de acetato 0.1 M (pH 4.3) a 30°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo adicionando 750 μ L de bórax 0.1 M. Se cuantificó el *p*-nitrofenol liberado a 400 nm. Una unidad de actividad glucoamilasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido por minuto bajo las condiciones de ensayo.

Sustrato: Maltosa

Se empleó la metodología de Withers y col. (1998) en la cual se cuantificó la glucosa liberada por la hidrólisis de maltosa por la acción de la glucoamilasa. La reacción se llevó a cabo con 150 μ L de extracto, 100 μ L de maltosa 1% (p/v) y 250 μ L de amortiguador de acetato 1M (pH 5.5) a 30°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo pasando a las muestras a un baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Se cuantificó la glucosa liberada usando un kit de glucosa oxidasa (SPINREACT, Gerona, España). Una unidad de actividad glucoamilasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de glucosa por minuto bajo las condiciones de ensayo.

6.6.2 α -Amilasa

Se empleó la metodología de Bernfeld (1955). Se cuantificaron los azúcares reductores liberados por hidrólisis de almidón soluble por la acción de las amilasas. Se empleó la mezcla de reacción reportada por Kato y col. (2002) la cual consta de 300 μ L de extracto enzimático, 200 μ L de almidón soluble 1% (p/v) y 500 μ L de amortiguador de acetato 50 mM (pH 5.5) y CaCl_2 5 mM a 30°C durante 30 minutos. Se detuvo la reacción con la adición de 1.5 mL de DNS y se incubaron los tubos en agua a 80°C durante 15 minutos. Se cuantificaron los azúcares reductores empleando la metodología de Miller y col. (1960). Una unidad de actividad α -amilasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de azúcar reductor, representado como glucosa, por minuto bajo las condiciones de ensayo.

6.6.3 Zimograma de actividad amilasa

Se utilizó la metodología reportada por Martinez y col. (2000) con modificaciones para detectar la actividad amilasa en un gel de poliacrilamida copolimerizada con almidón en presencia de SDS con las condiciones reportadas por Laemmli (1970), razón por la cual se le denomina SDS-PAGE-almidón. La actividad se revela usando una solución de yodo, detectando las bandas de amilasa como zonas amarillo claro contra un fondo azul oscuro de almidón teñido no hidrolizado.

Primero se describe la metodología que fue conservada a lo largo del trabajo y después dos Procedimientos que se utilizaron en diferentes capítulos de Resultados.

Amortiguador de muestra

El amortiguador de muestra tiene la siguiente composición: Tris 0.125 M, glicerol 20% (v/v), azul de bromofenol 0.04% (v/v) y SDS 2% (p/v). La muestra se diluyó 1:1 en amortiguador de muestra. No se adicionó β -mercaptoetanol ni se puso a ebullición la muestra ya que la electroforesis se llevó en condiciones nativas.

Preparación del gel sustrato (SDS-PAGE-almidón)

El gel de compactación y de separación se preparó de acuerdo a Laemmli (1970), la composición de los geles se muestran en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3 Preparación del gel-sustrato del zimograma SDS-PAGE-almidón.

Solución stock	Gel de compactación (4%)	Gel de resolución	
		(9%)	(10%)
Poliacrilamida ^{a)}	0.65 mL	3.0 mL	3.3 mL
Amortiguador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	1.25 mL	-	-
Amortiguador Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	-	2.5 mL	2.5 mL
Agua destilada	3.05 mL	3.25 mL	2.95 mL
Almidón soluble 2% p/v ^{b)}	-	1.25 mL	1.25 mL
SDS 10% p/v	50 µL	100 µL	100 µL
TEMED	5 µL	5 µL	5 µL
Persulfato de amonio 10% p/v ^{c)}	25 µL	50 µL	50 µL
Total	5.03 mL	10.155 mL	10.155 mL

- a) Acrilamida: Bis 30:0.8 p/p en agua destilada.
b) Solubilizada en agua en ebullición con agitación.
c) Preparada inmediatamente antes de utilizarse.

La electroforesis se llevó a cabo a baja temperatura (4°C) para evitar la hidrólisis del almidón y pérdida de resolución. Después de la electroforesis los geles se lavaron dos veces con agua destilada y se incubaron en amortiguador de fosfato-citrato 0.1 M y NaCl 0.05 M (pH 5.5) durante 3 horas a 30°C. Finalmente, los geles se lavaron dos veces con agua destilada y se fijaron con TCA 12% por 10 minutos. Después, se tiñeron con solución de Lugol (6.7 mg/mL de KI y 3.3 mg/mL de I₂). Las bandas de amilasa se detectaron como zonas amarillo claro contra un fondo azul oscuro de almidón teñido no hidrolizado. El marcador de peso molecular se retiró del gel después de la separación electroforética, se fijó y se tiñó (sección 6.8.3), la técnica de tinción fue diferente dependiendo del procedimiento empleado.

PROCEDIMIENTO A

Se empleó este procedimiento en el Capítulo I de Resultados.

Marcador de peso molecular

Se adicionaron 5 µL por carril de los estándares de peso molecular SDS-PAGE de amplio rango (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). El marcador de peso molecular se tiñó con Coomassie R-250 (sección 6.8.4).

Preparación de los extractos enzimáticos

Los extractos se descongelaron y centrifugaron a 10,000 rpm durante 2 minutos antes de prepararlos con el amortiguador de muestra. Se procuró que cada pozo se cargara con aproximadamente 0.02 U (en base a actividad α -amilasa) en los 20 µL de volumen máximo de

extracto que se podía cargar por pozo de gel. En el caso de los extractos de CS estos se diluyeron, los extractos del CMS los más diluidos tienen 5 veces menos actividad que la que se propuso cargar por pozo.

Preparación del gel sustrato (SDS-PAGE-almidón)

El gel de compactación y el de resolución fueron de 4% y 10% de acrilamida respectivamente, la composición de los geles se muestra en la Tabla 6.3. Los geles eran de 1.5 mm de grosor.

Separación electroforética

Se llevó a cabo la separación en dos fases: voltaje constante de 30 V por gel hasta que el azul de bromofenol entró al gel de separación, después los geles se sometieron a un voltaje constante de 80 V por gel hasta que el azul de bromofenol llegara al final del gel.

PROCEDIMIENTO B

Se empleó este procedimiento en el Capítulo III de Resultados.

Marcador de peso molecular

Se adicionaron 8 μ L por carril de los estándares Precision Plus Protein™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). El marcador de peso molecular se tiñó con azul Coomassie G-250 (Candiano y col. 2004) (sección 6.8.3).

Preparación de los extractos enzimáticos

Los extractos de cada medio de cultivo se ultrafiltraron y diafiltraron (10 kDa Amicon Ultra 15, Millipore, County Cork, Ireland) utilizando un amortiguador Tris-HCl 20 mM (pH 7.4). Cada pozo se cargó con 20 μ g de proteína.

Preparación del gel sustrato (SDS-PAGE-almidón)

El gel de compactación y el de resolución fueron de 4% y 9% de acrilamida respectivamente, la composición de los geles se muestra en la Tabla 6.3. Los geles eran de 1.0 mm de grosor.

Separación electroforética

Se llevó a cabo la separación a 200 V hasta que el azul de bromofenol llegara al final del gel.

6.7 Electroforesis

6.7.1 Electroforesis SDS-PAGE

Primero se describe la metodología que fue conservada a lo largo del trabajo y después se presentan las variaciones de la metodología de acuerdo a dos procedimientos empleados.

Amortiguador de muestra

El amortiguador de muestra tiene la siguiente composición:

Tris-HCl (pH 6.8)	31.5 mM
Glicerol	10% (v/v)
Azul de bromofenol	0.005% (v/v)
SDS	1% (p/v)
β -mercaptoetanol	355 mM

Preparación del gel SDS-PAGE

Se siguió la metodología según Laemmli (1970), la composición de los geles se muestran en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4 Preparación del gel del sistema SDS-PAGE de amortiguadores discontinuos.

Solución stock	Gel de compactación (4%)	Gel de resolución	
		(10%)	(12%)
Poliacrilamida ^{a)}	0.65 mL	3.3 mL	4.0
Amortiguador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	1.25 mL	-	-
Amortiguador Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	-	2.5 mL	2.5 mL
Agua destilada	3.05 mL	4.1 mL	3.4 mL
SDS 10% p/v	50 μ L	100 μ L	100 μ L
TEMED	5 μ L	5 μ L	5 μ L
Persulfato de amonio 10% p/v ^{b)}	25 μ L	50 μ L	50 μ L
Total	5.03 mL	10.055 mL	10.055 mL

a) Acrilamida: Bis 30:0.8 p/p en agua destilada.

b) Preparada inmediatamente antes de utilizarse.

Los SDS-PAGE se corrieron en una Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

PROCEDIMIENTO A

Este procedimiento se empleó en el Capítulo I de Resultados.

Marcador de peso molecular

Se adicionaron 5µL por carril de los estándares de peso molecular SDS-PAGE de amplio rango (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Preparación de la proteína

Los extractos crudos de proteína extracelular que estaban en congelación a -20°C se descongelaron y centrifugaron a 10,000 rpm durante 2 minutos antes de prepararlos con el amortiguador de muestra. Se cargaron 20 µL de extracto independientemente de la concentración de proteína. La muestra se diluyó 1:1 en amortiguador de muestra y se calentó en agua a ebullición durante 5 minutos antes de cargar en el SDS-PAGE

Preparación del SDS-PAGE

El gel de compactación y el de resolución son de 4% y 10% de acrilamida respectivamente, la composición de los geles se muestra en la Tabla 6.4. Los geles eran de 1.5 mm de grosor.

Separación electroforética

Se llevó a cabo la separación a un voltaje constante de 200 V para los cuatro geles que se corrieron hasta que el azul de bromofenol alcanzó la parte inferior de los geles.

Tinciones

Inmediatamente después los geles se fijaron (sección 6.7.3). Se probaron dos tipos de metodologías para la tinción de la proteína, Coomassie G-250 y tinción plata, la metodología de estas se describe en la sección 6.7.3.

PROCEDIMIENTO B

Se empleó este procedimiento en el Capítulo II y III de Resultados.

Marcador de peso molecular

Se adicionaron 10 µL por carril de los estándares Precision Plus Protein™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Preparación de la proteína

Los extractos de proteína extracelular obtenidos mediante la metodología de la sección 6.5.2 se resuspendieron en amortiguador de muestra de SDS-PAGE y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 2 minutos.

Una vez adicionado el amortiguador de muestra de SDS-PAGE se calentaron los extractos en agua a ebullición durante 5 minutos antes de cargar en el SDS-PAGE. Se cargaron 40 µg de proteína por carril.

Preparación del SDS-PAGE

El gel de compactación y el de resolución son de 4 y 12% de acrilamida respectivamente, la composición de los geles se muestra en la Tabla 6.4. Los geles eran de 1.0 mm de grosor.

Separación electroforética

Se llevó a cabo la separación a un voltaje de 200 V hasta que el azul de bromofenol alcanzó la parte inferior de los geles.

Tinciones

Inmediatamente después los geles se fijaron y posteriormente los geles se tiñeron con azul Coomassie G-250 (sección 6.7.3).

6.7.2 Electroforesis en 2 dimensiones

Se describe la metodología empleada para la electroforesis en 2 dimensiones en cada capítulo de Resultados. Antes de eso se muestra la composición del amortiguador de muestra empleado, el cual no se modificó en el transcurso del trabajo.

Amortiguador de muestra

Urea	8M
CHAPS	2% (p/v)
DTT	50 mM
Anfolitos (pH 3-10)	0.2% (p/v)
Azul de bromofenol	0.001% (p/v)

PROCEDIMIENTO A

Este procedimiento se empleó en el Capítulo I de Resultados.

Preparación de la proteína

En esta sección de resultados el extracto crudo de proteína extracelular se concentró precipitando con TCA como se describió en la sección 6.4.2 de preparación de proteína extracelular para análisis del secretoma. El “pellet” se resuspendió en amortiguador de

muestra para electroforesis de 2 dimensiones y se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos. Finalmente, se determinó la concentración de proteína con Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) para cargar la misma cantidad de proteína.

Isoelectroenfoque

Se cargaron 100 µg de proteína disuelta en el amortiguador de muestra en una tira IPG de 7 cm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) con gradiente lineal de pH 3-10. Para el isoelectroenfoque se empleó el protocolo descrito en la Tabla 6.5, el límite de corriente fue de 50 µA. Las proteínas se enfocaron en el sistema de isoelectroenfoque PROTEAN® i12™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Tabla 6.5 Protocolo de isoelectroenfoque.

Pasos	Voltaje	Gradiente	Corriente	Valor	Unidades
1	250	Lineal	50	0:20	HH:MM
2	4,000	Lineal	50	2:00	HH:MM
3	4,000	Rápido	50	10,000	Volts Hr
4	500	Hold	50		

Equilibrio de tiras IPG

Después del isoelectroenfoque de las tiras IPG se equilibraron dos veces por 15 minutos, la composición del amortiguador de equilibrio para cada paso se muestra en la Tabla 6.6.

Tabla 6.6 Composición de los amortiguadores de equilibrio de la electroforesis de 2-dimensiones.

Paso 1		Paso 2	
Tris-HCl (pH 8.8)	0.375 M	Tris-HCl (pH 8.8)	0.375 M
Urea	6M	Urea	6M
Glicerol	20% (v/v)	Glicerol	20% (v/v)
SDS	2% (p/v)	SDS	2% (p/v)
DTT	130 mM	Iodoacetamida	135 mM

Electroforesis SDS-PAGE

Después del equilibrio de las tiras se realizó la separación de las proteínas en la segunda dimensión, un SDS-PAGE siguiendo la metodología reportada por Laemmli (1970), el gel fue de 12% de poliacrilamida y 1 mm de grosor. El SDS-PAGE se corrió en una cámara Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 200 V hasta que el azul de

bromofenol alcanzó la parte inferior de los geles. Inmediatamente después los geles se fijaron y posteriormente se tiñeron con azul Coomassie G-250 (sección 6.7.3).

PROCEDIMIENTO B

Este procedimiento se empleó en el Capítulo III de Resultados.

Preparación de la proteína

La proteína liofilizada se resuspendió en el amortiguador de muestra para electroforesis de 2 dimensiones y se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos.

Isoelectroenfoque

La proteína disuelta en el amortiguador de muestra se cargó en una tira IPG de 7 cm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) con gradiente lineal de pH 3-10. Se cargaron 100 µg de proteína por tira IPG. Se realizó una rehidratación activa durante 14 horas, 50V a 20°C previo al isoelectroenfoque. Para el isoelectroenfoque se empleó el protocolo de Bio-Rad “7 cm pH 3-10 G” el cual se describe en la Tabla 6.7, el límite de corriente fue de 50 µA. Las proteínas se enfocaron en el sistema de isoelectroenfoque PROTEAN® i12™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Tabla 6.7 Protocolo de isoelectroenfoque de Bio-Rad “7 cm pH 3-10 G”.

Pasos	Voltaje	Gradiente	Corriente	Valor	Unidades
1	250	Rápido	50	0:15	HH:MM
2	4,000	Gradual	50	1:00	HH:MM
3	4,000	Rápido	50	15,000	Volts Hr
4	500	Hold	50		

Equilibrio de tiras IPG

Después del isoelectroenfoque de las tiras IPG se equilibraron dos veces por 15 minutos, la composición de la solución de equilibrio para cada paso se muestra en la Tabla 6.6.

Electroforesis SDS-PAGE

Después del equilibrio de las tiras se realizó la separación de las proteínas en la segunda dimensión, un SDS-PAGE siguiendo la metodología reportada por Laemmli (1970), el gel fue de 12% de poliacrilamida y 1.00 mm de grosor. El SDS-PAGE se corrió en una Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 150 V hasta que el azul de

bromofenol alcanzó la parte inferior de los geles. Inmediatamente después los geles se fijaron y posteriormente los geles se tiñeron con azul Coomassie G-250 (sección 6.7.3).

6.7.3 Fijación y tinción de los geles de electroforesis

Inmediatamente después de la separación electroforética se fijaron los geles con la solución con la composición siguiente:

Metanol	40%
Ácido acético	10%

Se adicionaron 50 mL de la solución fijadora a cada gel y se dejaron fijando toda la noche con agitación lenta. Se eliminó la solución de fijación haciendo lavados con agua destilada.

Para la tinción de los geles de electroforesis se emplearon las metodologías de tinción con azul de Coomassie R-250, tinción con azul de Coomassie G-250 y tinción plata, a continuación se describe la metodología para cada una de estas tinciones.

Tinción con azul de Coomassie R-250

Después de fijar los geles de electroforesis para la tinción Coomassie R-250 se utilizó una solución con la composición siguiente:

Coomassie R-250	0.1% (p/v)
Metanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (p/v)

Se realizó la destinción de los geles hasta obtener bandas bien resueltas, la composición de la solución de destinción es la siguiente:

Metanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (p/v)

Tinción con azul de Coomassie G-250

Se utilizó la metodología de tinción con azul Coomassie G-250 coloidal para análisis proteómico reportada por Candiano y col. (2004). La solución miceliar de Coomassie G-250 es la siguiente:

Coomassie G-250	0.12% (p/v)
Sulfato de amonio	10% (p/v)
Ácido fosfórico	10% (v/v)
Metanol	20% (v/v)

Después de la fijación del gel se adicionaron 50 mL de la solución miceliar de Coomassie G-250 y se dejaron tiñendo toda la noche los geles con agitación lenta. Después se retiró la solución de tinción y se enjuagaron con agua destilada.

Tinción Plata

Para la tinción con plata se utilizó el kit Silver Stain Plus™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

6.8 Adquisición y análisis de imágenes, e identificación de proteínas con cambio de abundancia en geles de 2 dimensiones

La adquisición y análisis de imágenes, e identificación de proteínas con cambio de abundancia se realizó para los geles de 2 dimensiones realizados en el Capítulo 3 de Resultados del análisis del secretoma de *A. niger* 10 en CMS.

6.8.1 Adquisición de imágenes

Los geles teñidos se escanearon usando Gel Doc™ EZ System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las imágenes se digitalizaron usando Image Lab Software versión 5.2.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y se analizaron usando PDQuest™ Advanced 2-D Analysis Software versión 8.0.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Se analizaron duplicados de geles de cada medio de cultivo obtenidos de dos cultivos independientes (replicas biológicas) para asegurar resultados representativos.

6.8.2 Análisis de imágenes

El programa PDQuest™ hizo una detección automática de los “spots” y le asignó a cada uno un número SSP. Después de la detección automática, los “spots” se revisaron manualmente para eliminar interferencias tales como: rayas verticales y horizontales y ruido de fondo tales como residuos de la solución de tinción. Se obtuvo la normalización de los “spots”, como una calibración interna para que los datos fueran independientes de las

variaciones experimentales entre geles, como ha sido sugerido por Jami y col. (2010), para comparar los geles de las diferentes condiciones evaluadas. La normalización de los “spots” se llevó a cabo usando el modelo de regresión local del programa y obteniendo la cantidad normalizada de todos los “spots” detectados. Para que un “spot” fuera considerado en el análisis de imagen tenía que estar presente en las dos imágenes de las réplicas biológicas. Esto se realizó para las tres condiciones evaluadas obteniendo a partir de esto lo que llama el programa un gel maestro que representa cada condición y es una imagen que genera el programa a partir del promedio de las réplicas.

Posteriormente, se hizo la comparación entre condiciones, los tres medios de cultivo evaluados, para lo cual se hicieron dos cosas:

1) La comparación de los geles maestros en el programa PDQuest™ sirvió para identificar los “spots” de proteína que se encontraban en tres condiciones, en dos, o los que eran únicos.

2) El análisis estadístico de la comparación de las condiciones se hizo exportando los datos de la cantidad normalizada de todos los “spots” de cada condición y generando una tabla de análisis de cambio de abundancia a partir del cual se hizo la identificación de los “spots” de proteína con cambio de abundancia. En esta tabla para cada “spot” de proteína estaba incluido lo siguiente:

- Número SSP de los “spots”.
- Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la cantidad normalizada de los “spots”.
- Pesos moleculares (kDa) y puntos isoelectricos experimentales estimados de la electroforesis en 2-D.
- La relación de las comparaciones por pares del promedio de la cantidad normalizada de un “spot” específico, el “fold”, haciendo la comparación en pares entre los tres medios de cultivo evaluados.
- Imágenes del “spot” de proteína en la electroforesis en 2-D de los tres medios de cultivo evaluados.

En el Anexo F se encuentra la información del análisis de cambio de abundancia de todos los “spots” de proteína detectados en las imágenes de la electroforesis en 2-D de los extractos de proteína extracelular de los tres medios de cultivo evaluados.

6.8.3 Identificación de proteínas

Se consideró que las proteínas tenían un cambio de abundancia cuando la relación de las comparaciones por pares del promedio de la cantidad normalizada de un “spot” específico era mayor a 1.5 (“fold” > 1.5), haciendo la comparación en pares entre los tres medios de cultivo evaluados (A20G0, A20G60 y A20G120). Además de este criterio, se realizó una prueba de ANOVA para asegurar diferencia significativa entre los promedios de la cantidad normalizada de un “spot” específico en las tres condiciones evaluadas con un valor $p < 0.05$.

6.9 Análisis de proteínas por MALDI-TOF MS

La selección de los “spots” para su identificación por MALDI-TOF MS, en inglés “matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry”, se hizo considerando la intensidad de un “spot” específico por medio de la cantidad normalizada y verificando si visualmente se podía hacer el corte manual del “spot”, además de los siguientes criterios: el “spot” solo se detectó en un medio de cultivo; el “spot” se detectó en los dos medios de cultivo con glucosa (A20G60 y A20G120); el “spot” se detectó en dos o tres medios de cultivo y tuvo un cambio de abundancia con un “fold” > 1.5 y un valor $p < 0.05$.

Los “spots” seleccionados se cortaron manualmente de los geles, se colocaron en tubos y se lavaron dos veces con agua Milli-Q[®]. La digestión triptica de las muestras y su identificación por MALDI-TOF MS se realizó por el Dr. Dennis Phillips en “Proteomics and Mass Spectrometry Core Facility” de la Universidad de Georgia. La metodología utilizada por el Dr. Dennis Phillips es la siguiente:

Des-tinción de las muestras

Se adicionaron 50 μ L de bicarbonato de amonio 20 mM en solución de metanol al 50% a cada gel. Después de 20 minutos, la solución se intercambió por otros 50 μ L de la misma solución por otros 20 minutos.

Deshidratación

Se reemplazó la solución con 50 μ L de una solución de acetonitrilo 75%. La solución se retiró de los geles y se colocaron los geles en un horno a 37°C durante 20 minutos.

Reducción

Se adicionaron 50 μL de ditioneitol (DTT) 10 mM en 20 mM de bicarbonato de amonio a los geles y se regresaron al horno durante una hora.

Alquilación

Se retiró la solución y se adicionaron 50 μL de iodoacetamida 100 mM en bicarbonato de amonio 20 mM a cada gel. Los geles se colocaron en oscuridad durante 30 minutos.

Se retiró la solución y se adicionaron 50 μL de bicarbonato de amonio 20 mM en una solución de metanol al 50% a cada gel. Esa solución se retiró después de 20 minutos y se adicionaron 50 μL de acetonitrilo 75%. Después de 20 minutos, la solución se retiró y los geles se colocaron en un horno a 37°C por 20 minutos.

Digestión triptica

Se adicionaron 25 μL de una solución de tripsina 2 ng/ μL (Promega, sequencing grade, Madison, WI, USA) a cada gel y los geles se colocaron en un horno a 37°C durante una noche.

Las soluciones se retiraron de los tubos y se mantuvieron separadas. A los geles se les adicionó acetonitrilo 50% en ácido fórmico 0.1% y después de 20 minutos las soluciones se reemplazaron con la misma. Después de 20 minutos se juntaron las soluciones del mismo gel. Las soluciones de las extracciones se secaron en un SpeedVacTM. Se resuspendieron en 1.5 μL de acetonitrilo 20% en ácido fórmico 0.1%. 0.6 μL de esto se colocó en un plato MALDI con 0.6 μL de una matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico.

Las muestras se analizaron usando el método de huella peptídica con un espectrómetro de masas Bruker Daltonics GmbH Autoflex MALDI-TOF usando modo reflectrón. Para un solo espectro de masas se promediaron juntos de 200-500 disparos de láser. Para calibrar el instrumento se utilizaron picos de angiotensina I e insulina. Los espectros se recalibraron y analizaron con FlexAnalysis versión 3.4 (build 7.0) de Bruker Daltonics GmbH (Bremen, Germany). Los espectros se recalibraron usando rutinas de calibración interna que utilizaron cortes de tripsina si se observaron, si no se observaron se utilizó una función estadística de péptidos con 500 ppm de variación. Para crear listas de picos la detección se hizo con el algoritmo “snap”, que automáticamente elimina los isótopos de los picos.

La señal de umbral de ruido se establece en 4, el umbral de intensidad relativa de 100, el número máximo de picos 100 y la resta de la línea base fue “TopHat”. A continuación, cada

espectro fue inspeccionado manualmente para encontrar otros picos. Picos de tripsina y de queratina se eliminaron si fueron observados.

El programa Mascot (Matrix Science, Boston, MA, USA) se utilizó para la identificación con la base de datos del proteoma de referencia (proteome ID UP000006706 de <http://www.uniprot.org>) derivado del genoma anotado de *A. niger* 513.88 (Pel y col. 2007). Los parámetros de búsqueda fueron: digestión triptica, tolerancia de péptido de 100 ppm, máxima pérdida de un corte, oxidación de residuos de metionina como modificaciones variables, carbamidometilación de los residuos de cisteína como modificación fija, carga de péptido de 1+. Los candidatos de proteínas fueron considerados validos cuando el “score” global de Mascot era mayor que el límite de 54 con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

6.10 Análisis bio-informático

Los números de acceso y los nombres de las proteínas son del genoma anotado de *A. niger* 513.88 (Pel y col. 2007) y de la base de datos de proteínas de NCBI por sus siglas en inglés “National Center for Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>). Para las proteínas que resultaron como “proteínas hipotéticas” se muestra el nombre que aparece en la anotación NCBI en la sección “CDS”. La función de las proteínas se buscó en UniProt (<http://www.uniprot.org>). Para la predicción de los mecanismos de secreción se utilizaron dos programas; la predicción de péptido señal en las proteínas se hizo mediante SignalP versión 4.1 (Petersen y col. 2011) y se hizo la predicción de los “nonclassical signal motifs” usando SecretomeP versión 2.0 (Bendtsen y col. 2004). Para la predicción de las proteínas transmembrana se utilizó el programa TMHMM versión 2.0 (Krogh y col. 2001; Sonnhammer y col. 1998). Se hizo la búsqueda en línea de las proteínas “moonlighting” en la base de datos MoonProt (<http://www.moonlightingproteins.org/>).

6.11 Análisis estadístico

El número de réplicas considerado en cada caso se indica en el texto. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa Statgraphics XVII (Statpoint Technologies, Inc. Warrenton, VA, USA). Se empleó la prueba de Tukey HSD como procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras con un nivel del 95% de confianza.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo se dividió en tres etapas. En la primera, se comparó la producción de amilasa en CMS y CS por las cepas *A. niger* 10 y *A. nidulans* FGCS26. En la segunda etapa de resultados se empleó respirometría como una medida indirecta del crecimiento para determinar el tiempo de muestreo para los análisis del secretoma de *A. niger* 10 en CMS. En la tercera etapa se evaluó el secretoma de *A. niger* 10 obtenido en CMS con tres diferentes medios de cultivo.

7.1. Producción de amilasas por dos cepas de *Aspergillus* en cultivos en medio sólido y sumergido

En la primera etapa del trabajo se establecieron las condiciones de cultivo y los métodos analíticos para el estudio de la producción de amilasas por dos cepas de *Aspergillus* en CMS y CS.

7.1.1 Producción de amilasas por *A. niger* 10 y *A. nidulans* FGCS26 en CMS Y CS

Se seleccionaron dos especies de *Aspergillus* para realizar los estudios del presente trabajo, *A. niger* y *A. nidulans* considerando los criterios que se mencionan a continuación. Ambos son hongos filamentosos de rápido crecimiento para evitar contaminación y con ello interferencias de proteínas ajenas a los hongos en el análisis del secretoma. El genoma de ambas especies ya estaba secuenciado (Pel y col. 2007; Andersen y col. 2011; Galagan y col. 2005). Además de que ya existían estudios de proteomas de ambas especies de *Aspergillus*.

El hongo *A. nidulans* ha sido utilizado en estudios de represión por carbono (Roy y col. 2008) y de inducción de amilasas (Kato y col. 2002; Murakoshi y col. 2012). Esta es información básica importante para la producción de amilasas y de la producción de estas enzimas en presencia de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo como posible fuente represora. En particular la cepa *A. nidulans* FGCS26 ha sido utilizada en estudios de proteomas (Shimizu y col. 2009) y es un organismo modelo en estudios básicos (Bayram y Braus 2011; Kim y col. 2002).

La cepa *A. niger* 10 había sido previamente evaluada en CMS en: crecimiento en sustratos de almidón en CMS (Raimbault y Alazard 1980, Oriol y col. 1988), en la comparación de la

producción de amilasas en CMS y CS (Alazard y Raimbault 1981), y en condiciones de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo en CMS (Oriol y col. 1988b; Gutiérrez-Rojas y col. 1995; Favela-Torres y col. 1998).

En esta sección de Resultados (7.1) los valores de actividad glucoamilasa (U/mL), proteína extracelular (mg/mL) y biomasa (mg/mL) se reportan por volumen de medio de cultivo para poder hacer la comparación entre los dos tipos de cultivo, el CS y el CMS. Además, los valores de pH son los del extracto crudo, la metodología para la obtención de estos extractos se menciona en la sección 6.4.1 de Materiales y Métodos.

Se describe a continuación la selección del método de determinación de actividad glucoamilasa y la producción de glucoamilasa por ambas cepas de *Aspergillus*.

7.1.1.1 Selección del método de determinación de actividad de glucoamilasa

Primero se evaluaron dos sustratos para la determinación de actividad glucoamilasa: maltosa y *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido, en un CS de 4 días para ambas cepas con el medio (A20G0) con 20 g/L de almidón como inductor y fuente de carbono (Fig. 7.1.1A y B). Para ambas cepas, los valores de actividad glucoamilasa con maltosa son mayores (alrededor de 50 veces) que los obtenidos con *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido. Por lo tanto, en los estudios posteriores se determinó la actividad glucoamilasa con maltosa. Estudios similares reportaron que en un extracto de *A. niger* la actividad glucoamilasa fue 20% mayor con maltosa que con *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (Withers y col. 1998).

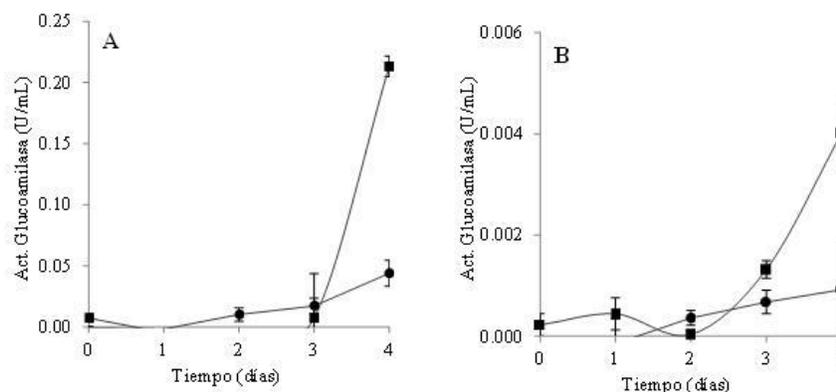


Figura 7.1.1 Actividad glucoamilasa (U/mL) por volumen de medio de cultivo del CS de *A. niger* 10 (■) y *A. nidulans* FGCS26 (●) con el medio A20G0 empleando el sustrato maltosa (A) y *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (B).

Después de seleccionar maltosa como sustrato para la determinación de actividad glucoamilasa se realizaron cinéticas de producción de actividad glucoamilasa en CMS y CS con ambas cepas de *Aspergillus*.

7.1.1.2 Producción de glucoamilasa en CMS y CS

Se evaluó el medio de cultivo A20G0 para la producción de glucoamilasa y el crecimiento de ambas cepas de *Aspergillus* en CMS y CS (Fig. 7.1.2).

La actividad glucoamilasa en CMS es mayor que en CS para ambas cepas (Fig. 7.1.2A). La actividad glucoamilasa de *A. niger* 10 es mayor que el de la cepa *A. nidulans* FGCS26. En el tercer día de cultivo se obtuvo la máxima actividad glucoamilasa y ésta se mantuvo hasta el quinto día. En todos los casos la producción de estas enzimas es mayor en CMS que en CS. Esto ya se ha reportado para amilasa con *A. niger* 10 (Alazard y Raimbault 1981) y con diversas enzimas: pectinasas (Díaz-Godínez y col. 2001), tanasas (Aguilar y col. 2001) e invertasas (Romero-Gómez y col. 2000; Giraldo y col. 2012; Alegre y col. 2009).

Los valores máximos de actividad glucoamilasa obtenidos al tercer día de cultivo para *A. niger* 10 son de 2.0 U/mL medio (0.27 U/mL extracto o 3.05 U/g soporte sólido) y de 0.38 U/mL medio para el CMS y CS respectivamente, y para *A. nidulans* FGCS26 son de 1.0 U/mL medio (0.13 U/mL extracto o 1.47 U/g soporte sólido) y 0.11 U/mL medio para el CMS y CS respectivamente. De la Tabla 7.1 podemos observar que los valores máximos obtenidos con *A. niger* 10 con ambos tipos de cultivo y con el CMS de *A. nidulans* FGCS26 son superiores a los reportados por *A. awamori* (Chiquetto y col. 1992) y *Thermomyces lanuginosus* (Haasum y col. 1991) en CS, pero inferiores a los obtenidos con la misma cepa de *A. niger* (Alazard y Raimbault 1981), otras cepas de *A. niger* (Li y col. 1984; Spier y col. 2006) y *Aspergillus* sp. (Abe y col. 1988).

La cinética de producción de proteína extracelular del extracto crudo (Fig. 7.1.2B) muestra gran variabilidad; por lo que, no se observa diferencia entre las cepas y los dos tipos de cultivos evaluados (CMS y CS).

La fase lag y la producción de biomasa fueron similares para ambas cepas en CS (Fig. 7.1.2C). También se determinó biomasa por gravimetría para el CMS (resultados no

mostrados) aunque hubo gran variabilidad en las determinaciones y además interferencias por parte del almidón ya que quedaba retenido en el papel Whatman No. 41 al filtrar la materia fermentada. Esto fue una limitante ya que se requería determinar la biomasa para ambos tipos de cultivos para poder establecer un tiempo de muestreo para los análisis del secretoma.

Los perfiles de pH del extracto crudo son similares para cada cepa independientemente del tipo de cultivo (Fig. 7.1.2D). Los valores de pH del extracto crudo de los cultivos de *A. niger* 10 disminuyen de 6.5 a alrededor de 5 y de los cultivos de *A. nidulans* FGCS26 aumentan a alrededor de 9. Los cambios en los valores del pH del extracto crudo se dieron a partir del segundo día de cultivo.

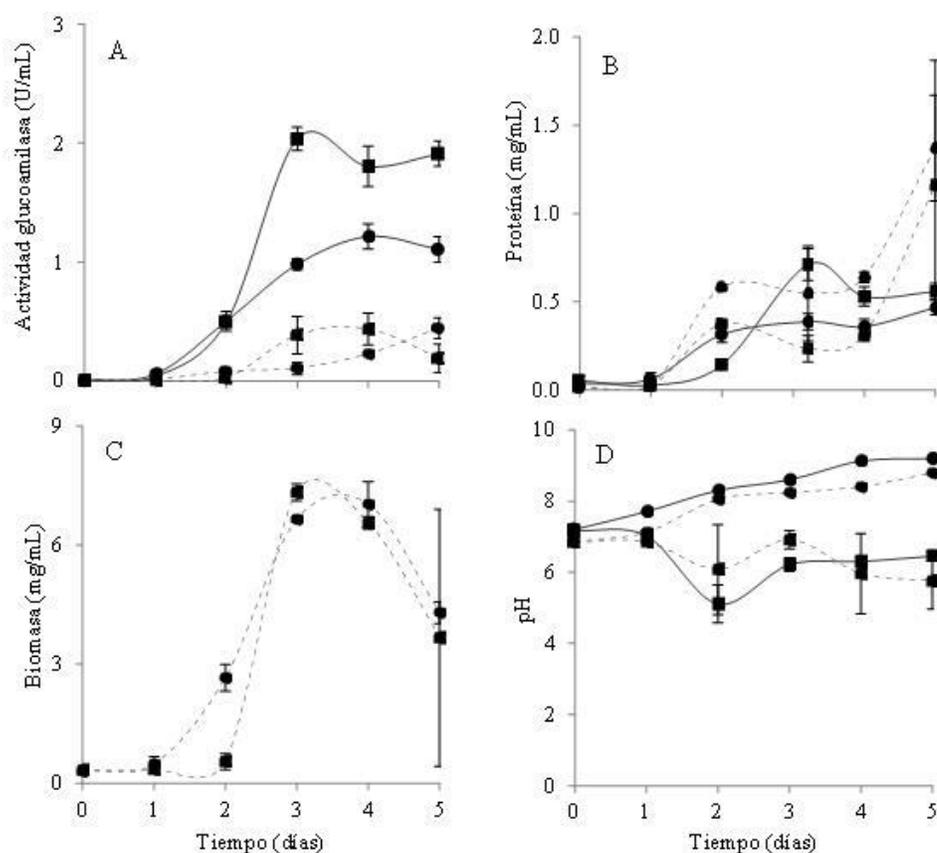


Figura 7.1.2 Actividad glucoamilasa (U/mL) (A), proteína extracelular (mg/mL) (B), y biomasa (mg/mL) (C) por volumen de medio de cultivo y valores de pH del extracto crudo (D) del CMS (—) y CS (---) de *A. niger* 10 (■) y *A. nidulans* FGCS26 (●) con el medio A20G0.

Tabla 7.1 Producción de actividad amilasa en otros reportes.

Microorganismo	Tipo de cultivo	Tipo de actividad	Actividad amilasa	Método de determinación de actividad	Definición de actividad	Referencia
<i>A. niger</i>	CMS	amilasa	950 U/g sustrato	Sustrato: almidón soluble Liberación de azúcares reductores con el método del ferricianuro o el método de Glucostat	La cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de glucosa por minuto	Alazard y Raimbault 1981
	CS	amilasa	650 U/g sustrato			
<i>Aspergillus sp. K-27</i>	CS	amilasa	5.5 U/mL	Sustrato: almidón soluble Liberación de la glucosa con el método glucosa oxidasa-peroxidasa	La cantidad de enzima que produce 1 μmol de glucosa por minuto	Abe y col. 1988
<i>A. awamori</i>	CS	glucoamilasa	1.14 U/mL	Sustrato: almidón soluble Liberación de la glucosa con el método glucosa oxidasa-peroxidasa	La cantidad de enzima que libera 1 gramo de glucosa en 60 minutos	Chiquetto y col. 1992
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	CS	glucoamilasa	0.265 U/mL	Sustrato: almidón Liberación de la glucosa con el método hexoquinasa/glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	La cantidad de proteína que liberó 1 μmol de glucosa por minuto	Haasum y col. 1991
<i>Penicillium chrysogenum</i>	CS	α -amilasa	662 U/mL	Sustrato: almidón soluble Disminución de la intensidad del color del almidón-yodo	La cantidad de enzima que hidroliza 0.1 mg de almidón en un minuto	Ertan y col. 2014
	CMS		694 U/mL			
<i>Penicillium griseofulvum</i>	CS	α -amilasa	400 U/mL			
	CMS		652 U/mL			
<i>Bacillus subtilis</i>	CMS	α -amilasa	532 U/g sustrato seco	Sustrato: almidón soluble Liberación de azúcares reductores determinados con el método de DNS	La liberación de azúcares reductores equivalentes a 1 μmol de glucosa por minuto	Mukherjee y col. 2009
<i>A. niger</i>	CS	glucoamilasa	82 U/mL	Sustrato: maltosa Liberación de la glucosa con el método hexoquinasa/glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Un micromol de glucosa producida por minuto	Li y col. 1984
		α -amilasa	21 U/mL	Sustrato: almidón Liberación del colorante azul Remazol brillante R del almidón azul	Definida por absorbancia, 0.1 absorbancia por minuto	
<i>A. niger</i>	CMS	glucoamilasa	2,044.94 U/g almidón de yuca	Sustrato: almidón soluble Liberación de azúcares reductores determinados con el método de DNS	La cantidad de enzima que libera 1 mg de glucosa por minuto	Spier y col. 2006
		α -amilasa	1,732.95 U/g almidón de yuca	Sustrato: almidón soluble Disminución de la intensidad del color del almidón-yodo	La cantidad de enzima que cataliza la transformación de 10 mg de almidón por 30 minutos	

Al repetir cuatro veces los cultivos de comparación de CMS con CS se mostró reproducibilidad de los resultados (resultados no mostrados). Se consideraron los resultados de actividad glucoamilasa para seleccionar la cepa para los estudios del secretoma ya que en todos los casos la producción de actividad glucoamilasa mostró diferencias entre las dos cepas y los dos tipos de cultivo evaluados, y además porque es de interés principal la producción de amilasas en este trabajo. Debido a que en los cuatro cultivos realizados los valores de actividad glucoamilasa producidos por *A. niger* 10 fueron mayores que los de la cepa *A. nidulans* FGCS26 al comparar el mismo tipo de cultivo, se decidió seleccionar a *A. niger* 10 para continuar con los estudios del secretoma.

7.1.2 Producción de glucoamilasa por *A. niger* 10 en CMS con medios con C/N variable

Se evaluó el efecto de la adición de glucosa al medio de cultivo A20G0 sobre la producción de glucoamilasa y el crecimiento de *A. niger* 10 en CMS. Se emplearon los medios A20G20V, A20G40V y A20G80V con 20 g/L de almidón/L y 20, 40 y 80 g/L de glucosa respectivamente, la V indica que son medios de cultivo con C/N variable (ver Tablas A.2 y A.3 de Anexo B).

La producción de glucoamilasa disminuyó al aumentar la glucosa inicial en el medio de cultivo (Fig. 7.1.3A); además, los valores de actividad son inferiores a los obtenidos en los cultivos en ausencia de glucosa (Fig. 7.1.2A). El descenso en los valores de actividad glucoamilasa con el aumento en la concentración de glucosa inicial en el medio de cultivo puede estar relacionado con el descenso en el pH (Fig. 7.1.3C), una posible represión catabólica y con el aumento en la C/N del medio. Mukherjee y col. (2009) reportaron un descenso en la producción de actividad α -amilasa por *Bacillus subtilis* en CMS con el aumento de la C/N al realizar un análisis de regresión lineal múltiple para optimizar la producción de la enzima.

En los resultados mostrados en esta sección se observó un efecto negativo de la glucosa en el medio de cultivo en la producción de amilasas en CMS. Sin embargo algunos reportes describen que la producción de amilasas no se ve afectada por la presencia de la glucosa. En el reporte de Nandakumar y col. (1999) se mantuvo similar la producción de glucoamilasa y α -amilasa por *A. niger* en CMS al evaluar el efecto de la glucosa (5, 10, 50 y 150 mg/g salvado

seco fermentado) con respecto al medio control (salvado e trigo) durante un cultivo de 4 días. Ertan y col. (2014) reportaron algo similar en la producción de α -amilasa en CMS por *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium griseofulvum* en presencia de glucosa ya que se mantuvo similar al control (salvado de trigo) hasta una concentración de 160 mg/g sustrato sólido con la cual se dio una reducción del 20% en la actividad.

Por otro lado, también ha sido reportado en diversas ocasiones un incremento en la producción de enzimas en CMS en presencia del inductor y glucosa, incluyendo un incremento en la producción de amilasas, un ejemplo es el reporte de Ramesh and Lonsane (1991) en la producción de α -amilasa por *Bacillus licheniformis* en CMS. Estudios de producción de pectinasas (Solis-Pereira y col. 1993; Díaz-Godínez y col. 2001) y tanasas (Aguilar y col. 2001) también mostraron que la adición de glucosa al medio de cultivo con pectina y ácido tánico como inductores respectivamente causaba un incremento en la producción de ambas enzimas.

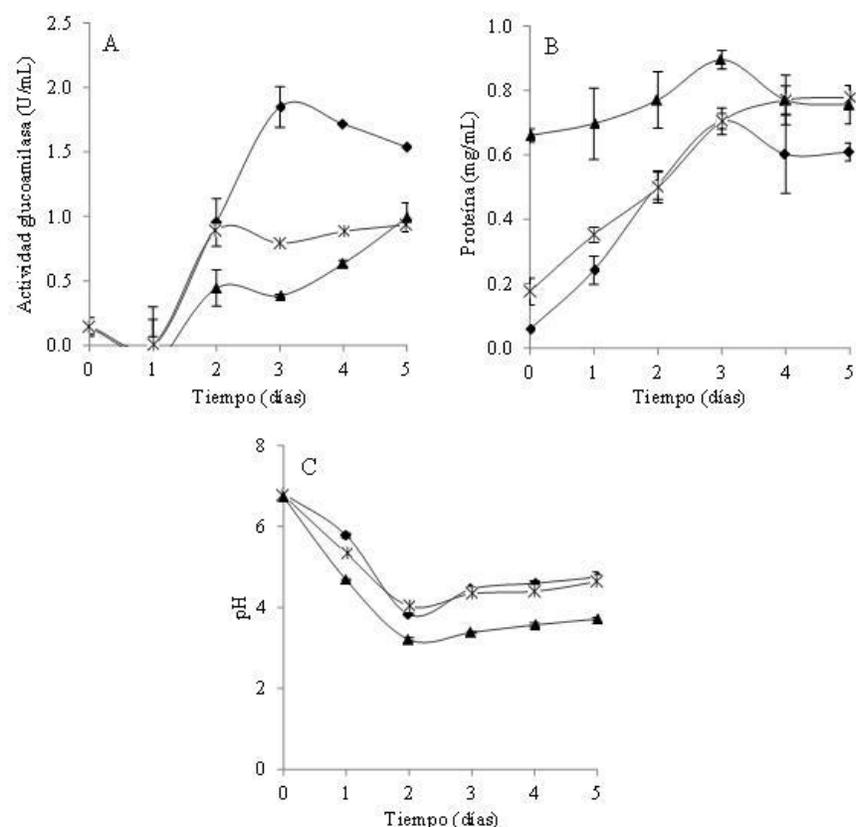


Figura 7.1.3 Actividad glucoamilasa (U/mL) (A), proteína extracelular (mg/mL) (B) por volumen de medio de cultivo y valores de pH del extracto crudo (C) del CMS de *A. niger* 10. Se evaluaron tres medios de cultivo: A20G20V (◆), A20G40V (*) y A20G80V (▲).

A partir del tercer día de cultivo la concentración de proteína extracelular se mantuvo constante a un valor similar para las tres concentraciones de glucosa evaluadas (Fig. 7.1.3B). Los valores de proteína obtenidos son similares a los valores obtenidos en los cultivos sin glucosa (Fig. 7.1.2B). En el tiempo inicial de los cultivos con 40 y 80 g/L de glucosa inicial el valor de proteína observado pudiera deberse a la interferencia de la alta concentración de glucosa en el medio de cultivo (Lowry y col. 1951; Bio-Rad *DC Protein Assay Instruction Manual*; Bio-Rad *Protein Assay Instruction Manual*; Thermo Scientific *Pierce Protein Assay Technical Handbook*).

Hubo una reducción del pH del extracto crudo (Fig. 7.1.3C) a valores de alrededor de cuatro para los cultivos con los medios con 20 y 40 g/L de glucosa inicial y hasta un valor de 3 para el cultivo con 80 g/L de glucosa, esto a partir del segundo día de cultivo y manteniéndose

hasta el quinto día de cultivo. Solis-Pereyra y col. (1996) obtuvieron un comportamiento similar en el perfil de pH en la producción de pectinasas en CMS utilizando bagazo de caña como soporte-sustrato y concentraciones de glucosa en el medio de cultivo de hasta de 450 g/L; a mayor concentración de glucosa inicial es mayor la caída en el valor del pH.

Se trató de cuantificar la biomasa por gravimetría, aunque por la interferencia del almidón que quedaba retenido en el papel Whatman No. 41 al filtrar la materia fermentada, los resultados mostraron gran variabilidad (resultados no mostrados).

Debido a que el descenso en los valores de actividad glucoamilasa podía estar relacionado con el aumento de la C/N del medio en la siguiente sección de resultados se evaluaron medios de cultivo con C/N constante.

7.1.3 Producción de amilasas por *A. niger* 10 en CMS y CS con medios con C/N constante

Se compararon el CMS y CS de *A. niger* 10 con cuatro medios de cultivo, los medios A20G0, A20G20, A20G40 y A20G80 con 20 g/L de almidón/L y 0, 20, 40 y 80 g/L de glucosa respectivamente. La relación C/N de los medios de cultivo se mantuvo constante mediante el incremento proporcional de la cantidad de sales minerales del medio de cultivo (ver Tablas A.2 y A.3 del Anexo B). Debido a que en los cultivos anteriores se mantuvo constante la actividad glucoamilasa y concentración de proteína extracelular a partir del tercer día de incubación, para este estudio solo se evaluó el tercer día de incubación.

De manera favorable, los valores de actividad α -amilasa y glucoamilasa en CMS y CS de *A. niger* 10 aumentaron al aumentar la concentración del medio de cultivo (Fig. 7.1.4A y B). Los valores de actividad glucoamilasa en CMS son mayores a los del CS al comparar el mismo medio de cultivo (Fig. 7.1.4A). De manera contraria en los resultados de actividad α -amilasa, la actividad en CS es mayor que en CMS al comparar el mismo medio de cultivo, incluso con el medio más concentrado (Fig. 7.1.4B).

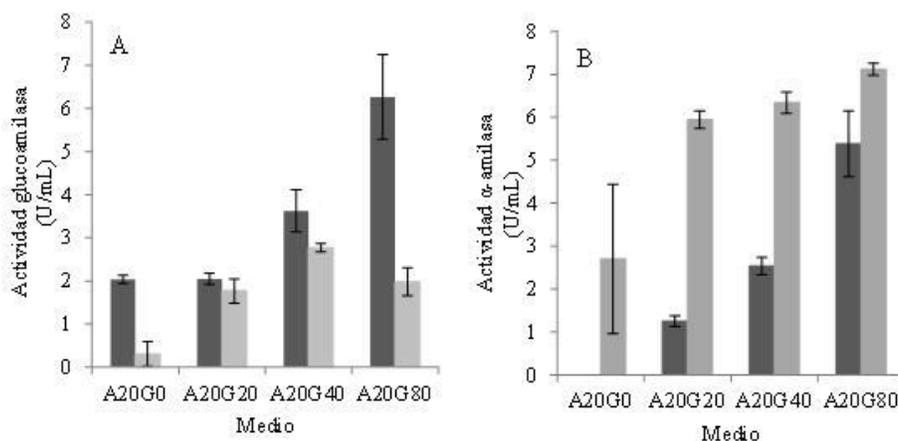


Figura 7.1.4 Valores de actividad glucoamilasa (U/mL) (A) y α -amilasa (U/mL) (B) por volumen de medio de cultivo del CMS (■) y CS (■) de *A. niger* 10 a tres días de cultivo. Se evaluaron cuatro medios de cultivo: A20G0, A20G20, A20G40 Y A20G80.

El resultado de que la actividad α -amilasa en CS sea mayor que en CMS es contrario a lo que se ha reportado al comparar ambos tipos de cultivo en la producción de amilasas (Alazard y Raimbault 1981; Ertan y col. 2014; Nandakumar y col. 1999; Ramesh y Lonsane 1991a; Ramesh y Lonsane 1991b). Aunque debe considerarse que no se realizó cinética y se pudieron haber desplazado los máximos, por ejemplo en el reporte de Alazard y Raimbault (1981) utilizando la misma cepa de *A. niger* 10, la máxima producción de amilasa fue a las 40 h y 64 h para el CS y CMS respectivamente. Además se ha reportado en la producción de α -amilasa por *Bacillus licheniformis* en CMS que al incrementar la concentración de una fuente de carbono adicional al inductor (por ejemplo glucosa) hay un aumento en la máxima producción de esta enzima junto con un desplazamiento en el tiempo para llegar a este máximo (Ramesh y Lonsane 1991a; Ramesh y Lonsane 1991b).

Además es de resaltar que se favoreció la producción de ambas amilasas en CS al aumentar la concentración del medio de cultivo, y con ello también la concentración de glucosa, sin observarse su represión con el medio más concentrado evaluado (A20G80). Se ha reportado un aumento en los valores de actividad α -amilasa en CS con *A. niger* NCIM 548 al aumentar la concentración inicial de almidón (10, 20, 30 y 40 g/L) (Rezaei y col. 2009). Aunque también se ha reportado en diversas ocasiones en CS la inhibición total de la producción de α -amilasa a partir de 10 g/L glucosa en el medio de cultivo con almidón con *Bacillus*

licheniformis (Ramesh y Lonsane 1991) y con *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium griseofulvum* (Ertan y col. 2014). Esto también se ha reportado para otras enzimas, la producción de pectinasas en CS por *Aspergillus* sp. se redujo a la mitad en un medio con pectina a partir de 5 g/L de glucosa con respecto a la ausencia de la glucosa (Aguilar y Huitrón 1990). Y de manera similar a los resultados del CMS en esta sección de resultados, se ha reportado en diversas ocasiones un incremento en la producción de enzimas en la presencia del inductor y glucosa (Ramesh and Lonsane 1991; Solis-Pereira y col. 1993; Díaz-Godínez y col. 2001; Aguilar y col. 2001).

Los valores máximos de actividad glucoamilasa se obtuvieron con el medio de cultivo A20G80 y fueron de 6.27 U/mL medio (0.97 U/mL extracto o 11.47 U/g soporte sólido) y 1.98 U/mL medio para el CMS y CS respectivamente. De la Tabla 7.1 podemos observar que los valores máximos de actividad glucoamilasa son superiores a los reportados para *A. awamori* (Chiquetto y col. 1992), *Thermomyces lanuginosus* (Haasum y col. 1991) y *Aspergillus* sp. K-27 (Abe y col. 1988) en CS pero inferiores a los obtenidos con otras cepas de *A. niger* (Li y col. 1984; Spier y col. 2006).

Los valores máximos de actividad α -amilasa se obtuvieron con el medio de cultivo A20G80 y fueron de 5.38 U/mL medio (0.83 U/mL extracto o 9.86 U/g soporte sólido) y 7.12 U/mL medio para el CMS y CS respectivamente. De la Tabla 7.1 podemos observar que los valores máximos de actividad α -amilasa son superiores a los reportados para *Aspergillus* sp. K-27 (Abe y col. 1988) en CS pero inferiores a los obtenidos con *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium griseofulvum* (Ertan y col. 2014), *Bacillus subtilis* (Mukherjee y col. 2009) y *A. niger* (Li y col. 1984; Spier y col. 2006).

No obstante hay que considerar que hay diferencias en los métodos de determinación de las actividades amilasas de los otros reportes con respecto al presente trabajo (Tabla 7.1). Además, en algunos casos las actividades amilasa obtenidas en otros reportes fueron optimizadas (Spier y col. 2006; Mukherjee y col. 2009) y en el presente trabajo no se realizaron estudios de optimización.

Los valores máximos de ambas actividades amilasa obtenidos en ambos cultivos en este trabajo son inferiores a los valores de actividad amilasa obtenidos por Alazard y Raimbault (1981) con la misma cepa (Tabla 7.1), la diferencia podría radicar en que hay diferencias en la

determinación de actividades amilasa y que utilizaron diferente soporte sustrato que actuó como inductor de amilasas (harina de yuca cocida) y diferente medio mineral.

La concentración de proteína extracelular, determinada mediante el método de Lowry, aumentó al aumentar la concentración del medio de cultivo para ambos tipos de cultivo evaluados (Fig. 7.1.5A); siendo los valores de proteína obtenidos en cada medio de cultivo muy similar para los dos tipos de cultivo evaluados.

Para ambos cultivos al aumentar la concentración de los medios, hasta el medio A20G40, aumenta la producción de biomasa (Fig. 7.1.5B). Al comparar la biomasa producida con el medio A20G80 con respecto al medio A20G40 en CMS aumenta y en CS disminuye la biomasa producida. En CS con el medio A20G80 podría haber una inhibición por sustrato del crecimiento. Díaz-Godínez y col. (2001) reportaron que *A. niger* C28B25 producía mayor cantidad de biomasa en CMS con respecto al CS al evaluar dos medios, un medio con pectina y otro medio con pectina y sacarosa (40 g/L), conservando la misma relación C/N en ambos medios. Proponiendo que esta diferencia se debe a una mayor disponibilidad de oxígeno en la interfase sólido-aire, ya que el oxígeno se disuelve pobremente en agua. En el presente trabajo se observó la diferencia en producción de biomasa entre los dos tipos de cultivos hasta 80 g/L de glucosa adicionada al medio a tres días de cultivo.

No hubo gran variación en los valores del pH del extracto crudo a los tres días de cultivo comparado con los iniciales (Fig. 7.1.5C y D).

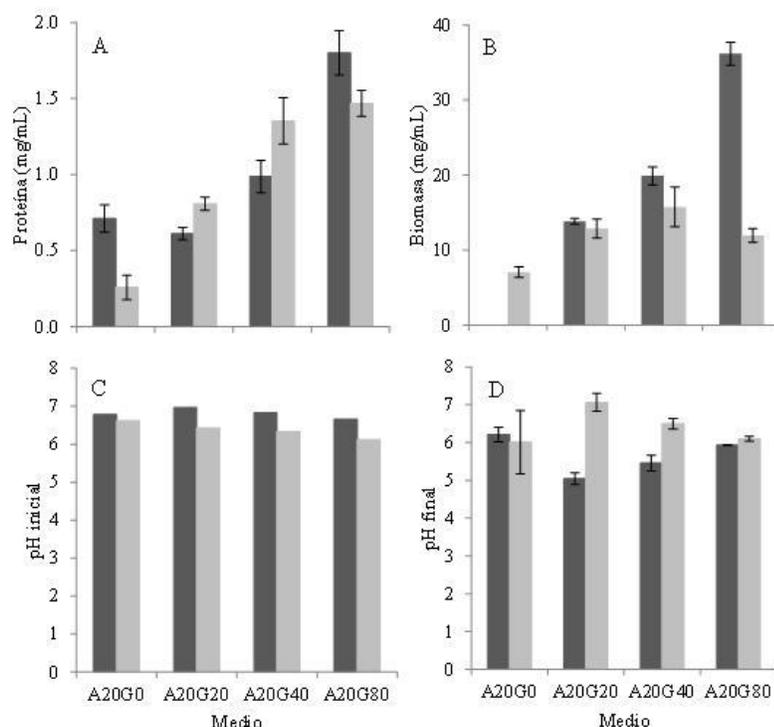


Figura 7.1.5 Valores de proteína (mg/mL) (A), biomasa (mg/mL) (B) por volumen de medio de cultivo, pH inicial (C) y pH final del extracto crudo (D) del CMS (■) y CS (■) de *A. niger* 10 después de tres días de cultivo. Se evaluaron cuatro medios de cultivo: A20G0, A20G20, A20G40 y A20G80.

No hay diferencia estadística de los valores de humedad de la materia húmeda fermentada en el tiempo de muestreo de los medios A20G40 y A20G80 pero si de estos dos medios con el medio A20G20 (Tabla 7.1.2). Hay una reducción de la humedad de alrededor de cuatro unidades de los valores iniciales a los de muestreo. No hay diferencia estadística en los valores de actividad de agua (a_w) iniciales de los medios A20G20 y A20G40 pero si de estos dos con el medio más concentrado A20G80.

Tabla 7.1.2 Valores de humedad inicial y de humedad y actividad de agua de la materia fermentada a tres días de cultivo del CMS de *A. niger* 10.

Medio de cultivo	Humedad (%)		Actividad de agua inicial (a_w)
	Inicial	Muestreo	
A20G20	59.7 ± 0.9^a	55.3 ± 0.0^a	0.993 ± 0.003^a
A20G40	57.5 ± 0.1^{ab}	53.6 ± 0.4^b	0.989 ± 0.001^a
A20G80	56.2 ± 0.5^b	53.4 ± 0.3^b	0.980 ± 0.000^b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

7.1.3.1 Zimograma de actividad amilasa

Los zimogramas de actividad amilasa se realizaron para conocer el número posible de proteínas con actividad amilasa que se tenían en los extractos de proteína extracelular y su peso molecular relativo.

Para realizar los zimogramas se utilizó la metodología reportada por Martínez y col. (2000). Los autores sugieren cargar la cantidad de proteína de cada muestra que contenga un mismo valor de actividad enzimática para hacer la comparación de condiciones, y además mencionan que la metodología empleada no es adecuada para enzimas sensibles a SDS. En los zimogramas del presente trabajo no se observaron diferencias en el número e intensidad de las bandas con actividad amilasa en presencia o ausencia de SDS (resultados no mostrados). Por ello se decidió seguir incluyendo SDS en la separación electroforética con la ventaja de poder conocer el peso molecular relativo de las enzimas.

Se observa la presencia de una banda de alto peso molecular, en el inicio del gel de separación en todos los medios y tipos de cultivo (Fig. 7.1.6A y B). En el zimograma de los extractos de CS (Fig. 7.1.6A) se observa una banda a la mitad del gel en todos los medios evaluados. En los zimogramas del CS se cargó una cantidad de proteína correspondiente a 0.02 U de actividad α -amilasa por pozo del gel. En los zimogramas de CMS se cargó por pozo de gel el volumen máximo de extracto (20 μ L) para tener la mayor cantidad posible de actividad (0.0044, 0.0084 y 0.0186 U para los medios A20G20, A20G40 y A20G80 respectivamente). Debido a que no se cargó una cantidad de proteína con la misma cantidad de actividad no se pudo realizar la comparación de las condiciones. Por ello se propuso concentrar los extractos mediante ultrafiltración para poder cargar cada pozo del gel con la misma cantidad de proteína. Como se observa en la Fig. 7.1.6A y B el marcador de peso molecular no se puede apreciar bien y no se pudo proponer un peso molecular relativo para las amilasas observadas.

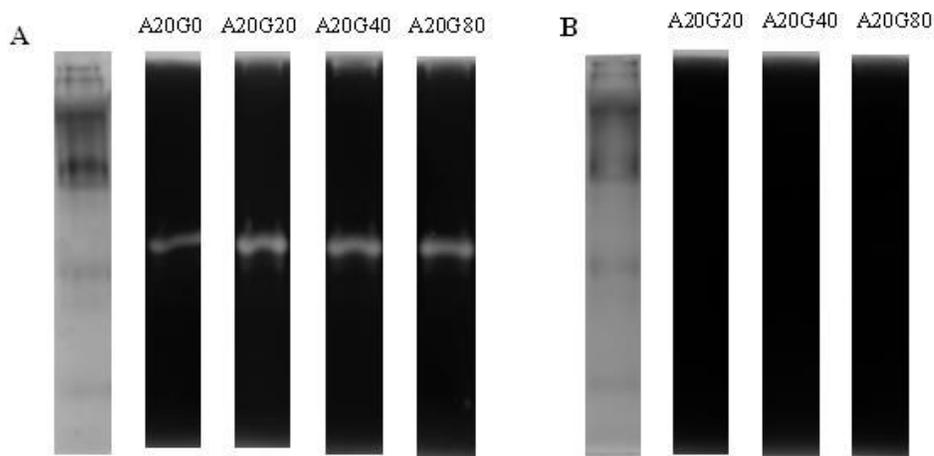


Figura 7.1.6 Imágenes de los zimogramas de actividad amilasa de los extractos crudos de proteína extracelular del CS (A) y CMS (B) de *A. niger* 10 a tres días de cultivo. Se evaluaron cuatro medios de cultivo (A20G0, A20G20, A20G40 y A20G80). Los pesos moleculares de los estándares de proteína están a la izquierda de las imágenes.

7.1.3.2 Geles SDS-PAGE

Se realizaron geles SDS-PAGE con tinción Coomassie G-250 y tinción plata (Fig. 7.1.7A-D) del extracto crudo de proteína extracelular del CS y CMS de *A. niger* 10 a tres días de cultivo. Se seleccionó la tinción Coomassie G-250 para los geles posteriores por su completa compatibilidad con espectrometría de masas y mejor reproducibilidad como es mencionado por Candiano y col. (2004).

Además se observa la degradación del marcador de peso molecular teñido con plata (Fig. 7.1.7C y D), probable razón por la cual se tuvo una mala resolución del marcador de peso molecular de los zimogramas ya que se ocupó el mismo (Fig. 7.1.6).

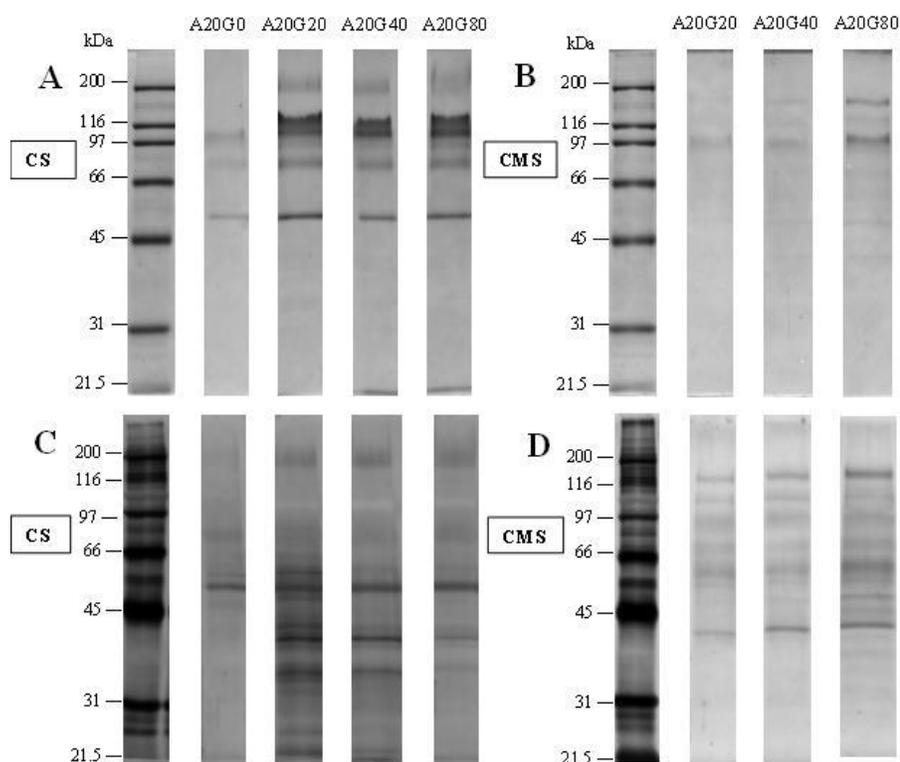


Figura 7.1.7 Imágenes de los geles SDS-PAGE con tinción Coomassie G-250 (A y B) y tinción plata (C y D) del extracto crudo de proteína extracelular del CS y CMS de *A. niger* 10 a tres días de cultivo. Se evaluaron cuatro medios de cultivo (A20G0, A20G20, A20G40 y A20G80). Los pesos moleculares de los estándares de proteína están a la izquierda de las imágenes.

7.1.3.4 Electroforesis en 2-D

Se hicieron dos geles de dos réplicas biológicas con extractos del CMS con el medio de cultivo A20G80 (Fig. 7.1.8), esto con el objetivo de evaluar reproducibilidad en réplicas biológicas. Se seleccionaron los extractos del CMS con el medio A20G80 para realizar los geles porque fue el medio con el cual se observaron mayor número de bandas en los geles SDS-PAGE (Fig. 7.1.7). Cabe mencionar que cuando se realizó el isoelectroenfoque no se pudo llegar al voltaje de 10,000 V. Esto último junto con el barrido en los geles se podría deber a una concentración muy alta de sales. Razón por la cual no se realizaron geles de 2 dimensiones de los demás extractos en esta sección de resultados. Por lo cual, se propuso para posteriores geles de 2 dimensiones concentrar los extractos y reducir la cantidad de sales mediante ultrafiltración y diafiltración.

No se realizó un análisis de imagen de los geles de 2 dimensiones. La figura 7.1.8 muestra la réplica de “spots” de proteína en el lado ácido de alto peso molecular.

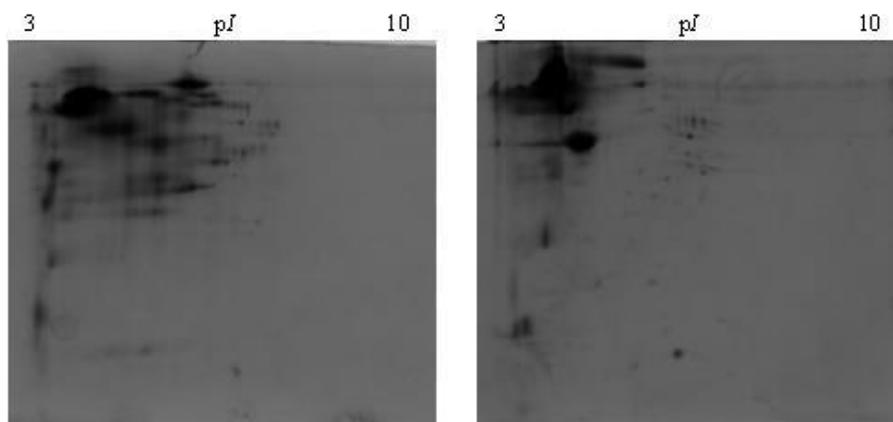


Figura 7.1.8 Imágenes de los geles de electroforesis de 2 dimensiones del extracto de proteína extracelular del CMS de *A. niger* 10 a tres días de cultivo con el medio A20G80 (n=2).

7.1.4 Conclusiones del capítulo

En la primera sección de resultados se seleccionó la cepa *A. niger* 10 en base a la producción de actividad glucoamilasa. También se determinó la importancia de concentrar toda la fracción mineral del medio Hill y Kafer (2001) y mantener fija la relación carbono/sales minerales al evaluar altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo para favorecer la producción de amilasas. No se observaron efectos de represión catabólica que inhibieran totalmente la producción de actividades amilasas en CS para la cepa *A. niger* 10 para las concentraciones evaluadas de los medios de cultivo con C/N constante a tres días de cultivo. Pero si se observó una inhibición del crecimiento por sustrato con el medio A20G80 en CS. Finalmente, se observaron diferencias entre el CMS y CS en la secreción de proteínas con los geles SDS-PAGE con el medio de cultivo A20G80 a tres días de cultivo.

7.2 Análisis de respirometría del CMS y CS de *A. niger* 10

La respirometría fue el método propuesto para seguir de manera indirecta el crecimiento de *A. niger* 10 y para monitorear el estado fisiológico del cultivo; lo que nos permite obtener muestras en estados fisiológicos similares para los estudios del secretoma. Además, la respirometría permitió evaluar la reproducibilidad biológica de los cultivos, importante también para los estudios del secretoma

En esta sección se presentan los resultados del análisis de respirometría de los cultivos de *A. niger* 10. Primero se muestran resultados de respirometría del CS y CMS, a partir de los cuales se decidió solo continuar con el análisis del secretoma producido en CMS. Posteriormente, se evaluaron cinco medios de cultivo en CMS y finalmente, se evaluaron los tres medios de cultivo seleccionados para el análisis del secretoma.

7.2.1 Análisis de respirometría del CMS y CS de *A. niger* 10

Se muestran los resultados de respirometría del CS de *A. niger* 10 con tres medios de cultivo, posteriormente, se realizó el análisis respirométrico en CMS con dos modelos experimentales (columna y matraz).

7.2.1.1 Análisis de respirometría del CS de *A. niger* 10

Se evaluaron tres medios de cultivo con diferente concentración de glucosa y C/N constante (A20G0, A20G10 y A20G20) en el CS de *A. niger* 10 y se determinaron algunos parámetros asociados a la producción de CO₂ (Tabla 7.2.1) y al consumo de O₂ (Tabla 7.2.2). Por la presencia de glucosa en los medios de cultivo A20G10 y A20G20 hubo una reducción en la fase lag de casi la mitad con respecto al medio A20G0 con almidón como única fuente de carbono; además, aumentó el coeficiente respiratorio de 0.55, 0.8 a 1.1 en correlación con el incremento en la concentración del medio de cultivo (A20G0, A20G10 y A20G20) (ver Fig. A.4 del Anexo D). A pesar de observarse diferencias del medio A20G20 con respecto a los medios A20G0 y A20G10 en los parámetros de crecimiento asociados a la producción de CO₂ y consumo de O₂, se observó mala reproducibilidad con las cuatro réplicas biológicas de los tres medios de cultivo evaluados (ver Fig. A.2 y A.3 del Anexo D). Esta variabilidad

dificultaba la obtención de muestras reproducibles para estados fisiológicos similares para los análisis del secretoma, razón por la cual se descartó continuar con el análisis del secretoma producido en CS. La mala reproducibilidad de los resultados puede ser debida a la presencia de crecimiento del hongo en la pared de los matraces. Este crecimiento es muy heterogéneo, difícil de controlar y por consiguiente difícil de reproducir.

Tabla 7.2.1 Efecto de tres medios de cultivo en el análisis de CO₂ de la respirometría del CS de *A. niger* 10 y parámetros de crecimiento estimados del ajuste del modelo exponencial a las curvas de producción de CO₂. Se evaluaron 4 réplicas biológicas. *Solo se utilizaron dos réplicas biológicas para el cálculo de la μ_{CO_2} del medio A20G0.

Medio de cultivo	Máxima tasa de producción de CO ₂ (mg/h/mL medio)	Tiempo (h) para alcanzar máxima tasa de producción de CO ₂	Producción final de CO ₂ (mg/mL medio)	Fase lag (h)	μ_{CO_2} (h ⁻¹)
A20G0	0.28 ± 0.11 ^a	46.4 ± 12.9 ^a	3.7 ± 2.1 ^a	48.7 ± 9.2 ^a	0.13 ± 0.02 ^{a*}
A20G10	0.65 ± 0.24 ^a	37.3 ± 1.2 ^a	7.7 ± 0.4 ^{ab}	26.7 ± 0.8 ^b	0.15 ± 0.02 ^a
A20G20	1.37 ± 0.53 ^b	35.1 ± 2.6 ^a	14.5 ± 6.2 ^b	27.3 ± 0.6 ^b	0.24 ± 0.04 ^b

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabla 7.2.2 Efecto de tres medios de cultivo en el análisis de O₂ de la respirometría del CS de *A. niger* 10. Se evaluaron 4 réplicas biológicas.

Medio de cultivo	Máxima tasa de consumo de O ₂ (mg/h/mL medio)	Tiempo (h) para alcanzar máxima tasa de consumo de O ₂	Consumo final de O ₂ (mg/mL medio)
A20G0	0.3 ± 0.0 ^a	58.4 ± 6.3 ^a	7.3 ± 2.0 ^a
A20G10	0.4 ± 0.1 ^a	37.7 ± 1.5 ^b	10.5 ± 0.7 ^{ab}
A20G20	0.8 ± 0.2 ^b	34.9 ± 2.7 ^b	14.3 ± 5.3 ^b

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

El valor del pH final (70 horas) de los extractos de los medios de cultivo con glucosa, A20G10 y A20G20, es muy similar al inicial, el valor del pH del medio de cultivo A20G0 aumento hasta 7.32 (Tabla 7.2.3). La biomasa final aumentó con la presencia de glucosa en el medio de cultivo con los medios de cultivo A20G10 y A20G20 con respecto al medio con almidón A20G0, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los medios de cultivo con glucosa (Tabla 7.2.3). En el medio de cultivo A20G20 es posible una inhibición

del crecimiento, problema de tasa o de metabolismo de *A. niger* 10 en CS ya que no aumentó la biomasa producida con respecto al medio de cultivo A20G10.

Tabla 7.2.3 Biomasa final (mg/mL medio) y valores de pH inicial y final del extracto crudo del CS de *A. niger* 10. Medios de cultivo: A20G0, A20G10 y A20G20.

Medio de cultivo	pH inicial	pH final	Biomasa final (mg/mL medio)
A20G0	6.54	7.32 ± 0.71 ^a	4.17 ± 1.38 ^a
A20G10	6.54	6.81 ± 0.19 ^{ab}	11.83 ± 0.16 ^b
A20G20	6.52	6.21 ± 0.20 ^b	12.62 ± 1.39 ^b

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

A partir de los resultados de respirometría del CS de *A. niger* 10 se descartó continuar con el análisis del secretoma producido en CS. A continuación se compararon dos tipos de reactores para el análisis de respirometría del CMS.

7.2.1.2 Comparación de dos reactores para el análisis de respirometría del CMS de *A. niger* 10

Para seleccionar el modelo experimental para el CMS se compararon dos tipos de reactores (columna y matraz Erlenmeyer). Adicionalmente se compararon dos medios de cultivo (A20G80 y A20G180).

Para los parámetros de crecimiento, producción final de CO₂, fase lag y μ_{CO_2} , no hay diferencias estadísticamente significativas al comparar los dos sistemas con el mismo medio de cultivo, pero sí hubo diferencias al comparar los medios de cultivo evaluados (Tabla 7.2.4). Con el medio A20G180 la fase lag fue 20 horas mayor que con el medio A20G80. El tiempo para alcanzar la máxima producción de CO₂ se duplicó con el medio A20G180 con respecto al medio A20G80 y no hubo un comportamiento claro de la máxima tasa de producción de CO₂ al comparar ambos medios de cultivo. La μ_{CO_2} disminuyó aproximadamente a la mitad y la producción final de CO₂ se duplicó con el medio A20G180 con respecto al medio A20G80. Los parámetros asociados al consumo de O₂ (Tabla 7.2.5) mostraron un comportamiento similar a los de CO₂.

Tabla 7.2.4 Efecto de dos medios de cultivo y dos sistemas en el análisis de CO₂ de la respirometría del CMS de *A. niger* 10 y parámetros de crecimiento estimados del ajuste del modelo exponencial a las curvas producción de CO₂. Se evaluaron 2 réplicas biológicas.

Medio de cultivo/Sistema	Máxima tasa de producción de CO ₂ (mg/h/g _{ss})	Tiempo (h) para alcanzar máxima tasa de producción de CO ₂	Producción final de CO ₂ (mg/g _{ss})	Fase lag (h)	μ _{CO2} (h ⁻¹)
A20G80/Matraz	9.4 ± 0.1 ^a	27.8 ± 0.1 ^a	88.9 ± 1.7 ^a	18.5 ± 0.9 ^a	0.32 ± 0.01 ^a
A20G80/Columna	7.2 ± 0.2 ^b	32.3 ± 0.6 ^a	77.1 ± 6.9 ^a	21.1 ± 1.5 ^a	0.28 ± 0.01 ^a
A20G180/Matraz	7.5 ± 0.4 ^b	65.9 ± 2.6 ^b	142.6 ± 9.7 ^b	45.2 ± 0.1 ^b	0.16 ± 0.02 ^b
A20G180/Columna	12.2 ± 0.6 ^c	68.9 ± 0.1 ^b	174.1 ± 11.3 ^b	43.9 ± 4.5 ^b	0.16 ± 0.01 ^b

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabla 7.2.5 Efecto de dos medios de cultivo y dos sistemas en el análisis de O₂ de la respirometría del CMS de *A. niger* 10. Se evaluaron 2 réplicas biológicas.

Medio de cultivo/Sistema	Máxima tasa de consumo de O ₂ (mg/h/g _{ss})	Tiempo (h) para alcanzar máxima tasa de consumo de O ₂	Consumo final de O ₂
A20G80/Matraz	5.3 ± 0.3 ^a	28.6 ± 0.1 ^a	105.5 ± 5.2 ^a
A20G80/Columna	4.5 ± 0.1 ^a	34.1 ± 0.1 ^b	107.0 ± 2.6 ^a
A20G180/Matraz	4.8 ± 0.4 ^a	66.3 ± 1.0 ^c	139.1 ± 7.9 ^b
A20G180/Columna	7.7 ± 0.2 ^b	68.9 ± 0.1 ^d	159.7 ± 6.4 ^b

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En la Fig. A.5 del Anexo D se muestran los resultados de la tasa de producción de CO₂, producción de CO₂, tasa de consumo de O₂ y consumo de O₂ del CMS de *A. niger* 10 con los sistemas columna y matraces Erlenmeyer y los medios de cultivo A20G80 y A20G180.

En la Fig. A.6 del Anexo D se muestra el coeficiente respiratorio de las condiciones evaluadas, el valor máximo se obtiene aproximadamente al mismo tiempo al comparar los dos sistemas con el mismo medio de cultivo. Con el medio de cultivo A20G80 los valores máximos del coeficiente respiratorio son cercanos a 1 con los dos sistemas evaluados. Con el medio de cultivo A20G180 los valores máximos del coeficiente respiratorio son de alrededor de 0.9 con los dos sistemas.

No se determinó la humedad final en esta sección de resultados. Aunque se realizó una prueba para determinar la pérdida de humedad al pasar un flujo de aire en el sistema matraz Erlenmeyer, importante porque en este sistema no se adaptó un burbujeador para suministrar un flujo de aire húmedo. Para ello se emplearon cuatro matraces Erlenmeyer de 500 mL con

16.36 g agrolita (deshidratada) y 30 mL de agua desionizada, 2 de los matraces se conectaron al sistema de respirometría (flujo de aire de 40 mL/min) y los otros 2 matraces se taparon con un tapón de hule sin flujo de aire durante 2 días a una temperatura de 30°C. Con un flujo de aire de 40 mL/min hubo una pérdida de aproximadamente del 1% por día y en total a los dos días se perdió 2.44% de humedad (resultados no mostrados). Considerando que los CMS generalmente tardan menos de dos días en llegar a la fase estacionaria de producción de CO₂ no se considera que la pérdida de humedad interfiera en los cultivos utilizando como sistema matraces Erlenmeyer.

Se seleccionó matraz Erlenmeyer como sistema para el análisis de respirometría del CMS debido a que no se observaron diferencias en los parámetros de crecimiento obtenidos de las curvas de producción de CO₂ al comparar ambos sistemas. Además, la obtención del extracto crudo se realiza directamente en el matraz de cultivo.

7.2.2 Efecto de 5 medios de cultivo en el análisis de respirometría del CMS de *A. niger* 10

Una vez que se decidió continuar con los CMS, se evaluó el efecto de 5 medios de cultivo con concentraciones crecientes de glucosa y C/N constante (A20G60, A20G80, A20G100, A20G120, A20G140) en la producción de CO₂ y consumo de O₂ para seleccionar tres medios de cultivo para los análisis del secretoma. Debido a que se evaluó el medio A20G180 en la sección anterior de Resultados, donde la fase lag aumentó 20 horas y la μ_{CO_2} disminuyó aproximadamente a la mitad con respecto al medio A20G80, se optó por evaluar concentraciones menores del medio de cultivo y conocer el efecto de esos medios sobre la respirometría de *A. niger* 10.

A partir de estos cultivos se aumentó el volumen de medio de cultivo adicionado al soporte sólido cuando se emplearon medios concentrados. Al aumentar el volumen de medio adicionado (no se modificó su concentración), la cantidad de componentes sólidos del medio aumentaron con respecto al soporte pero también el agua, lo cual es importante para evitar una reducción drástica en la humedad inicial que pudiera afectar a los cultivos. Los volúmenes de los medios de cultivo adicionados se muestran en la Tabla A.1 del Anexo A.

No hubo diferencias estadísticamente significativas del tiempo de la fase lag a excepción del medio de cultivo A20G140 que tuvo la fase lag más larga (Tabla 7.2.6). La máxima tasa de

producción de CO₂ aumentó con la concentración del medio de cultivo. Con los medios de cultivo A20G120 y A20G140 se obtuvieron los valores más altos. La producción final de CO₂ aumentó al aumentar la concentración del medio de cultivo. La μ_{CO_2} , disminuyó al aumentar la concentración de los medios de cultivo. Los parámetros asociados al consumo de O₂ son similares a los obtenidos con el CO₂ (Tabla 7.2.7). La máxima tasa de consumo de O₂ aumentó con la concentración del medio de cultivo, el tiempo para alcanzar estos valores se desplazó. También el consumo final de O₂ aumentó con la concentración del medio de cultivo hasta el medio A20G120 con el cual se mostró similitud con respecto al medio A20G140.

Lareo y col. (2006) evaluaron el efecto de la concentración de glucosa de 24.9 a 62.25 y 99.6 g/L sobre la respiración, el crecimiento y la producción de esporas por *Mucor bacilliformis* en CMS. La máxima tasa de producción de CO₂ y el tiempo para alcanzar este valor incrementó con la concentración del medio de cultivo de manera similar al presente trabajo. Aunque en el reporte de Lareo y col. (2006) los valores de la μ_{CO_2} (del modelo exponencial) aumentaron al aumentar la concentración del medio de cultivo de manera contraria al presente trabajo.

Además Oriol y col. (1988) también reportaron un aumento en el crecimiento de *A. niger* 10 a altas concentraciones de glucosa (57 a 417 g/L) en CMS. Ellos reportaron un incremento en la masa celular y una reducción en la tasa específica de crecimiento con un incremento en la concentración de glucosa, debido principalmente a una reducción en la actividad de agua (a_w). En el presente trabajo, los medios de cultivo A20G120 y A20G140 tuvieron el a_w inicial menor (Tabla 7.2.8), y se mostraron efectos similares en los parámetros de crecimiento como el reporte previo. En el reporte de Favela-Torres y col. (1998) usando *A. niger* 10 en CMS, no hubo diferencia en la fase y hubo una disminución en la tasa específica de crecimiento a partir de 200 g/L. Favela-Torres y col. (1998) atribuyeron la resistencia a altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo en CMS a un gradiente de concentración de azúcares y minerales, y a una reducción localizada de la concentración de sustrato.

Tabla 7.2.6 Efecto de la concentración inicial de glucosa en el análisis de CO₂ de la respirometría del CMS de *A. niger* 10 y parámetros de crecimiento estimados del ajuste del modelo exponencial a las curvas producción de CO₂. Se evaluaron 2 réplicas biológicas.

Medio de cultivo	Máxima tasa de producción de CO ₂ (mg/h/g _{ss})	Tiempo (h) para alcanzar máxima tasa de producción de CO ₂	Producción final de CO ₂ (mg/g _{ss})	Fase lag (h)	μ _{CO2} (h ⁻¹)
A20G60	9.0 ± 0.1 ^a	26.6 ± 0.5 ^a	88.4 ± 3.9 ^a	16.5 ± 0.4 ^a	0.35 ± 0.02 ^a
A20G80	10.0 ± 0.6 ^{ab}	27.6 ± 0.7 ^a	115.4 ± 3.4 ^b	15.2 ± 0.9 ^a	0.28 ± 0.01 ^b
A20G100	11.8 ± 0.9 ^b	31.1 ± 0.7 ^{ab}	147.9 ± 0.1 ^c	17.3 ± 1.1 ^a	0.25 ± 0.00 ^b
A20G120	14.1 ± 0.1 ^c	32.5 ± 0.1 ^b	187.6 ± 2.7 ^d	16.9 ± 0.1 ^a	0.23 ± 0.01 ^{bc}
A20G140	14.1 ± 0.0 ^c	41.8 ± 2.4 ^c	207.2 ± 9.3 ^e	21.7 ± 0.9 ^b	0.18 ± 0.00 ^c

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabla 7.2.7 Efecto de la concentración inicial de glucosa en el análisis de O₂ de la respirometría del CMS de *A. niger* 10. Se evaluaron 2 réplicas biológicas.

Medio de cultivo	Máxima tasa de consumo de O ₂ (mg/h/g _{ss})	Tiempo (h) para alcanzar máxima tasa de consumo de O ₂	Consumo final de O ₂
A20G60	4.9 ± 0.1 ^a	26.6 ± 0.5 ^a	81.4 ± 1.2 ^a
A20G80	5.4 ± 0.1 ^a	28.0 ± 0.1 ^{ab}	105.7 ± 2.9 ^b
A20G100	6.4 ± 0.3 ^b	31.1 ± 0.6 ^{ab}	126.8 ± 1.8 ^c
A20G120	7.5 ± 0.1 ^c	32.5 ± 0.1 ^b	147.4 ± 4.4 ^d
A20G140	8.4 ± 0.1 ^d	42.3 ± 3.0 ^c	154.0 ± 6.4 ^d

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En la Fig. A.7 del Anexo D se muestran las curvas de la tasa de producción de CO₂, producción de CO₂, tasa de consumo de O₂ y consumo de O₂ del CMS de *A. niger* 10 con los cinco medios de cultivo evaluados. Al aumentar la concentración del medio de cultivo aumentan los valores máximos de las curvas de las Fig. A.7 del Anexo D hasta el medio de cultivo A20G120 el cual muestra similitud con el medio de cultivo A20G140 solo que se desplaza el tiempo para la obtención de los valores máximos.

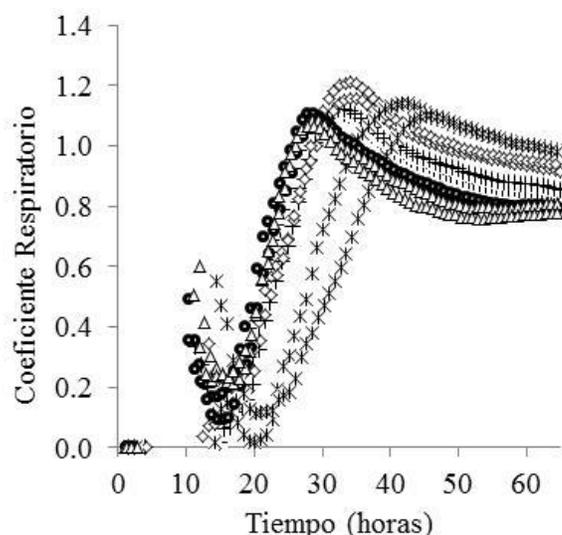


Fig. 7.2.1 Coeficiente respiratorio del CMS de *A. niger* 10. Medios de cultivo: A20G60 (Δ), A20G80 (\bullet), A20G100 (+), A20G120 (\diamond), A20G140 (*).

En la Fig. 7.2.1 se muestran los resultados del coeficiente respiratorio con los cinco medios de cultivo evaluados. El valor máximo del coeficiente respiratorio es de alrededor de 1.1 para todos los medios de cultivo solo hay un desplazamiento del tiempo para llegar a ese máximo, la excepción fue del medio A20G120 con el cual se acercó el valor máximo a 1.2. Además, el tiempo en el que se obtuvo el valor máximo del coeficiente respiratorio coincide con el tiempo en el que se obtuvieron los valores máximos de producción de CO_2 y consumo de O_2 (ver Fig. A.7 del Anexo D). De manera similar al presente trabajo en sistemas de producción de amilasas en CMS utilizando almidón como inductor con *Schwanniomyces castelli* (Saucedo-Castañeda y col. 1994) y *A. niger* LPB 28 (Spier y col. 2007) se han obtenido valores máximos de 1.1 en el coeficiente respiratorio, el tiempo en el cual se obtienen estos valores también coincide con el tiempo en el que se obtuvieron los valores máximos de producción de CO_2 y consumo de O_2 . En el reporte de Spier y col. (2007) además coincide este máximo con la máxima producción de glucoamilasa y α -amilasa, estas actividades amilasa no se midieron en esta sección de resultados del presente trabajo.

Valores cercanos a 1 en el coeficiente respiratorio durante el cultivo indican que la relación entre la producción de CO_2 y consumo O_2 es equimolar, teniendo el sistema suficiente aireación para lograr un metabolismo aerobio (Cruz-Córdova y col. 1999; Stertz y col. 1999). Se ha reportado que cuando se utilizan carbohidratos como sustratos, que equivalen a la composición de la glucosa, el coeficiente respiratorio teórico es de 1, se puede asumir que el

CO₂ producido se deriva de la oxidación completa de la glucosa ($C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$) (Stotzky 1965; Dilly 2001). Esto es de acuerdo con los coeficientes respiratorios máximos obtenidos en esta sección de resultados (de 1.1) con almidón y glucosa como fuentes de carbono. La diferencia observada en el coeficiente respiratorio podría deberse a la presencia de NaNO₃, fuente de nitrógeno que se concentró junto con las fuentes de carbono. Dilly (2001) mencionó que se obtienen coeficientes respiratorios mayores a 1 cuando aceptores de electrones alternativos tales como NO₃⁻, SO₄²⁻ o ácidos orgánicos están involucrados en la degradación de sustancias orgánicas. Además, la diferencia observada en el coeficiente respiratorio podría deberse a la producción de subproductos, como podrían ser ácidos orgánicos que se han producido por esta misma cepa a altas concentraciones de glucosa (Gutiérrez-Rojas y col. 1995).

En la Tabla 7.2.8 se muestran los valores iniciales de pH, humedad y a_w, no se hizo determinación de los valores finales de estas variables. El valor del pH de todos los medios de cultivo va de 5.9 a 6.2. Hubo diferencias de los valores de humedad y a_w de los medios más concentrados (A20G120 y A20G140) con los medios menos concentrados (A20G60, A20G80 y A20G100).

Tabla 7.2.8 Valores iniciales de pH, humedad y actividad de agua de los cultivos con los medios A20G60, A20G80, A20G100, A20G120, A20G140.

Medio de cultivo	pH	Humedad (%)	Actividad de agua (a _w)
A20G60	6.22	57.61 ± 0.30 ^a	0.981 ± 0.002 ^a
A20G80	6.11	56.16 ± 0.28 ^{ab}	0.975 ± 0.002 ^a
A20G100	6.02	55.75 ± 0.62 ^{ab}	0.972 ± 0.001 ^a
A20G120	5.98	54.43 ± 0.71 ^b	0.963 ± 0.003 ^b
A20G140	5.92	54.01 ± 0.99 ^b	0.959 ± 0.002 ^b

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Se seleccionaron los medios A20G0, A20G60 y A20G120 para los análisis del secretoma. Se hizo una selección de dos medios de cultivo en base en algunos parámetros asociados a la producción de CO₂ (Tabla 7.2.6). El medio A20G120 se seleccionó por tener la máxima tasa de producción de CO₂ más alta y alcanzar este valor más rápido de los medios de cultivo evaluados. Se seleccionó al medio A20G60 con la μ_{CO2} más rápida de los medios de cultivo

evaluados. Y el tercer medio seleccionado fue el medio A20G0 el cual solo tiene almidón como fuente de carbono e inductor de la producción de amilasas.

7.2.3 Producción de extractos extracelulares para el análisis del secretoma del CMS de *A. niger* 10

Con el fin de obtener secretomas en estados fisiológicos similares, se tomaron muestras cuando se alcanzó la máxima tasa de producción de CO₂, que corresponde aproximadamente al final de la fase de producción exponencial de CO₂. Este estado fisiológico disminuye la posibilidad de la presencia de actividad proteolítica presente en la fase estacionaria de producción de CO₂.

Hay reportes de análisis del secretoma de hongos donde consideran la importancia del estado fisiológico de los cultivos para la toma de muestras. En el reporte de Jami y col. (2010) del análisis del secretoma de *Penicillium chrysogenum* la toma de muestras fue a las 68 horas que corresponde al final de la fase lineal de crecimiento y entrada a la fase estacionaria para evitar eventos relacionados a lisis celular. Oda y col. (2006) comparan el secretoma de *A. oryzae* en CMS y CS mediante geles de 2 dimensiones. Hacen mención de que seleccionaron los geles de 2 dimensiones de las 40 horas para hacer la identificación de proteínas debido a que hay mayor número de spots y por la fase de crecimiento del hongo aunque no hacen mención de cuál es la fase de crecimiento del hongo. También hay reportes de análisis del secretoma de hongos donde no consideran la importancia de comparar las condiciones en estados fisiológicos similares. Tal es el caso del reporte de Han y col. (2010) donde comparan el secretoma del hongo *A. terreus* con medios de cultivo con concentración moderada (30 g/L) de glucosa, sacarosa y almidón y también a altas concentraciones (100 g/L) de sacarosa y glucosa. Las muestras de todos los cultivos se tomaron a los 3.5 días y aunque verificaron que no hubiera lisis celular no consideraron que las etapas de crecimiento del hongo a ese tiempo fueran diferentes debido a las diferentes fuentes de carbono y concentraciones evaluadas.

En la Fig. 7.2.2 se muestran los resultados de la tasa de producción de CO₂ y producción de CO₂ del CMS de *A. niger* 10 con los tres medios de cultivo evaluados (A20G0, A20G60 y A20G120). Se observa que las curvas de producción de CO₂ solo llegan a un valor posterior al

máximo de la tasa de producción de CO₂ ya que se tomaron muestras de proteína extracelular para hacer geles SDS-PAGE para los análisis del secretoma.

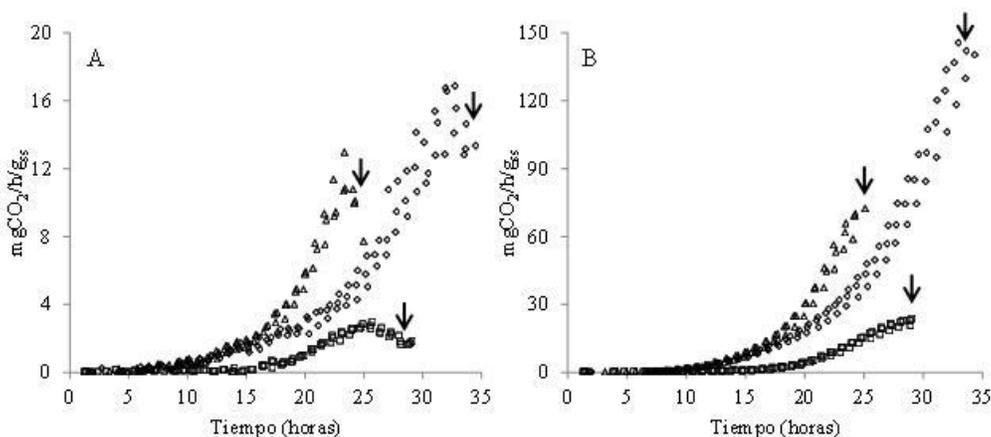


Fig. 7.2.2 Tasa de producción de CO₂ (mg/h/g_{ss}) (A) y producción de CO₂ (mg/g_{ss}) (B) del CMS de *A. niger* 10. Medios de cultivo: A20G0 (□), A20G60 (△) y A20G120 (◇). Muestreo (→).

En la Tabla 7.2.9 se muestran los parámetros asociados a la producción de CO₂. La fase lag con los medios de cultivo con glucosa fue estadísticamente la misma y más corta que con el medio de cultivo A20G0 con almidón como única fuente de carbono. Al aumentar la concentración de glucosa aumentó la máxima tasa de producción de CO₂. La μ_{CO_2} más rápida fue con el medio de cultivo A20G0 y disminuyó la μ_{CO_2} al aumentar la concentración de glucosa con los medios de cultivo A20G60 y A20G120. Aunque hay que señalar que no se obtuvo buena resolución de la curva de producción de CO₂ con el medio de cultivo A20G0.

Tabla 7.2.9 Efecto de tres medios de cultivo seleccionados para el análisis del secretoma en los parámetros de crecimiento de *A. niger* 10 en CMS estimados del ajuste del modelo exponencial a las curvas producción de CO₂ (mg/g_{ss}). Se evaluaron 3 réplicas biológicas.

Medio de cultivo	Máxima tasa de producción de CO ₂ (mg/h/g _{ss})	Tiempo (h) para alcanzar máxima tasa de producción de CO ₂	Producción final de CO ₂ (mg/g _{ss})	Fase lag (h)	μ_{CO_2} (h ⁻¹)
A20G0	2.7 ± 0.2 ^a	25.6 ± 0.1 ^a	22.3 ± 1.5 ^a	16.2 ± 0.7 ^a	0.27 ± 0.01 ^a
A20G60	11.5 ± 1.2 ^b	23.6 ± 0.4 ^b	65.9 ± 6.2 ^b	8.9 ± 0.2 ^b	0.24 ± 0.00 ^b
A20G120	32.8 ± 0.8 ^c	16.0 ± 1.2 ^c	142.6 ± 2.7 ^c	9.6 ± 0.1 ^b	0.16 ± 0.00 ^c

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En la Tabla 7.2.10 se muestran los valores de pH iniciales y del extracto crudo, podemos observar que con el medio de cultivo A20G0 aumenta el valor hasta 7.5 y con los medios de cultivo A20G60 y A20G120 se mantiene el pH similar al inicial. En la Tabla 7.2.10 también se muestran los valores iniciales de humedad y a_w de los medios de cultivo, observando diferencias en la a_w de los tres medios de cultivo y solo hay diferencias de humedad con el medio de cultivo más concentrado con respecto a los otros dos medios.

Tabla 7.2.10 Valores iniciales de humedad, actividad de agua y del pH inicial y del pH del extracto crudo de las muestras generadas para análisis del secretoma.

Medio de cultivo	Humedad (%)	Actividad de agua (a_w)	pH inicial	pH extracto crudo
A20G0	59.83 ± 0.44 ^a	0.999 ± 0.000 ^a	6.6	7.5
A20G60	58.23 ± 0.05 ^a	0.986 ± 0.002 ^b	6.3	6.2
A20G120	55.93 ± 0.69 ^b	0.971 ± 0.001 ^c	6.1	6.6

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La concentración de proteína extracelular aumenta al aumentar la concentración de glucosa en el medio de cultivo (Fig. 7.2.3). Se ha reportado que la secreción de proteína en hongos filamentosos está asociada a su crecimiento (Jami y col. 2010; Wösten y col. 1991; Peberdy 1994).

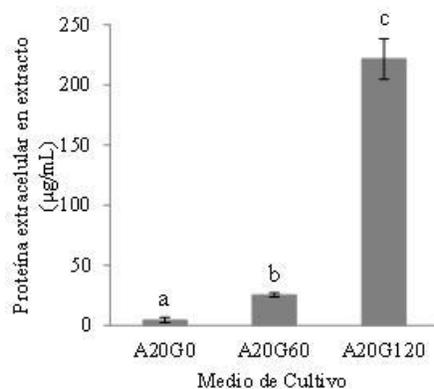


Fig. 7.2.3 Concentración de proteína extracelular en extractos crudos del CMS de *A. niger* 10. Se evaluaron tres medios de cultivo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Al comparar las réplicas biológicas por medio de cultivo se observa mucha similitud en los geles SDS-PAGE (Fig. 7.2.4). Podemos observar diferencias al comparar entre los geles de los

tres medios de cultivo evaluados. Aunque hay similitud de las bandas de alto peso molecular aunque con diferente intensidad entre los medios de cultivo con glucosa (A20G60 y A20G120).

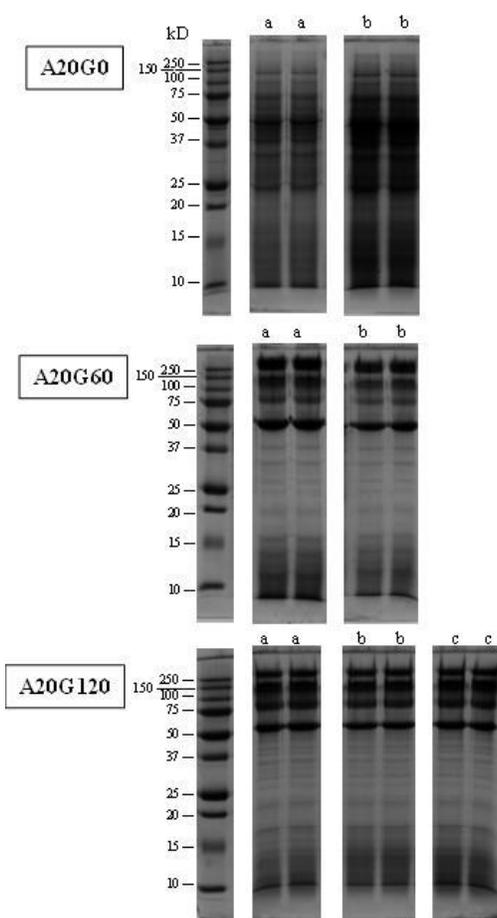


Fig. 7.2.4 Imágenes de los geles SDS-PAGE de proteína extracelular del CMS de *A. niger* 10. Se evaluaron tres medios de cultivo (A20G0, A20G60 y A20G120), se muestran las réplicas biológicas (a, b y c) por medio de cultivo. Los pesos moleculares de los estándares de proteína están a la izquierda de las imágenes.

7.2.4 Conclusiones del capítulo

Se monitoreó la producción de CO₂ y consumo de O₂ en el CS de *A. niger* 10, aunque el sistema de respirometría no permitió tener cultivos homogéneos y reproducibles. También se seleccionó el matraz Erlenmeyer como sistema para monitorear de manera indirecta el crecimiento de *A. niger* en CMS con la ventaja de que se puede hacer la extracción de proteína extracelular directamente en el matraz. Además se seleccionaron los medios de cultivo

A20G0, A20G60 y A20G120 para los análisis del secretoma del CMS de *A. niger* 10, se observaron diferencias entre los tres medios de cultivo en la secreción de proteína y en las imágenes de los geles SDS-PAGE.

7.3 Análisis del secretoma de *A. niger* 10 cultivado en medio sólido con diferentes concentraciones de nutrientes.

En la última parte de los resultados del trabajo se evaluó el efecto de la presencia de altas concentraciones de glucosa (60 y 120 g/L) sobre la composición del secretoma y la producción de amilasas por *A. niger* 10 en CMS. Primero se muestran las condiciones iniciales de cultivo. Posteriormente, se muestran los resultados del monitoreo de la producción de CO₂, la cuantificación de proteína y actividades amilasa (glucoamilasa y α -amilasa), así como zimogramas de actividad amilasa de los extractos crudos de las muestras tomadas para el análisis del secretoma. Finalmente, se describen los resultados del análisis del secretoma.

Para obtener los extractos extracelulares para el análisis del secretoma se realizaron CMS de *A. niger* 10 con los tres medios seleccionados (A20G0, A20G60 y A20G120); además, se incluyó el medio A0G20 como control de crecimiento. Al aumentar la concentración de nutrientes los valores iniciales de humedad y actividad de agua disminuyen ligeramente (Tabla 7.3.1); esto se debe al incremento en el volumen de medio de cultivo adicionado por soporte sólido con los medios más concentrados (Tabla A.1 del Anexo A). El pH inicial también disminuyó ligeramente al aumentar la concentración de nutrientes (Tabla 7.3.1).

Tabla 7.3.1 Valores de pH del medio inicial, humedad y actividad de agua inicial del CMS de *A. niger* 10. Se evaluaron cuatro medios de cultivo.

Medio de cultivo	pH	Humedad (%)	Actividad de agua
A0G20	6.5	64.33 \pm 0.21 ^a	0.998 \pm 0.001 ^a
A20G0	6.6	64.08 \pm 0.72 ^a	0.999 \pm 0.000 ^a
A20G60	6.2	60.25 \pm 0.61 ^b	0.989 \pm 0.001 ^b
A20G120	6.0	58.53 \pm 0.40 ^b	0.970 \pm 0.001 ^c

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En la Tabla 7.3.6 se muestra la máxima tasa de producción de CO_2 para los medios evaluados y el tiempo para alcanzar ésta. La máxima tasa de producción de CO_2 fue similar para los medios de cultivo A0G20 ($3.0 \pm 0.1 \text{ mg/h/g}_{\text{ss}}$) y A20G0 ($2.6 \pm 0.2 \text{ mg/h/g}_{\text{ss}}$) (Fig. 7.3.1A). Sin embargo, el tiempo para alcanzar la máxima tasa de producción de CO_2 fue 10 horas más lento en el medio A20G0 (29 h) con respecto al medio A0G20 (19 h). Al aumentar la concentración de nutrientes incrementó la máxima tasa de producción de CO_2 . El incremento en la tasa de producción de CO_2 con los medios A20G60 y A20G120, fue de cinco y nueve veces con respecto a los medios A0G20 y A20G0, respectivamente. El tiempo para alcanzar la máxima tasa de producción de CO_2 fue 21 y 32 horas para los medios A20G60 y A20G120, respectivamente.

De la integración de las curvas de la tasa de producción de CO_2 se obtuvieron las curvas de producción de CO_2 ($\text{mg CO}_2/\text{g}_{\text{ss}}$) (Fig. 7.3.1B). La producción final de CO_2 aumentó al aumentar la concentración de nutrientes en el medio; obteniendo la máxima producción ($257.3 \pm 5 \text{ mg/g}_{\text{ss}}$) con el medio A20G120.

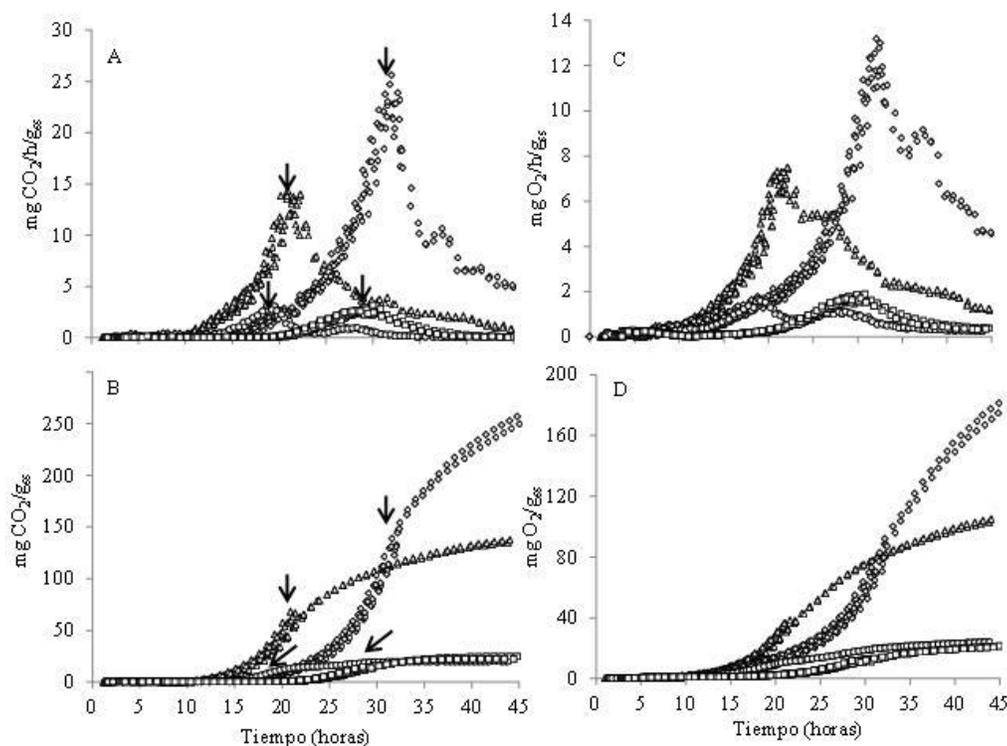


Fig. 7.3.1 Tasa de producción de CO_2 ($\text{mg/h/g}_{\text{ss}}$) (A), producción de CO_2 (mg/g_{ss}) (B), tasa de consumo de O_2 ($\text{mg/h/g}_{\text{ss}}$) (C) y consumo de O_2 (mg/g_{ss}) (D) del CMS de *A. niger* 10. Medios de cultivo: A0G20 (○), A20G0 (□), A20G60 (△) y A20G120 (◇). Muestreo (→).

En la Fig. 7.3.1C se muestran las curvas de tasa de consumo de O_2 ($mgO_2/h/g_{ss}$). El perfil de las curvas de consumo de O_2 es similar a los de la tasa de producción de CO_2 . La máxima tasa de consumo de O_2 fue similar para los medios de cultivo A0G20 y A20G0, 1.6 ± 0.1 y 1.7 ± 0.1 $mg/h/g_{ss}$ respectivamente. Sin embargo, el tiempo para alcanzar la máxima tasa de consumo de O_2 fue 10 horas más lento en el medio A20G0 (29 h) con respecto al medio A0G20 (19 h). La adición de glucosa a los medios de cultivo A20G60 y A20G120 incrementó la máxima tasa de consumo de O_2 a 7.2 ± 0.2 y 12.3 ± 0.6 $mg/h/g_{ss}$, respectivamente. El incremento del consumo de O_2 fue de cuatro y siete veces con respecto a los medios de cultivo A0G20 y A20G0, respectivamente. El tiempo para alcanzar la máxima tasa de consumo de O_2 fue de 21 y 32 horas para los medios A20G60 y A20G120, respectivamente.

En la Fig. 7.3.1D se muestran las curvas de producción de O_2 ($mg O_2/g_{ss}$) obtenidas de la integración de las curvas de la tasa de producción de O_2 . El consumo final de O_2 aumentó al aumentar la concentración de nutrientes en el medio; obteniendo la máxima producción (181.6 ± 4.7 mg/g_{ss}) con el medio A20G120.

El coeficiente respiratorio de los medios A0G20 y A20G0 llega a los valores máximos de alrededor de 0.93 a las 20 y 30 horas respectivamente y para los medios A20G60 y A20G120 los valores máximos son de alrededor de 1.2 a las 21 y 32 horas respectivamente (Fig. 7.3.2), a tiempos similares de la máxima producción de CO_2 y consumo de O_2 para estos medios de cultivo.

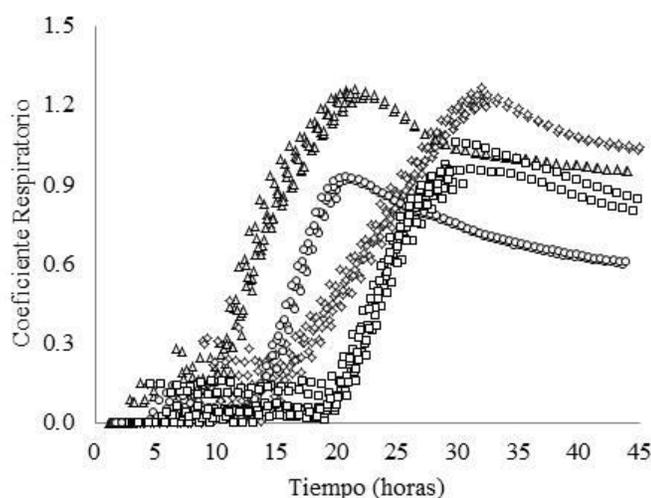


Fig. 7.3.2 Coeficiente respiratorio del CMS de *A. niger* 10. Medios de cultivo: A0G20 (○), A20G0 (□), A20G60 (△) y A20G120 (◇).

Los resultados de producción de CO₂ se usaron para estimar el tiempo lag y la tasa específica de producción de CO₂ (μ_{CO_2}); para ello, se evaluaron 4 modelos (exponencial, logístico, Gompertz y modelo de dos fases de Ikasari-Mitchell) (Tabla 7.3.2). Los modelos logístico y Gompertz se usaron para la obtención de parámetros desde el final de la fase lag hasta el final del cultivo; por otro lado, los modelos exponencial y de Ikasari-Mitchell (primera parte) se utilizaron para la obtención de parámetros desde el final de la fase lag hasta el tiempo en el que se obtiene la máxima tasa de producción de CO₂.

Tabla 7.3.2 Modelos usados para la estimación de parámetros asociados a la producción de CO₂.

Modelo	Ecuación ^a
Exponencial	$CO_2 = CO_{20}e^{\mu t}$
Logístico	$CO_2 = \frac{CO_{2max}}{1 + ((CO_{2max}/CO_{20}) - 1)e^{-\mu t}}$
Gompertz	$CO_2 = CO_{2max} e^{-CO_{20}e^{-\mu t}}$
Dos fases de Ikasari y Mitchell (2000)	Parte 1. $CO_2 = CO_{20}e^{\mu t}$, $t < t_a$ Parte 2. $CO_2 = CO_{2A} e^{\left[\frac{\mu L}{k}(1 - e^{-k(t-t_a)})\right]}$, $t \geq t_a$

^a t es tiempo (h), CO_{20} es concentración inicial de CO₂ (mg/g_{ss}), CO_{2max} es máxima producción de CO₂ (mg/g_{ss}), μ_{CO_2} es tasa específica de producción de CO₂ (h⁻¹), t_a es tiempo al final de la fase exponencial (h), CO_{2A} es producción de CO₂ por la biomasa activa (mg/g_{ss}), k es tasa de decaimiento exponencial (h⁻¹) y L representa la relación de la tasa específica de producción de CO₂ al inicio de la fase de desaceleración con respecto a la tasa específica de producción de CO₂ durante la fase exponencial previa.

En la Tabla 7.3.3 se muestran los valores obtenidos de μ_{CO_2} . En todos los casos se obtienen valores mayores de μ_{CO_2} con los medios menos concentrados. Además, los valores obtenidos con el modelo exponencial y el de Ikasari-Mitchell son mayores a los obtenidos con el modelo logístico y éstos mayores a los obtenidos con el modelo de Gompertz. De manera similar al presente trabajo, en el reporte de Lareo y col. (2006) en el CMS de *Mucor bacilliformis* los valores de la μ_{CO_2} obtenidos del ajuste del modelo exponencial a los datos de producción de CO₂ en la fase exponencial eran mayores que usando el modelo logístico en el rango de 0-96 horas.

En el Anexo E se muestran las gráficas de los ajustes de los modelos propuestos a las curvas de producción de CO₂.

Tabla 7.3.3 Tasa específica de producción de CO₂ (μ_{CO_2}) (h⁻¹) de *A. niger* 10 en CMS obtenidas del ajuste de los cuatro modelos evaluados. Las determinaciones son de cuatro medios de cultivo y dos replicas biológicas.

Medio	Modelo			
	Exponencial	Logístico	Gompertz	Dos fases
A0G20	0.45±0.02	0.39±0.00	0.26±0.00	0.45±0.02
A20G0	0.31±0.03	0.39±0.02	0.26±0.01	0.31±0.03
A20G60	0.31±0.00	0.29±0.00	0.18±0.00	0.31±0.00
A20G120	0.24±0.01	0.26±0.01	0.16±0.01	0.24±0.01

En la Tabla 7.3.4 se muestra la máxima producción de CO₂ (mg/g_{ss}) obtenida del ajuste del modelo logístico y el de Gompertz. Para ambos modelos los valores de la máxima producción de CO₂ son similares al comparar el mismo medio de cultivo y aumentan al aumentar la concentración del medio. Aunque se puede observar en el Anexo E que no hay un buen ajuste de estos modelos a la parte final de las curvas de producción de CO₂ de los medios con glucosa (A20G60 y A20G120) ya que estas curvas no llegan a una asíntota horizontal como lo hacen ambos modelos. Es por ello que se propuso el modelo de dos fases de Ikasari y Mitchell (2000).

Tabla 7.3.4 Máxima producción de CO₂ (CO_{2max}) (mg/g_{ss}) de *A. niger* 10 en CMS obtenidas del ajuste de los cuatro modelos evaluados. Las determinaciones son de cuatro medios de cultivo y dos replicas biológicas.

Medio	Modelo	
	Logístico	Gompertz
A0G20	19.29 ± 0.16	19.64 ± 0.16
A20G0	23.28 ± 1.42	23.80 ± 1.57
A20G60	128.71 ± 1.79	134.04 ± 1.93
A20G120	263.70 ± 5.80	279.41 ± 7.04

La primera parte del modelo de Ikasari y Mitchell (2000) es un modelo exponencial, la segunda parte describe una fase de desaceleración. En la Tabla 7.3.5 se muestran las constantes de la fase de desaceleración del modelo de dos fases de Ikasari y Mitchell (2000). La segunda fase de desaceleración del modelo de Ikasari y Mitchell (2000) se ajustó bien a la segunda parte de las curvas de producción de CO₂ tanto de los medios A0G20 y A20G0 con asíntotas horizontales en la parte final, así como en la curvas de los medios A20G60 y

A20G120 en donde se observa una desaceleración de la tasa de producción de CO₂ sin llegar a la asíntota horizontal (Anexo E).

Tabla 7.3.5 Constantes de la fase de desaceleración obtenidas del ajuste del modelo de dos fases de Ikasari y Mitchell (2000) de *A. niger* 10 en CMS. Las determinaciones son de cuatro medios de cultivo y dos réplicas biológicas.

Medio	CO _{2A} (mg/g _{ss})	L	k (h ⁻¹)	t _a (h)
A0G20	11.08 ± 0.39	0.24 ± 0.01	0.18 ± 0.00	19.68 ± 0.59
A20G0	14.46 ± 1.67	0.52 ± 0.05	0.35 ± 0.04	30.02 ± 0.90
A20G60	74.58 ± 0.08	0.25 ± 0.00	0.12 ± 0.00	23.06 ± 0.06
A20G120	147.62 ± 6.23	0.35 ± 0.06	0.12 ± 0.01	31.98 ± 0.65

Los ajustes de los modelos se realizaron para dos réplicas biológicas por medio de cultivo evaluado de las curvas de producción de CO₂ obtenidas hasta el final del cultivo. Del resto de las réplicas biológicas solo se tienen datos hasta la máxima tasa de producción de CO₂ ya que se emplearon para tomar muestras para el análisis del secretoma. En la Tabla 7.3.6 se muestra el número de réplicas biológicas de los medios de cultivo evaluados.

Debido a que las muestras para el análisis del secretoma se toman inmediatamente después de que se alcanza la máxima tasa de producción de CO₂, la tasa específica de producción de CO₂ (μ_{CO2}) se estimará usando el modelo exponencial (Tabla 7.3.6). Además en la Tabla 7.3.6 se muestra la fase lag para todas las réplicas biológicas.

Debido a que la asimilación de la glucosa es más fácil que la del almidón, la fase lag más larga se obtuvo en el medio de cultivo A20G0. Con respecto a la μ_{CO2}, fue más alta con el medio de cultivo con glucosa sin almidón (medio A0G20). No hubo diferencias significativas entre los medios A20G0 y A20G60 con respecto a la μ_{CO2}, y la μ_{CO2} más lenta se obtuvo con el medio A20G120.

Tabla 7.3.6 Efecto de cuatro medios de cultivo en los parámetros de crecimiento de *A. niger* 10 en CMS estimados del ajuste del modelo exponencial a las curvas producción de CO₂ (mg/g_{ss}).

Medio de cultivo	Fase lag (h)	Máxima tasa de producción de CO ₂ (mg/h g _{ss})	Tiempo (h) para alcanzar máxima tasa de producción de CO ₂ (mg/h g _{ss})	μ _{CO₂} (h ⁻¹)	No. replicas biológicas
A0G20	14.81 ± 0.25 ^a	2.96 ± 0.14 ^a	19.30 ± 0.42 ^a	0.46 ± 0.03 ^a	5
A20G0	21.80 ± 0.48 ^b	2.64 ± 0.22 ^a	29.18 ± 0.80 ^b	0.30 ± 0.02 ^b	10
A20G60	11.28 ± 0.41 ^c	13.57 ± 0.66 ^b	21.39 ± 0.73 ^c	0.31 ± 0.01 ^b	10
A20G120	14.48 ± 0.98 ^a	23.47 ± 1.15 ^c	31.73 ± 0.62 ^d	0.23 ± 0.01 ^c	8

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Con el fin de obtener secretomas en estados fisiológicos similares, se tomaron muestras cuando se alcanzó la máxima tasa de producción de CO₂ (Fig. 7.3.1A), que corresponde aproximadamente al final de la fase de producción exponencial de CO₂ (Fig. 7.3.1B). Este estado fisiológico disminuye la posibilidad de la presencia de actividad proteolítica presente en la fase estacionaria de producción de CO₂. Las muestras que se tomaron para los estudios del secretoma fueron a las 19, 29, 21 y 31 horas para los medios A0G20, A20G0, A20G60 y A20G120, respectivamente. En las curvas de la tasa de producción de CO₂ y producción de CO₂ (Fig. 7.3.1A y B) se observa la reproducibilidad de las muestras biológicas y además se señala con una flecha la toma de muestras para los análisis del secretoma.

En la Fig. 7.3.3 se muestran los valores de pH de los extractos crudos del CMS de *A. niger* 10 que se utilizaron para el análisis del secretoma. Para los medios A0G20, A20G60 y A20G120 se mantuvo el valor del pH de alrededor de 6, valores muy cercanos a los de los medios de cultivo iniciales (Tabla 7.3.1). Solo el medio de cultivo A20G0 subió el valor a 8.

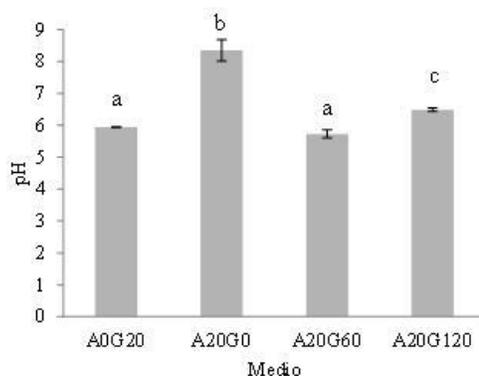


Fig. 7.3.3 Valores de pH del extracto crudo empleado para el análisis del secretoma del CMS de *A. niger* 10. Las determinaciones son de cuatro medios de cultivo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La concentración de proteína aumentó con el incremento en la concentración de glucosa en el medio de cultivo (Fig. 7.3.4). La concentración de proteína extracelular en el medio de cultivo sin almidón (A0G20) fue ocho veces menor que con el medio con almidón (A20G0); esto se puede deber a la secreción de amilasas para la hidrólisis del almidón en la condición A20G0. Se ha reportado que la secreción de proteína en hongos filamentosos está asociada a su crecimiento (Jami y col. 2010; Wösten y col. 1991; Peberdy 1994).

La cantidad de proteína secretada por *A. terreus* en CS en el tiempo de muestreo (3.5 días) fue similar en un medio de cultivo con concentración moderada (30 g/L) de glucosa, sacarosa y almidón y también a altas concentraciones (100 g/L) de sacarosa y glucosa (aproximadamente 10 μg de proteína/mL sobrenadante de cultivo) (Han y col. 2010), pero *A. terreus* a altas concentraciones de glucosa/sacarosa secretó menos de la mitad de proteína por biomasa (proteína extracelular/peso seco celular) bajo concentraciones moderadas de fuentes de carbono, demostrando que la secreción de proteínas por *A. terreus* se reprimió a altas concentraciones de glucosa. Esto es contrario al resultado obtenido en el presente trabajo usando *A. niger* en CMS, donde la concentración de proteína en el extracto aumentó al aumentar la concentración de glucosa en el medio de cultivo. Además, la concentración de proteína extracelular en el extracto obtenido en este trabajo era mayor en todos los medios de cultivo con almidón en comparación con los extractos de proteína de *A. terreus* (Han y col. 2010).

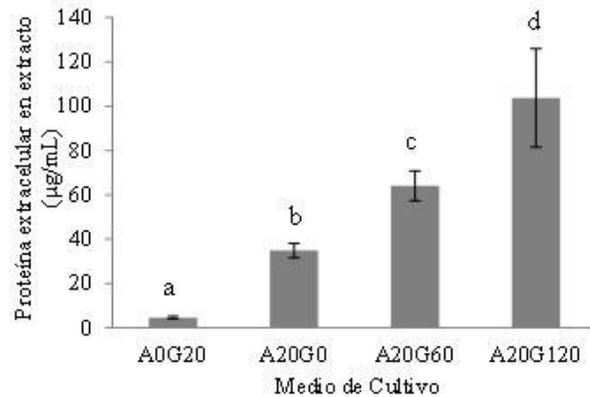


Fig. 7.3.4 Concentración de proteína extracelular en extractos crudos del CMS de *A. niger* 10. Se evaluaron cuatro medios de cultivo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Para determinar el posible efecto represor de la glucosa en la producción de amilasas, se determinaron actividades enzimáticas (α -amilasa y glucoamilasa) y se obtuvieron zimogramas de actividad amilasa de los extractos de proteína extracelular del CMS de *A. niger* 10 en el mismo estado fisiológico.

7.3.1 Actividades glucoamilasa y α -amilasa

La presencia de glucosa favoreció la producción de amilasas (Fig. 7.3.5A y B). La actividad α -amilasa es ocho veces mayor con los medios A20G60 y A20G120 con respecto al medio A20G0. La actividad glucoamilasa es 29 y 20 veces mayor con los medios A20G60 y A20G120, respectivamente, en comparación con el medio A20G0.

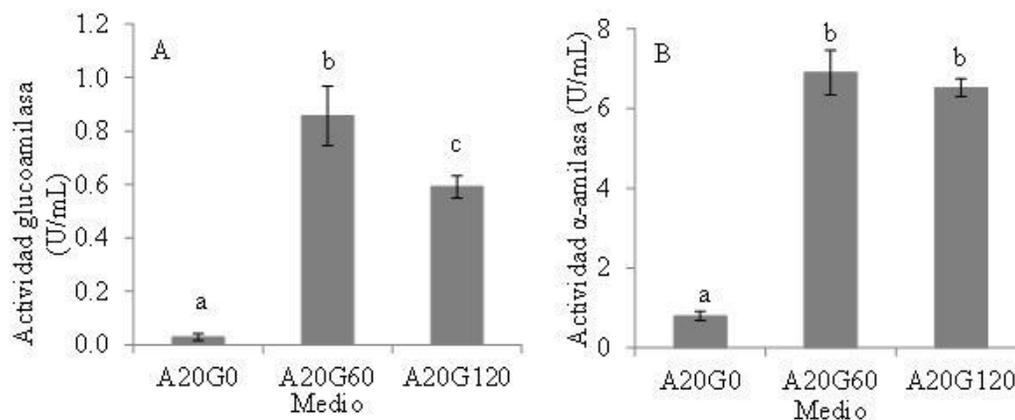


Fig. 7.3.5 Actividad glucoamilasa (A) y α -amilasa (B) en extractos crudos del CMS de *A. niger* 10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Ha sido reportado un incremento en la producción de enzimas en presencia del inductor y glucosa en CMS. Estudios de la producción de pectinasas (Solis-Pereira y col. 1993) y tanasas (Aguilar y col. 2001) mostraron que la adición de glucosa al medio de cultivo con pectina y ácido tánico como inductores respectivamente causaba un incremento en la producción de ambas enzimas. En CS ocurre el efecto contrario; es decir, la presencia de glucosa inhibe la producción de enzimas por represión catabólica. Por ejemplo, Rajoka y Yasmeeen (2005) evaluaron la producción de glucoamilasa de *A. niger* en CS con salvado de trigo y glucosa (1, 2.5, 5 y 10 g/L); estos autores reportaron que la presencia de glucosa incrementó la producción de masa celular (más glucosa = más biomasa) pero disminuyó la tasa de producción de glucoamilasa y consumo de sustrato casi a la mitad con 10 g/L de glucosa comparado con la ausencia de glucosa. Como se mencionó previamente, se ha reportado la inhibición total de la producción de amilasas en CS a partir de 10 g/L glucosa con *Bacillus licheniformis* (Ramesh y Lonsane 1991) y con *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium griseofulvum* (Ertan y col. 2014). En el presente estudio, se adicionaron hasta 120 g/L de glucosa al medio de cultivo con almidón como inductor sin que se produjera represión de la síntesis de α -amilasa y glucoamilasa.

La resistencia del CMS a la represión por carbono se puede atribuir a la posible existencia de gradientes microscópicos entre los agregados de masa celular o un cambio en la permeabilidad celular a los azúcares (Viniegra-González y Favela-Torres 2006).

7.3.2 Zimogramas de actividad amilasa

Se obtuvieron zimogramas de actividad amilasa usando extractos concentrados y diafiltrados cargando la misma cantidad de proteína (20 μ g por carril) en los tres medios de cultivo. Se cargaron dos muestras, es decir dos replicas técnicas (1 y 2), por replica biológica (a, b y c) como se muestra en la Fig. 7.3.6.

Con el medio de cultivo A20G0, se observaron tres bandas de actividad amilasa con un peso molecular promedio de 250, 120 y 40 kDa. Para el medio de cultivo A20G60, las bandas de 120 y 40 kDa se volvieron más intensas y apareció una banda de proteína de 80 kDa. En el zimograma del medio de cultivo A20G120 comparado con el medio A20G60, las mismas bandas de proteína permanecieron pero se observan menos intensas. La intensidad de las

bandas de proteína es consistente con los resultados de actividad volumétrica (U/mL extracto) descritos previamente, ya que se observan bandas más tenues con el medio A20G0 y las bandas más intensas con los medios de cultivo A20G60 y A20G120.

En la presencia de almidón, el hongo *A. niger* podría secretar varias amilasas para la degradación de este polisacárido. Van der Maarel y col. (2002) reportaron 10 enzimas que tienen como principal sustrato al almidón. En el presente trabajo, las bandas de proteína podrían ser diferentes amilasas, incluyendo las actividades glucoamilasa y α -amilasa. Sin embargo, también se debe considerar reactividad cruzada por sustrato causada por diferentes isoformas de amilasas u otras enzimas. Por ejemplo, se ha reportado que la mayoría de las glucoamilasas fúngicas son glicoproteínas que pueden ser secretadas con diferente contenido de carbohidratos, encontrando estas enzimas como isoformas (Vandersall y col. 1995; James y Lee 1997). En CMS, usando salvado de trigo y harina de maíz como sustratos *A. niger* secretó cuatro isoformas de glucoamilasas de 112, 104, 74 y 61 kDa (Selvakumar y col. 1996), y usando salvado de trigo como sustrato, *A. awamori* secretó tres isoformas de glucoamilasa de 110, 87 y 59 kDa (Negi y Banerjee 2009); en ambos reportes la determinación del peso molecular fue por medio de SDS-PAGE. En CS, *A. niger* secretó una glucoamilasa de 73.6 kDa determinado por PAGE no desnaturizante (peso molecular nativo) y de 90.6 kDa determinado por SDS-PAGE (Vandersall y col. 1995). Además en CS, usando almidón de tapioca crudo como fuente de carbono, *A. niger* secretó dos isoformas de glucoamilasa de 96 y 74 kDa (determinado por SDS-PAGE) (Amirul y col. 1996). Algunas de las bandas de glucoamilasa reportadas en estudios previos producidas en CMS (Selvakumar y col. 1996; Negi y Banerjee 2009) y CS (Vandersall y col. 1995; Amirul y col. 1996) son similares a las bandas de 120 y 80 kDa observadas en el presente trabajo. Sin embargo, los valores de peso molecular de las bandas de proteína de 250 y 40 kDa observadas en nuestro trabajo no coinciden con cualquiera de las isoformas de glucoamilasa de *Aspergillus* mencionadas previamente; por lo tanto, estas bandas pueden representar otro tipo de amilasas, tal como α -amilasa u otra(s) enzima(s) con reactividad cruzada por sustrato hacia el almidón .

Por lo tanto, se demostró a través de los ensayos de actividad y zimogramas que al incrementar las concentraciones de glucosa en el CMS de *A. niger* 10 se incrementó la

producción de amilasas. Es probable que una variedad de diferentes tipos de amilasas, isoformas de amilasas o enzimas relacionadas se produjeran en estas condiciones.

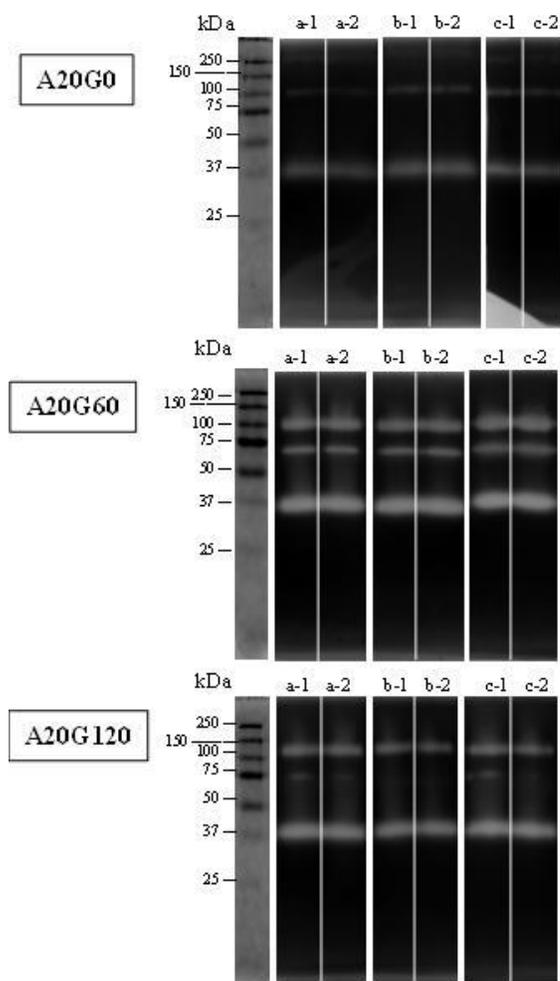


Fig. 7.3.6 Imágenes de los zimogramas de actividad amilasa de los extractos de proteína extracelular del CMS de *A. niger* 10. Se evaluaron tres medios de cultivo (A20G0, A20G60 y A20G120), se muestran tres replicas biológicas (a, b y c) y dos replicas técnicas (1 y 2) por medio de cultivo. Los pesos moleculares de los estándares de proteína están a la izquierda de las imágenes.

7.3.3 Análisis proteómico de proteínas extracelulares de *A. niger* 10 en CMS

7.3.3.1 Geles SDS-PAGE

En la Fig. 7.3.7 se muestran las imágenes de los geles SDS-PAGE obtenidos de los tres medios de cultivo (A20G0, A20G60 y A20G120), se cargaron dos muestras (1 y 2) por tres réplicas biológicas (a, b y c). Como se observaron diferencias en las proteínas secretadas en

los tres medios de cultivo a través de las imágenes de los geles SDS-PAGE se prosiguió a realizar geles de electroforesis de 2-D. Cabe destacar la gran similitud de los geles SDS-PAGE de este capítulo de Resultados con los de la Fig. 7.2.4 del segundo capítulo de Resultados.

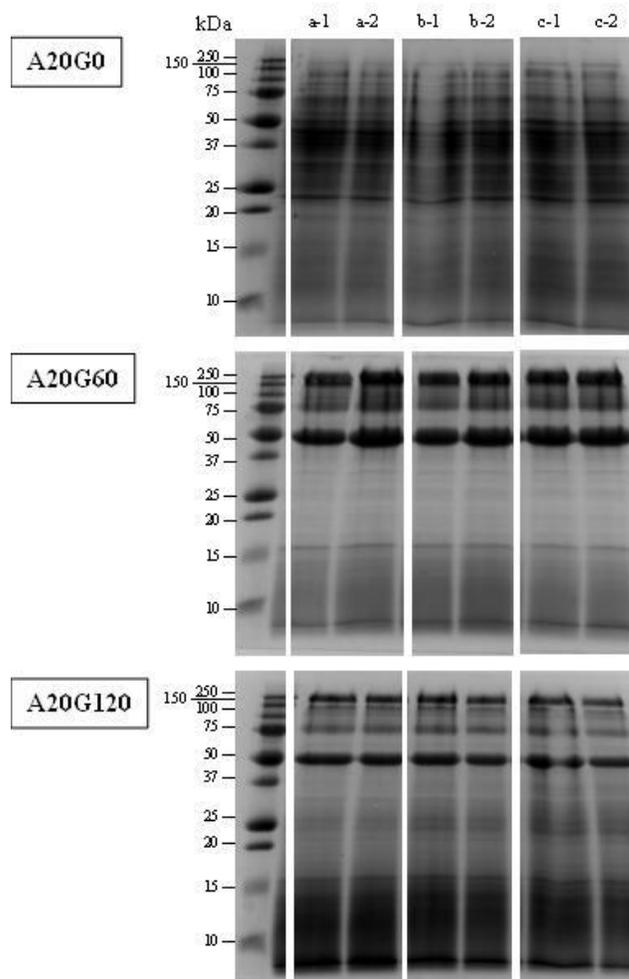


Fig. 7.3.7 Imágenes de los geles SDS-PAGE de proteína extracelular del CMS de *A. niger* 10. Se evaluaron tres medios de cultivo (A20G0, A20G60 y A20G120), se muestran tres réplicas biológicas (a, b y c) y dos réplicas técnicas (1 y 2) por medio de cultivo. Los pesos moleculares de los estándares de proteína están a la izquierda de las imágenes.

7.3.3.2 Geles de electroforesis de 2 dimensiones

Las imágenes de la electroforesis en 2-D de los extractos de proteína extracelular del CMS de *A. niger* 10 muestreados en el mismo estado fisiológico de los medios de cultivo con almidón (A20G0, A20G60 y A20G120) se muestran en la Fig. 7.3.8. Se realizaron triplicados biológicos de cada medio de cultivo evaluado (a, b y c).

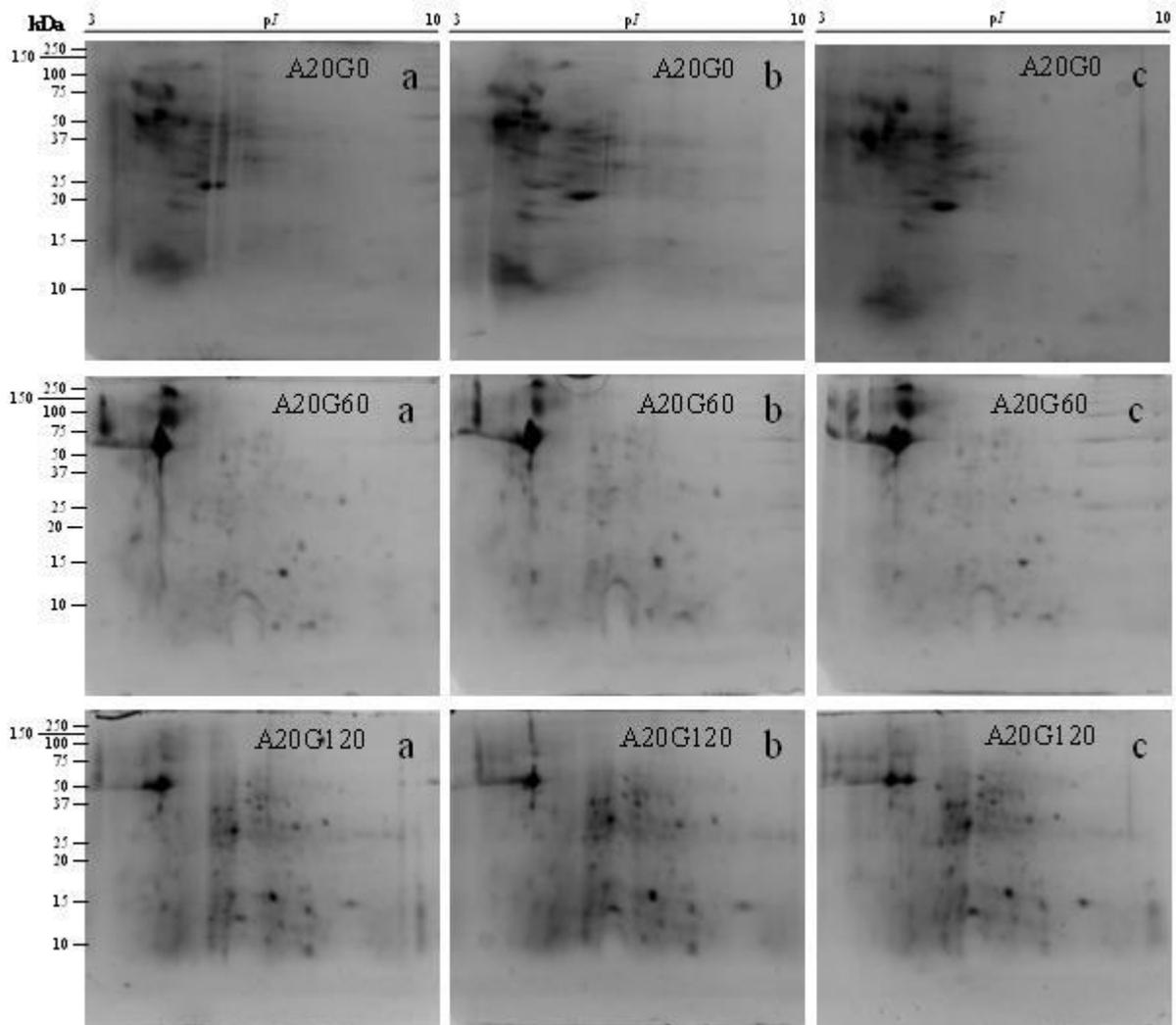


Fig. 7.3.8 Imágenes de los geles de electroforesis de 2-D de proteína extracelular del CMS de *A. niger* 10. Se evaluaron tres medios de cultivo (A20G0, A20G60 y A20G120), se muestran tres réplicas biológicas (a, b y c) por medio de cultivo. Los pesos moleculares de los estándares de proteína están a la izquierda de las imágenes.

7.3.3.3 Análisis de imagen de la electroforesis de 2 dimensiones

Se utilizó el programa PDQuestTM para analizar las imágenes de los geles de electroforesis de 2 dimensiones.

Debido a que dos geles de 2 dimensiones (uno de A20G0 y uno de A20G120) presentaron problemas de tinción, el análisis de imágenes de estos medios se hizo con 2 réplicas biológicas. Para el análisis de imágenes del medio A20G60 se usaron las 3 réplicas biológicas.

Para que un “spot” fuera considerado en el análisis debía de estar presente en al menos dos de las réplicas biológicas.

Una vez seleccionadas las réplicas de los geles 2D de cada medio se obtuvieron los geles maestros (Fig. 7.3.9), en los que se presenta el número total de “spots” incluidos en el análisis de imagen.

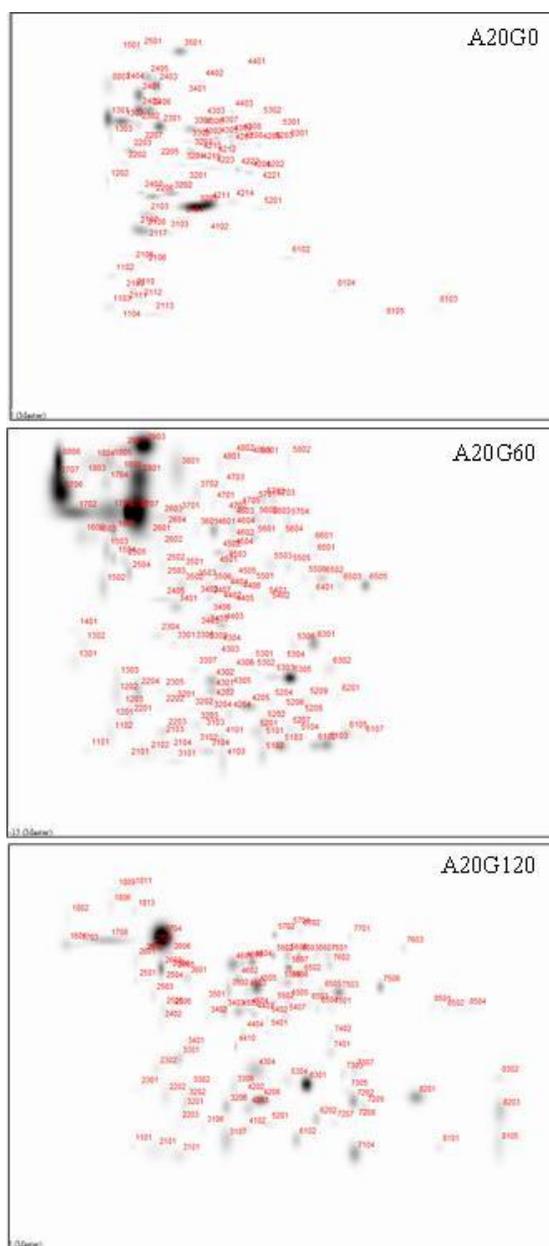


Fig. 7.3.9 Geles maestro con los números SSP de los “spots” de proteína considerados en el análisis de imagen de los geles de electroforesis de 2-D de proteína extracelular del CMS de *A. niger* 10. Se evaluaron tres medios de cultivo (A20G0, A20G60 y A20G120).

A partir de las imágenes de los geles maestros y un análisis estadístico se generó una tabla de análisis de cambio de abundancia, la cual se muestra en el Anexo F.

Se detectaron un total de 79, 153 y 108 “spots” para los medios de cultivo A20G0, A20G60 y A20G120, respectivamente. Se detectaron 28 “spots” en común en los tres medios de cultivo, mientras que se detectaron 28, 63 y 39 como “spots” únicos en los medios de cultivo A20G0, A20G60 y A20G120, respectivamente.

La distribución de los “spots” a diferentes intervalos de pH y peso molecular fueron dependientes de la composición del medio de cultivo, esto se muestra en las Fig. 7.3.10 A y B. En el medio de cultivo A20G0, los “spots” con proteínas con punto isoeléctrico entre pH 4 y 6 y pesos moleculares de 10 a 100 kDa representaron alrededor del 80% del total de “spots”. En el medio A20G60, el 80% del total de “spots” detectados tenían proteínas con punto isoeléctrico entre pH 4 y 7 y pesos moleculares entre 10 a 100 kDa. En este medio de cultivo, los “spots” con proteína con punto isoeléctrico básico y peso molecular entre 10 a 50 kDa se observaron por primera vez en comparación con el medio A20G0. En el medio de cultivo A20G120, el 86% del total de los “spots” se detectaron a intervalos de pH de 4 a 8 y pesos moleculares entre 10 y 100 kDa. Además, en este medio de cultivo, comparado con el medio A20G60, se observó un incremento en el número de “spots” con proteína de peso molecular entre 10 a 50 kDa. Por lo tanto, la presencia de glucosa en los medios de cultivo A20G60 y A20G120 incrementaron el número y la abundancia de “spots”. Tales “spots” tienen proteínas con punto isoeléctrico entre 6 y 9 y peso molecular entre 10 y 50 kDa. En contraste con los resultados presentados en este trabajo, Giardina y col. (2014) reportaron una rápida disminución de los niveles de un gran número de proteínas extracelulares en CS cuando células de *Saccharomyces cerevisiae* se transfirieron de una concentración de glucosa de 20 g/L a 40 g/L, contrario a lo obtenido en este trabajo usando CMS. Sin embargo, Han y col. (2010) evaluaron glucosa y sacarosa a concentraciones de 30 g/L y 100 g/L en el CS de *A. terreus*, los patrones proteómicos extracelulares observados en la electroforesis en 2-D eran similares independientemente de la concentración de fuente de carbono, diferente a los resultados del presente trabajo.

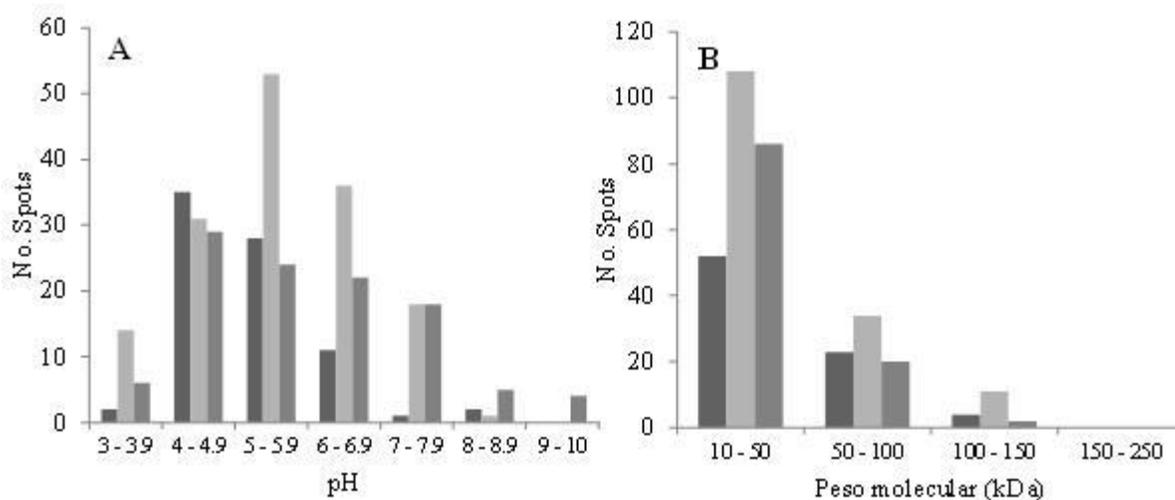


Fig. 7.3.10 No. “spots” detectados por rango de pH (A) y peso molecular (kDa) (B) de las imágenes de la electroforesis de 2-D de la proteína extracelular del CMS de *A. niger* 10 en los tres medios de cultivo. Medios de cultivo: A20G0 (■), A20G60 (▒) y A20G120 (■).

7.3.3.4 Identificación de proteínas por MALDI-TOF MS

El análisis del secretoma incluyó 40 “spots”, de los cuales 6 “spots” se detectaron en común en los tres medios de cultivo, en común en dos medios de cultivo se detectaron 7, 1 y 9 “spots” en los medios A20G0-A20G60, A20G0-A20G120 y A20G60-A20G120, respectivamente, y se detectaron 3, 8 y 6 como “spots” únicos en los medios de cultivo A20G0, A20G60 y A20G120, respectivamente. Estos “spots” se eligieron en base a los criterios mencionados en la sección 6.9 de Materiales y Métodos. En veintiuno de los “spots” analizados se identificaron las proteínas (Tabla 7.3.6); mientras que, en los otros 19 “spots” no se pudieron identificar las proteínas, ya sea porque no presentaron un “score” global válido de Mascot (estos resultados se muestran en el Anexo H) o porque no se obtuvo señal de proteínas y solo se observó en los espectros picos correspondientes a la tripsina. La dificultad en identificar esas proteínas podría deberse a una baja concentración de proteína en el gel. Además Oda y col. (2006) reportaron algunas dificultades en identificar proteínas secretadas por *A. oryzae*, entre ellas está el que las proteínas están altamente glicosiladas, una propiedad de las proteínas secretadas por hongos filamentosos, las cuales usualmente son resistentes a digestión trípica. Además, se dificulta la digestión trípica de proteínas ácidas porque tienen pocos residuos básicos de lisina y arginina específicos de la digestión triptica, y la

identificación de proteínas menores a 30 kDa por MALDI-TOF MS es extremadamente reducida (Oda y col. 2006).

Para la identificación de las proteínas se hizo la búsqueda con el programa Mascot y se utilizó para la identificación la base de datos del proteoma de referencia derivado del genoma anotado de *A. niger* 513.88 (Pel y col. 2007). También se hizo la búsqueda con la base de datos del proteoma de referencia derivado del genoma anotado de *A. niger* ATCC 1015 (Andersen y col. 2011) y no hubo diferencias en los resultados.

En el Anexo I se muestran los espectros de masa de los “spots” de proteínas analizados mediante MALDI-TOF MS que se identificaron como amilasas. De la búsqueda en el programa Mascot se muestran los péptidos predichos de la proteína identificada y los picos de los espectros de masa de los “spots” de proteína que hicieron “match” con la proteína identificada.

Las proteínas identificadas en la Tabla 7.3.6 y Tabla A.5 (Anexo G) se clasificaron de acuerdo a su proceso biológico en: amilasas, proteína involucrada en estrés oxidativo y proteínas involucradas en el metabolismo. La cantidad normalizada de la abundancia del “spot” de las proteínas identificadas se presenta en la Tabla 7.3.6. En la Tabla A.5 (Anexo G) se presenta información de las proteínas identificadas incluyendo pesos moleculares y puntos isoeléctricos teóricos y experimentales, número de acceso, “score”, cobertura de la secuencia y número total de péptidos asignados a la proteína.

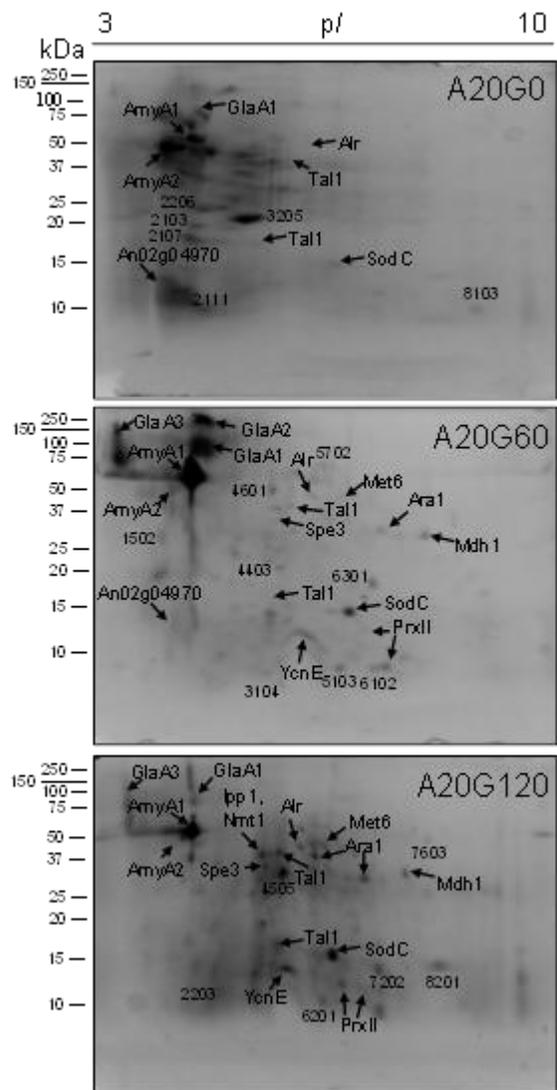


Fig. 7.3.11 Proteínas identificadas (abreviación) y “spots” con proteínas no identificadas (números SSP) en las imágenes de los geles de la electroforesis de 2-D de proteína extracelular del CMS de *A. niger* 10.

Tabla 7.3.6 Proteínas extracelulares identificadas por MALDI-TOF MS del CMS de *A. niger* 10 en el mismo estado fisiológico. Se evaluaron tres medios de cultivo (A20G0, A20G60 y A20G120).

"Spot" ^a	Nombre de la proteína	Cantidad normalizada ^b			SigP ^c	SecP ^d
		A20G0	Medio A20G60	A20G120		
Amilasas						
GlaA1	Glucoamilasa	55,134±1,430 ^a	1,374,689±48,553 ^b	ND	Si	No
GlaA2	Glucoamilasa	ND	994,835±211,758	ND	Si	No
GlaA3	Glucoamilasa	ND	324,724±4,813	ND	Si	No
AmyA1	α-Amilasa	159,491±102,035 ^a	364,479±167,810 ^a	29,435±4,444 ^a	Si	No
AmyA2	α-Amilasa	147,029±22,190 ^a	65,308±8,111 ^b	8,697±1,117 ^c	Si	No
Estrés oxidativo						
SodC	Superóxido dismutasa [Cu-Zn]	16,206±9,211 ^a	331,374±24,247 ^b	249,159±99,224 ^b	No	Si
Metabolismo						
PrxII	Peroxiredoxin PrxII tipo 2	ND	152,727±12,576	ND	No	Si
PrxII	Peroxiredoxin PrxII tipo 2	ND	ND	23,734±8,923	No	Si
PrxII	Peroxiredoxin PrxII tipo 2	ND	27,200±1,844 ^a	49,760±9,243 ^a	No	Si
Nmt1	Proteína nmt1	ND	ND	116,763±26,646	No	Si
An02g04970	Proteína hipotética An02g04970	10,043±377 ^a	52,662±7,907 ^b	ND	No	Si
Mdh1	Malato deshidrogenasa Mdh1	ND	101,702±14,711 ^a	60,406±1,368 ^a	No	Si
Alr	Aldehído reductasa dependiente de NADPH	5,182±2,945 ^a	38,945±5,436 ^b	46,397±21,562 ^b	No	Si
Tal1	Transaldolasa	9,533±9,229 ^a	7,657±852 ^a	152,760±58,308 ^b	No	No
Tal1	Transaldolasa	10,925±7,603 ^a	24,216±2,877 ^a	76,257±564 ^b	No	No
Ara1	D-arabinosa deshidrogenasa Ara1	ND	ND	54,400±483	No	No
Ara1	D-arabinosa deshidrogenasa Ara1	ND	56,489±5,963 ^a	99,117±22,692 ^b	No	No
Ipp1	Pirofosfatasa inorgánica Ipp1	ND	ND	116,763±26,646	No	No
Met6	5-metiltetrahidropteriloltriglutamato – homocisteína S-metiltransferasa Met6	ND	26,910±1,788 ^a	34,513±2,192 ^a	No	No
YcnE	Proteína hipotética ycnE	ND	132,890±16,915 ^a	23,640±3,618 ^b	No	No
Spe3	Espermidina sintasa Spe3	ND	8,853±1,045 ^a	27,847±400 ^b	No	No

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$). ^aEl nombre del “spot” corresponde al nombre del gen/proteína de acuerdo a la base de datos de proteínas del NCBI y son las que se muestran en la Fig. 7.3.11. ^bCantidad normalizada de un “spot” específico. ^cSigP, predicciones de secuencia señal usando SignalP 4.1 (Petersen y col. 2011). ^dSecP, predicciones de señal no clásica de secreción usando SecretomeP 2.0 (Bendtsen y col. 2004). ND, “spot” específico no detectado en ese medio de cultivo.

Amilasas

Las amilasas fueron las únicas proteínas que tenían un péptido señal amino-terminal para ser secretadas a través de la ruta de secreción convencional de acuerdo con la predicción obtenida con SignalP 4.1 (Petersen y col. 2011), como se muestra en la Tabla 7.3.6.

Se identificaron dos tipos de amilasas, α -amilasa (AmyA) y glucoamilasa (GlaA); que correspondieron a los “spots” más abundantes (Fig. 7.3.11 y Tabla 7.3.6). Se identificaron dos isoformas de AmyA, y se les asignó el nombre AmyA1 y AmyA2. La abundancia de AmyA1 fue similar en los tres medios de cultivo evaluados (Tabla 7.3.6). La otra isoforma, AmyA2, disminuyó su abundancia al incrementar la concentración de glucosa. Con respecto a GlaA, una isoforma, llamada GlaA1, se detectó en los tres medios de cultivo y era más abundante en el medio de cultivo A20G60. Se identificaron dos isoformas adicionales de GlaA (GlaA2 y GlaA3) en los medios de cultivo con glucosa (A20G60 y A20G120); aunque la abundancia de estas dos isoformas fue menor en A20G120 con respecto a A20G60. Estos resultados son consistentes con los resultados actividad amilasa de los extractos crudos (Fig. 7.3.5) y zimogramas (Fig. 7.3.6).

Por lo tanto, AmyA y GlaA también se detectaron en los medios A20G60 y A20G120 suplementados con almidón y glucosa, la abundancia de las isoformas fue diferente dependiendo de la concentración de glucosa (Tabla 7.3.6). Además, diferentes isoformas de GlaA solo se identificaron en las muestras con alta concentración de glucosa (A20G60 y A20G120). Es por ello que se menciona que la regulación post-traduccional podría tener un rol importante en la secreción de amilasas de *A. niger* 10 en CMS en presencia de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo. La regulación post-traduccional en la secreción de amilasas no ha sido reportado antes para *A. niger* en CMS, aunque Adav y col. (2014) encontraron que la glicosilación (una modificación post-traduccional) de enzimas secretadas por *Phanerochaete chrysosporium* era dependiente del sustrato al comparar la degradación de los sustratos glucosa, celulosa y lignina. Han sido reportados otros tipos de regulación en la secreción de amilasas en hongos filamentosos en CMS. Oda y col. (2006) reportaron que la secreción de glucoamilasa A y α -amilasa de *A. oryzae* en CMS era controlada a nivel post-transcripcional. El gen *glab*, de la proteína glucoamilasa B (GlaB), se

expresó específicamente en CMS de *A. oryzae* (Hata y col. 1998) y su producción es regulada a nivel transcripcional (Oda y col. 2006; Ishida y col. 2001).

Se han reportado mayores valores de actividad enzimática en la producción de enzimas de interés industrial en CMS en comparación con CS incluso con la presencia de un represor catabólico, pero la importancia de la regulación post-traducciona l en la secreción de AmyA y GlaA no se ha reportado. Es importante orientar los estudios para entender la regulación post-traducciona l de estas enzimas en CMS para incrementar su secreción. Se requiere de más pruebas, como Western blot y la caracterización de la glicosilación (como una modificación post-traducciona l) de las amilasas secretadas por *A. niger* en CMS para confirmar estos resultados.

También se ha reportado la presencia de amilasas extracelulares producidas por hongos filamentosos con diferentes fuentes de carbono. En el proteoma extracelular de la cepa *A. niger* AB1.13 crecido en maltosa en CS, se encontraron glucoamilasas como “spots” múltiples en los geles de 2-dimensiones y representaron alrededor del 50% del proteoma extracelular (Lu y col. 2010). Se detectaron dos α -amilasas, una glucoamilasa, dos α -glucosidasas y una α -glucosidasa B durante el crecimiento de *A. nidulans* en CMS con rastrojo de sorgo como sustrato, donde la presencia y abundancia de estas enzimas era dependiente del tiempo de cultivo (Saykhedkar y col. 2012). Se detectó la presencia de una α -amilasa, una α -glucosidasa y una glucoamilasa en el secretoma de *A. niger* ATCC 1015 en CS después del crecimiento de 2 días con altas concentraciones (150 g/L) de glucosa o glicerol en el medio de cultivo; ambas amilasas también se detectaron en el medio de cultivo con goma de algarrobo, pectina, sorbitol y xilano (Tsang y col. 2009). La presencia de amilasas en estudios de proteómica de proteínas extracelulares de hongos filamentosos es común y no se requiere almidón o sus productos de hidrólisis como inductores para ser detectadas. Sin embargo, un medio definido con almidón o sus productos de hidrólisis pueden facilitar la producción de amilasas por *A. niger* en CMS, este proceso se puede mejorar con la presencia de glucosa sin los efectos de represión catabólica, como se mostró en el presente trabajo.

Proteínas secretadas a través de una ruta de secreción no convencional

A parte de las amilasas también se identificaron proteínas que se clasificaron en: proteína involucrada en el estrés oxidativo (SodC) y otras involucradas en diferentes metabolismos (PrxII, Ipp1, Nmt1, Ara1, Mdh1, YcnE, Spe3, Met6, Tal1, Alr). Estas proteínas identificadas no presentan péptido señal amino-terminal y su abundancia aumentó o solo se detectaron en los medios de cultivo con glucosa (A20G60 y A20G120), como se muestra en la Tabla 7.3.6.

Aunque la presencia de estas proteínas en los extractos de proteína extracelular podría deberse a lisis celular durante el muestreo, nos gustaría enfatizar que la lisis celular se redujo tomando muestras con estados fisiológicos asociados con el fin de la fase de exponencial de producción de CO₂, como se mencionó previamente. Esta es una razón por la cual las proteínas podrían haber sido secretadas a través de mecanismos no convencionales de secreción. Se ha reportado la secreción no convencional de proteínas en hongos y se ha sugerido que regula aspectos fisiológicos desacoplados con el crecimiento de las hifas (Shoji y col. 2014). Las proteínas SodC, PrxII, Nmt1, An02g04970, Mdh1 y Alr tienen señal no-clásica de secreción como se predijo usando SecretomeP (Bendtsen y col. 2004) (Tabla 7.3.6). Ninguna es una proteína transmembrana como se predijo usando TMHMM (Krogh y col. 2001; Sonnhammer y col. 1998).

Las proteínas Tal1, Spe3, Met6, Mdh1, Ara1, Alr, PrxII and SodC se han detectado como proteínas extracelulares en otros análisis proteómicos de hongos como se describe a continuación. Spe3 también se ha detectado en el secretoma de *A. terreus* en un medio de cultivo con sacarosa (Han y col. 2010) y en el secretoma de *A. oryzae* en el CMS del koji de soya (Liang y col. 2009). Tal1 se detectó en el secretoma de *A. oryzae* en CMS cuando se comparó el secretoma de este hongo en CMS con CS (Oda y col. 2006). La actividad de la proteína Met6 se ha demostrado en extractos libres de células del hongo *A. nidulans* (Balinska y Paszewski 1979). Mdh1 también se detectó en el secretoma de *A. flavus* en el medio de cultivo con rutina (Medina y col. 2005) y en el secretoma de *S. cerevisiae* crecido con glucosa (Giardina y col. 2014). Ara1 y Alr se detectaron como componentes menores del proteoma extracelular de *A. niger* crecido en xilosa, y PrxII se detectó cuando este hongo creció con maltosa (Lu y col. 2010).

La abundancia del “spot” que contenía a la proteína SodC en las imágenes de los geles de electroforesis de 2-D aumentó 20.5 veces del medio A20G0 al medio A20G60, y la abundancia fue similar en el medio A20G120 con respecto al medio A20G60 (Tabla 7.3.6); hubo un gran aumento de la abundancia del “spot” con la presencia de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo. SodC se ha identificado en estudios de proteómica de *Aspergillus* donde su abundancia incrementa cuando las células crecieron bajo estrés ambiental. SodC fue abundante a las elevadas temperaturas de 40 y 50 °C en la degradación de aserrín por *A. fumigatus* en CMS (Adav y col. 2013). Tsang y col. (2009) detectaron SodC con un medio de cultivo con 150 g/L glucosa como fuente de carbono en CS en comparación con medios de cultivo con glicerol, goma de algarrobo, pectina, sorbitol y xilano. De manera contraria al presente trabajo, los niveles de SodC en el CS de *S. cerevisiae* determinados por el proteoma y Western blot se redujeron después de la transferencia de las células de baja (20 g/L) a alta (40 g/L) concentración de glucosa en el medio de cultivo (Giardina y col. 2014).

Las proteínas PrxII y SodC han sido reportadas como proteínas “moonlighting” con una segunda función en la superficie de la célula o en el espacio extracelular. Las proteínas “moonlighting” son proteínas multifuncionales, muchas de estas proteínas están implicadas en el desarrollo de enfermedades (Jeffery 2015). La segunda función reportada de PrxII es la unión del plasminógeno en la superficie celular de *Candida albicans*; la activación del plasminógeno podría aumentar potencialmente la capacidad del hongo a la invasión de tejidos y necrosis (Crowe y col. 2003). SodC se encontró en la superficie celular en *Mycobacterium avium*, teniendo como segunda función la adhesión a través de la cual *M. avium* se une a células epiteliales y causa infecciones diseminadas oportunistas en pacientes infectados con VIH (Reddy y Suleman 2004). En la comparación del secretoma de dos cepas de *Enterococcus faecalis*, un aislado clínico y un aislado de alimentos, SodC se detectó como una de las proteínas que se encontraron exclusivamente en el secretoma del aislado clínico y se identificó como posible factor de virulencia y potencial proteína “moonlighting” (Pessione y col. 2012).

Las proteínas secretadas por vesículas extracelulares es un mecanismo no convencional de secreción de proteínas, incluyendo proteínas “moonlighting”, que ha sido reportado que está asociado a la patogénesis en varios hongos (Shoji y col. 2014; Gil-Bona y col. 2015). Las

proteínas Mdh1, Ipp1, Spe3, Met6, Tal1 y SodC se detectaron en los medios de cultivo con glucosa (A20G60 y A20G120) en el presente trabajo y también se detectaron por Albuquerque y col. (2008) en el mecanismo de secreción por transporte vesicular usado para promover la virulencia en *Histoplasma capsulatum*. La proteína Met6 también se detectó por Gil-Bona y col. (2015) en un análisis proteómico de vesículas extracelulares de *C. albicans* como biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico para la candidiasis sistémica.

Los medios de cultivos más concentrados (A20G60 y A20G120) tenían una actividad de agua (a_w) inicial menor al medio de cultivo A20G0, como se muestra en la Tabla 7.3.1. La secreción de proteínas a través de mecanismos no convencionales puede estar involucrada en la adaptación de *A. niger* al crecimiento en baja a_w en CMS.

Es necesaria evidencia experimental adicional para confirmar que las proteínas detectadas en este trabajo podrían ser secretadas a través de vías de secreción no convencionales. Si lo son, también es importante comprender la función de estas proteínas en la superficie celular o en el espacio extracelular; para esto, se requiere un análisis a nivel molecular.

7.3.4 Conclusiones del capítulo

Los análisis de respirometría permitieron llevar a cabo el muestreo para el análisis del secretoma en el estado fisiológico de mayor tasa de producción de CO₂. La producción de amilasas por *A. niger* 10 en CMS aumentó con concentraciones de glucosa tan altas como 120 g/L. Altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo de *A. niger* 10 en CMS aumentó el número de proteínas detectadas y la abundancia de algunas proteínas en las imágenes de electroforesis de 2-D. La regulación post-traducciona podría tener un rol importante en la secreción de amilasas de *A. niger* 10 en CMS en presencia de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo, ya que por la presencia de la glucosa hubo un efecto variable en la abundancia de las isoformas de las amilasas identificadas y la aparición de isoformas de GlaA. La abundancia de las proteínas identificadas que no tenían péptido señal amino-terminal, las cuales se pudieron secretar a través de una ruta de secreción no convencional, aumentó o solo se detectaron en los medios de cultivo con glucosa (A20G60 y A20G120). Algunas de estas proteínas están asociadas con patogénesis.

8. CONCLUSIONES GENERALES

La producción de amilasas por *A. niger* 10 en CMS aumentó con concentraciones de glucosa tan altas como 120 g/L. Al aumentar la concentración de glucosa se incrementó el número y la abundancia de proteínas en general, y hubo una variación en la abundancia de las isoformas de las amilasas identificadas y la aparición de isoformas de GlaA en particular. En los extractos extracelulares producidos con alta concentración de glucosa se identificaron proteínas sin péptido señal amino terminal; algunas de ellas son proteínas “moonlighting” asociadas con patogénesis.

El uso de un medio mínimo definido asociado al análisis respirométrico permitieron establecer la tasa máxima de producción de CO₂ como criterio cuantitativo para definir el estado fisiológico para determinar el efecto de la concentración de glucosa en el secretoma de *A. niger* 10 en CMS.

9. PERSPECTIVAS

A partir del trabajo realizado surgen las perspectivas siguientes:

- Es necesaria evidencia experimental adicional para confirmar que las proteínas sin péptido señal amino terminal detectadas en presencia de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo de *A. niger* 10 en CMS podrían ser secretadas a través de vías de secreción no convencionales. Si lo son, también es importante comprender la función de estas proteínas en la superficie celular o en el espacio extracelular; para esto, se requiere un análisis a nivel molecular.
- Caracterizar la glicosilación de las amilasas extracelulares e intracelulares para confirmar la posible regulación post-traducciona en la secreción de amilasas de *A. niger* 10 en CMS en presencia de altas concentraciones de glucosa.
- Complementar el secretoma de *A. niger* 10 en CMS en presencia de altas concentraciones de glucosa con el proteoma intracelular con el fin de identificar los cambios metabólicos en la resistencia de este tipo de cultivo a la represión catabólica.
- Analizar el papel del factor de transcripción CreA en el CMS de *A. niger* 10 en presencia de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo para aportar un modelo de regulación de la represión catabólica en este tipo de cultivo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe J ichi, Bergmann FW, Obata K, Hizukuri S (1988) Production of the raw-starch digesting amylase of *Aspergillus* sp. K-27. *Appl Microbiol Biotechnol* 27:447–450. doi: 10.1007/BF00451611
- Adav SS, Chao LT, Sze SK (2012) Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. *Mol Cell Proteomics* 11:M111.012419-15. doi: 10.1074/mcp.M111.012419
- Adav SS, Li AA, Manavalan A, Punt P, Sze SK (2010) Quantitative iTRAQ secretome analysis of *Aspergillus niger* reveals novel hydrolytic enzymes. *J Proteome Res* 9:3932–3940. doi: 10.1021/pr100148j
- Adav SS, Ravindran A, Sze SK (2013) Proteomic analysis of temperature dependent extracellular proteins from *Aspergillus fumigatus* grown under solid-state culture condition. *J Proteome Res* 12:2715–2731. doi: 10.1021/pr4000762
- Adav SS, Ravindran A, Sze SK (2014) Study of *Phanerochaete chrysosporium* secretome revealed protein glycosylation as a substrate-dependent post-translational modification. *J Proteome Res* 13:4272–4280. doi: 10.1021/pr500385y
- Agger T, Spohr AB, Nielsen J (2001) alpha-Amylase production in high cell density submerged cultivation of *Aspergillus oryzae* and *A. nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:81–84.
- Aguilar CN, Augur C, Favela-Torres E, Viniestra-González G (2001) Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. *J Ind Microbiol Biotechnol* 26:296–302. doi: 10.1038/sj.jim.7000132
- Aguilar G, Huitrón C (1990) Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon source. *Biotechnol Lett* 12:655–660. doi: 10.1007/BF01088189
- Alazard D, Raimbault M (1981) Comparative study of amylolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in liquid and solid state cultivation. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 12:113–117. doi: 10.1007/BF01970044
- Albuquerque PC, Nakayasu ES, Rodrigues ML, Frases S, Casadevall A, Zancope-Oliveira RM, Almeida IC, Nosanchuk JD (2008) Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes.

- Cell Microbiol 10:1695–1710. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01160.x
- Alegre ACP, Polizeli M de LT de M, Terenzi HF, Jorge JA, Guimarães LHS (2009) Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. Brazilian J Microbiol 40:612–622. doi: 10.1590/S1517-83822009000300025
- Amirul AA, Khoo SL, Nazalan MN, Razip MS, Azizan MN (1996) Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. Folia Microbiol (Praha) 41:165–174. doi: 9138312
- Andersen MR, Nielsen J (2009) Current status of systems biology in Aspergilli. Fungal Genet Biol 46 Suppl 1:S180–S190. doi: 10.1016/j.fgb.2008.07.006
- Andersen MR, Salazar MP, Schaap PJ, Van De Vondervoort PJI, Culley D, Thykaer J, Frisvad JC, Nielsen KF, Albang R, Albermann K, Berka RM, Braus GH, Braus-Stromeyer SA, Corrochano LM, Dai Z, Van Dijck PWM, Hofmann G, Lasure LL, Magnuson JK, Menke H, Meijer M, Meijer SL, Nielsen JB, Nielsen ML, Van Ooyen AJJ, Pel HJ, Poulsen L, Samson RA, Stam H, Tsang A, Van Den Brink JM, Atkins A, Aerts A, Shapiro H, Pangilinan J, Salamov A, Lou Y, Lindquist E, Lucas S, Grimwood J, Grigoriev I V., Kubicek CP, Martinez D, Van Peij NNME, Roubos JA, Nielsen J, Baker SE (2011) Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. Genome Res 21:885–897. doi: 10.1101/gr.112169.110
- Balinska M, Paszewski A (1979) Betaine-homocysteine methyltransferase in the fungus *Aspergillus nidulans*. Biochem Biophys Res Commun 91:1095–1100.
- Barreiro C, García-Estrada C, Martín J (2012) Proteomics methodology applied to the analysis of filamentous fungi - new trends for an impressive diverse group of organisms. In: Prasain JK (ed) In Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles. InTech, Rijeka, pp 127–160
- Bayram Ö, Braus GH (2011) Coordination of secondary metabolism and development in fungi: The velvet family of regulatory proteins. FEMS Microbiol Rev 36:1–24. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00285.x
- Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, von Heijne G, Brunak S (2004) Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. Protein Eng Des Sel 17:349–356. doi:

10.1093/protein/gzh037

- Bernfeld P (1955) Amylases, alpha and beta. *Methods Enzymol* 1:149–158. doi: 10.1016/0076-6879(55)01021-5
- Braaksma M, Martens-Uzunova ES, Punt PJ, Schaap PJ (2010) An inventory of the *Aspergillus niger* secretome by combining in silico predictions with shotgun proteomics data. *BMC Genomics* 11:1–11. doi: 10.1186/1471-2164-11-584
- Callegari E, Navarrete M (2012) The use of mass spectrometry for characterization of fungal secretomes. In: Prasain JK (ed) *In Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*. InTech, Rijeka, pp 221–234
- 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. *Electrophoresis* 25:1327–1333. doi: 10.1002/elps.200305844
- Carlsen M, Spohr AB, Nielsen J, Villadsen J (1996) Morphology and physiology of an α -amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnol Bioeng* 49:266–276. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960205)49:3<266::AID-BIT4>3.0.CO;2-I
- Carrasco-Navarro U, Vera-Estrella R, Barkla BJ, Zúñiga-León E, Reyes-Vivas H, Fernández FJ, Fierro F (2016) Proteomic analysis of the signaling pathway mediated by the heterotrimeric Ga protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum*. *Microb Cell Fact* 15:11–17. doi: 10.1186/s12934-016-0564-x
- Carrillo-Sancen G, Carrasco-Navarro U, Tomasini-Campocosio A, Corzo G, Pedraza-Escalona MM, Favela-Torres E (2016) Effect of glucose as a carbon repressor on the extracellular proteome of *Aspergillus niger* during the production of amylases by solid state cultivation. *Process Biochem* 1–10. doi: 10.1016/j.procbio.2016.09.001
- Chevalier F (2010) Highlights on the capacities of “Gel-based” proteomics. *Proteome Sci* 8:1–23. doi: 10.1186/1477-5956-8-23
- Chiquetto ML, Facciotti MCR, Kilikian, Beatriz V, Schmidell W (1992) Influence of carbon and nitrogen sources on glucoamylase production by *Aspergillus* in batch process. *Biotechnol Lett* 14:465–470.

- Conesa A, Punt PJ, van Luijk N, van den Hondel CA (2001) The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genet Biol* 33:155–171. doi: 10.1006/fgbi.2001.1276
- Coutinho PM, Andersen MR, Kolenova K, VanKuyk PA, Benoit I, Gruben BS, Trejo-Aguilar B, Visser H, van Solingen P, Pakula T, Seiboth B, Battaglia E, Aguilar-Osorio G, de Jong JF, Ohm RA, Aguilar M, Henrissat B, Nielsen J, Ståhlbrand H, de Vries RP (2009) Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol* 46 Suppl 1:S161–S169. doi: 10.1016/j.fgb.2008.07.020
- Crowe JD, Sievwright IK, Auld GC, Moore NR, Gow NAR, Booth NA (2003) *Candida albicans* binds human plasminogen: Identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol Microbiol* 47:1637–1651. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03390.x
- Cruz-Córdova T, Roldán-Carrillo TG, Díaz-Cervantes D, Ortega-López J, Saucedo-Castañeda G, Tomasini-Campocoso A, Rodríguez-Vázquez R (1999) CO₂ evolution and ligninolytic and proteolytic activities of *Phanerochaete chrysosporium* grown in solid state fermentation. *Resour Conserv Recycl* 27:3–7. doi: 10.1016/S0921-3449(98)00080-9
- Davidson H, Mecklenburg R, Peterson C (1988) *Nursery Management, Administration and Culture*, 2da edn. Prentice Hall, New Jersey
- Díaz-Godínez G, Soriano-Santos J, Augur C, Viniegra-González G (2001) Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *J Ind Microbiol Biotechnol* 26:271–275. doi: 10.1038/sj.jim.7000113
- Dilly O (2001) Microbial respiratory quotient during basal metabolism and after glucose amendment in soils and litter. *Soil Biol Biochem* 33:117–127. doi: 10.1016/S0038-0717(00)00123-1
- Ertan F, Balkan B, Yarkin Z (2014) Determination of the effects of initial glucose on the production of α -amylase from *Penicillium* sp. under solid-state and submerged fermentation. *Biotechnol Equip* 28:96–101. doi: 10.1080/13102818.2014.901670
- Favela-Torres E, Cordova-López J, García-Rivero M, Gutiérrez-Rojas M (1998) Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations.

Process Biochem 33:103–107.

- Ferreira de Oliveira JMP, de Graaff LH (2011) Proteomics of industrial fungi: trends and insights for biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:225–237. doi: 10.1007/s00253-010-2900-0
- Ferreira de Oliveira JMP, van Passel MWJ, Schaap PJ, de Graaff LH (2011) Proteomic analysis of the secretory response of *Aspergillus niger* to D-maltose and D-xylose. *PLoS One* 6:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0020865
- Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma L-J, Wortman JR, Batzoglou S, Lee S-I, Baştürkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V, Jurka J, Scazzocchio C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D’Enfert C, Bouchier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M, Selker EU, Archer DB, Peñalva MÁ, Oakley BR, Momany M, Tanaka T, Kumagai T, Asai K, Machida M, Nierman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fischer R, Miller B, Dyer P, Sachs MS, Osmani SA, Birren BW (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438:1105–1115. doi: 10.1038/nature04341
- Giardina BJ, Stanley BA, Chiang H-L (2014) Glucose induces rapid changes in the secretome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteome Sci* 12:1–21. doi: 10.1186/1477-5956-12-9
- Gil-Bona A, Llama-Palacios A, Parra CM, Vivanco F, Nombela C, Monteoliva L, Gil C (2015) Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *J Proteome Res* 14:142–153. doi: 10.1021/pr5007944
- Giraldo MA, da Silva TM, Salvato F, Terenzi HF, Jorge JA, Guimarães LHS (2012) Thermostable invertases from *Paecilomyces variotii* produced under submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues. *World J Microbiol Biotechnol* 28:463–472. doi: 10.1007/s11274-011-0837-9
- Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B (2003) Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochem* 38:1599–1616. doi: 10.1016/S0032-9592(03)00053-0
- 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* 17:219–224. doi: 10.1007/BF00127992
- Haasum I, Eriksen SH, Jensen B, Olsen J (1991) Growth and glucoamylase production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in a synthetic medium. *Appl Microbiol Biotechnol* 34:656–660. doi: 10.1007/BF00167918
- Han MJ, Kim NJ, Lee SY, Chang HN (2010) Extracellular proteome of *Aspergillus terreus* grown on different carbon sources. *Curr Genet* 56:369–382. doi: 10.1007/s00294-010-0308-0
- Hata Y, Ishida H, Ichikawa E, Kawato A, Suginami K, Imayasu S (1998) Nucleotide sequence of an alternative glucoamylase-encoding gene (glaB) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Gene* 207:127–134. doi: 10.1016/S0378-1119(97)00612-4
- Hill TW, Kafer E (2001) Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genet Newsl* 48:20–21.
- Hölker U, Höfer M, Lenz J (2004) Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:175–186. doi: 10.1007/s00253-003-1504-3
- Ikasari L, Mitchell DA (2000) Two-phase model of the kinetics of growth of *Rhizopus oligosporus* in membrane culture. *Biotechnol Bioeng* 68:619–627. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000620)68:6<619::AID-BIT4>3.0.CO;2-E
- Ishida H, Matsumura K, Hata Y, Kawato A, Suginami K, Abe Y, Imayasu S, Ichishima E (2001) Establishment of a hyper-protein production system in submerged *Aspergillus oryzae* culture under tyrosinase-encoding gene (melO) promoter control. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:131–137. doi: 10.1007/s002530100771
- James JA, Lee BH (1997) Glucoamylases: Microbial sources, industrial applications and molecular biology - A review. *J Food Biochem* 21:1–52. doi: DOI 10.1111/j.1745-4514.1997.tb00223.x
- Jami MS, García-Estrada C, Barreiro C, Cuadrado AA, Salehi-Najafabadi Z, Martín JF (2010) The *Penicillium chrysogenum* extracellular proteome. Conversion from a food-rotting strain to a versatile cell factory for white biotechnology. *Mol Cell proteomics* 9:2729–2744. doi: 10.1074/mcp.M110.001412
- Jeffery CJ (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* 24:8–11. doi: 10.1016/S0968-

0004(98)01335-8

- Jeffery CJ (2015) Why study moonlighting proteins? *Front Genet* 6:1–5. doi: 10.3389/fgene.2015.00211
- Kato N, Murakoshi Y, Kato M, Kobayashi T, Tsukagoshi N (2002) Isomaltose formed by α -glucosidases triggers amylase induction in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 42:43–50. doi: 10.1007/s00294-002-0325-8
- Kelly S, Grimm LH, Hengstler J, Schultheis E, Krull R, Hempel DC (2004) Agitation effects on submerged growth and product formation of *Aspergillus niger*. *Bioprocess Biosyst Eng* 26:315–323. doi: 10.1007/s00449-004-0368-y
- Kim HS, Han KY, Kim KJ, Han DM, Jahng KY, Chae KS (2002) The veA gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 37:72–80. doi: 10.1016/S1087-1845(02)00029-4
- Kim Y, Nandakumar MP, Marten MR (2007a) Proteomics of filamentous fungi. *Trends Biotechnol* 25:395–400. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.07.008
- Kim Y, Nandakumar MP, Marten MR (2007b) Proteome map of *Aspergillus nidulans* during osmoadaptation. *Fungal Genet Biol* 44:886–895. doi: 10.1016/j.fgb.2006.12.001
- Kniemeyer O, Lessing F, Scheibner O, Hertweck C, Brakhage AA (2006) Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet* 49:178–189. doi: 10.1007/s00294-005-0047-9
- Kojima T, Kunitake E, Ihara K, Kobayashi T, Nakano H (2016) A Robust Analytical Pipeline for Genome-Wide Identification of the Genes Regulated by a Transcription Factor: Combinatorial Analysis Performed Using gSELEX-Seq and RNA-Seq. *PLoS One* 11:1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0159011
- Krijgsheld P, Altelaar AFM, Post H, Ringrose JH, Muller WH, Heck AJR, Wosten HAB (2012) Spatially resolving the secretome within the mycelium of the cell factory *Aspergillus niger*. *J Proteome Res* 11:2807–2818. doi: 10.1021/pr201157b
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer ELL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305:567–580. doi: 10.1006/jmbi.2000.4315
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage

- T4. Nature 227:680–685.
- Landis TD, Tinus RW, McDonald SE, Barnett JP (1990) Containers and Growing Media, Vol. 2. In: Nisley RG (ed) The Container Tree Nursery Manual. Agricultural Handbook 674. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington D.C., p 88
- Lareo C, Sposito AF, Bossio AL, Volpe DC (2006) Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. Enzyme Microb Technol 38:391–399. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.06.009
- Li G, Linko Y, Linko P (1984) Glucoamylase and alpha-amylase production by immobilized *Aspergillus niger*. Biotechnol Lett 6:645–650.
- Liang Y, Pan L, Lin Y (2009) Analysis of extracellular proteins of *Aspergillus oryzae* grown on soy sauce koji. Biosci Biotechnol Biochem 73:192–195. doi: 10.1271/bbb.80500
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265–275. doi: 10.1016/0304-3894(92)87011-4
- Lu X, Sun J, Nimtz M, Wissing J, Zeng AP, Rinas U (2010) The intra- and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. Microb Cell Fact 9:1–13. doi: 10.1186/1475-2859-9-23
- Makita T, Katsuyama Y, Tani S, Suzuki H, Kato N, Todd RB, Hynes MJ, Tsukagoshi N, Kato M, Kobayashi T (2009) Inducer-dependent nuclear localization of a Zn(II)2Cys6 transcriptional activator, AmyR, in *Aspergillus nidulans*. Biosci Biotechnol Biochem 73:391–399. doi: 10.1271/bbb.80654
- Martinez TF, Alarcón FJ, Díaz-lópez M, Moyano FJ (2000) Improved detection of amylase activity by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with copolymerized starch. Electrophoresis 21:2940–2943.
- Martínez-Valdez FJ, Martínez-Ramírez C, Martínez-Montiel L, Favela-Torres E, Soto-Cruz NO, Ramírez-Vives F, Saucedo-Castañeda G (2015) Rapid mineralisation of the organic fraction of municipal solid waste. Bioresour Technol 180:112–118. doi: 10.1016/j.biortech.2014.12.083
- Medina ML, Haynes PA, Breci L, Francisco WA (2005) Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. Proteomics 5:3153–3161. doi: 10.1002/pmic.200401136
- Metwally M (1998) Glucoamylase production in continuous cultures of *Aspergillus niger* with

- special emphasis on growth parameters. *World J Microbiol Biotechnol* 14:113–118. doi: 10.1023/A:1008840904246
- Miller GL, Blum R, Glennon WE, Burton AL (1960) Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal Biochem* 2:127–132. doi: 10.1016/0003-2697(60)90004-X
- Mukherjee AK, Borah M, Rai SK (2009) To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular alpha-amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of alpha-amylase in laundry. *Biochem Eng J* 43:149–156. doi: 10.1016/j.bej.2008.09.011
- Murakoshi Y, Makita T, Kato M, Kobayashi T (2012) Comparison and characterization of α -amylase inducers in *Aspergillus nidulans* based on nuclear localization of AmyR. *Appl Microbiol Biotechnol* 94:1629–1635. doi: 10.1007/s00253-012-3874-x
- Nakamura T, Maeda Y, Tanque N, Makita T, Kato M, Kobayashi T (2006) Expression profile of amylolytic genes in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:2363–2370. doi: 10.1271/bbb.50694
- Nandakumar MP, Thakur MS, Raghavarao K, Ghildyal NP (1999) Studies on catabolite repression in solid state fermentation for biosynthesis of fungal amylases. *Lett Appl Microbiol* 29:380–384. doi: 10.1046/j.1472-765X.1999.00652.x
- Negi S, Banerjee R (2009) Optimization of extraction and purification of glucoamylase produced by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation. *Biotechnol Bioprocess Eng* 14:60–66. doi: 10.1007/s12257-008-0107-3
- Nitsche BM, Jørgensen TR, Akeroyd M, Meyer V, Ram AFJ (2012) The carbon starvation response of *Aspergillus niger* during submerged cultivation: Insights from the transcriptome and secretome. *BMC Genomics* 13:380. doi: 10.1186/1471-2164-13-380
- Norouzian D, Akbarzadeh A, Scharer JM, Moo Young M (2006) Fungal glucoamylases. *Biotechnol Adv* 24:80–85. doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.06.003
- 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 Microbiol* 72:3448–3457. doi: 10.1128/AEM.72.5.3448
- Oh YT, Ahn C-S, Kim JG, Ro H-S, Lee C-W, Kim JW (2010) Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 47:246–253.

doi: 10.1016/j.fgb.2009.11.002

- Oriol E, Raimbault M, Roussos S, Viniestra-gonzales G (1988a) Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotech* 27:498–503.
- Oriol E, Schettino B, Viniestra-Gonzalez G, Raimbault M (1988b) Solid-state culture of *Aspergillus niger* on support. *J Ferment Technol* 66:57–62.
- Pandey A (1990) Improvements in solid-state fermentation for glucoamylase production. *Biol Wastes* 34:11–19. doi: 10.1016/0269-7483(90)90140-N
- Pandey A (1991) Effect of particle size of substrate of enzyme production in solid-state fermentation. *Bioresour Technol* 37:169–172. doi: 10.1016/0960-8524(91)90206-Y
- Pandey A (2003) Solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 13:81–84. doi: 10.1016/S1369-703X(02)00121-3
- Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R (2000) Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem* 31:135–52. doi: 10.1042/BA19990073
- Pandey A, Radhakrishnan S (1993) The production of glucoamylase by *Aspergillus niger* NCIM 1245. *Process Biochem* 28:305–309.
- Pandey A, Selvakumar P, Ashakumary L (1994) Glucoamylase production by *Aspergillus niger* on rice bran is improved by adding nitrogen sources. *World J Microbiol Biotechnol* 10:348–349. doi: 10.1007/BF00414878
- Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P (1999) Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr Sci* 77:149–162.
- Paszczynski A, Miedziak I, Lobarzewski J, Kochmanska J, Trojanowski J (1982) A simple method of affinity chromatography for the purification of glucoamylase obtained from *Aspergillus niger* C. *FEBS Lett* 149:63–66. doi: 10.1016/0014-5793(82)81072-7
- Pazur JH, Knull HR, Cepure A (1971) Glycoenzymes: Structure and properties of the two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Carbohydr Res* 20:83–96. doi: 10.1016/S0008-6215(00)84951-4
- Peberdy JF (1994) Protein secretion in filamentous fungi - trying to understand a highly productive black box. *Trends Biotechnol* 12:50–57. doi: 10.1016/0167-7799(94)90100-7
- Pedersen H, Beyer M, Nielsen J (2000) Glucoamylase production in batch, chemostat and fed-

batch cultivations by an industrial strain of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:272–277. doi: 10.1007/s002530050020

- Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, de Vries RP, Albang R, Albermann K, Andersen MR, Bendtsen JD, Benen JAE, van den Berg M, Breestraat S, Caddick MX, Contreras R, Cornell M, Coutinho PM, Danchin EGJ, Debets AJM, Dekker P, van Dijck PWM, van Dijk A, Dijkhuizen L, Driessen AJM, D'Enfert C, Geysens S, Goosen C, Groot GSP, de Groot PWJ, Guillemette T, Henrissat B, Herweijer M, van den Hombergh JPTW, van den Hondel CAMJJ, van der Heijden RTJM, van der Kaaij RM, Klis FM, Kools HJ, Kubicek CP, van Kuyk P a, Lauber J, Lu X, van der Maarel MJEC, Meulenbergh R, Menke H, Mortimer M a, Nielsen J, Oliver SG, Olsthoorn M, Pal K, van Peij NNME, Ram AFJ, Rinas U, Roubos JA, Sagt CMJ, Schmoll M, Sun J, Ussery D, Varga J, Verwecken W, van de Vondervoort PJJ, Wedler H, Wösten HAB, Zeng A-P, van Ooyen AJJ, Visser J, Stam H (2007) Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol* 25:221–31. doi: 10.1038/nbt1282
- Pessione A, Lamberti C, Coccolin L, Campolongo S, Grunau A, Giubergia S, Eberl L, Riedel K, Pessione E (2012) Different protein expression profiles in cheese and clinical isolates of *Enterococcus faecalis* revealed by proteomic analysis. *Proteomics* 12:431–447. doi: 10.1002/pmic.201100468
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785–786. doi: 10.1038/nmeth.1701
- Pirt SJ (1975) *Principles of microbe and cell cultivation*, John Wiley. New York
- Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C (2010) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J Proteomics* 73:2064–2077. doi: 10.1016/j.jprot.2010.05.016
- Rabilloud T, Lelong C (2011) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *J Proteomics* 74:1829–1841. doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.040
- Raimbault M, Alazard D (1980) Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 9:199–209. doi: 10.1007/BF00504486
- Rajoka MI, Yasmeen A (2005) Induction, and production studies of a novel glucoamylase of

- Aspergillus niger*. World J Microbiol Biotechnol 21:179–187. doi: 10.1007/s11274-004-1766-7
- Ramasesh N, Sreekantiah KR, Murthy VS (1982) Studies on the two forms of amyloglucosidase of *Aspergillus niger* van Tieghem. Starch - Stärke 34:346–351. doi: 10.1002/star.19820341006
- Ramesh MV, Lonsane BK (1991a) 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 13:355–360.
- Ramesh M V., Lonsane BK (1991b) Ability of a solid state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis*-M27. Appl Microbiol Biotechnol 35:591–593.
- Reddy VM, Suleman FG (2004) *Mycobacterium avium*-superoxide dismutase binds to epithelial cell aldolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and cyclophilin A. Microb Pathog 36:67–74. doi: 10.1016/j.micpath.2003.09.005
- Rezaei PS, Najafpour GD, Shafaghat H, Mahjoub S (2009) Production of alpha amylase from starch using *Aspergillus niger* NCIM 548. World Appl Sci J 7:306–311.
- Rizwan M, Miller I, Tasneem F, Bohm J, Gemeiner M, Razzazi-Fazeli E (2010) Proteome analysis of *Aspergillus ochraceus*. Mycotoxin Res 26:171–180. doi: 10.1007/s12550-010-0051-x
- Rocha NR de AF, Barros MA, Fischer J, Coutinho Filho U, Cardoso VL (2013) Ethanol production from agroindustrial biomass using a crude enzyme complex produced by *Aspergillus niger*. Renew Energy 57:432–435. doi: 10.1016/j.renene.2013.01.053
- Romero-Gómez SJ, Augur C, Viniestra-González G (2000) Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. Biotechnol Lett 22:1255–1258. doi: 10.1023/A:1005659217932
- Roy P, Lockington RA, Kelly JM (2008) CreA-mediated repression in *Aspergillus nidulans* does not require transcriptional auto-regulation, regulated intracellular localisation or degradation of CreA. Fungal Genet Biol 45:657–670. doi: 10.1016/j.fgb.2007.10.016
- Sahnoun M, Bejar S, Sayari A, Triki MA, Kriaa M, Kammoun R (2012) Production, purification and characterization of two α -amylase isoforms from a newly isolated

- Aspergillus oryzae* strain S2. *Process Biochem* 47:18–25. doi: 10.1016/j.procbio.2011.09.016
- Santerre Henriksen AL, Carlsen M, de Bang H, Nielsen J (1999) Kinetics of alpha-amylase secretion in *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol Bioeng* 65:76–82. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19991005)65:1<76::AID-BIT9>3.0.CO;2-D
- Saucedo-Castañeda G, Trejo-Hernández MR, Lonsane BK, Navarro JM, Roussos S, Dufour D, Raimbault M (1994) On-line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochem* 29:13–24. doi: 10.1016/0032-9592(94)80054-5
- Saykhedkar S, Ray A, Ayoubi-Canaan P, Hartson SD, Prade R, Mort AJ (2012) A time course analysis of the extracellular proteome of *Aspergillus nidulans* growing on sorghum stover. *Biotechnol Biofuels* 5:1–17. doi: 10.1186/1754-6834-5-52
- Schneider T, Gerrits B, Gassmann R, Schmid E, Gessner MO, Richter A, Battin T, Eberl L, Riedel K (2010) Proteome analysis of fungal and bacterial involvement in leaf litter decomposition. *Proteomics* 10:1819–1830. doi: 10.1002/pmic.200900691
- Selvakumar P, Ashakumary L, Helen A, Pandey A (1996) Purification and characterization of glucoamylase produced by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Lett Appl Microbiol* 23:403–406.
- Shabbiri K, Adnan A, Noor B, Jamil S (2012) Optimized production, purification and characterization of alpha amylase by *Brevibacterium linens* DSM 20158, using bio-statistical approach. *Ann Microbiol* 62:523–532. doi: 10.1007/s13213-011-0286-6
- Shimizu M, Fujii T, Masuo S, Fujita K, Takaya N (2009) Proteomic analysis of *Aspergillus nidulans* cultured under hypoxic conditions. *Proteomics* 9:7–19. doi: 10.1002/pmic.200701163
- Shimizu M, Wariishi H (2005) Development of a sample preparation method for fungal proteomics. *FEMS Microbiol Lett* 247:17–22. doi: 10.1016/j.femsle.2005.04.021
- Shoji H, Sugimoto T, Hosoi K, Shibata K, Tanabe M, Kawatsura K (2007) Simultaneous production of glucoamylase and acid-stable alpha-amylase using novel submerged culture of *Aspergillus kawachii* NBRC4308. *J Biosci Bioeng* 103:203–205. doi: 10.1263/jbb.103.203

- Shoji JY, Kikuma T, Kitamoto K (2014) Vesicle trafficking, organelle functions, and unconventional secretion in fungal physiology and pathogenicity. *Curr Opin Microbiol* 20:1–9. doi: 10.1016/j.mib.2014.03.002
- Soares R, Pires E, Almeida AM, Santos R, Gomes R, Koci K, Ferraz Franco C, Coelho AV (2012) Tandem mass spectrometry of peptides. In: Prasain JK (ed) *In Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*. InTech, Rijeka, pp 35–56
- Solis-Pereira S, Favela-Torres E, Viniegra-Gonzalez G, Gutierrez-Rojas M (1993) Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 39:36–41.
- Solis-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 Microbiol Biotechnol* 12:257–260. doi: 10.1007/BF00360924
- Sonnhammer ELL, von Heijne G, Krogh A (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In: Glasgow J, Littlejohn T, Major F, Lathrop R, Sankoff D, Sensen C (eds) *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. AAAI Press, Menlo Park, pp 175–182
- Sørensen LM, Lametsch R, Andersen MR, Nielsen P V., Frisvad JC (2009) Proteome analysis of *Aspergillus niger* lactate added in starch-containing medium can increase production of the mycotoxin fumonisin B2 by modifying acetyl-CoA metabolism. *BMC Microbiol* 9:255. doi: 10.1186/1471-2180-9-255
- Spier MR, Greiner UK, Greiner R, Rodriguez-Leon JA, Carvalho JC, Woiciechowski AL, Soccol CR (2007) Relation between respirometric data and amylolytic enzyme production by SSF in column-type bioreactor. *Int. J. Chem. Reactor Eng* 5:A67.
- Spier MR, Woiciechowski AL, Vandenberghe LPD, Soccol CR (2006) Production and characterization of amylases by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agro industrials products. *Int J Food Eng* 2:3. doi: Artn 6rDoi 10.2202/1556-3758.1116
- Stertz SC, Soccol CR, Raimbault M, Pandey A, Rodriguez-Leon JA (1999) Growth kinetics of *Rhizopus formosa* MUCL 28422 on raw cassava flour in solid state fermentation. *J Chem Technol Biotechnol* 74:580–586. doi: 10.1002/(SICI)1097-4660(199906)74:6<580::AID-

JCTB81>3.0.CO;2-E

- Stotzky G (1965) Microbial respiration. In: Black CA, Evans DD, White JL, Ensminger LE, Clark FE (eds) *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy, Inc., Madison, WI, pp 1550–1572
- Téllez-Jurado A, Arana-Cuenca A, González-Becerra AE, Viniegra-González G, Loera O (2006) Expression of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentations. *Enzyme Microb Technol* 38:665–669. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.07.021
- Thygesen A, Thomsen AB, Schmidt AS, Jørgensen H, Ahring BK, Olsson L (2003) Production of cellulose and hemicellulose-degrading enzymes by filamentous fungi cultivated on wet-oxidised wheat straw. *Enzyme Microb Technol* 32:606–615. doi: 10.1016/S0141-0229(03)00018-8
- Tsang A, Butler G, Powlowski J, Panisko EA, Baker SE (2009) Analytical and computational approaches to define the *Aspergillus niger* secretome. *Fungal Genet Biol* 46:153–160. doi: 10.1016/j.fgb.2008.07.014
- van der Maarel M, van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *J Biotechnol* 94:137–155. doi: 10.1016/S0168-1656(01)00407-2
- Vandersall AS, Cameron RG, Nairn CJ, Yelenosky G, Wodzinski RJ (1995) Identification, characterization, and partial purification of glucoamylase from *Aspergillus niger* (syn *A. ficuum*) NRRL 3135. *Prep Biochem* 25:29–55. doi: 10.1080/10826069508010106
- Viniegra-González G, Favela-Torres E (2006) Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression? *Food Technol Biotechnol* 44:397–406.
- Volke-Sepulveda T, Salgado-Bautista D, Bergmann C, Wells L, Gutierrez-Sanchez G, Favela-Torres E (2016) Secretomic insight into glucose metabolism of *Aspergillus brasiliensis* in solid-state fermentation. *J Proteome Res* 15:3856–3871. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00663
- Wartenberg D, Vodisch M, Kniemeyer O, Albrecht-Eckardt D, Scherlach K, Winkler R, Weide M, Brakhage AA (2012) Proteome analysis of the farnesol-induced stress response in *Aspergillus nidulans*-The role of a putative dehydrin. *J Proteomics* 75:4038–4049. doi:

10.1016/j.jprot.2012.05.023

- Withers JM, Swift RJ, Wiebe MG, Robson GD, Punt PJ, Van den Hondel C, Trinci APJ (1998) Optimization and stability of glucoamylase production by recombinant strains of *Aspergillus niger* in chemostat culture. *Biotechnol Bioeng* 59:407–418. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19980820)59:4<407::AID-BIT3>3.0.CO;2-K
- Wösten HAB, Moukha SM, Sietsma JH, Wessels JGH (1991) Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. *J Gen Microbiol* 137:2017–2023. doi: 10.1099/00221287-137-8-2017
- Wright JC, Sugden D, Francis-McIntyre S, Riba-Garcia I, Gaskell SJ, Grigoriev I V, Baker SE, Beynon RJ, Hubbard SJ (2009) Exploiting proteomic data for genome annotation and gene model validation in *Aspergillus niger*. *BMC Genomics* 10:1–14. doi: 10.1186/1471-2164-10-61
- Xie G, West TP (2006) Citric acid production by *Aspergillus niger* on wet corn distillers grains. *Lett Appl Microbiol* 43:269–273. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01958.x
- Zhang F, Zhong H, Han X, Guo Z, Yang W, Liu Y, Yang K, Zhuang Z, Wang S (2015) Proteomic profile of *Aspergillus flavus* in response to water activity. *Fungal Biol* 119:114–124. doi: 10.1016/j.funbio.2014.11.005
- Zhang H, Wang S, Zhang X xiang, Ji W, Song F, Zhao Y, Li J (2016) The amyR-deletion strain of *Aspergillus niger* CICC2462 is a suitable host strain to express secreted protein with a low background. *Microb Cell Fact* 15:1–11. doi: 10.1186/s12934-016-0463-1

11. ANEXOS

ANEXO A. Características de los cultivos evaluados

Tabla A.1 Características de los cultivos evaluados. ME: matraz Erlenmeyer. C: columna.

Capítulo	Tipo de cultivo	Sistema	Medio de cultivo	Inóculo (No. esporas)	Volumen de medio (mL)	Cantidad de soporte sólido (g)	Agitación (rpm)	Flujo de aire en respirometría (mL/min)	Replicas biológicas
CAPÍTULO 1									
7.1.1.1	CS	ME 250 mL	A20G0	1x10 ⁶ /mL medio	50	-	150	-	2
7.1.1.2	CS	ME 250 mL	A20G0	1x10 ⁶ /mL medio	50	-	150	-	2
	CMS	ME 125 mL	A20G0	1x10 ⁷ /g ss	4.5	3	-	-	2
7.1.2	CMS	ME 125 mL	A20G20V	1x10 ⁷ /mL medio	4.5	3	-	-	2
	CMS	ME 125 mL	A20G40V	1x10 ⁷ /mL medio	4.5	3	-	-	2
	CMS	ME 125 mL	A20G80V	1x10 ⁷ /mL medio	4.5	3	-	-	2
7.1.3	CS	ME 250 mL	A20G0	1x10 ⁷ /mL medio	50	-	150	-	3
	CS	ME 250 mL	A20G20	1x10 ⁷ /mL medio	50	-	150	-	3
	CS	ME 250 mL	A20G40	1x10 ⁷ /mL medio	50	-	150	-	3
	CS	ME 250 mL	A20G80	1x10 ⁷ /mL medio	50	-	150	-	3
	CMS	ME 125 mL	A20G20	1x10 ⁷ /mL medio	5.5	3	-	-	4
	CMS	ME 125 mL	A20G40	1x10 ⁷ /mL medio	5.5	3	-	-	4
	CMS	ME 125 mL	A20G80	1x10 ⁷ /mL medio	5.5	3	-	-	4
	CAPÍTULO 2								
7.2.1	CS	ME 125 mL	A20G0	1x10 ⁶ /mL medio	30	-	150	30	4
	CS	ME 125 mL	A20G10	1x10 ⁶ /mL medio	30	-	150	30	4
	CS	ME 125 mL	A20G20	1x10 ⁶ /mL medio	30	-	150	40	4
7.2.2	CMS	ME 250 mL	A20G80	1x10 ⁷ /mL medio	11	6	-	40	2
	CMS	ME 250 mL	A20G180	1x10 ⁷ /mL medio	11	6	-	40	2
	CMS	C	A20G80	1x10 ⁷ /mL medio	11	6	-	40	2
	CMS	C	A20G180	1x10 ⁷ /mL medio	11	6	-	40	2
7.2.3.1	CMS	ME 250 mL	A20G60	1x10 ⁷ /mL medio	11.7	6	-	40	2
	CMS	ME 250 mL	A20G80	1x10 ⁷ /mL medio	12	6	-	40	2
	CMS	ME 250 mL	A20G100	1x10 ⁷ /mL medio	12.3	6	-	40	2
	CMS	ME 250 mL	A20G120	1x10 ⁷ /mL medio	12.5	6	-	40	2
	CMS	ME 250 mL	A20G140	1x10 ⁷ /mL medio	12.8	6	-	40	2

7.2.3.2	CMS	ME 250 mL	A20G0	1x10 ⁷ /mL medio	11	6	-	40	4
	CMS	ME 250 mL	A20G60	1x10 ⁷ /mL medio	11.7	6	-	40	2
	CMS	ME 250 mL	A20G120	1x10 ⁷ /mL medio	12.5	6	-	40	2
	CMS	ME 250 mL	A20G0	1x10 ⁷ /mL medio	11	6	-	20	3
	CMS	ME 250 mL	A20G60	1x10 ⁷ /mL medio	11.7	6	-	30	3
	CMS	ME 250 mL	A20G120	1x10 ⁷ /mL medio	12.5	6	-	40	3
CAPÍTULO 3									
7.3	CMS	ME 500 mL	A0G20	1x10 ⁷ /mL medio	22	12	-	30	5
	CMS	ME 500 mL	A20G0	1x10 ⁷ /mL medio	22	12	-	30	10
	CMS	ME 500 mL	A20G60	1x10 ⁷ /mL medio	24.9	12	-	60	10
	CMS	ME 500 mL	A20G120	1x10 ⁷ /mL medio	28.1	12	-	60	8

ANEXO B. Macronutrientes y elementos traza de los medios de cultivo evaluados

Tabla A.2 Macronutrientes de los medios de cultivo utilizados. V: medio de cultivo con C/N variable.

Componente (g/L)	Medio de cultivo													
	A0G20	A20G0	A20G20V	A20G40V	A20G80V	A20G10	A20G20	A20G40	A20G60	A20G80	A20G100	A20G120	A20G140	A20G180
Glucosa	20	-	20	40	60	10	20	40	60	80	100	120	140	180
Almidón	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
NaNO ₃	6	6	6	6	6	9	12	18	24	30	36	42	48	60
KCl	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.78	1.04	1.56	2.08	2.6	3.12	3.64	4.16	5.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.78	1.04	1.56	2.08	2.6	3.12	3.64	4.16	5.2
KH ₂ PO ₄	0.815	0.815	0.815	0.815	0.815	1.2225	1.63	2.445	3.26	4.075	4.89	5.705	6.52	8.15
K ₂ HPO ₄	1.045	1.045	1.045	1.045	1.045	1.5675	2.09	3.135	4.18	5.225	6.27	7.315	8.36	10.45

Tabla A.3 Elementos traza de los medios de cultivo utilizados. V: medio de cultivo con C/N variable.

Componente (mg/L)	Medio de cultivo													
	A0G20	A20G0	A20G20V	A20G40V	A20G80V	A20G10	A20G20	A20G40	A20G60	A20G80	A20G100	A20G120	A20G140	A20G180
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22	22	22	22	22	33	44	66	88	110	132	154	176	220
H ₃ BO ₃	11	11	11	11	11	16.5	22	33	44	55	66	77	88	110
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5	5	5	5	5	7.5	10	15	20	25	30	35	40	50
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5	5	5	5	5	7.5	10	15	20	25	30	35	40	50
CoCl ₂ ·5H ₂ O	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	2.4	3.2	4.8	6.4	8	9.6	11.2	12.8	16
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	2.4	3.2	4.8	6.4	8	9.6	11.2	12.8	16
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.65	2.2	3.3	4.4	5.5	6.6	7.7	8.8	11
Na ₄ EDTA	50	50	50	50	50	75	100	150	200	250	300	350	400	500
Biotina	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.375	0.5	0.75	1	1.25	1.5	1.75	2	2.5

ANEXO C. Agrolita y su preparación para el CMS

Se utilizó agrolita como soporte inerte para el CMS. La agrolita es un mineral de aluminio-silicato de origen volcánico obtenido por minería en varios países, incluyendo Estados Unidos y Nueva Zelanda. Después de ser extraído el material se tritura y se expone a temperaturas de hasta 1,000 °C produciendo partículas blancas y ligeras. Tiene una estructura celular cerrada, por lo cual el agua solo se adhiere a la superficie de las partículas de agrolita (Landis y col. 1990). Tiene una capacidad de retención de agua en la superficie de las partículas igual a tres o cuatro veces su peso (Davidson y col. 1988). La agrolita es rígida y no se comprime fácilmente lo que promueve una buena porosidad. Debido a las altas temperaturas de las cuales procede, la agrolita es completamente estéril. Es esencialmente infértil ya que prácticamente no contiene nutrientes. El pH de la agrolita oscila alrededor de la neutralidad (Landis y col. 1990).

Preparación de la agrolita para el CMS

La preparación de la agrolita constó de lo siguiente.

1) Tamizado

Se tamizó la agrolita durante diez minutos utilizando los tamices del número 6, 12, 16 y 20. Se colectó la agrolita retenida en los tamices del número 16 y 20 y se desechó la retenida en la base y en los tamices del número 6 y 12 (Fig. A.1). La agrolita retenida en los tamices 16 y 20 tiene un tamaño menor a 1.70 mm y mayor a 0.85 mm.

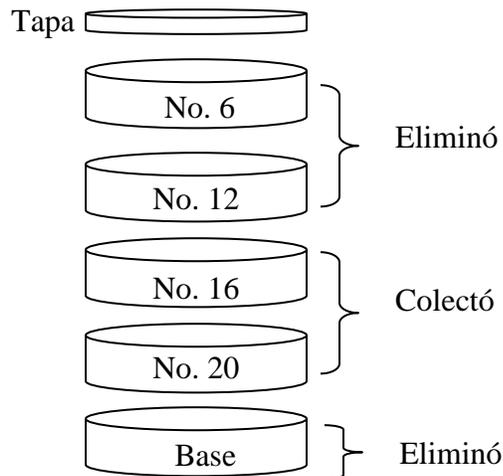


Fig. A.1 Tamices empleados en el tamizado de la agrolita.

2) Lavado

La agrolita tamizada se lavó dos veces con agua destilada a temperatura ambiente y una vez con agua caliente.

3) Secado

Una vez lavada la agrolita se escurrió y se puso en charolas de aluminio formando una capa delgada para secarla en una estufa a 60°C durante 48 horas o hasta tener un contenido de humedad menor al 1%.

4) Almacenamiento

Se almacenó la agrolita en bolsas de plástico cerradas.

ANEXO D. Análisis de respirometría de los cultivos del Capítulo 2 de Resultados

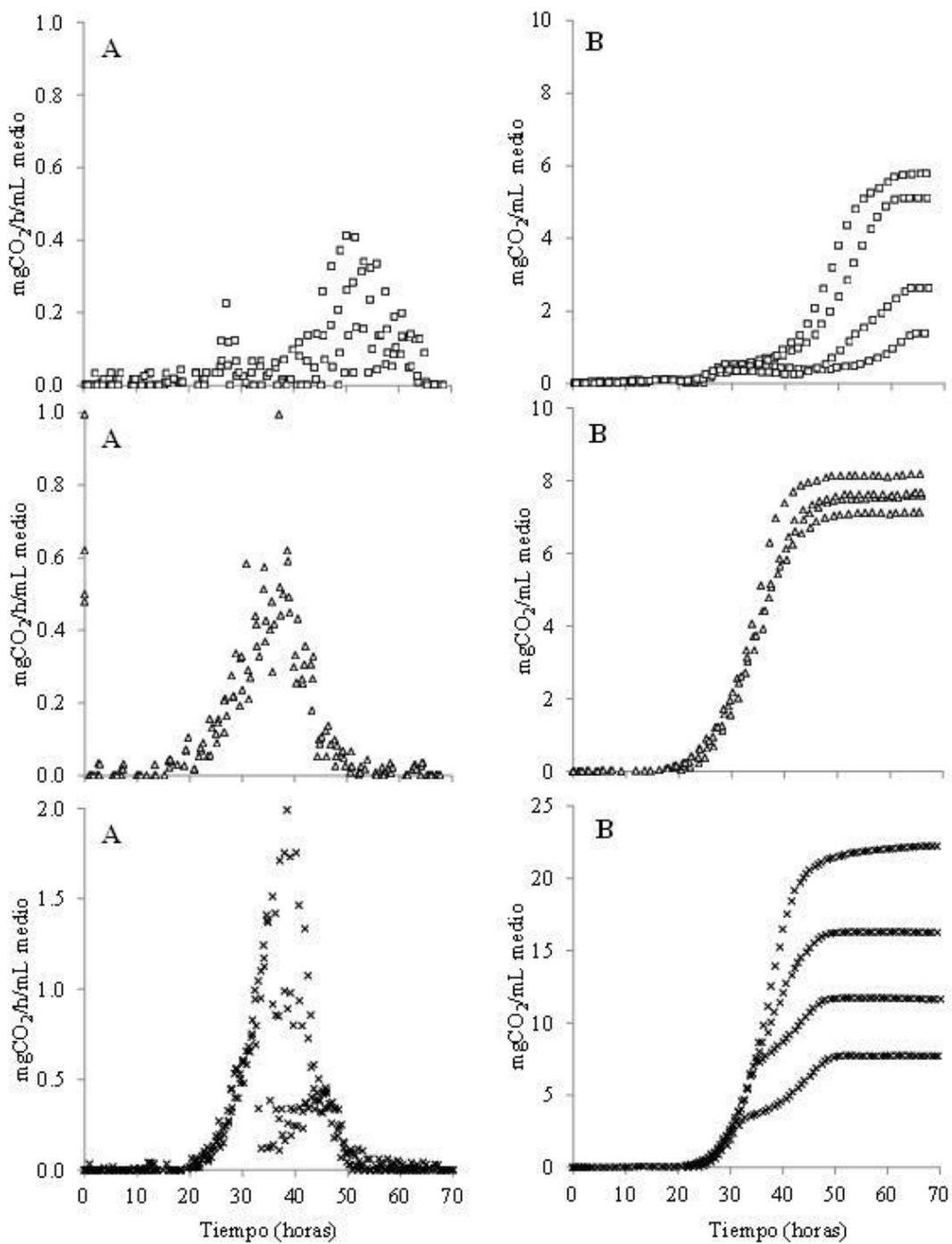


Fig. A.2 Tasa de producción de CO₂ (mg/h/g_{ss}) (A) y producción de CO₂ (mg/g_{ss}) (B) del CS de *A. niger* 10. Medios de cultivo: A20G0 (□), A20G10 (△) y A20G20 (×).

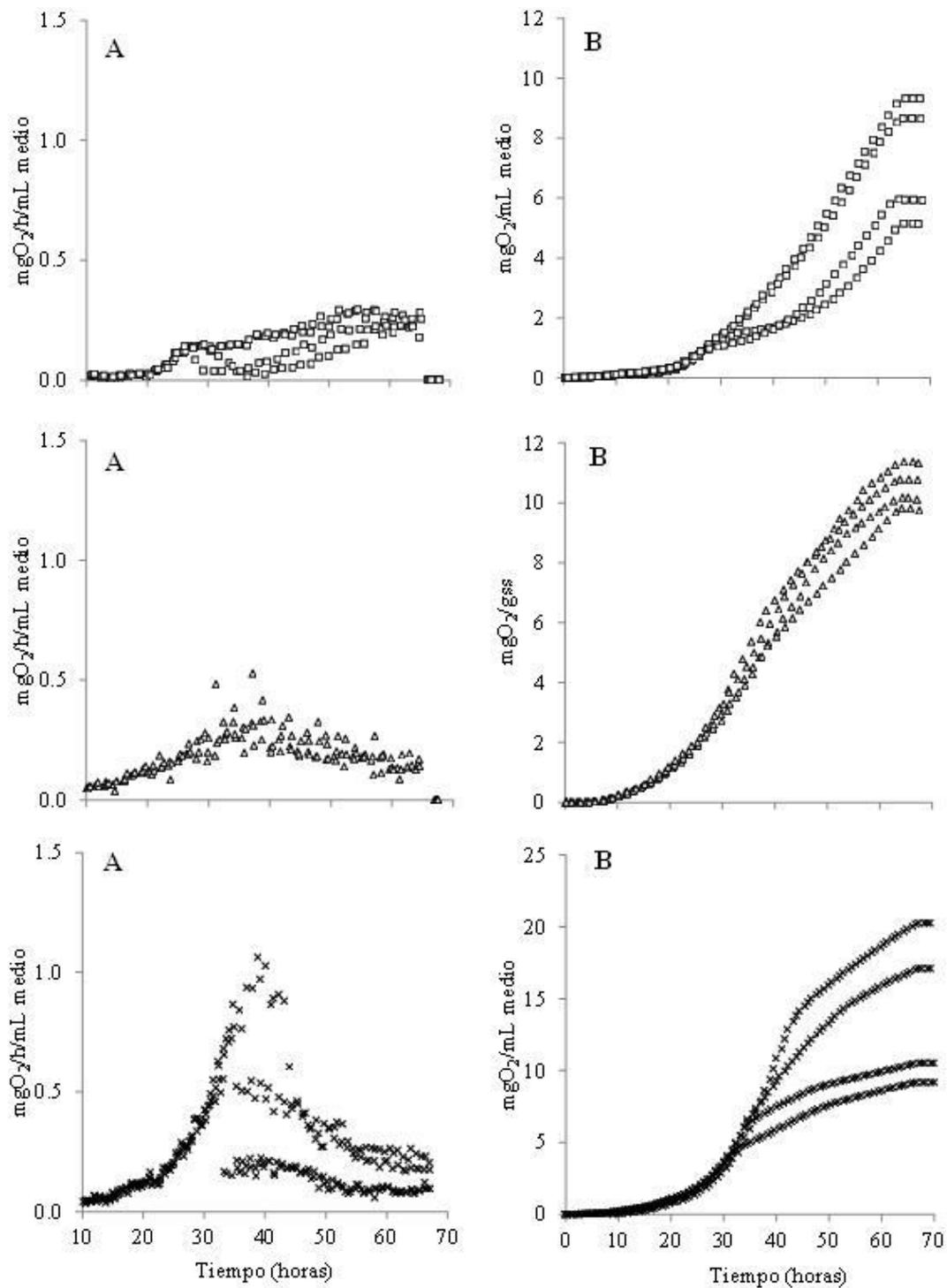


Fig. A.3 Tasa de consumo de O₂ (mg/h/g_{ss}) (A) y consumo de O₂ (mg/g_{ss}) (B) del CS de *A. niger* 10. Medios de cultivo: A20G0 (□), A20G10 (△) y A20G20 (×).

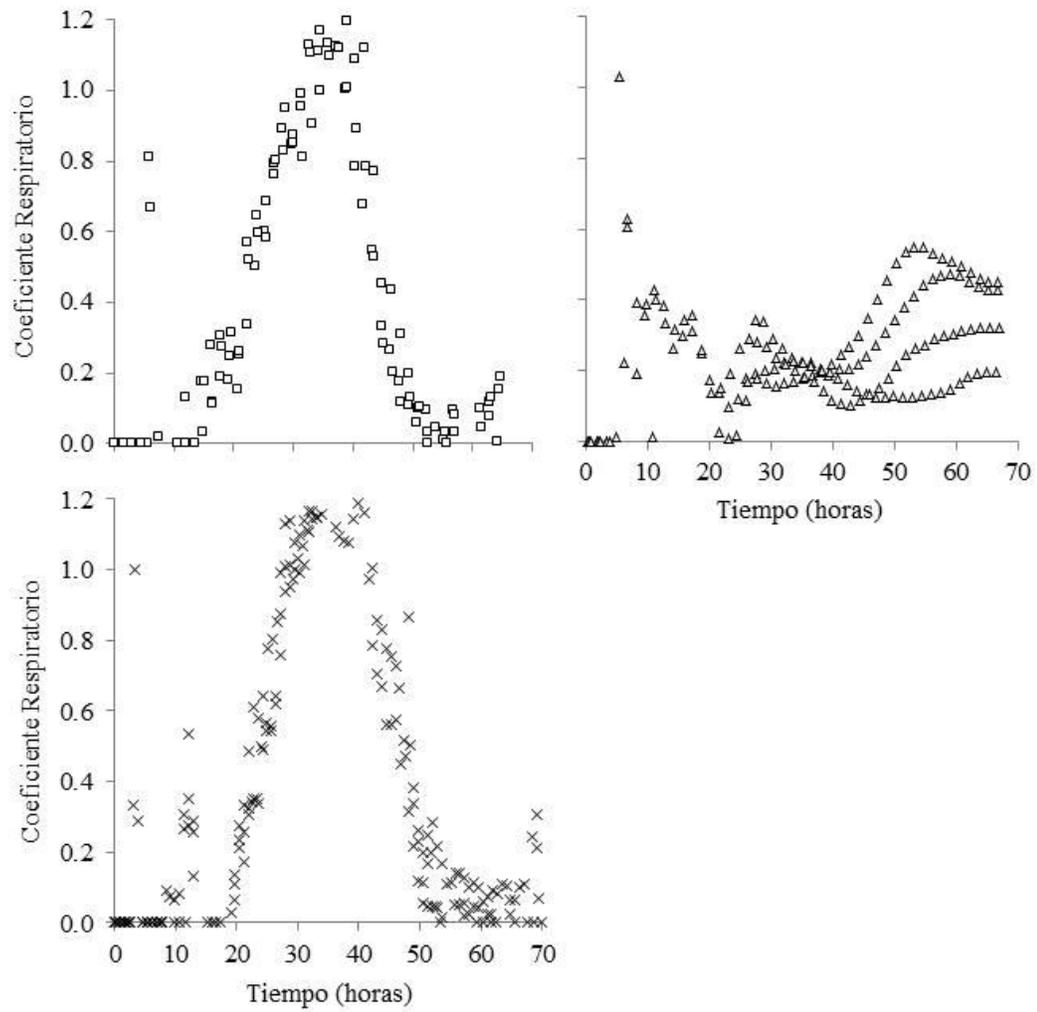


Fig. A.4 Coeficiente respiratorio del CS de *A. niger* 10. Medios de cultivo: A20G0 (\square), A20G10 (\triangle) y A20G20 (\times).

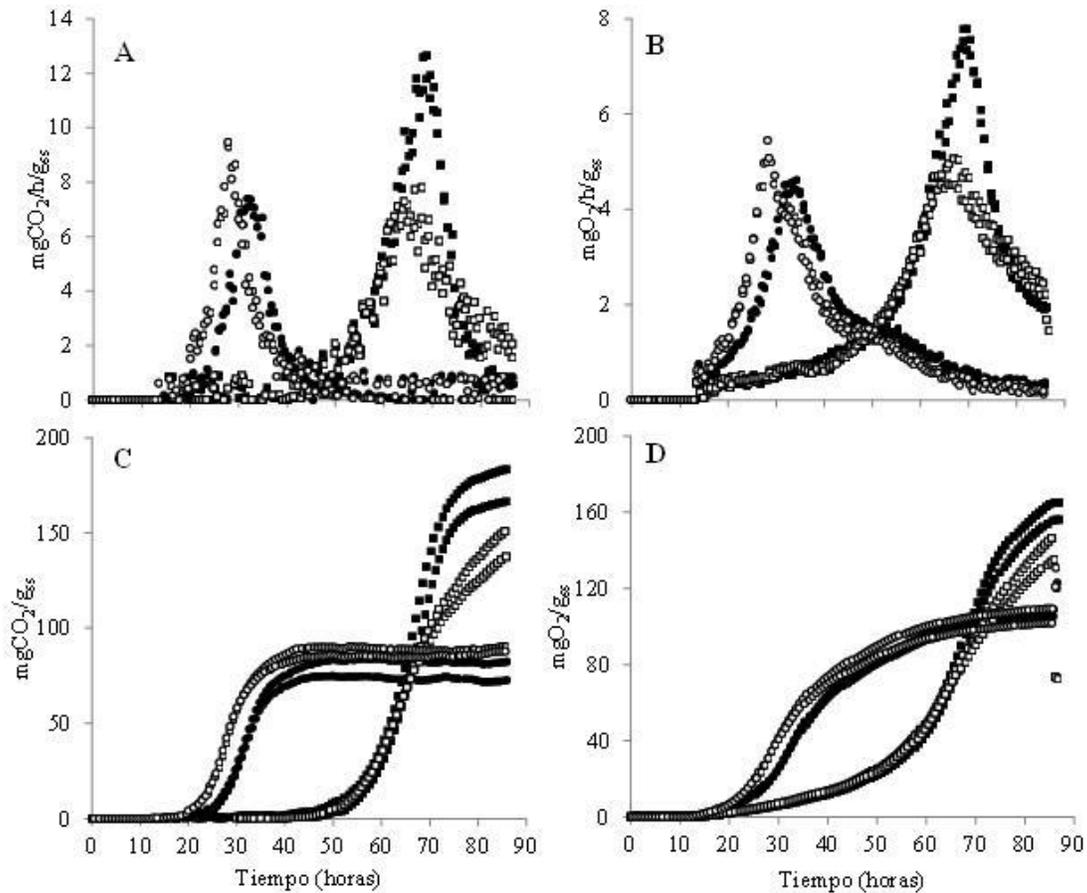


Fig. A.5 Tasa de producción de CO₂ (mg/h/g_{ss}) (A), producción de CO₂ (mg/g_{ss}) (B), tasa de consumo de O₂ (mg/h/g_{ss}) (C) y consumo de O₂ (mg/g_{ss}) (D) del CMS de *A. niger* 10. Sistemas/medios de cultivo: matraz Erlenmeyer/A20G80 (○), columna/A20G80 (●), matraz Erlenmeyer/A20G180 (□) y columna/A20G180 (■).

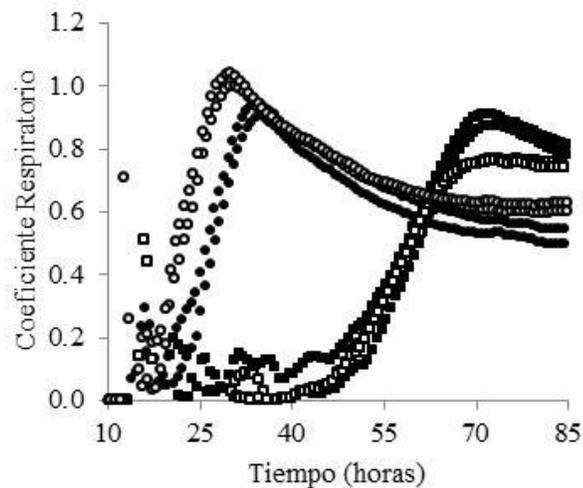


Fig. A.6 Coeficiente respiratorio del CMS de *A. niger* 10. Sistemas/medios de cultivo: A20G80/matraz Erlenmeyer 250 mL (○), A20G80/columna (●), A20G180/matraz Erlenmeyer 250 mL (□) y A20G180/columna (■).

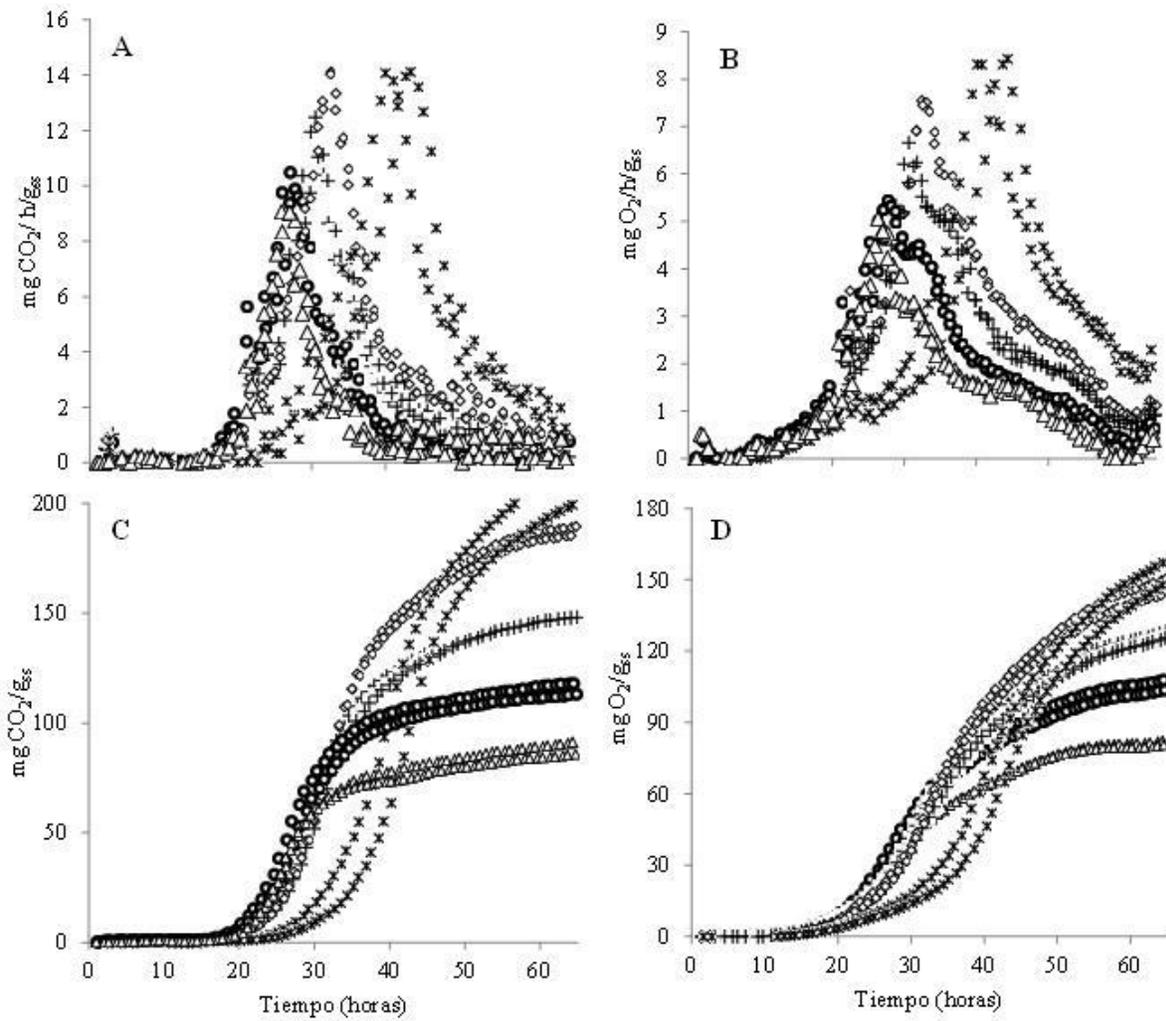
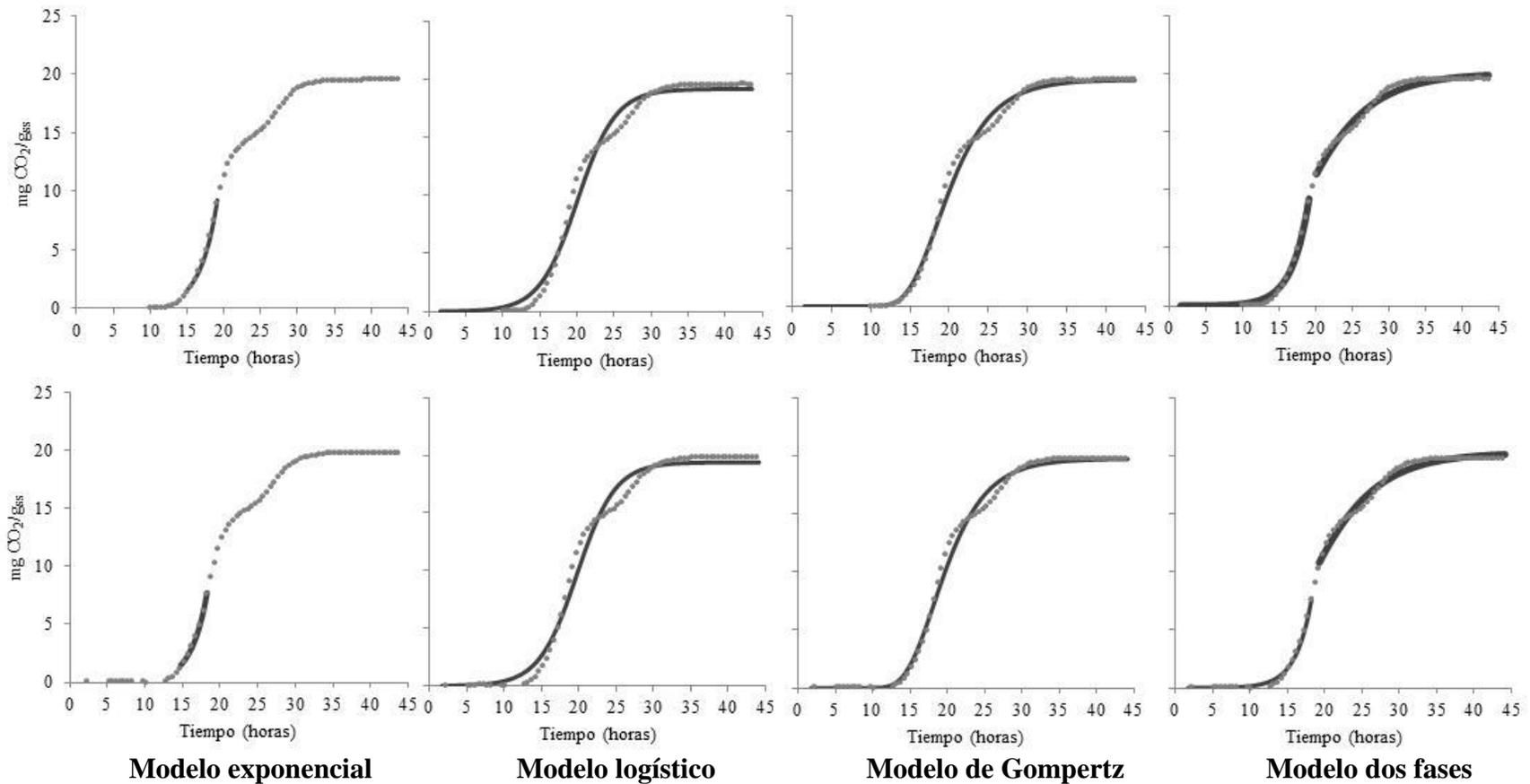


Fig. A.7 Tasa de producción de CO₂ (mg/h/g_{ss}) (A), producción de CO₂ (mg/g_{ss}) (B), tasa de consumo de O₂ (mg/h/g_{ss}) (C) y consumo de O₂ (mg/g_{ss}) (D) del CMS de *A. niger* 10. Medios de cultivo: A20G60 (△), A20G80 (●), A20G100 (+), A20G120 (◇), A20G140 (*).

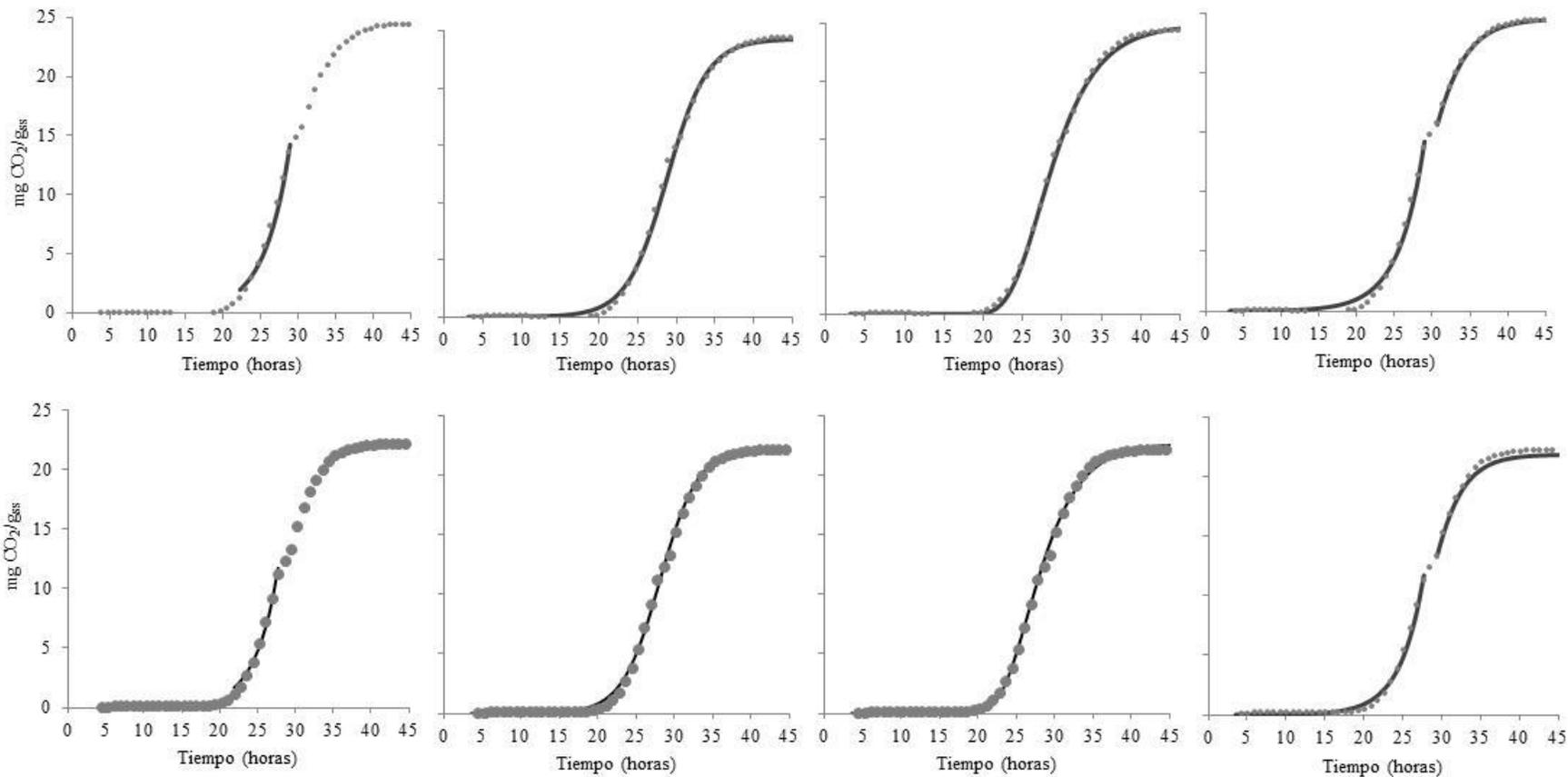
ANEXO E. Ajuste de modelos a la curva de producción de CO₂

Se muestran las gráficas de los ajustes de modelos a las curvas de producción de CO₂ de los resultados de la parte 3. Los modelos ajustados fueron: exponencial, logístico, Gompertz y el de dos fases de Ikasari y Mitchell (2000).

Cultivo A0G20



Cultivo A20G0



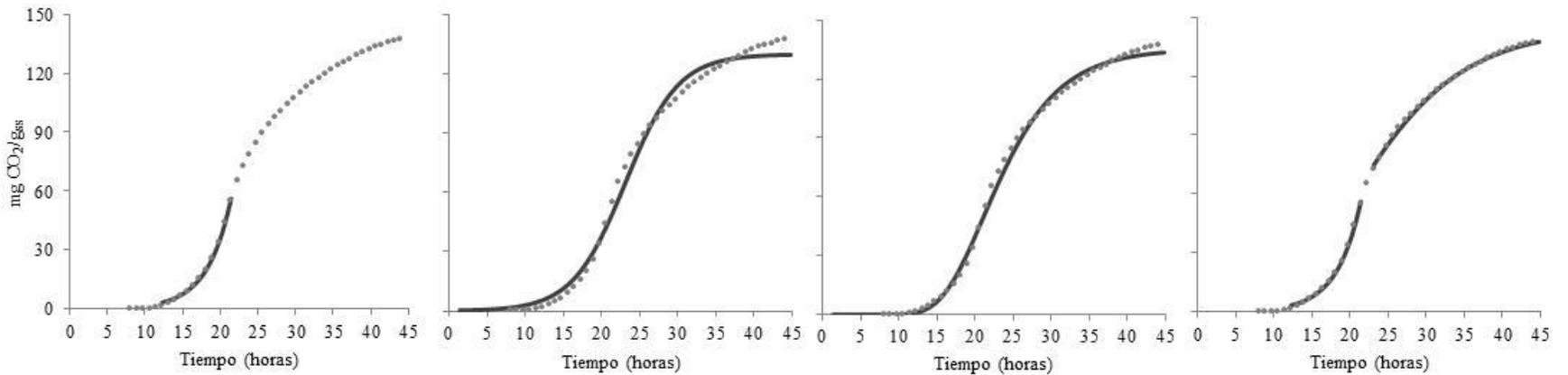
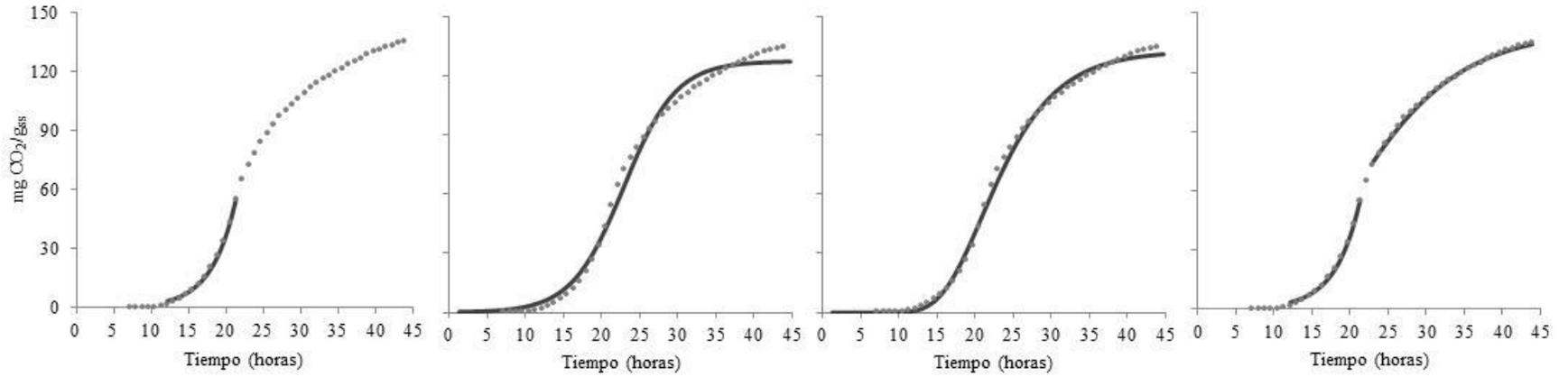
Modelo exponencial

Modelo logístico

Modelo de Gompertz

Modelo dos fases

Cultivo A20G60



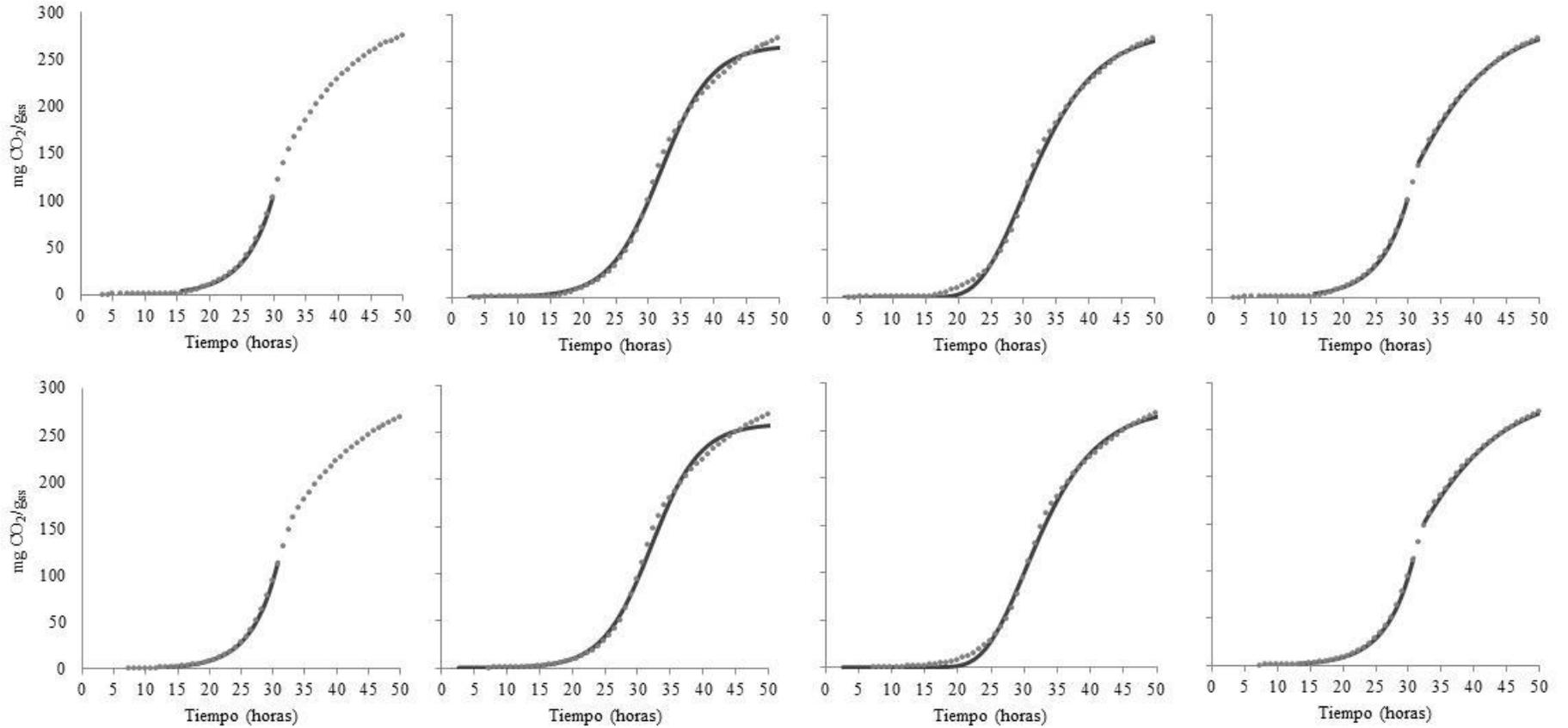
Modelo exponencial

Modelo logístico

Modelo de Gompertz

Modelo dos fases

Cultivo A20G120



Modelo exponencial

Modelo logístico

Modelo de Gompertz

Modelo dos fases

ANEXO F. Resumen del análisis de cambio de abundancia

Tabla A.4 Resumen del análisis de cambio de abundancia de los “spots” de proteína detectados en las imágenes de la electroforesis de 2-D de la proteína extracelular del CMS de *A. niger* 10 en los tres medios de cultivo evaluados. Cada análisis corresponde al mismo “spot” que se pudo haber detectado en uno, en dos o en los tres medios de cultivo evaluados. SSP, número asignado al “spot” de proteína por el programa PDQuest™. ^aPM, peso molecular (kDa) experimental estimado de la electroforesis en 2D. ^bpI, punto isoeléctrico experimental estimado de la electroforesis en 2D. “Fold” 1, A20G0 contra A20G60. “Fold” 2, A20G0 contra A20G120. “Fold” 3, A20G60 contra A20G120.

No. análisis	Medio de cultivo															“Fold”					
	A20G0						A20G60						A20G120								
	SSP	Cantidad normalizada del “spot”			PM ^a (kDa)	pI ^b	SSP	Cantidad normalizada del “spot”			PM ^a (kDa)	pI ^b	SSP	Promedio	D.E.	C.V.	PM ^a (kDa)	pI ^b	1	2	3
	Promedio	D.E.	C.V.			Promedio	D.E.	C.V.				Promedio	D.E.	C.V.							
1						1803	16629.5	4928.4	29.6	88.3	3.8										
2						806	324724.4	4812.6	1.5	104.6	3.4										
3						707	459462.0	45832.7	10.0	87.4	3.4										
4						706	382233.8	30628.7	8.0	74.6	3.4	1802	36173.3	32516.3	89.9	89.0	3.0				10.6
5						1702	233270.7	67177.1	28.8	61.2	3.7	1601	33674.0	29490.5	87.6	62.9	3.0				6.9
6						1602	74807.2	58565.1	78.3	48.3	3.8										
7												1703	17795.9	8219.6	46.2	61.9	3.1				
8						1401	15432.0	2818.2	18.3	19.8	3.7										
9						1302	38311.5	3993.9	10.4	17.3	3.8										
10						1301	32287.8	9095.4	28.2	14.5	3.7										
11						1101	26093.4	15095.1	57.9	6.3	3.8										
12						2903	994834.7	211757.9	21.3	115.9	4.7										
13	2501	16006.7	13068.4	81.6	130.0	4.4	2901	73709.0	24403.3	33.1	112.6	4.4								4.6	
14	2405	55134.0	1429.9	2.6	101.5	4.5	2801	1374689.3	48553.3	3.5	88.3	4.6								24.9	
15	1501	34020.4	42100.8	123.8	125.4	4.1	1805	144742.6	32794.8	22.7	103.8	4.2	1811	9112.0	2174.6	23.9	117.2	4.0	4.3	3.7	15.9
16							1804	105730.7	78704.1	74.4	103.3	3.9	1809	11804.7	4187.5	35.5	115.5	3.7			9.0
17	801	179889.9	183755.2	102.1	94.5	3.9	1704	56831.7	6454.2	11.4	82.9	4.1	1806	23219.0	1772.9	7.6	99.1	3.6	3.2	7.7	2.4
18							1806	61828.7	33632.8	54.4	92.4	4.3	1813	22516.9	11979.0	53.2	94.2	4.0			2.7
19	3501	84761.1	2483.0	2.9	127.7	5.0	3801	216767.5	81864.4	37.8	95.8	5.2								2.6	
20	4402	4099.2	1800.7	43.9	98.0	5.3	3702	53750.3	2735.1	5.1	75.3	5.5								13.1	
21	4401	13189.7	14395.0	109.1	109.0	6.0															
22							4703	14370.3	489.4	3.4	80.7	5.9									
23							4801	19650.2	131.9	0.7	100.2	5.9									
24							4802	40888.7	6208.4	15.2	107.4	6.1									
25							4803	9846.3	258.7	2.6	105.7	6.3									
26							5801	15524.3	6134.3	39.5	106.0	6.4									
27							5802	22426.8	2512.4	11.2	106.1	7.0									
28							1706	642145.9	254266.3	39.6	61.7	4.2	1708	168272.9	68803.9	40.9	65.9	3.6			3.8
29	2402	159490.7	102034.8	64.0	71.8	4.4	2705	364479.3	167809.8	46.0	61.9	4.4	2703	29435.3	4443.9	15.1	61.7	4.3	2.3	5.4	12.4
30	2406	125691.5	57546.5	45.8	71.2	4.6	2707	570777.1	34008.4	6.0	61.3	4.6	2704	918064.5	641724.4	69.9	69.1	4.4	4.5	7.3	1.6
31	1302	147029.3	22190.2	15.1	63.0	4.1	1605	65308.0	8110.8	12.4	50.3	4.2	2602	8697.1	1116.8	12.8	55.2	4.1	2.3	16.9	7.5

83	4308	10924.9	7602.6	69.6	53.8	5.9	4504	24216.3	2876.9	11.9	42.2	6.0	4604	76257.2	564.1	0.7	51.2	5.7	2.2	7.0	3.1
84	4207	17461.0	2498.7	14.3	48.0	5.8	4503	37795.7	990.2	2.6	37.5	6.0							2.2		
85							4501	8853.0	1045.1	11.8	35.6	5.8	4602	27847.2	399.5	1.4	41.7	5.5			3.1
86	4223	54796.7	53312.4	97.3	37.7	5.5	3506	53732.4	17805.1	33.1	30.2	5.7							1.0		
87							4505	30166.3	8477.9	28.1	32.0	6.1	4505	193895.8	39090.8	20.2	38.2	5.8			6.4
88	5202	4588.2	534.0	11.6	36.1	6.3	5501	15820.4	6831.6	43.2	30.4	6.4	5502	35174.6	10082.6	28.7	30.9	6.1	3.4	7.7	2.2
89	4208	9832.3	3338.4	34.0	48.7	5.9															
90	4307	39452.7	49956.0	126.6	58.1	5.5															
91	4305	37141.5	16958.4	45.7	51.7	5.5															
92	4212	19904.3	18951.3	95.2	41.9	5.5															
93	4209	19244.3	16023.9	83.3	48.3	6.2															
94													4503	30693.3	14775.9	48.1	35.9	5.7			
95	5203	2850.5	425.7	14.9	48.5	6.4	5503	32018.0	82.1	0.3	36.9	6.6	5506	31817.6	8343.0	26.2	39.9	6.3	11.2	11.2	1.0
96	6301	3929.5	1570.5	40.0	50.1	6.7	5505	25901.9	3209.9	12.4	36.1	7.0	6502	33545.1	24758.5	73.8	43.3	6.5	6.6	8.5	1.3
97							5506	15258.3	2788.7	18.3	32.4	7.2	6505	22981.4	2143.0	9.3	35.7	6.9			1.5
98	5301	4592.6	2422.9	52.8	56.6	6.5															
99													5504	23273.6	2029.3	8.7	40.0	6.2			
100													5607	54400.1	482.7	0.9	47.6	6.3			
101													5505	29549.1	3178.0	10.8	32.0	6.3			
102							6501	4402.2	782.1	17.8	40.1	7.3	7602	22912.6	1904.4	8.3	48.9	7.0			5.2
103							6502	56488.5	5963.3	10.6	32.3	7.4	7503	99116.9	22691.8	22.9	35.4	7.1			1.8
104							6503	42378.3	7159.8	16.9	30.4	7.7									
105	2407	13915.5	6560.6	47.1	29.5	4.5															
106	2103	38137.1	5570.7	14.6	23.2	4.5															
107													2505	14566.5	9833.6	67.5	28.8	4.4			
108													2506	9336.5	5258.4	56.3	28.8	4.5			
109													2402	10048.1	3176.1	31.6	24.6	4.4			
110	3201	23087.5	16899.2	73.2	32.3	5.1	3401	49002.1	10122.2	20.7	24.7	5.2	3402	17197.4	10877.7	63.3	26.1	5.1	2.1	1.3	2.8
111	3205	459452.0	58620.8	12.8	25.6	5.2	3403	10591.2	217.2	2.1	20.0	5.5							43.4		
112							3402	6567.5	2320.6	35.3	26.8	5.5	3403	52653.4	17068.6	32.4	28.1	5.3			8.0
113							2405	18926.9	3128.3	16.5	26.6	5.0									
114	2206	51302.4	4957.0	9.7	28.5	4.6															
115	3202	58188.0	16651.1	28.6	29.3	4.9															
116	4211	168846.8	38856.5	23.0	26.5	5.4	3405	8766.9	2358.1	26.9	20.4	5.7	4410	46118.0	46306.0	100.4	18.3	5.5	19.3	3.7	5.3
117	4214	15419.9	325.0	2.1	26.9	5.8	4403	51078.4	9468.3	18.5	20.9	5.9							3.3		
118							3406	24600.5	429.5	1.7	22.7	5.7	4404	17693.1	5263.1	29.7	21.6	5.6			1.4
119							4405	38495.4	17558.4	45.6	24.7	6.1									
120							4402	16153.1	3786.2	23.4	25.5	5.9	4407	36515.8	17850.9	48.9	27.2	5.8			2.3
121							3407	16256.7	4561.0	28.1	26.6	5.7	4502	66355.1	12357.1	18.6	28.1	5.5			4.1
122	4222	27750.4	21256.9	76.6	37.3	5.9	4404	26109.7	9389.2	36.0	28.7	6.0	4504	10549.3	1400.4	13.3	28.9	5.7	1.1	2.6	2.5
123	4204	23833.3	18560.9	77.9	36.0	6.1	4406	32084.4	6361.4	19.8	27.8	6.2	5402	11094.4	4681.1	42.2	25.9	6.0	1.3	2.1	2.9
124													5401	9991.7	4078.5	40.8	22.1	6.0			
125	5201	8451.1	1982.7	23.5	25.0	6.2															
126	4221	5548.9	4204.6	75.8	32.2	6.2															
127							5401	10347.9	979.0	9.5	26.8	6.6	5407	19735.5	8731.3	44.2	26.8	6.3			1.9
128							5402	16295.6	3686.8	22.6	25.4	6.6									
129													6503	15916.9	5352.7	33.6	30.5	6.6			
130													6504	13487.5	2526.3	18.7	29.1	6.8			
131							6401	23949.6	9307.3	38.9	27.5	7.3	7501	19553.8	847.0	4.3	29.0	7.0			1.2
132													7402	20452.9	6249.6	30.6	20.6	7.0			
133	2105	4649.7	1213.7	26.1	13.2	4.3	1303	43244.0	4445.4	10.3	12.5	4.3	2301	10518.4	1512.8	14.4	12.2	4.1	9.3	2.3	4.1

134	2107	54004.6	10909.5	20.2	19.7	4.4															
135	2108	65729.8	22123.3	33.7	19.1	4.5															
136	2117	8994.8	7910.6	87.9	16.9	4.5															
137	3103	29836.8	15573.8	52.2	18.7	4.8	3301	15013.9	912.6	6.1	17.3	5.2	3401	10518.2	73.9	0.7	18.0	4.7	2.0	2.8	1.4
138	3104	15762.5	2700.7	17.1	22.3	5.0	3306	17001.4	2469.2	14.5	17.3	5.5							1.1		
139													3301	35909.0	17132.4	47.7	16.4	4.7			
140													2302	29761.8	2493.6	8.4	14.9	4.3			
141													3302	8881.9	2514.5	28.3	12.4	4.8			
142							2304	25518.0	31.7	0.1	18.8	4.9									
143							3307	22642.8	1651.0	7.3	13.6	5.5									
144							3309	10194.1	1328.2	13.0	17.2	5.7									
145							4304	7549.4	4137.4	54.8	16.9	5.9									
146							4306	41552.7	852.2	2.1	13.4	6.1									
147							5301	26079.2	4284.4	16.4	14.6	6.4									
148	4102	9532.8	9228.8	96.8	18.2	5.4	4303	7656.7	851.7	11.1	15.2	5.9	4304	152760.1	58308.4	38.2	14.6	5.8	1.2	16.0	20.0
149							5302	13205.1	2900.4	22.0	13.4	6.4	5304	32218.9	9624.5	29.9	13.4	6.3			2.4
150							5306	19249.0	2987.0	15.5	17.1	7.0									
151							5304	10942.6	3645.3	33.3	14.5	6.8									
152							5303	25369.6	4778.4	18.8	12.7	6.7									
153	6102	16205.8	9210.6	56.8	14.0	6.7	5305	331374.0	24247.2	7.3	12.6	7.0	6301	249158.6	99223.8	39.8	12.9	6.6	20.4	15.4	1.3
154							6302	43980.9	5286.5	12.0	13.7	7.5	7303	22553.6	2046.1	9.1	14.2	7.2			2.0
155													7307	29429.5	2532.1	8.6	14.6	7.4			
156													7305	22554.5	1388.9	6.2	11.9	7.3			
157	2106	4472.8	2487.7	55.6	12.8	4.5	2204	109698.8	17068.2	15.6	11.2	4.6	2202	29417.0	23750.9	80.7	11.4	4.5	24.5	6.6	3.7
158	1102	10042.9	376.6	3.7	11.6	4.0	1202	52661.8	7906.8	15.0	10.7	4.3								5.2	
159	2109	7031.0	8610.0	122.5	9.7	4.1	1203	21717.0	17430.2	80.3	9.4	4.4								3.1	
160	2111	9603.4	2203.4	22.9	8.6	4.2	2201	68107.7	1319.9	1.9	8.7	4.5								7.1	
161	1103	19515.7	753.9	3.9	8.3	3.9	1201	9911.8	2258.0	22.8	8.4	4.2								2.0	
162	2110	24472.3	22198.5	90.7	10.0	4.3															
163	2112	6062.5	7575.6	125.0	8.8	4.4															
164							2305	13843.3	1609.5	11.6	11.1	5.0	3202	16953.6	11445.7	67.5	10.9	4.8			1.2
165							2202	9433.3	1703.5	18.1	9.5	5.0	2203	13785.9	180.1	1.3	8.6	4.6			1.5
166							3202	27463.3	8608.5	31.3	9.3	5.5	3106	9532.5	4045.4	42.4	8.2	5.0			2.9
167							3201	8288.8	1882.8	22.7	10.0	5.2									
168							3203	6459.5	1561.5	24.2	8.1	5.5									
169													3201	24489.0	5433.2	22.2	9.9	4.7			
170							4302	66040.8	8778.3	13.3	12.3	5.8	3306	27826.2	15015.3	54.0	12.4	5.5			2.4
171							4301	56231.0	7614.1	13.5	11.1	5.8	3206	66999.8	17561.7	26.2	10.2	5.4			1.2
172							4305	31785.2	6074.9	19.1	11.3	6.0	4202	24573.7	12445.4	50.6	11.4	5.6			1.3
173							3204	40516.4	9296.7	22.9	9.0	5.7	3107	98344.5	69722.9	70.9	7.2	5.4			2.4
174							4204	55803.9	8031.6	14.4	9.0	6.0	4102	35156.0	13445.6	38.2	8.1	5.6			1.6
175							4205	132890.0	16915.0	12.7	9.6	6.3	5201	23639.6	3618.3	15.3	8.5	6.0			5.6
176							4202	17712.2	11668.0	65.9	10.1	5.8									
177													4203	47980.8	14825.5	30.9	9.9	5.7			
178													4206	163143.2	1214.2	0.7	10.8	5.9			
179							5209	27200.1	1844.4	6.8	10.2	7.2	6202	49759.6	9243.4	18.6	9.0	6.8			1.8
180							5204	25029.7	9689.3	38.7	10.1	6.6									
181							5202	48786.3	3064.6	6.3	8.2	6.5									
182							5206	13766.0	589.5	4.3	9.2	6.8									
183							5208	17555.1	4690.1	26.7	8.7	7.1									
184	8104	8145.3	5334.7	65.5	9.8	7.3	6201	31354.6	2353.2	7.5	10.5	7.7	7208	5997.3	2733.0	45.6	8.8	7.4	3.8	1.4	5.2

185													7207	23733.5	8923.2	37.6	8.6	7.1			
186													7202	94882.8	22208.1	23.4	10.8	7.4			
187													7205	30691.8	792.0	2.6	10.1	7.5			
188	1104	12161.5	12176.9	100.1	7.0	4.1	1102	43537.8	2142.9	4.9	7.4	4.2	1101	7750.7	2367.5	30.5	6.8	4.0	3.6	1.6	5.6
189							2101	27948.8	6903.9	24.7	5.8	4.4									
190	2113	24087.3	9196.1	38.2	7.6	4.6	2203	35476.1	3987.7	11.2	7.6	5.0							1.5		
191							2103	15554.0	7120.9	45.8	7.1	5.0	3101	47410.3	11996.7	25.3	6.3	4.7			3.0
192							2102	48175.2	12432.3	25.8	6.2	4.8									
193							2104	7871.7	221.8	2.8	6.3	5.1									
194							3101	38515.7	8812.2	22.9	5.7	5.2									
195							3102	14256.7	742.4	5.2	6.6	5.5									
196													2101	54032.5	24546.5	45.4	6.6	4.3			
197							3103	4713.0	3070.3	65.1	7.6	5.6									
198							3104	43446.5	8664.6	19.9	6.3	5.7									
199							4101	36467.0	4120.0	11.3	7.1	5.9									
200							4103	92243.6	31635.0	34.3	5.8	5.9									
201							5207	29467.2	4749.3	16.1	7.8	7.0	6102	50174.9	28457.4	56.7	7.3	6.4			1.7
202							5201	44179.3	2701.4	6.1	7.6	6.4									
203							5101	51851.7	4858.7	9.4	7.1	6.5									
204							5102	58980.0	11417.6	19.4	6.1	6.5									
205							5103	112828.2	491.8	0.4	6.6	6.8									
206							5104	26426.3	1638.1	6.2	7.3	7.1									
207							6105	61910.3	10790.5	17.4	7.5	7.8	7104	126621.0	105060.7	83.0	6.4	7.4			2.0
208							6102	63839.5	12926.9	20.2	6.6	7.3									
209							6103	152727.3	12575.8	8.2	6.7	7.5									
210							6301	84740.4	2930.8	3.5	17.4	7.3	7401	30914.4	4103.6	13.3	17.3	7.0			2.7
211													8105	55472.7	45418.3	81.9	6.9	9.5			
212													8203	83164.4	80702.4	97.0	9.7	9.5			
213													8302	24863.7	3680.7	14.8	13.7	9.5			
214	8103	8743.3	987.0	11.3	8.2	8.8							8101	22575.1	2366.4	10.5	6.8	8.6			2.6
215													8501	11272.5	3621.1	32.1	29.7	8.4			
216													8502	7539.5	46.7	0.6	28.3	8.6			
217													8504	19201.2	5115.4	26.6	28.5	9.0			
218	8105	4565.3	768.7	16.8	7.2	8.0	6107	18578.4	5312.1	28.6	7.1	8.1							4.1		
219													8201	165621.1	29018.5	17.5	11.2	8.2			
220							6505	101702.3	14711.1	14.5	30.3	8.1	7506	60405.9	1368.3	2.3	37.8	7.7			1.7
221													7603	17942.7	3571.9	19.9	60.6	8.0			

ANEXO G. Información de las proteínas extracelulares identificadas por MALDI-TOF MS

Tabla A.5 Información de las proteínas extracelulares identificadas por MALDI-TOF MS del CMS de *A. niger* 10 en el mismo estado fisiológico.

“Spot” ^{aa}	Nombre de la proteína	No. acceso NCBI	Teo. PM/ pI ^b	Exp. PM/ pI ^c	Especies	“Score” de Mascot ^d	NPM ^e	CS ^f (%)
Amilasas								
GlaA1	Glucoamilasa	CAK38411.1	68.8 4.3	115.9 4.7	<i>A. niger</i>	111	11	36
GlaA2	Glucoamilasa	CAK38411.1	68.8 4.3	104.6 3.4	<i>A. niger</i>	70	7	21
GlaA3	Glucoamilasa	CAK38411.1	68.8 4.3	94.9 4.6	<i>A. niger</i>	82	9	29
AmyA1	α -Amilasa	CAK46324.1	55.2 4.5	65.1 4.4	<i>A. niger</i>	130	13	29
AmyA2	α -Amilasa	CAK46324.1	55.2 4.5	56.1 4.2	<i>A. niger</i>	82	9	21
Estrés oxidativo								
SodC	Superóxido dismutasa [Cu-Zn]	A2QMY6.1	16.1 5.9	13.2 6.8	<i>A. niger</i>	83	6	58
Metabolismo								
PrxII	Peroxiredoxin PrxII tipo 2	CAK41307.1	18.7 5.4	10 7.5	<i>Brassica napus</i>	55	4	29
PrxII	Peroxiredoxin PrxII tipo 2	CAK41307.1	18.7 5.4	10 7.1	<i>Brassica napus</i>	102	8	57
PrxII	Peroxiredoxin PrxII tipo 2	CAK41307.1	18.7 5.4	10 7	<i>Brassica napus</i>	67	4	36
Nmt1	Proteína nmt1	CAK44380.1	38.4 5.8	49.6 5.5	<i>A. parasiticus</i>	98	11	39
An02g04970	Proteína hipotética An02g04970	CAK37605.1	58.2 6.2	11.1 4.1	<i>A. niger</i>	55	7	14
Mdh1	Malato deshidrogenasa Mdh1	CAK39307.1	35.7 8.9	34.1 7.9	<i>S. cerevisiae</i>	147	11	45
Alr	Aldehído reductasa dependiente de NADPH	CAK45849.1	42.2 6.3	55.8 6.2	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	56	6	25
Tal1	Transaldolasa	CAK48135.1	35.6 5.6	16 5.7	<i>A. niger</i>	128	13	30
Tal1	Transaldolasa	CAK48135.1	35.6 5.6	49.1 5.9	<i>A. niger</i>	109	10	31
Ara1	D-arabinosa deshidrogenasa Ara1	CAK43815.1	37.0 6.0	47.6 6.3	<i>S. cerevisiae</i>	120	11	48
Ara1	D-arabinosa deshidrogenasa Ara1	CAK43815.1	37.0 6.0	33.9 7.3	<i>S. cerevisiae</i>	71	5	27
Ipp1	Pirofosfatasa inorgánica Ipp1	CAK96430.1	32.5 5.2	49.6 5.5	<i>S. cerevisiae</i>	100	10	46
Met6	5-metiltetrahydropteroltriglutamato – homocisteína S-metiltransferasa Met6	CAK47939.1	87.2 6.2	51.5 6.6	<i>S. cerevisiae</i>	95	13	22
YcnE	Proteína hipotética ycnE	CAK41553.1	12.3 5.6	9.1 6.1	<i>Bacillus subtilis</i>	63	4	42
Spe3	Espermidina sintasa Spe3	CAK45626.1	33.6 5.3	38.6 5.7	<i>S. cerevisiae</i>	89	7	33

^aEl nombre del “spot” corresponde al nombre del gene/proteína de acuerdo a la base de datos de proteínas del NCBI y son las que se muestran en la Fig. 7.3.11. ^bTeo. PM/pI, peso molecular (kDa) y punto isoeléctrico teóricos basados en la secuencia de la proteína identificada. ^cExp. PM/pI, peso molecular (kDa) y punto isoeléctrico experimentales estimados de los geles de 2D. ^dProteína con “Score” de Mascot mayor al límite de 54 fue considerada como significativa ($p < 0.05$). ^eNPM, número de péptidos que hicieron “match”. ^fCS, cobertura de la secuencia de aminoácidos de las proteínas identificadas.

ANEXO H. Búsqueda de proteínas analizadas mediante MALDI-TOF MS en Mascot que no tuvieron un “score” global valido

Tabla A.6 Proteína con el “score” más alto de los “spots” de proteína que no tuvieron un “score” global valido de Mascot analizados mediante MALDI-TOF MS.

Medio de cultivo	No. “spot” ^a	Nombre de la proteína (probable función) ^b	Teo.		Exp.		“Score” de Mascot ^e	NPM ^f	CS ^g (%)
			PM/	pI ^c	PM/	pI ^d			
A20G60	3104	<i>A. niger</i> contig An07c0220	14,902	10.2	10	5.7	38	3	27
A20G60	5103	<i>A. niger</i> contig An12c0070	33,181	5.2	10	6.8	36	3	13
A20G60	6102	<i>A. niger</i> contig An12c0290	18,688	5.4	10	7.3	42	3	24
A20G0	2111	<i>A. niger</i> contig An07c0130	5,569	3.8	10	4.2	46	3	30
A20G120	6201	<i>A. niger</i> contig An12c0290	18,688	5.4	10	6.4	48	4	29
A20G120	7603	<i>A. niger</i> contig An07c0260	53,650	5.8	60.6	8.0	42	5	10
A20G60	4403	<i>A. niger</i> contig An07c0150	105,087	5.9	20.9	5.9	44	5	5
A20G60	4601	<i>A. niger</i> contig An06c0090	6,922	10.5	51.3	5.8	39	3	41
A20G60	5702	<i>A. niger</i> contig An04c0370	13,959	8.4	69.8	6.5	30	2	15
A20G0	2103	<i>A. niger</i> contig An02c0160	40,840	6.2	23.2	4.5	54	6	14
A20G0	2107	Phosphoglycerate kinase	44,390	6.2	19.7	4.4	44	4	17
A20G0	2206	Uncharacterized protein	59,847	6.8	28.5	4.6	28	3	7
A20G0	3205	<i>A. niger</i> contig An15c0220	150,217	8.5	25.6	5.2	46	6	6

^aNo. “spot”, corresponde al número SSP asignado al “spot” de proteína por el programa PDQuestTM, y son los que se muestran en la Fig. 7.3.13. ^bNombre de la proteína, es el asignado por Mascot derivado de la base de datos del proteoma de referencia derivado del genoma anotado de *A. niger* 513.88 (Pel y col. 2007). ^cTeo. PM/pI, peso molecular (kDa) y punto isoeléctrico teóricos basados en la secuencia de la proteína identificada. ^dExp. PM/pI, peso molecular (kDa) y punto isoeléctrico experimentales estimados de los geles de 2D. ^e“Score” de Mascot menor al límite de 54 ($p > 0.05$), por lo cual fueron proteínas que no fueron consideradas como significativas. ^fNPM, número de péptidos que hicieron “match”. ^gCS, cobertura de la secuencia de aminoácidos de las proteínas.

ANEXO I. Espectros de masa de los “spots” de proteínas analizados mediante MALDI-TOF MS

Se muestran los espectros de masa de los “spots” de proteína que fueron identificados como amilasas. Están numerados con el número SSP asignado por el programa PDQuest™ y el medio de cultivo del cual se cortó el “spot” de los geles de electroforesis de 2-D. De la búsqueda en el programa Mascot se muestran los péptidos predichos de la proteína identificada y resaltados con gris los picos de los espectros de masa de los “spots” de proteína que hicieron “match” con la proteína identificada.

1. Glucoamilasa

- Medio S20G60 Spot 2903

Proteína: **Glucoamilasa (GlaA1)**

Número de péptidos que hicieron “match”: **11**

Espectro del Medio S20G60 Spot 2903

m/z	Intens.	SN	Quality Fac.	Res.	Area	Rel. Intens.	FWHM	Chi^2	Bk. Peak
522.834	155.268	6.734	74.463	1530.990	80.857	0.014	0.342	1462.502	0
628.071	247.435	11.098	1762.860	1571.795	151.182	0.023	0.400	241.645	0
637.201	132.769	5.552	587.284	1084.997	103.042	0.012	0.587	93.985	0
731.134	77.853	2.816		6372.359	10.012	0.007	0.115		0
833.312	144.391	6.116	654.223	1155.651	155.117	0.013	0.721	191.686	0
842.369	720.456	34.145	8301.232	1737.933	618.743	0.066	0.485	1240.384	0
851.279	1720.584	82.969	7346.970	1889.470	1395.937	0.157	0.451	6905.714	0
863.372	7373.107	359.010	40174.864	1655.462	7167.948	0.671	0.522	59158.011	0
1022.307	98.949	3.928		3420.939	24.796	0.009	0.299		0
1602.718	6517.425	305.770	69268.207	2770.998	11351.496	0.593	0.578	78358.016	0
1617.769	168.356	6.870	2361.526	2548.313	276.164	0.015	0.635	399.547	0
1633.866	10989.067	518.168	119424.204	2751.301	20157.606	1.000	0.594	131628.943	0
1647.936	487.743	21.897	20662.471	2740.725	877.665	0.044	0.601	923.120	0
1684.923	1490.828	66.795		4277.049	738.465	0.136	0.394		0
1690.577	194.720	7.716		2865.321	103.293	0.018	0.590		0
1708.973	4910.818	240.168	46672.207	2719.718	9988.590	0.447	0.628	64400.293	0
1777.859	490.525	22.783	15313.596	2984.699	915.537	0.045	0.596	1730.286	0
1791.808	266.707	13.132	3058.075	2699.449	568.556	0.024	0.664	878.907	0
1865.179	203.695	8.361		4300.357	89.082	0.019	0.434		0
1866.059	509.490	22.345		4315.060	257.743	0.046	0.432		0
1900.071	101.093	3.915		5408.869	39.588	0.009	0.351		0
1941.003	1093.774	57.204	23722.322	3416.489	2128.969	0.100	0.568	7562.998	0
1967.067	3711.246	208.135	68627.685	3183.211	8208.749	0.338	0.618	27477.850	0
1981.059	126.149	4.691		3710.059	57.222	0.011	0.534		0
1984.043	1669.120	97.734	2217.820	3267.617	3776.898	0.152	0.607	36728.007	0
2012.293	77.594	2.462		8883.803	16.618	0.007	0.227		0
2083.102	73.506	2.536		9808.649	15.693	0.007	0.212		0
2182.108	71.042	2.594		8985.484	17.280	0.006	0.243		0
2244.200	114.072	4.688		4019.225	61.712	0.010	0.558		0
2406.108	172.440	11.611	1196.452	3899.668	383.753	0.016	0.617	707.050	0
2631.281	195.754	14.110	6422.322	4348.333	421.880	0.018	0.605	805.643	0
2653.281	127.103	9.207	1376.675	3981.180	299.364	0.012	0.666	531.504	0
3222.362	316.441	15.686		9337.096	134.597	0.029	0.345		0
3223.293	1082.723	56.023		7994.563	737.097	0.099	0.403		0
3237.324	91.872	8.019	1129.452	4077.197	258.577	0.008	0.794	256.010	0
3961.337	61.254	2.539		15243.600	17.353	0.006	0.260		0
3169.019	305.846	23.672	771.223	4957.736	561.761	0.015	0.827	2615.164	0

- 2. Medio S20G60 Spot 0806

Proteína: **Glucoamilasa (GlaA2)**

Número de péptidos que hicieron “match”: 7

Espectro del Medio S20G60 Spot 0806

m/z	Intens.	SN	Quality Fac.	Res.	Area	Rel. Intens.	FWHM	Chi ²	Bk. Peak
649.222	309.058	3.609		3966.764	46.177	0.110	0.164		0
851.523	329.152	5.329		2321.398	108.124	0.118	0.367		0
863.510	2801.103	58.939		1623.097	1724.919	1.000	0.532		0
870.568	276.161	4.428		3825.432	77.949	0.099	0.228		0
1022.554	319.340	6.851		2835.373	136.710	0.114	0.361		0
1051.154	128.326	2.183		6431.316	16.856	0.046	0.163		0
1216.343	109.455	2.173		5954.414	24.428	0.039	0.204		0
1537.214	86.888	1.889		7167.275	16.574	0.031	0.214		0
1602.572	724.664	26.610		4862.416	319.853	0.259	0.330		0
1633.796	675.235	25.110		3474.156	362.951	0.241	0.470		0
1684.634	115.193	3.064		12929.630	18.132	0.041	0.130		0
1708.560	109.196	2.966		9300.896	18.400	0.039	0.184		0
1777.755	225.923	7.890		3517.992	117.419	0.081	0.505		0
1967.016	237.804	8.744		4272.667	102.994	0.085	0.460		0
2011.242	63.716	1.258		9878.148	6.291	0.023	0.204		0
2082.753	81.133	2.034		12512.027	17.451	0.029	0.166		0
2653.199	98.212	3.328		8840.701	33.366	0.035	0.300		0
3212.487	47.988	1.066		10633.854	6.876	0.017	0.302		0
3222.199	61.231	1.725		12050.820	11.250	0.022	0.267		0

- 2. Medio S20G60 Spot 2801

Proteína: **Glucoamilasa (GlaA3)**

Número de péptidos que hicieron “match”: 9

Espectro del Medio S20G60 Spot 2801

m/z	Intens.	SN	Quality Fac.	Res.	Area	Rel. Intens.	FWHM	Chi ²	Bk. Peak
561.164	407.395	4.579		1435.474	178.403	0.032	0.391	2463.826	0
619.252	480.514	5.984		845.883	416.498	0.038	0.732	920.601	0
677.250	824.831	11.936		1362.031	605.423	0.066	0.497	4499.571	0
699.261	391.217	4.946		462.515	1180.258	0.031	0.592	1042.324	0
851.362	660.466	9.965		11162.796	1724.597	0.053	0.494	1033.488	0
863.464	12565.561	216.494		112180.720	1803.513	1.000	0.479	85674.321	0
885.458	325.215	4.395		870.821	1485.323	0.026	0.596	747.655	0
920.470	486.773	7.465		1498.218	1613.182	0.039	0.571	987.780	0
1022.518	1848.387	33.417		38228.625	1908.081	0.147	0.536	4186.538	0
1079.547	215.000	2.966		7218.662	30.940	0.017	0.150		0
1600.808	300.140	4.959		38.202	2924.843	0.024	0.547	11571.996	0
1602.729	2818.615	59.635		50546.375	2830.755	0.224	0.566	13490.253	0
1633.843	3289.301	70.193		69730.885	2942.661	0.262	0.555	15701.697	0
1659.890	256.000	4.001		3505.585	78.065	0.020	0.473		0
1667.820	301.747	5.044		592.756	2362.818	0.024	0.706	845.810	0
1684.699	222.000	3.305		6641.119	47.214	0.018	0.254		0
1690.851	312.047	5.346		668.655	2407.643	0.025	0.702	1017.852	0
1709.043	238.000	3.777		9765.569	41.887	0.019	0.175		0
1710.040	384.000	6.965		3593.283	154.754	0.031	0.476		0
1940.746	249.000	4.166		11882.622	44.933	0.020	0.163		0
1940.988	242.000	4.011		9644.449	46.030	0.019	0.201		0
1967.036	1366.132	32.029		29436.294	3526.364	0.109	0.558	5879.203	0
2631.168	147.000	2.115		10718.240	27.081	0.012	0.245		0
2822.597	101.000	1.125		11232.429	11.008	0.008	0.251		0
3212.517	152.000	2.201		17763.475	16.949	0.012	0.181		0
3222.205	221.000	3.853		12114.265	49.579	0.018	0.266		0
3223.214	611.000	13.157		10261.595	266.252	0.049	0.314		0

3961.376	94.000	1.028	22090.114	12.711	0.007	0.179	0
4101.831	127.000	1.875	9828.492	24.340	0.010	0.417	0

Péptidos predichos de glucoamilasa (GlaA) en Mascot.

No. Acceso NCBI: CAK38411.1

Start	End	Mr(calcd)	M	Peptide
1	1	149.051	0	M
1	4	539.2526	0	MSFR
1	23	2436.323	1	MSFRSLLALSGLVCTGLANVISK
2	4	408.2121	0	SFR
2	23	2305.283	1	SFRSLLALSGLVCTGLANVISK
5	23	1915.081	0	SLLALSGLVCTGLANVISK
5	24	2071.182	1	SLLALSGLVCTGLANVISKR
24	24	174.1117	0	R
24	39	1788.912	1	RATLDSWLSNEATVAR
25	39	1632.811	0	R.ATLDSWLSNEATVAR.T
25	78	5715.739	1	ATLDSWLSNEATVARTAILNNGADGAWVSGADSGIVV ASPSTDNPDYFYTWTR
40	78	4100.939	0	TAILNNGADGAWVSGADSGIVV ASPSTDNPDYFYTWTR
40	85	4813.351	1	TAILNNGADGAWVSGADSGIVV ASPSTDNPDYFYTWTRDSGLVLK
79	85	730.4225	0	DSGLVLK
79	92	1574.903	1	DSGLVLKTLVDLFR
86	92	862.4913	0	TLVDLFR
86	132	4804.441	1	TLVDLFRNGDTSLLSTIENYISAQAIQGISNPSGDLSSGAGLGEPK
93	132	3959.96	0	R.NGDTSLLSTIENYISAQAIQGISNPSGDLSSGAGLGEPK.F
93	149	5924.873	1	NGDTSLLSTIENYISAQAIQGISNPSGDLSSGAGLGEPKFNVD EYATGWSWRPQR
133	149	1982.924	0	K.FNVDEYATGWSWRPQR.D
133	155	2592.247	1	FNVDEYATGWSWRPQRDGPALR
150	155	627.334	0	DGPALR
150	184	3804.93	1	DGPALRATAMIGFGQWLLDNGYTSTATDIVWPLVR
156	184	3195.606	0	ATAMIGFGQWLLDNGYTSTATDIVWPLVR
156	218	7214.461	1	ATAMIGFGQWLLDNGYTSTATDIVWPLVRNDSLYVAQYWNQTYDLWEEVNGSSFFTIQVHR
185	218	4036.866	0	NDSLYVAQYWNQTYDLWEEVNGSSFFTIQVHR
185	265	9211.218	1	NDSLYVAQYWNQTYDLWEEVNGSSFFTIQVHRALVEGSAFATAV GSSSCWCDSPAPEILCYLQSFWTGSFILANFDSSR
219	265	5192.363	0	ALVEGSAFATAV GSSSCWCDSPAPEILCYLQSFWTGSFILANFDSSR
219	268	5464.512	1	ALVEGSAFATAV GSSSCWCDSPAPEILCYLQSFWTGSFILANFDSSRSGK
266	268	290.159	0	SGK
266	297	3493.552	1	SGKDANTLLGSIHTFDPEAACDDSTFQPCSPR
269	297	3221.403	0	K.DANTLLGSIHTFDPEAACDDSTFQPCSPR.A
269	303	3855.758	1	DANTLLGSIHTFDPEAACDDSTFQPCSPRALANHK
298	303	652.3657	0	ALANHK
298	310	1484.774	1	ALANHKEVVDSFR
304	310	850.4185	0	EVVDSFR
304	329	2798.372	1	EVVDSFRSIYTLNDGLSDSEAVAVGR
311	329	1965.964	0	R.SIYTLNDGLSDSEAVAVGR.Y
311	361	5865.71	1	SIYTLNDGLSDSEAVAVGRYPEDTYNGNPWFCLTLAAAEQLYDALYQWDK
330	361	3917.756	0	YPEDTYNGNPWFCLTLAAAEQLYDALYQWDK
330	376	5583.581	1	YPEDTYNGNPWFCLTLAAAEQLYDALYQWDKQGSLEVTDVSLDFFK
362	376	1683.836	0	K.QGSLEVTDVSLDFFK.A
362	402	4296.049	1	QGSLEVTDVSLDFFKALYSDAATGTYSSSSSTYSIVDAVK
377	402	2630.224	0	K.ALYSDAATGTYSSSSSTYSIVDAVK.T
377	428	5402.457	1	ALYSDAATGTYSSSSSTYSIVDAVKTFADGFVSIVETHAASNGSMSEQYDK
403	428	2790.244	0	TFADGFVSIVETHAASNGSMSEQYDK
403	437	3733.68	1	TFADGFVSIVETHAASNGSMSEQYDKSDGEQLSAR
429	437	961.4465	0	SDGEQLSAR
429	452	2651.294	1	SDGEQLSARDLTWSYAALLTANRR
438	452	1707.858	0	R.DLTWSYAALLTANRR.R
438	453	1863.959	1	DLTWSYAALLTANRR
453	453	174.1117	0	R
453	516	6178.977	1	RNSVVPASWGETSASSVPGTCAATS AIGTYSSVTVTSWPSIVATGGTTTTATPTGSGSVTSTSK
454	516	6022.875	0	NSVVPASWGETSASSVPGTCAATS AIGTYSSVTVTSWPSIVATGGTTTTATPTGSGSVTSTSK
454	523	6683.22	1	NSVVPASWGETSASSVPGTCAATS AIGTYSSVTVTSWPSIVATGGTTTTATPTGSGSVTSTSKTTATASK
517	523	678.3548	0	TTATASK
517	579	6452.075	1	TTATASKTSTSTSTCTTPTAVAVTFDLTATTTYGENIYLVGISISQLGDWETS DGIALSADK
524	579	5791.731	0	TSTSTSTCTTPTAVAVTFDLTATTTYGENIYLVGISISQLGDWETS DGIALSADK
524	602	8425.984	1	TSTSTSTCTTPTAVAVTFDLTATTTYGENIYLVGISISQLGDWETS DGIALSADKYTSSDPLWYVTVTL PAGESFEYK
580	602	2652.264	0	K.YTSSDPLWYVTVTL PAGESFEYK.F
580	605	3068.517	1	YTSSDPLWYVTVTL PAGESFEYKFIR
603	605	434.2642	0	FIR
603	620	2192.997	1	FIRIESDSSVEWESDPNR
606	620	1776.744	0	R.IESDSSVEWESDPNR.E
606	640	4001.75	1	IESDSSVEWESDPNREYTPQACGTSTATVTDTW
621	640	2243.017	0	R.EYTPQACGTSTATVTDTW.R.-

2. α -Amilasa

- Medio S20G60 Spot 2705

Proteína: α -Amilasa (AmyA1)

Número de péptidos que hicieron “match”: 13

Espectro del Medio S20G60 Spot 2705

m/z	Intens.	SN	Quality Fac.	Res.	Area	Rel. Intens.	FWHM	Chi ²	Bk. Peak
533.158	151.000	4.597		2002.033	36.585	0.031	0.266		0
547.166	246.159	7.761	2367.350	1374.461	142.957	0.051	0.398	295.847	0
816.406	3563.839	120.177	19259.994	1751.488	2901.684	0.735	0.466	22012.499	0
820.414	416.802	13.516	4946.562	1940.771	314.340	0.086	0.423	757.303	0
842.546	1294.028	43.243	4124.082	1583.863	1183.346	0.267	0.532	3874.770	0
849.464	193.981	5.936	1894.975	1680.492	172.593	0.040	0.505	264.723	0
873.461	231.297	7.231	704.831	1585.455	205.547	0.048	0.551	421.762	0
899.346	131.000	3.906		6217.856	19.963	0.027	0.145		0
928.606	3056.000	104.372		1996.136	1657.029	0.630	0.465		0
930.518	695.928	23.073	1188.931	2460.353	477.092	0.144	0.378	4549.800	0
952.412	166.572	5.096	1273.869	1855.558	158.623	0.034	0.513	317.634	0
983.584	1020.539	34.219	17117.910	1964.254	990.279	0.211	0.501	2930.275	0
1026.513	840.197	28.182	8228.482	1965.925	841.600	0.173	0.522	1673.117	0
1040.604	174.103	5.382	1329.760	1976.700	170.274	0.036	0.526	349.539	0
1048.511	234.982	7.477	2885.222	1794.333	260.767	0.048	0.584	398.434	0
1127.527	189.844	5.934	1786.199	2201.889	196.038	0.039	0.512	442.031	0
1149.355	114.000	3.377		3087.373	35.685	0.024	0.372		0
1313.709	536.686	17.759	13666.254	2384.910	700.343	0.111	0.551	1648.141	0
1335.685	165.965	5.036	849.837	2132.540	240.233	0.034	0.626	350.827	0
1342.797	4847.933	165.151	46807.638	2314.435	6899.001	1.000	0.580	41278.012	0
1364.796	158.000	4.777		3883.104	63.236	0.033	0.351		0
1398.699	395.933	12.896	437.447	2333.776	639.497	0.082	0.599	5096.166	0
1675.777	116.000	3.448		7518.383	29.911	0.024	0.223		0
1676.165	110.000	3.242		8948.472	22.147	0.023	0.187		0
1723.919	406.013	13.342	19007.537	3095.264	672.029	0.084	0.557	734.361	0
1739.861	139.079	4.319	626.540	2994.860	232.058	0.029	0.581	271.501	0
1766.981	136.000	4.009		8834.679	32.348	0.028	0.200		0
1859.942	518.269	17.896	23089.598	3435.907	904.114	0.107	0.541	1170.874	0
1881.935	188.323	6.638	677.289	3048.397	372.438	0.039	0.617	822.998	0
1940.963	119.000	3.428		8223.800	25.832	0.025	0.236		0
2274.075	1361.810	62.643	9384.007	4534.978	2540.571	0.281	0.501	13480.669	0
2296.172	103.000	3.036		11561.013	18.935	0.021	0.199		0
2331.099	312.764	14.252	1384.699	4627.752	569.714	0.065	0.504	2056.567	0
2909.430	102.579	5.796	883.042	5398.278	216.630	0.021	0.539	284.554	0
3411.700	130.894	10.259	204.546	5339.163	373.497	0.027	0.639	904.765	0

- Medio S20G0 Spot 2402

Proteína: α -Amilasa (AmyA2)

Número de péptidos que hicieron “match”: 9

Espectro del Medio S20G0 Spot 2402

m/z	Intens.	SN	Quality Fac.	Res.	Area	Rel. Intens.	FWHM	Chi ²	Bk. Peak
523.206	209.117	6.144	112.221	1613.377	100.650	0.027	0.324	1649.450	0
816.439	572.415	18.359	4125.718	2094.085	396.366	0.074	0.390	1274.792	0
820.405	370.197	11.640	1590.992	2224.864	236.244	0.048	0.369	562.204	0
928.647	112.000	3.137		2765.904	24.773	0.014	0.336		0
930.512	167.490	5.027	491.761	1622.756	157.205	0.022	0.573	307.154	0
1026.422	686.534	22.773	10599.570	2580.138	557.587	0.089	0.398	993.219	0
1127.501	152.000	4.591		6929.669	30.208	0.020	0.163		0
1313.651	180.309	5.621	786.069	2244.953	244.537	0.023	0.585	350.872	0
1342.707	1736.352	59.919	20265.020	2719.674	2066.362	0.224	0.494	6976.210	0
1859.824	485.863	17.202	20127.071	3997.057	740.266	0.063	0.465	780.033	0
1925.961	133.129	4.962	525.614	2666.893	295.582	0.017	0.722	363.460	0
1940.937	7748.962	302.373	73199.181	4051.627	12990.893	1.000	0.479	88357.850	0
1962.960	146.906	4.983	767.638	3638.538	233.522	0.019	0.539	306.643	0
1998.007	214.198	7.433	1170.589	3653.556	331.320	0.028	0.547	503.634	0

2012.036	329.475	12.331	6397.727	4078.638	519.348	0.043	0.493	775.372	0
2083.071	638.831	25.919	12967.817	4454.819	1014.660	0.082	0.468	3306.090	0
2274.096	425.854	19.161	6209.979	4493.058	748.143	0.055	0.506	2293.521	0

Péptidos predichos de α -Amilasa (AmyA) en Mascot.

No. Acceso NCBI: CAK46324.1

Start	End	Mr(calc)	M	Peptide
1	1	149.051	0	M
1	27	3003.547	0	MVAWWSLFLYGLQVAAPALAATPADWR
1	38	4327.229	1	MVAWWSLFLYGLQVAAPALAATPADWRSQSIYFLLTDR
2	27	2872.507	0	VAWWSLFLYGLQVAAPALAATPADWR
2	38	4196.189	1	VAWWSLFLYGLQVAAPALAATPADWRSQSIYFLLTDR
28	38	1341.693	0	R.SQSIYFLLTDR.F
28	41	1715.9	1	SQSIYFLLTDRFAR
39	41	392.2172	0	FAR
39	56	1943.864	1	FARTDGSSTATCNTADQK
42	56	1569.658	0	TDGSTTATCNTADQK
42	68	2948.292	1	TDGSTTATCNTADQKYCGGTWQGIIDK
57	68	1396.645	0	YCGGTWQGIIDK
57	121	7394.459	1	YCGGTWQGIIDKLDYIQGMGFTAIWITPVTAQLPQTAYGDAYHGYWQQDIYSLNENYGTADDLK
69	121	6015.825	0	LDYIQGMGFTAIWITPVTAQLPQTAYGDAYHGYWQQDIYSLNENYGTADDLK
69	130	6980.335	1	LDYIQGMGFTAIWITPVTAQLPQTAYGDAYHGYWQQDIYSLNENYGTADDLKALSSALHER
122	130	982.5196	0	ALSSALHER
122	200	9014.061	1	ALSSALHERGMYLMVDVVAHMGYDAGSSVDYSVFKPFSSQDYFHPFCFIQNYEDQTQVEDCWLGDNTVSLPDLDTTK
131	200	8049.552	0	GMYLMVDVVAHMGYDAGSSVDYSVFKPFSSQDYFHPFCFIQNYEDQTQVEDCWLGDNTVSLPDLDTTK
131	204	8490.811	1	GMYLMVDVVAHMGYDAGSSVDYSVFKPFSSQDYFHPFCFIQNYEDQTQVEDCWLGDNTVSLPDLDTTKDVVK
201	204	459.2693	0	DVVK
201	224	2813.366	1	DVVKNEWYDWVGSLSVSNYSIDGLR
205	224	2372.107	0	NEWYDWVGSLSVSNYSIDGLR
205	229	2928.429	1	NEWYDWVGSLSVSNYSIDGLRIDTVK
225	229	574.3326	0	IDTVK
225	233	1066.614	1	IDTVKHVQK
230	233	510.2914	0	HVQK
230	241	1517.742	1	HVQKDFWPGYNK
234	241	1025.461	0	K.DFWPGYNK.A
234	283	5750.688	1	DFWPGYNKAAGVYICIGEVLDGDPAYTCPYQNVMDGVLNYPYIYPLLNAFK
242	283	4743.238	0	AAGVYICIGEVLDGDPAYTCPYQNVMDGVLNYPYIYPLLNAFK
242	300	6600.066	1	AAGVYICIGEVLDGDPAYTCPYQNVMDGVLNYPYIYPLLNAFKSTSGSMDDLYNMINTVK
284	300	1874.839	0	STSGSMDDLYNMINTVK
284	320	4129.83	1	STSGSMDDLYNMINTVKSDCPDSTLLGTFVENHDNPR
301	320	2273.002	0	K.SDCPDSTLLGTFVENHDNPR.F
301	332	3567.658	1	SDCPDSTLLGTFVENHDNPRFASYTNDIALAK
321	332	1312.666	0	R.FASYTNDIALAK.N
321	364	4705.357	1	FASYTNDIALAKNVAAFIILNDGIPYIYAGQEQHYAGGNDPANR
333	364	3410.701	0	NVAAFIILNDGIPYIYAGQEQHYAGGNDPANR
333	380	5251.553	1	NVAAFIILNDGIPYIYAGQEQHYAGGNDPANREATWLSGYPTDSELYK
365	380	1858.863	0	R.EATWLSGYPTDSELYK.L
365	389	2768.402	1	EATWLSGYPTDSELYKLIASANAIR
381	389	927.5501	0	K.LIASANAIR.N
381	395	1603.905	1	LIASANAIRNYAISK
390	395	694.365	0	NYAISK
390	403	1605.804	1	NYAISKDTGFVITYK
396	403	929.4495	0	K.DTGFVITYK.N
396	409	1730.867	1	DTGFVITYKNWPIYK
404	409	819.4279	0	K.NWPIYK.D
404	417	1722.84	1	NWPIYKDDTTIAMR
410	417	921.4226	0	DDTTIAMR
410	418	1049.518	1	DDTTIAMRK
418	418	146.1055	0	K
418	432	1559.852	1	KGTDGSQIVTILSNK
419	432	1431.757	0	GTDGSQIVTILSNK
419	481	6182.042	1	GTDGSQIVTILSNKGASGDSYTLSSLSGAGYTAGQQLTEVIGCTTVTVGSDGNVPPMAGGLPR
433	481	4768.296	0	GASGDSYTLSSLSGAGYTAGQQLTEVIGCTTVTVGSDGNVPPMAGGLPR
433	488	5598.75	1	GASGDSYTLSSLSGAGYTAGQQLTEVIGCTTVTVGSDGNVPPMAGGLPRVLYPTEK
482	488	848.4644	0	VLYPTEK
482	493	1304.734	1	VLYPTEKLAGSK
489	493	474.2802	0	LAGSK
489	498	1008.491	1	LAGSKICSSS
494	498	552.2214	0	ICSSS