

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**



**ANÁLISIS COMPARATIVO DEL SECRETOMA DE *Aspergillus
brasiliensis* OBTENIDO CON DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE GLUCOSA EN MEDIO SÓLIDO.**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

DANIEL ALFONSO SALGADO BAUTISTA

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesores: Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda

Dr. Gerardo Gutiérrez Sánchez

México, D. F. 2015

Iztapalapa, Distrito Federal, México a 27 de julio del 2015.

EL jurado asignado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

Análisis comparativo del secretoma de *Aspergillus brasiliensis* obtenido con diferentes concentraciones de glucosa en medio sólido.

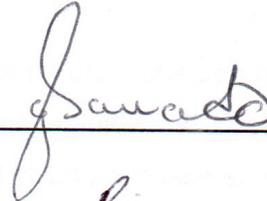
Presentó:

IBQ Daniel Alfonso Salgado Bautista

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Sinodales:

Presidente: Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda



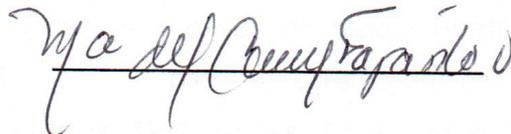
Secretario: Dra. Araceli Tomasini Campocosio



Vocal: Dr. Ricardo Hernández Martínez



Vocal: Dra. María del Carmen Fajardo Ortiz



Este trabajo se realizó en la Planta Piloto 4 de Fermentaciones en Medio Sólido de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa; en colaboración del CCRC (Complex Carbohydrate Research Center) de la Universidad de Georgia, Athens, EUA.; bajo la dirección de Ernesto Favela Torres y la asesoría de Jesús Gerardo Saucedo Castañeda y Gerardo Gutiérrez Sánchez. El apoyo financiero estuvo bajo el programa de becas de posgrado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Iztapalapa, Distrito Federal, México a 27 de julio del 2015.

EL jurado asignado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud Unidad
Iztapalapa aprobó la tesis:

**Análisis comparativo del secretoma de *Aspergillus brasiliensis* obtenido con
diferentes concentraciones de glucosa en medio sólido.**

Presentó:

IBQ Daniel Alfonso Salgado Bautista

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Sinodales:

Presidente: Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda _____

Secretario: Dra. Araceli Tomasini Campocosio _____

Vocal: Dr. Ricardo Hernández Martínez _____

Vocal: Dra. María del Carmen Fajardo Ortiz _____

RESUMEN

Análisis comparativo del secretoma de *Aspergillus brasiliensis* obtenido con diferentes concentraciones de glucosa en medio sólido.

Daniel Alfonso Salgado Bautista

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

En este trabajo se compararon los secretomas producidos en fermentación sólida por *Aspergillus brasiliensis* ATCC9642, utilizando un medio de glucosa a tres concentraciones (30, 100 y 180 g/L) y agrolita, como soporte inerte.

Para la obtención del secretoma, se definió un estado fisiológico, donde el hongo presentaba la tasa de producción de CO₂ más alta, la cual fue determinada por respirometría. Posteriormente, las proteínas obtenidas fueron separadas por electroforesis (2D-PAGE y 1D-SDS-PAGE), las imágenes obtenidas por los geles 2D-PAGE se analizaron por el software PDQuest, identificando los *spots* considerados de buena calidad en cada gel, siendo éstos reproducibles entre réplicas y presentando un bajo coeficiente de variación.

Se seleccionaron un total de 11 *spots* los cuales fueron digeridos con tripsina para la obtención de péptidos, separados por cromatografía líquida; y posteriormente, inyectados en un espectrómetro de masas (LC-MS/MS). El mismo proceso se realizó para las bandas del gel unidimensional. Los espectros de masas obtenidos se convirtieron en formato MZMXL y después a formato PKL para su posterior análisis por medio del algoritmo de Mascot, donde se utilizó una base de datos de las proteínas de *Aspergillus brasiliensis*, así obteniendo las secuencias FASTA. EL análisis bioinformático de las secuencias se realizó utilizando los siguientes algoritmos y bases de datos: BlastP, Secretome P, Signal P, TMHMM, Pfam, Uniprot y KEGG, para su caracterización y reconocimiento de sus posibles funciones. Se identificaron 19 proteínas, de las cuales 6 se identificaron como extracelulares y 13 como intracelulares.

Al analizar las funciones de las proteínas, se concluyó que la concentración de la glucosa y de los componentes del medio, influyó sobre el secretoma de *A. brasiliensis* ATCC9642, ya que se presentaron proteínas de choque térmico, respuesta a estrés osmótico, inhibición de proteínas de la glucólisis, mayor expresión de proteínas que participan en el crecimiento microbiano y enzimas que actúan sobre estrés oxidativo.

Además el aumento de la concentración de glucosa influye en la producción total de proteína secretada, así como en la biomasa final.

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS.....	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Definición de fermentación en estado sólido.....	2
2.2 Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido.....	2
2.3 Usos de la fermentación en estado sólido.....	4
2.4 Reactores en fermentación en estado sólido.....	6
2.5 Características de los hongos filamentosos.....	7
2.5.1 <i>Aspergillus niger</i>	8
2.5.2 Características fisiológicas y químicas de <i>Aspergillus niger</i>	8
2.5.3 De <i>Aspergillus niger</i> ATCC9642 a <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC9642.....	9
2.6 Proteómica.....	9
2.6.1 Características e importancia del secretoma	11
2.6.2 Técnicas para la separación e identificación de proteínas en proteómica.....	12
2.6.2.1 Geles Bidimensionales (2-DE).....	12
2.6.3 Espectrometría de masas e identificación de proteínas.....	13
2.6.4 Estudios de proteómica de <i>Aspergillus</i>	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS.....	17
5.1 Objetivo general.....	17
5.2 Objetivos específicos.....	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6.1 Cepa y conservación.....	18
6.1.1 Microorganismo.....	18
6.1.2 Activación y conservación de <i>Aspergillus brasiliensis</i> para el estudio del secretoma.....	18
6.1.3 Propagación del inóculo.....	18
6.2 Medio de cultivo.....	19

6.3 Acondicionamiento del soporte inerte.	19
6.4 Preparación de la fermentación en medio sólido.....	19
6.5 Obtención del secretoma.....	20
6.6 Análisis de proteína.	21
6.7 Geles 2D-PAGE	22
6.8 Análisis de imágenes de geles 2D-PAGE y preparación de <i>spots</i> para el análisis por LC-MS/MS.	23
6.9 Electroforesis SDS-PAGE para el análisis másico (<i>shotgun</i>) de proteínas.	24
6.10 Digestión trípica.	24
6.11 Espectrometría de masas.	27
6.12 Selección e identificación de proteínas.....	27
7. RESULTADOS.	29
7.1. Estudios respirométricos.	29
7.1.1 Tasas y cinéticas de producción de CO ₂ de las concentraciones 30-180 g/L. ...	29
7.1.2 Tasas y cinéticas de producción de CO ₂ de las concentraciones 30,100 y 180 g/L.	40
7.2 Separación de proteínas extracelulares.....	48
7.2.1. Cuantificación de proteína y separación en 1 y 2 dimensiones.....	48
7.3. Identificación de proteínas en los <i>spots</i> seleccionados de los geles bidimensionales.	68
7.3.1. Identificación y caracterización de las proteínas.....	69
7.3.2. Proteínas identificadas como intracelulares.....	71
7.3.3. Proteínas identificadas como extracelulares.	73
8. CONCLUSION.....	80
9. BIBLIOGRAFIA.....	81
ANEXOS.....	92

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Esquema del sistema de medición del proceso de respiración.....	20
Figura 2 Esquema de corte de banda para digestión trípica.....	25
Figura 3 Tasa de producción de CO ₂ de medios de cultivo concentraciones de glucosa 30 a 180 g/L	29
Figura 4 Cinéticas de producción de CO ₂ de medios de cultivo con concentraciones de glucosa de 30 a 180 g/L.....	30
Figura 5 Tasa máxima de producción de CO ₂ , concentraciones 30 a 180 g/L.....	32
Figura 6 Tasa de consumo de O ₂ , concentraciones 30 a 180 g/L	34
Figura 7 Producción total de CO ₂ , concentraciones 30 a 180 g/L.....	35
Figura 8 Consumo total de O ₂ , concentraciones 30 a 180 g/L.....	36
Figura 9 Tiempo de la fase lag, concentraciones 30 a 180 g/L.....	37
Figura 10 Tiempo de producción continua de CO ₂ , concentraciones 30 a 180 g/L...	38
Figura 11 Tasa específica de producción de CO ₂ , concentraciones 30 a 180 g/L..	39
Figura 12 Tasa de producción de CO ₂ de la concentración de 30 g/L.....	41
Figura 13 Tasa de producción de CO ₂ de la concentración de 100 g/L.....	42
Figura 14 Tasa de producción de CO ₂ de la concentración de 180 g/L.....	42
Figura 15 Cinéticas de producción de CO ₂ de la concentración de 30 g/L.....	43
Figura 16 Cinéticas de producción de CO ₂ de la concentración de 100 g/L	43
Figura 17 Cinéticas de producción de CO ₂ de la concentración de 180 g/L	44
Figura 18 Tasas específicas de las concentraciones 30, 100 y 180 g/L.....	46

Figura 19 Geles maestro de los extractos proteicos obtenidos a partir de medios de cultivo con concentraciones iniciales de glucosa 30, 100 y 180 g/L	49
Figura 20 Número de <i>spots</i> identificados por cada condición	50
Figura 21 Diagrama de Venn con los <i>spots</i> seleccionados bajo ciertos criterios....	51
Figura 22 <i>Spots</i> seleccionados con y sin análisis por PDQuest	58-59
Figura 23 Gel 2D-virtual obtenido a partir de las muestras analizadas por LC-MS/MS	64
Figura 24 Diagrama de Venn obtenido por <i>shotgun</i> , comparando las proteínas identificadas por el LC-MS/MS	64
Figura 25 Distribución de los <i>spots</i> analizados por LS-MS/MS, 30 g/L (a), 100 g/L (b) y 180 g/L (c).....	68-69

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Comparación entre la FES y FEL	4
Tabla 2 Productos tradicionales utilizando la FES.....	5
Tabla 3 Tipo de biorreactores usados y productos obtenidos en FES	7
Tabla 4 Preparación de las diluciones de BSA estándar	21
Tabla 5 Promedio de parámetros asociados a respirometría.....	31
Tabla 6 Comparación entre tasas de producción de CO ₂ con prueba de Tukey ..	32
Tabla 7 Comparación entre tasas de consumo de O ₂ con prueba de Tukey	33
Tabla 8 Comparación entre la producción total de CO ₂ de cada condición con prueba de Tukey.....	34
Tabla 9 Comparación entre consumo total de consumo de O ₂ de cada condición con prueba de Tukey	35
Tabla 10. Resultados de prueba de Tukey entre el tiempo de producción continúa de CO ₂ de cada condición.....	37
Tabla 11 Resumen de los parámetros similares entre condiciones.....	39
Tabla 12 Resumen de los parámetros analizados en los cinco lotes	45
Tabla 13 Cuantificación de proteína por el método de Bradford.....	48
Tabla 14 Número de <i>spots</i> identificados por cada condición.....	50
Tabla 15 Características de los <i>spots</i> seleccionados por análisis de imagen.....	52
Tabla 16 Características de los <i>spots</i> seleccionados sin análisis de imagen	60
Tabla 17 Cuantificación de proteínas por el método de BCA	63

Tabla 18 Comparación de resultados obtenidos por ambos métodos.	65
Tabla 19 Proteínas identificadas en los <i>spots</i> seleccionados.	70
Tabla 20 Proteínas identificadas en las concentraciones 30, 100 y 180 g/L.	77
Tabla 21 Proteínas identificadas presentes en dos condiciones.	78
Tabla 22 Proteínas identificadas presentes como únicas de la condición 180 g/L .	79

1. INTRODUCCIÓN

La fermentación en estado sólido (FES) se ha empleado desde hace cientos de años para la producción de alimentos tradicionales de diversas partes del mundo (Raimbault, 1998). Este tipo de cultivo favorece el crecimiento de cierto tipo de microorganismos, la producción de enzimas más estables y de mayor productividad de metabolitos microbianos, comparado con la FEL; es por ello, que la FES ha tomado importancia en los últimos años (Pandey, 2003; Acuña y col., 1995). En particular, los hongos filamentosos son los más utilizados en procesos de FES (Biesebeke y col., 2002).

Por otro lado, debido a la importancia de *A. niger* en la producción industrial de enzimas y ácidos orgánicos, se han realizado numerosos estudios enfocados a las características fisiológicas y bioquímicas de crecimiento de este hongo en FES (Meijer y col., 2011). Para ampliar los conocimientos acerca de los procesos de la FES con *A. niger* se ha recurrido a la proteómica; dicha herramienta permite obtener información relevante sobre la síntesis de proteínas, su distribución, vías de secreción, y la respuesta fisiológica que ejerce a las variaciones de las condiciones ambientales (Torres y Aguilar, 2012). Esta herramienta ha sido muy importante para determinar el impacto de las condiciones de cultivo sobre la fisiología y bioquímica microbiana; en particular, ha sido muy usada para identificar las proteínas expresadas por las diversas especies de *Aspergilli* bajo diferentes condiciones de cultivo (Kniemeyer, 2011).

Kim y col. (2007) demostraron que el proteoma de *A. nidulans* presenta diferencias significativas al utilizar medios de cultivo con diferentes concentraciones de KCl. Con base en ello, y con estudios previos realizados en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, en este trabajo se comparó el secretoma de *Aspergillus brasiliensis* en medios de cultivo sólido con concentraciones crecientes de fuente de carbono.

La estructura de este trabajo se compone por esta introducción, marco teórico, justificación, hipótesis y objetivos del trabajo. Posteriormente, se presenta la sección de métodos y materiales, donde se encuentra el trabajo experimental; integrado por una primera etapa donde se caracterizó cinéticamente el crecimiento, a través de la producción de CO₂, de *A. brasiliensis* en medios de cultivo con concentraciones crecientes de nutrientes. Con base en los resultados obtenidos, se establecieron las condiciones de cultivo para la obtención del secretoma de *A. brasiliensis* en diferentes

medios. Y por una segunda etapa, donde los extractos extracelulares obtenidos fueron separados por electroforesis bidimensional (2D-PAGE) y unidimensional (1D-SDS-PAGE).

El trabajo finaliza con la sección de resultados y discusión, comparando los resultados globales obtenidos con ambos tipos de separación, para posteriormente, presentar las conclusiones más relevantes.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Definición de fermentación en estado sólido.

Existen dos tipos principales de fermentación usadas a nivel industrial: la fermentación en estado líquido (FEL) y la fermentación en estado sólido (FES); esta última ha tomado gran importancia en algunas industrias como: alimentaria, química, farmacéutica, energética y relacionadas con problemas medio ambientales. (Pandey, 2003).

La FES se define como el cultivo de microorganismos que se adhieren a un medio o matriz sólida con un contenido de humedad relativamente bajo oscilando entre 12 y 80%. Se pueden usar bacterias, hongos y levaduras; sin embargo, los hongos filamentosos son los más utilizados; tanto por su crecimiento miceliar como por su tolerancia a bajas actividades de agua y condiciones de alta osmolaridad (Romero, 2001). Por otra parte, en 1997 Viniegra definió a la FES como “un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles”.

2.2 Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido.

La FES presenta ciertas ventajas sobre la FEL, pero a su vez tiene ciertas limitaciones que impiden un estudio más preciso sobre el comportamiento microbiano (Favela y col., 1998). A continuación se presentan algunas ventajas y desventajas de la FES en comparación con la FEL (Chávez y col., 2009).

Ventajas:

- Los medios de cultivo generalmente son subproductos agrícolas que contienen los nutrientes necesarios para el metabolismo microbiano.
- La baja actividad del agua reduce contaminaciones por bacterias y levaduras.
- Existe alta transferencia de oxígeno.

- Algunos productos son utilizados integralmente como alimento animal, productos para el control biológico, entre otros.

Entre las principales desventajas se encuentran:

- Son sistemas complejos difíciles de caracterizar.
- Dificultad para controlar el proceso (pH, contenido de humedad, temperatura).
- Problemas con la transferencia de calor, principalmente a gran escala.
- El diseño de reactores y el escalado están muy poco caracterizados.

Las diferencias básicas entre el FES y FEL de acuerdo con (Ruiz y Col., 2007; Matute, 2011) se resumen como sigue:

- En la FES, el crecimiento microbiano y formación del producto no se distribuyen homogéneamente en el medio de cultivo a causa de que el sustrato no presenta homogeneidad.
- El contenido de humedad de FES es bajo, en función de las características físicas o químicas del sustrato. Para los medios de cultivo con alto contenido de humedad, la transferencia de oxígeno se dificulta.
- En la FES es común el uso de cereales, soja, biomasa agrícola y residuos sólidos como sustrato.
- Los microorganismos utilizados en FES, generalmente, son hongos que producen enzimas para degradar el material y penetrar en el sustrato sólido.
- La acumulación de calor metabólico aumenta la temperatura en el medio provocando pérdida de humedad y, eventualmente, alteraciones en el metabolismo microbiano.

En la Tabla 1 se presentan algunas de las diferencias más importantes entre ambos tipos de cultivo.

Tabla 1. Comparación entre la FES y FEL (Raimbault, 1998).

Comparación	FEL	FES
Sustrato	Solubles (azúcares simples)	Polímeros insolubles (azúcares complejos)
Condiciones Asépticas	Esterilización por calentamiento y control aséptico	Tratamiento por vapor, no hay condiciones estériles
Agua	Altos volúmenes consumidos	Menor contenido de humedad
Calentamiento metabólico	Fácil control de temperatura	Difícil control de temperatura
Aeración	Limitada por solubilidad del oxígeno, altos niveles de aire requerido	Fácil aireación y alto intercambio en la superficie aire-sustrato
Control de pH	Fácil control	Amortiguado con sustratos sólidos y difícil ajuste durante el proceso
Agitación	Buena Homogenización	Puede dañar la integridad de los microorganismos
Escalamiento	Equipos industriales disponibles	Difícil diseño por falta de información
Inoculación	Fácil inoculación, proceso continuo	Inoculación por esporas, por lote.
Contaminación	Riesgos de contaminación por bacterias de cepas individuales.	Riesgos de contaminación por un lento crecimiento de hongos.
Gasto de energía	Alto consumo	Bajo consumo
Volumen de equipo	Altos volúmenes y costos en tecnología.	Bajos volúmenes y costos de equipos.
Efluentes	Altos niveles de efluentes	No efluentes, menor polución

2.3 Usos de la fermentación en estado sólido.

En la literatura existe una gran cantidad de reportes acerca de investigaciones relacionadas con la FES, a continuación se citan algunos.

Aguilar y col., 2002, compararon la producción de tanasa por *A. niger* obtenida FES y FEL. Demostraron que la producción de proteasas indeseables es mayor en FEL que en FES; lo que permite una mayor producción de tanasa en este último. También demostraron los niveles de secreción de tanasa son mayores en la FES que en FEL.

Otras investigaciones se han orientado a la producción de enzimas como amilasas (Ramesh y Lonsane, 1997; Hashemi y col., 2013; Biesebeke y col. 2005), lipasas (Rajan y Nair, 2009; Castilho y col., 2000), invertasas (Giraldo y col., 2012; Alegre y col., 2009; Romero y col., 2000), entre otras. Sin embargo, la mayoría de estos trabajos son de carácter básico y/o tecnológico para una mejor comprensión de los procesos de FES. En la actualidad, la mayoría de los procesos industriales se siguen realizando en FEL. Papagianni y col. (2001) enfatizan sobre las diferencias en los patrones de crecimiento de los hongos entre los diferentes tipos de cultivo, resaltando que los procesos en FEL son los más estudiados.

La FES ha sido empleada desde hace muchos años en la producción de alimentos tradicionales; en la tabla 2 se presentan algunas aplicaciones de los procesos de FES a nivel industrial.

Tabla 2. Procesos industriales de fermentación en estado sólido (Raimbault, 1998)*.

Sector económico	Aplicación	Ejemplos
Industria agroalimentaria	Producción de alimentos tradicionales, conservación y producción de hongos, productos por bioconversión y aditivos para alimentos	Alimentos (Koji, Rae, quesos fermentados), hongos (<i>Agaricus</i> , <i>Pleurotus</i>), bioconversión de productos (pulpa de bagazo de caña, pulpa de café), aditivos para alimentos (compostaje de ensilaje, saborizantes, aceites esenciales y ácidos orgánicos)
Agricultura	Biocontrol y bioinsecticidas, hormonas, crecimiento de plantas, hongos silvestres y micorrizas	Microorganismos usados: <i>Beauveria Metarhizium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Giberella</i> , <i>Rhizobium</i> ,
Fermentación industrial	Producción de enzimas, antibióticos, ácidos orgánicos, etanol y otros metabolitos fúngicos	Enzimas (amilasas, celulasas, proteasas, pectinasas y xilanasas), antibióticos (penicilina), ácidos orgánicos (cítrico, fumárico, gálico y láctico); etanol producido por <i>Schwanniomyces</i> sp., malteado y elaboración de cerveza; otros productos: alcaloides, hormonas y probióticos

*Para completar la información Pandey (1999), muestra información de los sustratos y microorganismos empleados y productos obtenidos por la FES.

Como se observa en la tabla 2, la producción de enzimas a nivel industrial es muy importante, produciendo una amplia variedad de éstas, y tomando en cuenta que la producción de enzimas a gran escala por FES se ha vuelto frecuente, principalmente, en la producción de hidrolasas producidas por hongos filamentosos (Grajek, 1987). El uso de éste tipo de hongos en la FES, es debido a la baja actividad de agua que existe en el medio, ya que favorece su germinación y su crecimiento miceliar (Romero, 2001).

Como se ha mencionado anteriormente, existen diferencias entre los procesos de la FES y FEL (Viniegra y col., 2003). En la mayor parte de los estudios realizados en FES, el uso de residuos agroindustriales como sustratos y soportes es muy frecuente. Este tipo de sustratos dificultan la caracterización de los procesos, debido a su complejidad y a la presencia de compuestos que interfieren con los métodos clásicos de estimación del crecimiento microbiano. Éstas dificultades, se pueden resolver con el uso de soportes inertes, ayudando a una mejor caracterización de los procesos durante el crecimiento, como resultado de un mejor control e identificación de los componentes del medio de cultivo (Gerardo y col., 2003). Para realizar una buena selección del soporte inerte, se

debe considerar algunos criterios de selección (Romero, 2001), que a continuación son descritos.

La matriz empleada debe poseer las siguientes características: ser porosa, inerte, que favorezca el crecimiento microbiano, con capacidad de absorción de agua (una o varias veces su propio peso), resistente a la compresión y al mezclado (para esto deben ser partículas pequeñas y granulosas), libre de componentes que puedan inhibir procesos, y ser capaz de mantener o absorber los sustratos necesarios; la matriz puede ser natural (bagazo de caña, salvado de trigo y residuos de desechos orgánicos) o inerte (poliuretano, poliestireno, amberlita y agrolita). Los soportes naturales tienen un pretratamiento químico o mecánico para tener una mejor disponibilidad de los nutrientes que lo conforman, pero, al ser tan complejos como se ha mencionado, ocasionan problemas de inducción, represión o inhibición en los procesos metabólicos. Por otro lado, los soportes inertes han ayudado en la FES al diseño de reactores y medios de cultivo, al monitoreo de parámetros sobre el proceso; proporcionando un mejor control sobre la transferencia de calor y masa, y una fácil obtención del producto de interés, debido a las bajas impurezas que existen (Figuroa, 2011). Siendo la agrolita, un soporte inerte que pueda ser utilizado en cultivos en medio sólido, ya que favorece a una mejor caracterización de los sistemas de estudio, no interfiere con el crecimiento microbiano, no presenta capacidad de intercambio iónico o de amortiguador, mantiene el agua en su superficie, no se deteriora, es rígida, no se comprime creando buena porosidad y presenta un pH neutro (Gerardo y col., 2003)

2.4 Reactores en fermentación en estado sólido.

De acuerdo con Ali y col. (2011), los biorreactores de la FES se clasifican en los siguientes grupos:

- Grupo 1: aireación no forzada, sin mezclar.
- Grupo 2: aireación forzada, sin mezclar.
- Grupo 3: aireación no forzada, mezclando continua o intermitentemente.
- Grupo 4: aireación forzada, mezclando continua o intermitentemente.

La misma publicación presenta la tabla 3, dando ejemplos de biorreactores utilizados en la obtención de ciertos productos biotecnológicos por la FES.

Tabla 3. Ejemplos de tipo de biorreactores usados y productos obtenidos en FES.

Biorreactor	Sustratos	Microorganismo usados	Productos
Bandeja (Matraz de Erlenmeyer)	Paja de trigo, cáscara de café, residuos de té, madera de álamo, salvado de trigo, pasta de sésamo, polvo de semilla de jaca, salvado de soya	<i>A. ellipticus</i> , <i>Ceratocystis fimbriata</i> , <i>A. niger</i> , <i>Trametes trogii</i> , <i>Zygosaccaromyces rouxi</i> , <i>Monascus purpucus</i> , <i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Mucor racemosus</i> , <i>Rhizopus chinesis</i>	Celulasas, saborizantes, ácido glucónico, lacasas, endoxilanasas, L-glutaminasas, pigmentos, lipasas, fitasas, manganeso peroxidadas
Mezclado continuo, aireación forzada	Glucosa y granos de trigo	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>A. oryzae</i>	Enzimas lignolíticas
Biorreactor de tambor rotatorio	Residuos de piña, biorremediación de suelo, espuma de poliuretano	<i>A. niger</i> , <i>Penicillium glabrum</i> y otras células microbianas	Ácido cítrico, cultivos, tanasas fúngicas
Biorreactor de lecho empacado	Almidón de tapioca, bagazo de azúcar, yuca y café	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>A. niger</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	Proteasas, penicilina, ácido cítrico
Bandeja (Biorreactor de bandejas)	Salvado de trigo y torta de residuo de haba	<i>Bacillus thuringiensis (Bt)</i>	Cultivación de (<i>Bt</i>)
Bandeja (Matraz cónico)	Excremento de cerdo	<i>Bacillus subtilis</i>	Poli-c-ácido glutámico

2.5 Características de los hongos filamentosos.

Los hongos filamentosos se consideran fábricas biológicas debido a su capacidad de producción enzimática y a su resistencia para crecer en medios muy concentrados, las modificaciones genéticas han ayudado a mejorar su producción de enzimas, ya que las cepas silvestres tienen una capacidad muy reducida para ser empleadas a nivel industrial (Punt y col., 2002). Estos organismos eucarióticos están constituidos por filamentos microscópicos que crecen longitudinalmente y ramifican, su clasificación es a partir del estudio de su morfología, macro y microscópica, considerándose cenocíticos (koinos: "común": kitos: "vaso hueco"), ya que su citoplasma es continuo a través de todo su cuerpo (García, 2004), no son fotosintéticos, por lo tanto, recurren a materia orgánica disponible como fuente de carbono y energía (Arias y Piñeros, 2008), a causa de que tienen una pared rígida compuesta por polisacáridos, polipéptidos y quitina, no tienen la capacidad de fagocitar y recurren a la desintegración de polímeros mediante enzimas extracelulares, obteniendo nutrientes simples y solubles para absorberlos fácilmente (Arenas, 2008)

Los filamentos que lo conforman se llaman hifas, alcanzan diámetros entre 5 y 10 μm , y su longitud varía, éstas conforman el talo o micelio. Por el tipo de hifa que presentan

se clasifican en dos grupos: septados, donde las hifas están divididas por celdas con tabiques transversales que contienen poros donde pasarán los nutrientes y organelos; y no septados, los que carecen de estas divisiones. (García, 2004).

La reproducción de los hongos es sexual, asexual o por esporulación, adaptándose a diversas condiciones aunque no sean las óptimas para ellos (Arias y Piñeros, 2008). Se pueden clasificar por la temperatura en que crecen: psicrófilos (temperaturas ≤ 0 °C), mesófilos (temperaturas óptimas 30-37 °C) y sólo algunos termófilos (temperaturas de 62 °C), el pH óptimo oscila entre 4 a 6, considerando que a un pH muy ácido afecta los sistemas enzimáticos, y si es alcalino, perjudica a la solubilidad de metales que son importantes para su metabolismo (García, 2004; Arias y Piñeros, 2008; Arenas, 2008)

2.5.1 *Aspergillus niger*

La importancia de *A. niger* en la industria, se debe a la gran diversidad de enzimas que produce, las cuales son utilizadas en diversos campos de la biotecnología, siendo uno de los hongos filamentosos más empleados. Además, ocasionalmente causa enfermedades al ser humano; entre algunos *Aspergillus* considerados patógenos, se encuentran *A. flavus*, *A. ochraceus* y *A. fumigatus*. *A. niger* presenta un genoma conocido que se aproxima a 35.5 y 38.5 megabases (Mb), el cual se encuentra dividido entre ocho cromosomas/grupos de ligamiento de 3,5 a 6,6 Mb (Baker, 2006).

2.5.2 Características fisiológicas y químicas de *Aspergillus niger*.

Durante un cultivo, la composición elemental de un microorganismo no se modifica considerablemente, teniendo en cuenta que para hongos y bacterias es similar. La composición elemental promedio en (% p/p) es: Carbono (C)= 46.5; Hidrógeno (H)=6.49; Oxígeno (O)=31.0; Nitrógeno (N)=10.85 y sales aproximadamente del 5%, manteniéndose constante durante el cultivo (Ertola y col., 2007).

Al inicio de su crecimiento, *A. niger* presenta un color blanco, que posteriormente, se vuelve negro, variando entre café o amarillo oscuro, dependiendo las situaciones ambientales, crece por extensión, sus hifas son septadas, sus esporas asexuales crecen en las hifas aéreas y estarán disponibles para dispersarse, es un hongo aerobio, mesófilo, heterótrofo y quimiorganotrófico (Castillo y Villafañe, 2003).

2.5.3 De *Aspergillus niger* ATCC9642 a *Aspergillus brasiliensis* ATCC9642.

Los *Aspergillus* negros, son un grupo de hongos filamentosos difícil de identificar y caracterizar, actualmente se han encontrado nuevas especies, algunos ejemplos son: *A. tubingensis*, *A. heteromorphus*, *A. ellipticus*, *A. carbonarius*, entre otros más. Para el 2007, Varga realizaba estudios fenotípicos y genotípicos a una cepa aislada en Brasil, Australia y EUA, nombrándola como *A. niger*, pero los resultados arrojaron que poseía algunas diferencias con *A. niger*, por lo que fue nombrada *A. brasiliensis*. Cabe mencionar que la cepa a utilizar en este estudio es *A. brasiliensis* ATCC 9642 (*A. niger* ATCC 9642), fue depositada en ATCC por el investigador W.H. Weston como *A. niger*; esta cepa es usada para pruebas de resistencia a adhesivos bacterianos, adhesivos fúngicos, degradación de plásticos, producción de enzimas como pululano isopululanasa, 4-glucanohidrolasa, lactoileglutación glioxalasa, pruebas a agentes antimicrobianos, entre otras (Website ATCC, 2015)

2.6 Proteómica.

Las proteínas son biomoléculas que se encuentran presentes en cada uno de los procesos celulares, siendo indispensables para todo ser vivo, participan en reacciones químicas, estructuras celulares, duplicación celular, producción de energía, en la regulación del metabolismo y son transportadoras de moléculas. Por lo tanto, si se desea conocer el modo de operación del sistema vivo en estudio, necesitamos conocer profundamente a las proteínas (Mojica y col., 2003; Pando y Batista, 2007).

Actualmente, para comprender los procesos moleculares que ocurren en los sistemas vivos en distintos estados fisiológicos en un cierto momento, la proteómica ha surgido como herramienta capaz de darnos información del funcionamiento proteico-enzimático que lleva a cabo el organismo (Kim y col., 2008), el término de proteómica adoptado por Marc Wilkins y colaboradores en los 90s, tomó como base los términos de genómica y genoma, siendo las proteínas un reflejo de lo que son los genes (Liebler, 2002).

Para Mojica y col. (2003), “La proteómica es la nueva etapa en la investigación biológica que emana naturalmente de la genómica y que incluye la caracterización de la expresión de las proteínas codificadas por un genoma y el establecimiento de sus propiedades funcionales y estructurales”.

En el desarrollo de la proteómica se consideran los siguientes factores:

- La secuenciación de genomas y el desarrollo de bases de datos de proteínas.
- El desarrollo de técnicas de espectrometría de masas para analizar proteínas y péptidos.
- Los avances realizados en la separación de proteínas mediante 2D-PAGE, con la introducción de los gradientes de pH inmovilizados (IPGs) (Morales y Gallo, 2006).

Santiago y col. (2004) proponen que la proteómica incide en diversos campos de investigación como son:

- La identificación de las proteínas expresadas por un organismo en una condición dada, definiéndose como proteómica descriptiva o estructural, estas proteínas son expresadas en un momento y en un contexto.
- La identificación de los cambios en el nivel de expresión de proteínas asociadas a cambios en las condiciones del organismo, se denomina proteómica comparativa, donde las proteínas cambian cuando un organismo se somete a condiciones diferentes.
- La proteómica funcional, la cual identifica los conjuntos funcionales de proteínas, es decir, grupos de proteínas que se localizan en mismo sitio celular y que operan en mutua interacción (interacciones proteína-proteína).
- La identificación de las proteínas que forman un organelo. Este tipo de identificación conduce a la elaboración de un mapa molecular de la célula.

Por otro lado, Girotti (2010) y Morales y Gallo (2006) mencionan que la proteómica se segrega en tres campos principales:

-La proteómica de expresión, se enfoca a la cuantificación de la expresión de proteínas que proceden de muestras que difieren en alguna variable, lográndose separar por medio de técnicas como HPLC multidimensional, electroforesis bidimensional y electroforesis capilar. Se puede comparar la expresión de proteínas totales o subproteomas (proteínas intracelulares, de membrana o extracelulares), ayudando a identificar posibles proteínas que participen en transducción de señales, sean específicas del proceso o proteínas de interés microbiológico.

-La proteómica funcional, se enfoca en la función que ejercen las proteínas en el sistema biológico, como son reguladas (modificaciones postraduccionales), y a su vez estudian la interacción que hay entre ligando-receptor.

-La proteómica estructural, se enfoca a la determinación y análisis de estructuras tridimensionales de las proteínas, cuales son responsables de su función e identidad molecular sobre otras proteínas, esto es importante, ya que al conocer la estructura dimensional de la proteína se pueden diseñar compuestos que interactúen con grupos funcionales, así modificando las proteínas para usos más específicos.

2.6.1 Características e importancia del secretoma

La palabra secretoma se utilizó para la descripción de las proteínas que se procesan a través del retículo endoplásmico, pero actualmente, se emplea para las proteínas que se secretan en la región extracelular. Se sabe que las proteínas secretadas tienen una participación importante en los procesos biológicos, por lo que se han considerado importante su estudio para tener un mejor entendimiento, auxiliándonos de los genomas, herramientas analíticas y computacionales; varias de estas proteínas participan en procesos de inmunidad celular, proliferación celular, diferenciación celular, morfogénesis, comunicación celular, deconstrucción de paredes celulares de las plantas, patogénesis y defensa (Tsang y col., 2008).

El secretoma es una fracción del proteoma celular que incluye proteínas secretadas, proteínas de la matriz extracelular o que están implicadas a la vía de secretora, éste dependerá de las variables ambientales, como fuente de carbono, pH, temperatura, estado del medio, etc., cada una de ellas puede modificar el perfil proteico. Su caracterización es complicada ya que además de afectar las variables ambientales, las herramientas de caracterización e identificación también interfieren. El secretoma es aproximadamente el 10% del genoma (Callegari y Navarrete, 2012; Caccia y col., 2013)

Se ha mencionado que el conocimiento sobre las vías de secreción que emplean los hongos filamentosos es muy poco conocido, pero no se descarta la idea que las diferencias con levaduras y hongos superiores sea mínima. Existen diversos mecanismos de secreción de proteínas; por un lado tenemos la vía clásica de secreción de proteínas que presentan un péptido N-terminal específico; este péptido consta aproximadamente de 15-30 aminoácidos y determina la orientación de la proteína a un organelo o hacia el

medio ambiente por medio de vesículas. Por otro lado, existen diversos mecanismos denominados no convencionales; entre ellos, podemos citar proteínas que presentan el sistema TAT (Twin arginine translocation) en procariotas y plantas, y las secuencias señal de la caja tipo en bacterias. Pero igualmente existen otras proteínas que no requieren de algún péptido señal para su secreción, ya que éstas son expulsadas por exocitosis por vesículas recubiertas, lisosomas secretoras y microvesículas, pero como se ha mencionado, el conocimiento sobre estas vías alternas es muy poco entendido. Entre las proteínas secretadas por vías no clásicas están: enzimas metabólicas, chaperonas, factores de traducción y reguladores de transcripción (Girard y col., 2012; Caccia y col., 2013; Giardina y col., 2014).

2.6.2 Técnicas para la separación e identificación de proteínas en proteómica.

Girotti (2010), realizó una clasificación de las técnicas más usadas en proteómica. Para la identificación de proteínas, primero se separan mediante electroforesis, ya sea unidimensional (1-DE) o bidimensional (2-DE), cromatografía líquida (LC) o cromatografía de afinidad (TAP=*Tandem affinity purification*), al finalizar la separación, se realizan técnicas de cuantificación por medio de tinciones por plata, Sypro Ruby o Commasie sobre los geles uni o bidimensionales, o realizar una marcación previa a la separación, ya sea por DIGE (2-D-Difference In Gel Electrophoresis), iTRAQ (Isobaric Tag for Relative and Absolute quantitation), SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture), o iCAT (Isotope-Code Affinity Tagging), para después identificarlas por medio de huella peptídica con o sin datos de fragmentación de péptidos empleando espectrometría de masas simple (MS) o en tándem (MS/MS ó MS_n) o recurrir a la secuenciación de Novo.

2.6.2.1 Geles Bidimensionales (2-DE).

La separación de proteínas por medio de electroforesis bidimensional (2-DE), es una técnica muy empleada en estudios de proteómica, se desarrolló desde los años 50's, modificándose a través del tiempo para mejorarla, siendo el método más utilizado el publicado por O'Farrell (Klose, 2009). La separación de las proteínas se lleva a partir del punto isoeléctrico y peso molecular que éstas poseen, siendo posteriormente, teñidas con tinción Coomassie, tinción por plata, tinciones fluorescentes o por marcaje, logrando detectar las proteínas separadas en el gel. Es empleada para conocer la cantidad y

localización subcelular de proteínas individuales, identificar cambios en la expresión de proteínas en respuesta a estímulos o identificar proteínas regulatorias, la electroforesis 2-D es empleada para localizar y separar proteínas de interés, y para comprender funciones dentro y fuera de la célula (Encarnación, s/año)

2.6.3 Espectrometría de masas e identificación de proteínas.

La espectrometría de masas es una técnica que se utiliza para determinar masas de polipéptidos, características estructurales que incluyen la secuencia de aminoácidos, sitios de unión que presenta y tipos de modificaciones postraduccionales que puede sufrir. Siendo el MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) y el ESI (*Electrospray Ionization*), los métodos de ionización más usados, acoplados a una gran variedad de combinaciones de analizadores de masas, mejorando la identificación de las moléculas (Domon y Aebersold, 2006).

Las características de los métodos de ionización son las siguientes:

- MALDI: Ésta técnica fue introducida por Karas y Hillenkamp en 1988, la muestra se incorpora a una matriz, que posteriormente, se colocará en una placa de metal para dar lugar a la formación de cristales; cristalizada la muestra se somete a radiación por láser, dando lugar a la producción de iones moleculares, predominando iones monovalentes. Las cargas que presentan pueden ser inducidas mediante la adición o pérdida de protones para formar MH^+ , MH_2^{++} , MH^- , $MNaH^{++}$, a causa de la pérdida o ganancia de electrones, o a su vez por la adición de pequeños iones como Na^+ , acetato, amonio, entre otros. Después, las muestras son aceleradas por un campo eléctrico hasta el analizador de masas. La matriz absorbe la luz del láser ($\lambda=337$ nm), esto, se debe a que la matriz está constituida por moléculas con anillos aromáticos, como son: el ácido 2,5-dihidroxibenzóico, el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico o el ácido sinapínico (Wysocki y col., 2005; Morales y Gallo, 2006).

- ESI: En esta técnica descrita por Fenn en 1989, se hace fluir la muestra líquida desde un microcapilar hasta el orificio del espectrofotómetro de masas, generando una nube con gotas finas cargadas eléctricamente a causa de la diferencia de potencial que hay entre el microcapilar y la entrada al espectrómetro de masas, la solvatación se produce antes de la entrada en el alto vacío del espectrómetro de masas. Por lo general, está técnica es acoplada a un sistema cromatográfico, ya sea de fase inversa o electroforesis capilar, permitiendo el análisis de muestras complejas, éste método induce

estados de carga, donde los espectrómetros de masas detectan masa/carga= m/z. Las cargas eléctricas se distribuyen en las moléculas de analitos, resultando iones multivalentes denominándolo un estado de carga. Para calcular la masa real de las proteínas se emplea al menos 2 iones multivalentes utilizando algoritmos de convolución. Una ventaja del ESI, es que permite utilizar una mínima cantidad de analito, pero tiene que ser purificado después de la digestión en gel (Wysocki y col., 2005; Morales y Gallo, 2006).

La correcta identificación de proteínas, dependerá de la calidad de los datos que se obtengan del análisis por espectrómetro de masas, de la información de las bases de datos y de los métodos que se empleen para la búsqueda de datos. Dentro de los estudios de proteómica las bases de datos más empleadas para encontrar información acerca de la identidad de las proteínas, son: Profound, MOWSE, MASCOT, SEQUEST, FindMod y FASTA (Morales y Gallo, 2006), para identificar el secretoma, se puede emplear a Phobius y Signal P, para identificar secuencias señal, TMHMM para la identificación de proteínas putativas transmembranales, Secretome P para identificación de proteínas secretadas por vías alternas, TargetP que ayuda a eliminar proteínas que son dirigidas a mitocondria y Prosite para la identificación de proteínas que residan en el retículo endoplasmático para eliminar proteínas putativas (Tsang y col., 2008).

2.6.4 Estudios de proteómica de *Aspergillus*.

Krijgsheld y col. (2012), evaluaron el efecto de la adición de la cicloheximida sobre el secretoma de *A. niger* usando como fuente de carbono xilosa. Encontraron que la cicloheximida inhibe la secreción de proteínas en la periferia de la colonia, mientras que en zonas intermedias y centrales hay un aumento. A partir de dicho estudio, se identificaron 124 proteínas en colonias tratadas con cicloheximida, de las cuales 19 proteínas secretadas no se habían identificado; 53 de las 124 proteínas no se encontraron en las colonias no tratadas; 35 proteínas secretadas resultaron ser ≥ 4 veces en las zonas centrales y subperiféricas de colonias tratadas con cicloheximida en comparación con las no tratadas. La composición del secretoma en cada una de las cinco zonas concéntricas estudiadas difería.

Mientras que Yang y col. (2012), compararon las proteínas expresadas por *A. niger* AN-1, usando como fuentes de carbono el gopipol y la glucosa. Identificaron 51 proteínas expresadas diferencialmente entre los medios que pueden relacionarse con la

degradación de gosispol. Por otro lado, estudios realizados por de Oliveira y col. (2011) con *A. niger* cultivado en medios con D-sorbitol con concentraciones mínimas de D-maltosa y D-xilosa, como inductores, demostraron la presencia de 102 proteínas secretadas y 1,126 proteínas microsomales.

Han y col., (2010) analizaron los secretomas de *A. terreus* obtenidos en cultivos con sacarosa, glucosa, almidón y fécula. Los investigadores identificaron 82 proteínas, de las cuales 12 proteínas se detectaron en presencia de al menos dos fuentes de carbono diferentes, 16 proteínas únicas en sacarosa, 3 en glucosa, y 8 en almidón.

Oda y col. (2006) realizaron una comparación del secretoma producido por *A. oryzae* en cultivo sólido y sumergido. Encontraron 85 proteínas en cultivo sólido y 110 en cultivo sumergido. Clasificando un total de 29 proteínas en cuatro grupos.

Medina y col. (2005) analizaron el secretoma de *A. flavus* utilizando rutina como fuente de carbono y comparando con medios de glucosa y papa-dextrosa. En el secretoma se identificaron 10 proteínas con rutina, 5 con glucosa y una con papa-dextrosa. Del total, 16 proteínas comunes en los tres medios y 14 desconocidas o hipotéticas. Previamente, Medina y col., (2004), analizaron el secretoma del mismo hongo, utilizando como inductor la rutina, encontraron 15 proteínas inducidas por rutina y 7 proteínas no inducidas y más de 90 de proteínas no identificadas

A pesar de que actualmente se ha dado un auge en la investigación sobre la expresión de proteínas de origen microbiano a través de la proteómica, falta mucha información por obtener; ya que como se ha observado, la síntesis de proteínas depende de cada sistema ambiental y microorganismo. Por lo que se recomienda realizar estudios sobre el proteoma en condiciones de gran interés, para poder profundizar y mejorar el crecimiento microbiano, si así se desea.

De tal forma que el objetivo de este trabajo es buscar la caracterización del secretoma de *A. brasiliensis* ATCC9642, en un medio simple en estado sólido, usando glucosa como fuente de carbono; para tratar de obtener información sobre los procesos bioquímicos que realiza éste hongo para su adaptación en medio sólido. Y posteriormente, tratar de entender las diferencias que existen comparando con la FEL.

3. JUSTIFICACIÓN

Los mecanismos empleados por los microorganismos para llevar a cabo su crecimiento en la fermentación en estado sólido, aún no son del todo comprendidos; hace falta ampliar el conocimiento sobre éste tipo de cultivo. Por lo que creemos que al estudiar el secretoma expresado por *Aspergillus brasiliensis* ATCC9642, se pueda obtener información acerca de los procesos que realiza el hongo para crecer en medios sólidos, así como los mecanismos que emplea resistir a concentraciones elevadas de glucosa. Logrando identificar las proteínas que expresen como únicas en cada condición estudiada, que tal vez, nos puedan aportar información acerca del efecto de cada concentración sobre el crecimiento celular. También la caracterización de las proteínas nos puede ayudar a identificar proteínas con funciones nuevas o no conocidas, que puedan ser de interés industrial.

4. HIPÓTESIS

- Existen diferencias significativas en el secretoma de *Aspergillus brasiliensis* ATCC9642, expresado en diferentes concentraciones de glucosa, siendo al menos una proteína diferente entre las condiciones.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

- Obtener y comparar el secretoma de *Aspergillus brasiliensis* ATCC9642 en cultivo sólido a diferentes concentraciones de glucosa.

5.2 Objetivos específicos.

- Obtener el perfil respiratorio a diferentes concentraciones de glucosa.
- Identificar las diferencias entre los secretomas obtenidos.
- Identificar y caracterizar las proteínas que conforman el secretoma.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Cepa y conservación.

6.1.1 Microorganismo.

Se utilizó *Aspergillus brasiliensis* ATCC9642 (antes *Aspergillus niger* ATCC 9642) (Varga, 2007). La cepa forma parte del cepario de la planta piloto de Fermentación Medio Sólido (FMS) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, donde es conservada en glicerol al 20% (v/v) a -20°C y liofilizada.

6.1.2 Activación y conservación de *Aspergillus brasiliensis* para el estudio del secretoma.

A partir de liofilizado, se inoculó un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de medio de papa-dextrosa-agar (PDA-Bioxon®). El cultivo se incubó durante 7 días a 30 °C. Las esporas producidas se cosecharon con 30 mL de 0.05% (v/v) Tween 80. La suspensión obtenida se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min a 10 °C; posteriormente, el “pellet” obtenido se resuspendió en glicerol al 20% (v/v), agitándose en vórtex para homogenizar la suspensión. Finalmente, se separó en viales de 2 mL, que se conservan a -20 °C. Las esporas contenidas en estos viales se utilizaron para la propagación del inóculo.

6.1.3 Propagación del inóculo.

Para cada cultivo, el inóculo se propagó a partir de un vial con suspensión de esporas conservado en glicerol a -20 °C. La reactivación y propagación del inóculo se realizó en dos etapas denominadas semilla 1 (S1) y semilla 2 (S2), respectivamente. Semilla 1: A partir de un vial, se inocularon, por estriado, 3 tubos de ensaye (dimensiones 1.9 cm x 17.5 cm PYMEX No.9820) inclinados con 10 mL de PDA y con tapón de algodón. Los cultivos se incubaron por 7 días a 30 °C. Semilla 2: Al terminar el tiempo de los cultivos de los tubos de ensaye (S1), se adicionó 10 mL de 0.05% (v/v) Tween 80 al tubo con mayor esporulación, se agitó ligeramente en un vórtex para desprender las esporas, evitando la ruptura del PDA. De la suspensión obtenida se tomó 1 mL y se inoculó un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de PDA (por triplicado), se incubaron 7 días a 30 °C. Al finalizar el periodo de incubación, las esporas obtenidas se utilizaron como inóculo para los cultivos empleados en el estudio del secretoma expresado de *A. brasiliensis* ATCC9642.

6.2 Medio de cultivo.

El medio de cultivo utilizado fue el reportado por Hill y Kafer (2001), variando la fuente de carbono para ajustar la relación C/N a 6. Para determinar el efecto de la concentración de nutrientes sobre el secretoma de *A. brasiliensis*, se concentraron todos los componentes del medio de cultivo en la misma magnitud manteniendo la relación entre éstos. El medio basal contiene (en g/L): Glucosa 20, NaNO₃ 6, KCl 0.52, KH₂PO₄ 0.815, K₂HPO₄ 1.045 y MgSO₄·7H₂O 0.52.

Por cada litro de medio se adicionó un mililitro de solución elementos traza con la siguiente composición (en g/L): FeSO₄·7H₂O 0.005, EDTA 0.05, ZnSO₄·7H₂O 0.022, H₃BO₃ 0.011, MnCl₂·4H₂O 0.005, CoCl₂·6H₂O 0.0016, CuSO₄·5H₂O 0.0016 y (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.0016.

El pH inicial del medio de cultivo oscilaba entre 5.7-6.4.

6.3 Acondicionamiento del soporte inerte.

El soporte inerte empleado fue agrolita con un tamaño de partícula de 0.85-1.0 mm (Tamices 16 y 20). La agrolita fue lavada dos veces con agua corriente y una vez con agua destilada; posteriormente, se escurrió y se deshidrató a 60°C, hasta tener una humedad menor al 3% (p/p).

6.4 Preparación de la fermentación en medio sólido.

La fermentación en medio sólido se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 6 g de agrolita seca. Por cada matraz se utilizaron 11 mL de medio de cultivo inoculado. El medio de cultivo y el soporte inerte fueron esterilizados por separado a 93 °C por 15 min, esto para evitar la caramelización de la glucosa con las altas concentraciones que se trabajaron. Una vez frío el medio de cultivo, se inoculó con un volumen de suspensión de esporas (conteniendo 1.1x10⁸ esporas). La suspensión de esporas se obtuvo de la S2, la cual se cosechó con 30 mL de 0.05% (v/v) Tween 80 estéril. Una vez inoculado el medio de cultivo contenido en un tubo de ensaye, se adiciona asépticamente al matraz que contiene la agrolita ya estéril. Se mezcla hasta observar mezclado homogéneo y se cambia el tapón de algodón del matraz por el tapón con distribución de aire, para el análisis de aire a la salida de los matraces (Fig.1). Los cultivos se incubaron a 30°C con un flujo de aire de 30 a 40 mL/min por matraz. Se evaluaron medios de cultivo con

concentraciones de glucosa de 30, 60, 100, 120, 140, 160 y 180 g/L. Los cultivos se realizaron por duplicado en al menos dos tiempos diferentes.

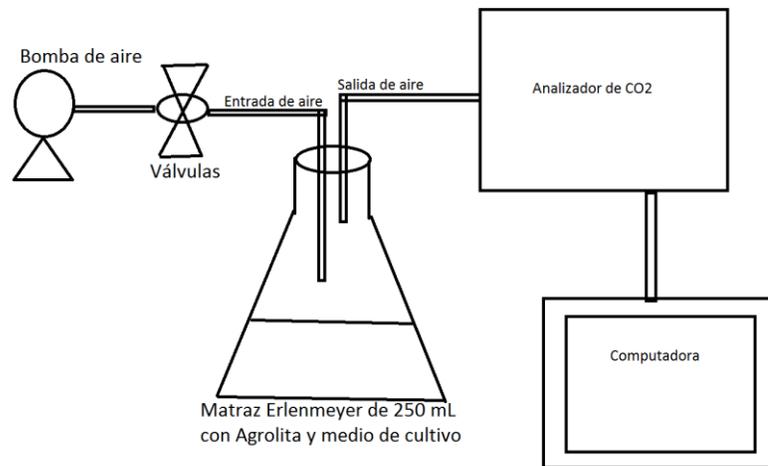


Figura 1. Esquema del sistema de medición del proceso de respiración.

6.5 Obtención del secretoma.

El secretoma se obtiene de muestras cosechadas en el tiempo de cultivo al que se alcanza la tasa máxima de producción de CO₂. Este tiempo de cultivo depende de la concentración inicial de glucosa. Una vez alcanzada la tasa máxima de producción de CO₂, el matraz se desconecta del sistema de análisis de gases y se refrigera a 4°C durante 30 min para detener el metabolismo.

Posteriormente, se adicionan 60 mL de agua destilada fría que contiene 20 µL de coctel inhibidor de proteasa de Sigma-Aldrich® y se agita a 150 rpm durante 30 minutos a 4°C, al concluir la agitación, se filtra al vacío a través de papel Whatmann 41, este paso se realiza dos veces para mejorar la separación de la biomasa del extracto proteico. Posteriormente, el filtrado se separa en dos fracciones, una de 10 mL para análisis de pH final y proteína, mientras que el resto se usa para analizar el secretoma.

Para análisis del secretoma, parte del filtrado (alrededor de 40 mL) se somete a un proceso de ultrafiltración y diafiltración en tubos Amicon MWCO 10kDa de 15 mL. Esta operación se realiza en lotes de 10 mL de extracto proteico centrifugados a 3750 rpm durante 25 minutos. Para cada lote se recuperan entre 1 y 1.5 mL del extracto concentrado. Finalmente, se juntan los extractos proteicos, se adicionan de 6 a 8 mL de amortiguador 20mM Tris-HCl pH 7.2 y se concentran y dialfiltran hasta obtener un

volumen final de 1mL. Esta operación se repite dos veces para obtener al final entre 2 y 2.5 mL de extracto extracelular concentrado y diafiltrado. El extracto obtenido se separa en viales en volúmenes de 300 µL, se liofiliza y se almacena a -20°C.

6.6 Análisis de proteína.

Método de Bradford (microensayo). El contenido de proteína en los extractos proteicos concentrados se determinó con el microensayo de Bradford en microplaca. Para la curva estándar se utilizó albumina sérica bovina (abreviada en inglés BSA) con una concentración inicial de 1470 µg/mL; diluyéndose de la siguiente manera: 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 y 1:640. Para las muestras del extracto proteico sin concentrar se diluyeron 1:50, y las muestras concentradas después de la ultrafiltración se diluyeron en 1:150. Como blanco se usó el amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 7.2. Para el microensayo, se pipetea 160 µL de la muestra estándar y de la muestra problema, los cuales se colocaron en los pozos de la placa. Después se adiciona el reactivo de Bradford concentrado con un volumen de 40 µL, dejando reposar durante 5 minutos para que se lleve a cabo la reacción y, posteriormente, se realiza la medición de la absorbancia en el lector de placas a una $\lambda=630$ nm. Este método de cuantificación se empleó para las muestras de proteína separadas en los geles 2D-PAGE, método usado en la Planta Piloto 4 (FMS) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.

Método de BCA. Adicionalmente, el contenido de proteína en los extractos concentrados fue determinado por el método del ácido bicinonínico (abreviado en inglés BCA). Este método se empleó para la proteína usada para la separación por 1D-SDS-PAGE. Se utilizó el Kit de Pierce BCA “protein Assay Kit” (Thermo scientific®).

Para la curva estándar se prepara una solución concentrada de BSA (2 mg/mL) y se hacen diluciones seriadas como se indica en la tabla 4.

Tabla 4. Preparación de las diluciones de BSA estándar.

Vial	Volumen de diluyente (µL)	Volumen y fuente de BSA (µL)	Concentración final de BSA(µg/mL)
A	0	300 de stock	2000
B	125	375 de stock	1500
C	325	325 de stock	1000
D	175	175 de B	750
E	325	325 de C	500
F	325	325 de E	250
G	325	325 de F	125
H	400	100 de G	25
I	400	0	0

Para la preparación del reactivo: se mezclan 5 mL del reactivo A (carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato de sodio en 0.1M hidróxido de sodio) con 100 μ L del reactivo B (4% de sulfato cúprico). Posteriormente, se colocan 10 μ L de la muestra estándar o problema en los pozos de la microplaca, y después se adicionan 200 μ L del reactivo, se agita por 30 segundos, y se incuba a 37°C. La microplaca debe de cubrirse para evitar evaporación de las muestras en los pozos.

Al concluir el tiempo de incubación se mide la absorbancia a una $\lambda=540$ nm en un lector de placas de Biorad® (Modelo 680, software Microplate manager 5.2), Finalmente, se hace la regresión lineal de los datos de las muestras estándar y se obtiene la ecuación de la recta, la cual se denominó curva estándar.

Este método de cuantificación de proteína se utilizó para las muestras separadas por los geles 1D-SDS-PAGE, siguiendo el protocolo establecido en el CCRC de la Universidad de Georgia.

6.7 Geles 2D-PAGE

La separación de las muestras en dos dimensiones (2D-PAGE) se realizó en dos etapas: en la primera etapa se hizo una separación por punto isoeléctrico en un equipo de isoelectroenfoque y posteriormente, la segunda dimensión se realizó en geles SDS-PAGE con una T al 12% (%T=g acrilamida + g bis-acrilamida*100/volumen total).

Isoelectroenfoque. La proteína liofilizada se resuspendió en amortiguador de rehidratación, el cual se compone de: Urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 1% (p/v), DTT 50mM y anfolitos 0.2% (v/v). La proteína tiene que estar totalmente soluble. Posteriormente, se adicionan 125 μ L de la solución que contiene 150 μ g de proteína en cada canal de la bandeja de enfoque, y a continuación se colocan las tiras Ready-strip IPG de Biorad® con gradiente de pH 3-10 y longitud de 7 cm, sellándose con aceite mineral de Biorad®, la placa se conecta al equipo de isoelectroenfoque (IEF) Protean i12 IEF Cell Biorad® para realizar una rehidratación activa por un tiempo de 14 horas. Al concluir la rehidratación, se colocan los *wiks* (tiras de papel filtro con 1 cm de longitud) que eliminarán sales y otros compuestos que puedan interferir con el proceso de IEF, el cual siguió el siguiente protocolo:

- Paso 1 250V/15 min

- Paso 2 gradiente 4000v/1h
- Paso 3 4000V hasta 15000 V-hora
- Paso hold a 500V

Al finalizar el proceso de IEF, se retira el aceite mineral y se cubren las tiras con la solución de equilibrio I, se agitó suavemente durante 15 minutos, al concluir el tiempo, se retiró la solución de equilibrio I y se adicionó la solución de equilibrio II, se agitó por 15 minutos. La composición de las soluciones de equilibrio es la siguiente (en g/mL de solución): Urea 0.36, SDS 0.02; (en mL/mL de solución): Tris-HCl (1M pH 8.8) 0.25, glicerol 0.2. Se adicionan 0.02 g/mL de DTT e iodoacetamida a las soluciones de equilibrio I y II, respectivamente.

Al terminar de equilibrar las tiras, se colocan en los geles SDS-PAGE con una T al 12%. Los geles se sellan con agarosa y las proteínas migran a 150V. Después de terminar la corrida, el gel se coloca en una solución fijadora (10% ácido acético, 40% etanol y 50% agua) por 2 horas. Posteriormente, se lava con agua destilada y se tiñe con azul de Commasie G-250, se digitalizan las imágenes de los geles por un documentador Geldoc de Biorad® y el software ImageLab.

6.8 Análisis de imágenes de geles 2D-PAGE y preparación de *spots* para el análisis por LC-MS/MS.

Para la identificación y diferenciación de *spots* de las imágenes digitalizadas, se usó el software PDQuest de Biorad®. Los geles maestro de cada condición se obtuvieron a partir de dos imágenes; posteriormente, se hizo la comparación de los geles maestro entre condiciones. Sólo se consideraron como *spots* diferentes, aquellos que fueron únicos en cada condición.

Los *spots* seleccionados, se cortaron de forma manual, empleando puntas para pipetas de 200 µL, cortando cada punta con un bisturí (previamente esterilizado) al tamaño del *spot* a extraer. Posteriormente, los *spots* se colocaron en tubos de PCR, bien etiquetados con una solución desteñidora (solución: 50% metanol, 5% ácido acético y 45% agua) para eliminar el azul de Coomassie, al estar libre de la solución de tinción, se procede con la digestión trípica.

6.9 Electroforesis SDS-PAGE para el análisis másico (*shotgun*) de proteínas.

Los extractos proteicos concentrados y liofilizados se resuspendieron con 150 μL de amortiguador de Tris-HCl 20mM pH 7.2. La proteína se cuantificó por el método de BCA y se fraccionó en alícuotas de 100 μg de proteína; las alícuotas se liofilizaron nuevamente. Los 100 μg de proteína ya liofilizados se solubilizaron con 15 μL de amortiguador Laemmli 2x (Sigma-Aldrich) y 15 μL de agua desionizada. Se agitó con un vórtex hasta solubilizar la muestra. Después se dejó reposar las muestras en un baño María por 4 minutos. Al concluir el tiempo, se inyectaron los 30 μL de cada muestra en los carriles en el gel de electroforesis NuPAGE 12% Bis-Tris, 1mm x 10 carriles (Novex de Invitrogen[®]), las muestras corrieron en una cámara X-Cell Sure Lock Novex[®] y una fuente de poder Model 1000/500 de Biorad[®] a 150 V. Para observar el peso molecular aproximado de las proteínas presentes, se utilizaron 10 μL del marcador de peso molecular (Seebblue plus2 Pre-Stained Protein Standar de Novex[®]). Al concluir la corrida, los geles se lavan con agua destilada para eliminar residuos del amortiguador de corrida, y posteriormente, se tiñe con 50 mL de Bio-safe Coomassie G-250 Stain de Biorad[®], Model; #161-0786). Dejando en agitación durante una hora, se lava y se escanea la imagen. Posteriormente, se el gel como se indica a continuación.

Cada banda se fracciona en tres partes iguales: superior, intermedia e inferior, de las cuales se cortan en fragmentos más pequeños como se muestra en la figura 2, Estos fragmentos de gel se destiñen (solución: 50% metanol, 5% ácido acético y 45% agua) en tubos Eppendorf de 1.5 mL, hasta eliminar el colorante.

6.10 Digestión trípica.

Estando, las piezas de geles completamente destiñidas, se deshidrataron con 200 μL de acetonitrilo durante 10 minutos, se removió el acetonitrilo y se añadieron otros 200 μL , incubándose por 5 minutos. Esta operación se repitió 2 veces más hasta observar que las piezas de los geles se tornaron a un blanco opaco. Para eliminar residuos de acetonitrilo, las muestras se secan a vacío en una centrífuga a vacío (AJ114486 Heto CT110 Cooling Trap with VR-Maxi-1 Vacuum Centrifuge) durante 20 minutos.

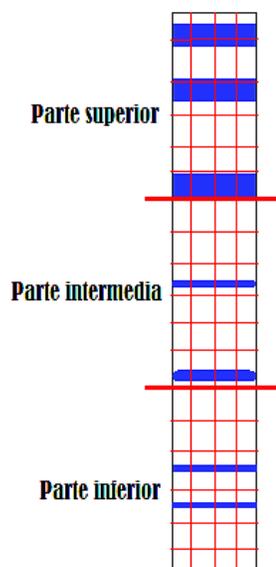


Figura 2. Esquema de corte de banda para digestión trípica

A continuación, se realizó la reducción de las proteínas con una solución de DTT 10 mM en bicarbonato de amonio 100 mM, cubriendo totalmente las piezas de los gels con un volumen de 400 μ L e incubando a 56°C durante 1 h. Posteriormente, se removió la solución de DTT. La alquilación se realizó añadiendo 400 μ L de solución de iodoacetamida 100 mM en bicarbonato de amonio 100 mM, incubando por 45 min en un lugar oscuro. Al concluir la alquilación, se remueve la solución de iodoacetamida y se lavaron los pedazos del gel con 100 μ L de solución de bicarbonato de amonio 100 mM, se dejó reposar 10 minutos. Al finalizar el tiempo se eliminó el exceso de la solución y se deshidrataron las piezas de gel con 200 μ L de acetonitrilo, durante 5 minutos, repitiendo el lavado otras dos veces cambiando la solución de acetonitrilo, hasta que las piezas tuvieran un blanco opaco. Se removió el acetonitrilo y se añadieron 100 μ L de la solución de bicarbonato de amonio 100 mM para rehidratar las piezas del gel, esta solución se dejó durante 10 minutos; al terminar la rehidratación se removió el exceso de la solución de bicarbonato de amonio y se añadió 200 μ L de acetonitrilo reposando 5 minutos, esto para deshidratar nuevamente los fragmentos de gel, repitiendo este paso dos veces más hasta observar las piezas del gel con un blanco opaco. Para la eliminación del acetonitrilo, los fragmentos se secan a vacío durante 20 minutos.

Previo a la digestión trípica, se preparó la solución de tripsina de Promega®, disolviendo 20 μ g de tripsina en 1 mL de solución de bicarbonato de amonio 100mM, conservándose fría. Al tener los gels deshidratados, se adicionaron 60 μ L a cada tubo,

que contiene las piezas de gel, y se incubaron por 10 minutos en un baño de hielo. Al concluir el tiempo, se adicionaron 140 μL de bicarbonato de amonio 100 mM y se agitó en vórtex. Incubándose a 37°C toda la noche para que se llevará a cabo la digestión trípica. Posteriormente, los péptidos se extrajeron con 200 μL de bicarbonato de amonio 100 mM, se agitó en vórtex, se incubó por 10 min, se centrifugó 2 min a 10000 rpm y se recolectó el sobrenadante en un vial; esto se realizó dos veces más, recolectando los sobrenadantes en el mismo tubo por cada parte de la banda. El líquido se evaporó en la centrifuga a vacío, y posteriormente, se resuspende la muestra con 150 μL de una solución de ácido fórmico 0.1%, 94.9 % agua y 5 % acetonitrilo. A continuación se filtró en tubos Centricon (Pall®, nanosep MF) de tamaño de poro de 0.2 μm , que deja pasar partículas menores a 20 kDa, esto se realizó a 12 000 rpm por 15 minutos; se recuperó el filtrado y se secó por centrifugación a vacío. Finalmente, se etiquetó cada tubo indicando a que parte de la banda corresponde y se almacena en congelación hasta el análisis por espectrometría de masas.

Para el análisis de los *spots* se realizaron los mismos pasos para la digestión de las proteínas mencionados anteriormente, sólo que se modificaron los volúmenes de las soluciones, debido a que la cantidad de proteína en los *spots* es menor. Los volúmenes usados por spot son los siguientes:

Para deshidratar el gel se utilizaron 20 μL de acetonitrilo, hasta obtener un blanco opaco.

Para la reducción con la solución de DTT 10 mM en bicarbonato de amonio 100 mM, se utilizaron 10 μL , igualmente en la solución de iodoacetamida 55 mM.

Para lavar y rehidratar los *spots*, se adicionaron 10 μL de bicarbonato de amonio 100 mM.

La digestión trípica se realizó adicionando 1 μL de la solución de tripsina, más 2 μL de bicarbonato de amonio 100 mM.

La extracción de péptidos se realizó con 20 μL de bicarbonato de amonio 100 mM, se evapora la solución y la muestra se resuspende con 40 μL de ácido fórmico al 0.1%, 95% agua y 5% acetonitrilo, y se filtra por centrifugación durante 5 minutos a 12 000 rpm.

6.11 Espectrometría de masas.

Las muestras ya digeridas con tripsina, se resuspendieron en 20 μ L de ácido fórmico 0.1%, 94.9 % agua y 5 % acetonitrilo, se disuelven bien y se depositan en insertos. Para evitar la presencia de burbujas, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 10s. Posteriormente, las muestras se llevaron al LC-MS/MS, analizando por duplicado los péptidos obtenidos por cada condición.

Se utilizó un equipo LC Agilent 1100 (Palo Alto, CA, USA) conectado al espectrómetro de masas a través de un divisor T para permitir la alimentación de muestras a flujos bajos. Para la separación de péptido se usó una columna C18 con perlas de 5 μ m de diámetro (Rainin Woburn, MA, USA), que fueron empaquetadas en un capilar de sílice fundido (10.5 cm x100 μ m ID) a una presión de 1000 psi utilizando gas nitrógeno. Las muestras de péptidos se cargaron en la columna durante 45 minutos bajo la misma presión. Los péptidos se eluyeron con gradiente usando 0.1% ácido fórmico (A) y 99.9% Acetonitrilo/0.1% ácido fórmico (B). Tras el lavado inicial con 95 % de A durante 10 minutos; los péptidos se eluyeron de la columna con un gradiente lineal de 5-60% de B durante 90 minutos a una velocidad de flujo aproximadamente de 200 η L/min; directamente dentro de una trampa de iones lineal de espectrometría de masas LTQ, a través de una fuente electrospray (Thermo Fisher, San Jose, Ca, USA) usando un voltaje de 2500V.

El equipo se ajustó para adquirir espectros MS/MS de los nueve iones precursores más abundantes de cada escaneó MS con una serie de tres repeticiones, cada repetición se realizaba cada 5 segundos. La exclusión dinámica se habilitó a los 160 segundos. Los algoritmos de los espectrómetros de masas en RAW tándem se convirtieron en una lista de picos usando ReAdW seguido por bymzMXL2O. Los datos de la lista de picos fueron investigados usando Mascot 1.9 (Matrix Science, Boston, MA, USA).

6.12 Selección e identificación de proteínas.

La selección de las proteínas se realizó al observar cuales eran únicas o en común para cada condición; posteriormente, la información obtenida en el espectrómetro de masas y por MASCOT, se comparó en bases de datos para observar si las proteínas forman parte del secretoma, las bases de datos y algoritmos consultados: BlastP (consultado en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); SignalP 4.1 Server, SecretomeP 2.0 Server, TMHMM

Server v. 2.0 (consultados en <http://www.cbs.dtu.dk>); Pfam 27.0 (consultado en <http://pfam.xfam.org/>); Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) y KEGG (<http://www.kegg.jp/>).

7. RESULTADOS.

Este capítulo se divide en tres secciones; la primera se presenta los resultados de producción de CO₂ en medios con diferentes fuentes de carbono. En la segunda sección se presentan los resultados de la separación 2D-SDS-PAGE y 1D-SDS-PAGE de los extractos proteicos, obtenidos con diferentes concentraciones de nutrientes en el medio de cultivo. En la última sección, se presenta el análisis de las proteínas obtenidas de la separación 2D-SDS-PAGE.

7.1. Estudios respirométricos.

En este apartado se presentan y se analizan los resultados obtenidos por respirometría del crecimiento de *A. brasiliensis* ATCC9642 en medios de cultivo con diferentes concentraciones de glucosa. La primera parte de este capítulo, muestra los resultados obtenidos por respirometría de las diferentes concentraciones de glucosa evaluadas para la selección de una concentración mínima, media y máxima. Posteriormente, la segunda parte está conformada por los resultados de respirometría de las concentraciones seleccionadas para el estudio del secretoma.

7.1.1 Tasas y cinéticas de producción de CO₂ de las concentraciones 30-180 g/L.

En la figura 3 se presenta la tasa de producción de CO₂ en medios de cultivo sólido con concentraciones de glucosa de 30 a 180 g/L.

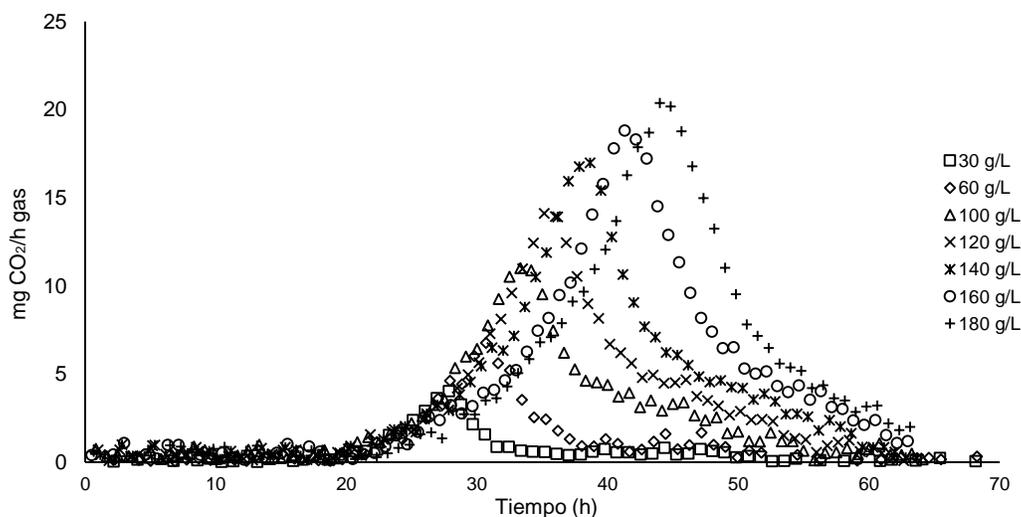


Figura 3. Tasa de producción de CO₂ de medios de cultivo con concentraciones de glucosa de 30 a 180 g/L.

La tasa máxima de producción de CO₂ incrementa al aumentar la concentración de glucosa en el medio de cultivo; así mismo, el tiempo en el que se presenta la tasa máxima a cada concentración de nutrientes es mayor. Esto demuestra la ausencia de efectos negativos (presión osmótica o inhibición por sustrato) en medios de cultivo con concentración de glucosa de hasta 180 g/L. Este resultado es similar a los que presenta Favela y col. (1998), donde se demostró que *A. niger* 10 creció favorablemente en altas concentraciones de glucosa (30-450 g/L) en medio sólido.

En la figura 4, se presenta las cinéticas de producción de CO₂ en medios de cultivo sólido con concentraciones de glucosa de 30 a 180 g/L. La producción de CO₂ aumenta en función de la concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo, donde las concentraciones de 30 y 60 g/L llegan a la fase estacionaria a las 30-35 horas, mientras que las concentraciones de 100-180 g/L, alrededor de las 55-60 horas van entrando a la fase estacionaria. El comportamiento de las cinéticas de producción de CO₂ es similar a las cinéticas de crecimiento por *A. niger* C28B25 a concentraciones de 6.25-100 g/L de sacarosa reportadas por Viniegra y col. (2003).

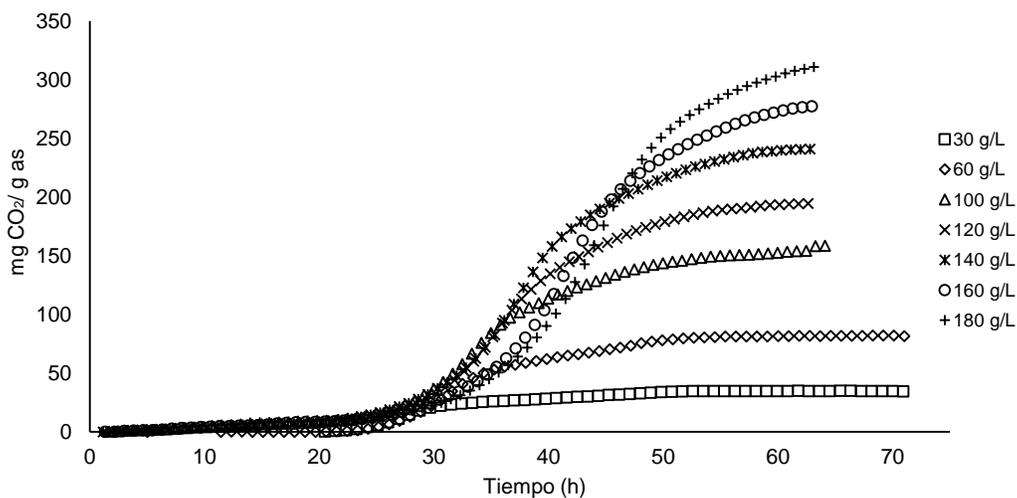


Figura 4. Cinéticas de producción de CO₂ de medios de cultivo con concentraciones de glucosa de 30 a 180 g/L.

A partir de los datos cinéticos obtenidos se estimaron parámetros asociados a la producción de CO₂ (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros asociados a respirometría.

Parámetro	Concentración g/L						
	30	60	100	120	140	160	180
mg CO₂/gas h (tasa máxima)	4.02± 0.10	7.36± nd	11.13± 0.18	14.50± 1.76	17.01± 1.33	18.81± 0.16	20.26± 0.94
mg O₂/gas h (tasa máxima)	2.01± 0.10	4.08± nd	6.70± 0.23	8.54± 0.68	9.85± 0.86	11.54± 0.08	12.72± 0.14
mg CO₂/g as (Total producido)	35.23± 5.52	82.30± nd	154.79± 0.10	194.61± 4.13	241.52± 3.70	283.34± 12.81	318.84± 1.30
mg O₂/g as (total consumido)	38.14± 0.83	77.28± nd	138.91± 14.19	175.75± 2.29	204.67± 17.70	241.39± 4.39	253.04± 6.27
Fase Lag (h)	20.52± 1.00	21.32± nd	21.32± 3.62	20.58± 0.64	22.99± 1.40	21.33± 1.24	24.11± 2.53
Tiempo producción continua de CO₂ (h)	7.34± 1.29	10.08± nd	13.90± 2.15	15.00± 0.00	15.71± 0.18	20.00± 1.74	20.21± 2.66
μ (1/h) Ecuación logística	0.29± 0.11	0.24± nd	0.22± 0.02	0.22± 0.01	0.22± 0.01	0.21± 0.00	0.22± 0.02
μ (1/h) Ecuación Gompertz	0.19± 0.07	0.16± nd	0.14± 0.01	0.14± 0.01	0.14± 0.00	0.13± 0.01	0.14± 0.01

En la tabla cinco, se observa que el tiempo de fase lag, el tiempo de producción continua y las tasas específicas de producción (μ_{CO_2}), resultan ser muy similares entre las concentraciones evaluadas. Por lo tanto, se realizó un análisis estadístico para cada parámetro, buscando diferencias entre condiciones, a través de un ANOVA y una prueba de Tukey. Lo cual permitió obtener información que nos sirviera para realizar una adecuada elección de las concentraciones a estudiar.

Cabe mencionar, que la evaluación de los parámetros de la concentración de 60 g/L no se realizó, a causa de que no se contó con los datos suficientes para realizar un análisis estadístico, debido a problemas con las réplicas.

Evaluación de los parámetros respirométricos.

-El primero parámetro evaluado, es la tasa máxima de producción de CO₂, la cual incrementa de acuerdo aumentó la concentración de glucosa en el medio (Fig. 5). Los datos se analizaron mediante un ANOVA, resultando una $F=79.93 > F_{(crítica)}=4.39$, la cual indicó que al menos una condición presentaba una tasa máxima de producción distinta. Posteriormente, con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) se observó que condiciones eran similares y diferentes entre sí, encontrando los siguientes resultados:

Tabla 6. Comparación entre tasas máximas de producción de CO₂ con prueba de Tukey.

Concentraciones (g/L)	Similitud	Variable	Diferencia (mg CO ₂ /h g as)
30-100		x	7.12
30-120		x	10.48
30-140		x	12.99
30-160		x	14.79
30-180		x	16.25
100-120	x		3.36
100-140		x	5.87
100-160		x	7.68
100-180		x	9.13
120-140	x	x	2.51
120-160		x	4.31
120-180		x	5.77
140-160	x		1.8
140-180	x		3.26
160-180	x		1.45
DHS (Tukey)			3.92

Los resultados de la tabla 6, se obtuvieron al comparar la Diferencia Significativa Honesta (DHS) de la prueba de Tukey con la diferencia entre promedios de la tasa máxima de producción entre condiciones; sí el promedio resulta ser menor a la DHS, esas condiciones presentan la misma tasa máxima de producción, en caso contrario, existen diferencias entre las concentraciones. Resultando que la tasa máxima de producción CO₂ de la condición de 30 g/L es diferente de todas las condiciones.

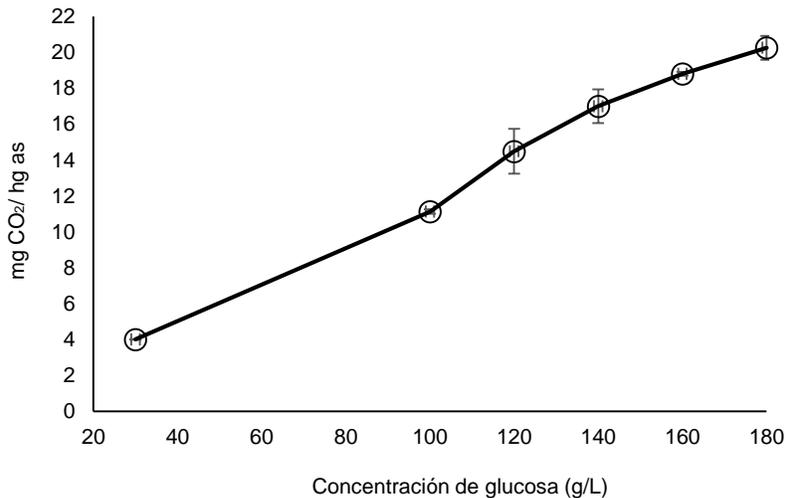


Figura 5. Tasa máxima de producción de CO₂, concentraciones 30 a 180 g/L.

Como se mencionó anteriormente, hay un incremento proporcional de acuerdo a la concentración de glucosa, al observar la figura 5, se aprecia un ligero descenso de la

pendiente en las concentraciones de 140-180 g/L, tal vez a esto se deba a las similitudes de las tasas de producción en éstas concentraciones.

-El segundo parámetro analizado, presenta la tasa máxima de consumo de oxígeno, siendo este proporcional al aumento de glucosa en el medio. Se realizó un ANOVA, para observar si existen diferencias en el consumo de oxígeno, encontrando al menos una condición diferente (Anexo A), por lo cual se realizó la prueba de Tukey para encontrar que condiciones presentan variabilidad y similitud, los datos se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Comparación entre tasas de consumo de O₂ con prueba de Tukey.

Concentraciones (g/L)	Similitud	Variable	Diferencia mgO ₂ /h g as (tasa máxima)
30-100		x	4.69
30-120		x	6.53
30-140		x	7.84
30-160		x	9.53
30-180		x	10.71
100-120	x		1.84
100-140		x	3.15
100-160		x	4.84
100-180		x	6.02
120-140	x	x	1.31
120-160		x	2.99
120-180		x	4.18
140-160	x		1.69
140-180		x	2.87
160-180	x		1.18
HSD (Tukey)		1.84	

Analizando la tabla anterior, por medio de la prueba de Tukey encontramos que sólo la condición de 30 g/L resulta ser diferente en éste parámetro, el resto de las condiciones, tienen similitud comparada con otra.

Los datos obtenidos de la tasa de consumo de O₂ por respirometría se presentan en la figura 6, mostrando un incremento lineal en el consumo de oxígeno con respecto a la cantidad de glucosa en el medio, esto para poder metabolizarla hasta la producción de CO₂.

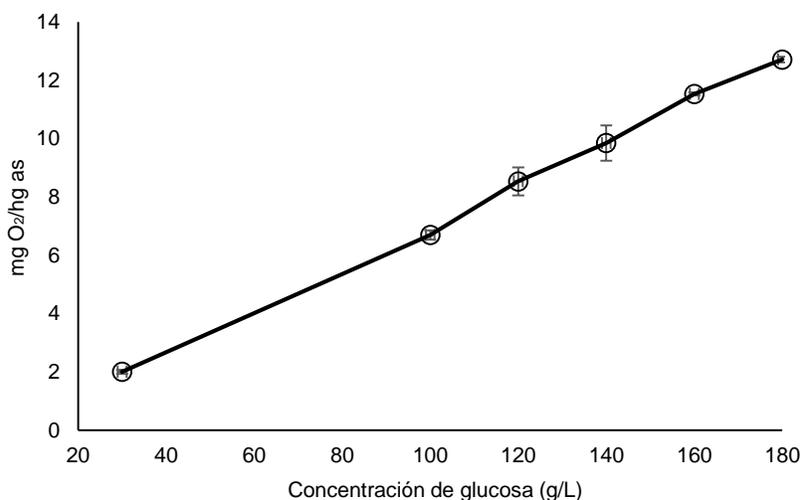


Figura 6. Tasa de consumo de oxígeno, concentraciones 30 a 180 g/L.

-El tercer parámetro comparado es el CO₂ total producido durante el crecimiento del *A. brasiliensis* ATCC9642, el cual incrementa como aumenta la fuente de carbono. A continuación se muestra los resultados por Tukey (tabla 8) y el comportamiento de la producción de CO₂ (Fig. 7).

Tabla 8. Comparación entre la producción total de CO₂ de cada condición con Tukey.

Concentraciones (g/L)	Similitud	Variable	Diferencia mg CO ₂ /g as (Total producido)
30-100		x	119.56
30-120		x	159.38
30-140		x	206.29
30-160		x	248.11
30-180		x	283.61
100-120	x		39.82
100-140	x		86.74
100-160		x	128.55
100-180		x	164.05
120-140	x	x	46.91
120-160	x		88.73
120-180		x	124.23
140-160	x		41.82
140-180	x		77.32
160-180	x		35.50
HSD (Tukey)		106.53	

En este parámetro encontramos que el CO₂ producido en 30 g/L de glucosa difiere del CO₂ producido en las demás concentraciones de glucosa; de las cuales, al menos una de ellas presentan similitud comparada con alguna otra.

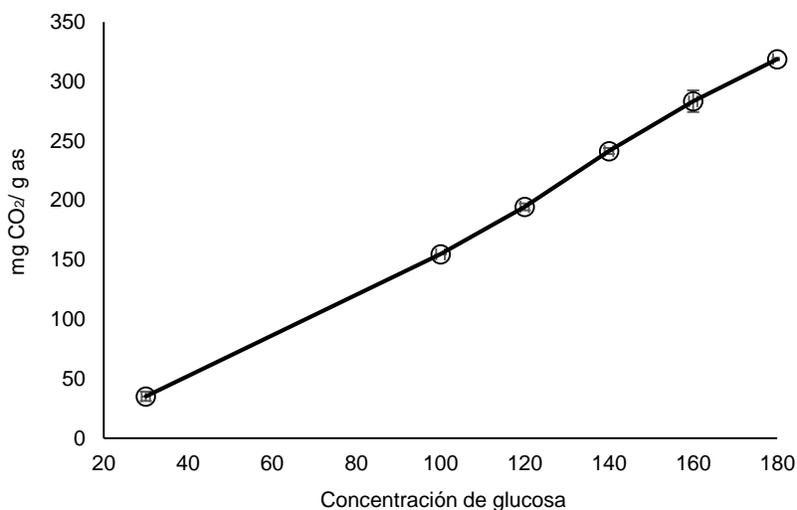


Figura 7. Producción total de CO₂, concentraciones 30 a 180 g/L.

Por otro lado, observamos el comportamiento de la producción de CO₂ en las diferentes concentraciones de glucosa junto con las tasas de producción de CO₂ y consumo de O₂, presenta una tendencia lineal.

-El cuarto parámetro es el consumo total de O₂, es directamente proporcional al aumento de la concentración de glucosa. En la tabla 9, se presentan los resultados obtenidos con la prueba de Tukey, mostrando cuales condiciones son similares y variables. La figura 8 muestra el comportamiento del consumo total de O₂.

Tabla 9. Comparación entre consumo total de O₂ de cada condición con prueba de Tukey.

Concentraciones (g/L)	Similitud	Variable	Diferencia mg O ₂ /g as (total consumido)
30-100		X	100.77
30-120		X	137.62
30-140		X	166.53
30-160		X	203.25
30-180		X	214.91
100-120	X		36.84
100-140		X	65.76
100-160		X	102.47
100-180		X	114.13
120-140	X		28.92
120-160		X	65.64
120-180		X	77.29
140-160	X		36.72
140-180		X	48.37
160-180	X		11.66
HSD (Tukey)		39.12	

El consumo de O_2 para la concentración de 30 g/L de glucosa, resultó ser diferente al consumo que se da en el resto de las condiciones, ya que éstas tienen al menos un consumo similar entre alguna otra condición.

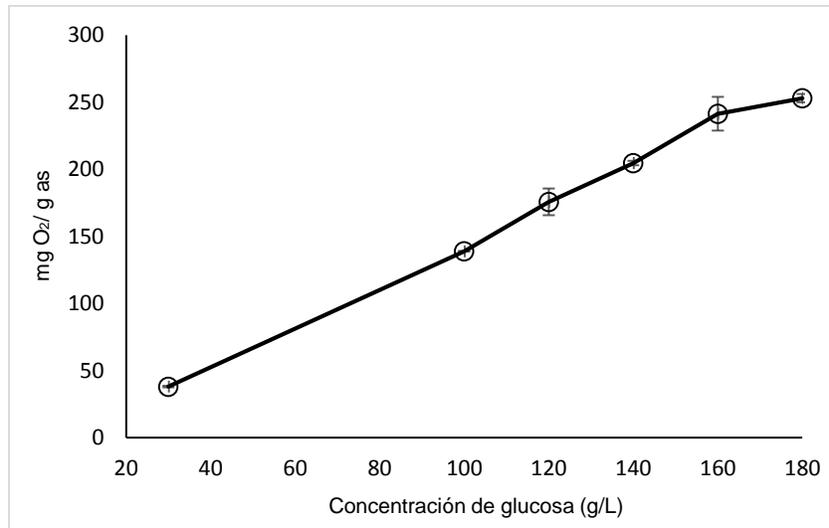


Figura 8. Consumo total de O_2 , concentraciones 30 a 180 g/L de glucosa.

El consumo tiene una tendencia lineal de 30-160 g/L, observándose un ligero descenso de la pendiente entre las concentraciones 160-180 g/L, dando como resultado una similitud en el consumo de oxígeno total entre estas dos condiciones, indicando que el metabolismo del hongo sea muy parecido.

-El quinto parámetro indica el tiempo promedio de la fase lag (Fig. 9), al realizarse un ANOVA se encuentra que no hay variabilidad significativa en la fase lag entre condiciones, ya que se obtuvo una $F=1.0082$ siendo menor a la $F_{crítica}=4.3873$, por lo tanto, el tiempo de la fase lag resultó ser igual para todas las concentraciones (Anexo A).

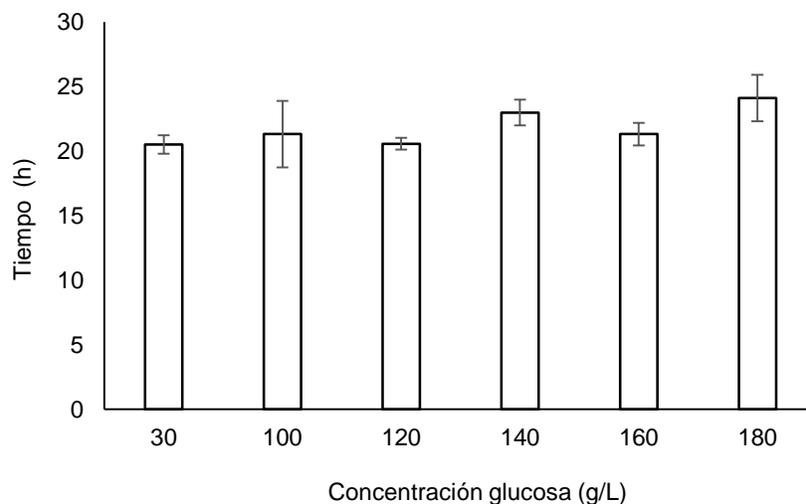


Figura 9. Tiempo de la fase lag, concentraciones 30 a 180 g/L de glucosa.

-El sexto parámetro es el tiempo de producción continua de CO₂, indica el tiempo que tarda el hongo desde que termina la fase lag hasta producir la tasa máxima de CO₂, al realizarse un ANOVA (Anexo A) encontramos que al menos una condición resulta tener un tiempo distinto. Para encontrar las condiciones que resultan ser diferentes, utilizamos la prueba de Tukey (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de prueba de Tukey entre el tiempo de producción continua de CO₂ de cada condición.

Concentraciones (g/L)	Similitud	Variable	Diferencia Tiempo producción continua de CO ₂ (h)
30-100		x	6.56
30-120		x	7.67
30-140		x	8.37
30-160		x	12.67
30-180		x	12.87
100-120	x		1.11
100-140	x		1.81
100-160	x		6.11
100-180		x	6.31
120-140		x	0.70
120-160	x		5.00
120-180	x		5.21
140-160	x		4.29
140-180	x		4.50
160-180	x		0.21
HSD (Tukey)		6.24	

En los resultados anteriores, se observa que la única condición que resulta ser diferente en el tiempo de producción continua de CO₂, es la condición de 30 g/L de glucosa; mientras que las concentraciones de 100-180 g/L de glucosa, presentaron tiempos similares, sin observarse diferencias significativas.

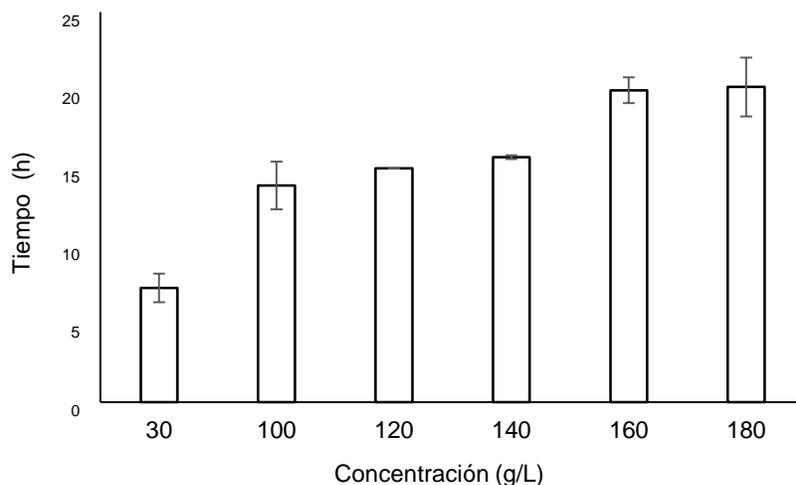


Figura 10. Tiempo de producción continua de CO₂, concentraciones 30 a 180 g/L.

La condición 30 g/L de glucosa, presenta un tiempo de producción continua de CO₂ menor que las otras 5 condiciones, la variación entre réplicas no es significativa. Y las mayores similitudes en el tiempo se dan entre 100, 120 y 140 g/L de glucosa y por otra parte el tiempo de producción continua de CO₂ en 160 g/L de glucosa parece ser muy próximo a 180 g/L de glucosa.

-El último parámetro considerado para el análisis es la tasa específica de producción de CO₂, el cual fue determinado por dos modelos matemáticos: Logístico y Gompertz. Mediante un ANOVA, se demostró que μ_{CO_2} es igual estadísticamente en todas las concentraciones, presentando los siguientes resultados del ANOVA: por el modelo Logístico presentó $F=0.8154 < F_{crítica}=4.3874$, y por el modelo de Gompertz mostró $F=1.1026 < F_{crítica}=4.3874$ (Ver anexo A). La variación de la estimación de la tasa específica de producción de CO₂ entre los dos modelos puede ser causada por la distribución de los puntos sobre la curva, dando un punto de inflexión distinto para cada ecuación.

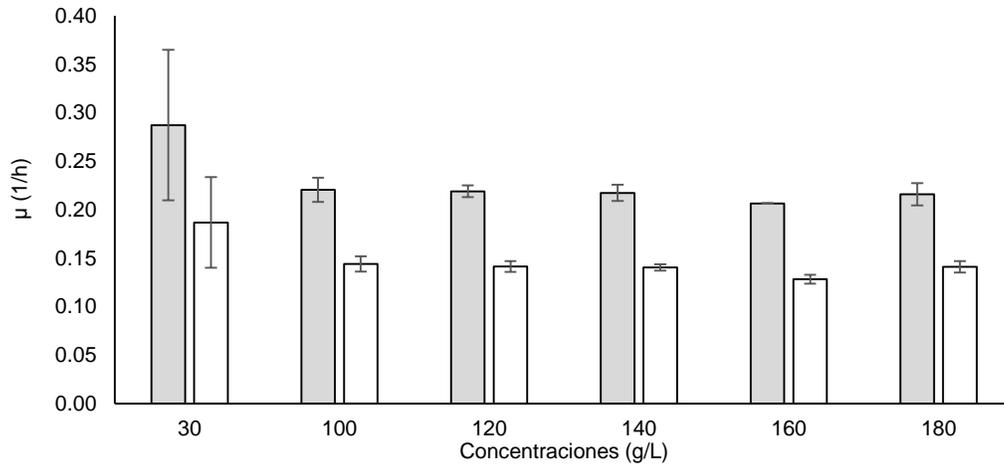


Figura 11. Tasa específica de producción de CO₂ (μ_{CO₂}), concentraciones 30-180 g/L, ■ corresponde ecuación Logística y □ corresponde a ecuación de Gompertz.

Al observar el gráfico, se aprecia que la concentración de 30 g/L de glucosa presenta una mayor μ_{CO₂}, pero estadísticamente resulta igual comparada con las demás condiciones.

En la tabla 11, se resume la información obtenida por respirometría de las concentraciones 30-180 g/L de glucosa, descartando a 60 g/L de glucosa por los motivos mencionados anteriormente. La información muestra las concentraciones que presentaron similitudes en los parámetros analizados, los cuales nos ayudaron para la selección de una concentración de glucosa mínima, media y máxima.

Tabla 11. Resumen de los parámetros similares entre condiciones.

Concentraciones (g/L)	Condiciones similares							
	mg CO ₂ /h g as Máximo producido	mg O ₂ /h g as Máximo consumido	mg CO ₂ /g as Máximo producido	mg O ₂ /g as Máximo consumido	Fase Lag (h)	Tiempo producción continua de CO ₂ (h)	μ (1/h) Ecuación logística	μ (1/h) Ecuación Gompertz
30-100					X		X	X
30-120					X		X	X
30-140					X		X	X
30-160					X		X	X
30-180					X		X	X
100-120	X	X	X	X	X	X	X	X
100-140			X		X	X	X	X
100-160					X	X	X	X
100-180					X		X	X
120-140	X	X	X	X	X		X	X
120-160			X		X	X	X	X
120-180					X	X	X	X
140-160	X	X	X	X	X	X	X	X
140-180	X		X		X	X	X	X
160-180	X	X	X	X	X	X	X	X

A partir de los resultados resumidos en la tabla 11, se definió como concentración mínima a 30 g/L de glucosa, ya que ésta presentó ser diferente entre las condiciones en la mayoría de los parámetros, únicamente teniendo similar resultado en el tiempo de fase lag y tasa específica de producción de CO₂ (μ_{CO_2}). Mientras para la selección de la concentración media fue más complicado, ya que las concentraciones 100, 120 y 140 presentaron similitudes en la mayoría de los parámetros analizados, ocurriendo lo mismo para las concentraciones altas 140, 160 y 180 g/L. Entonces, para realizar la selección de la concentración media, primero realizamos la selección de la concentración alta, al observar que no existe algún tipo de inhibición por el sustrato durante el crecimiento de *A. brasiliensis* en el cultivo de 180 g/L, siendo la concentración más elevada en el estudio, se optó para utilizarla para los cultivos posteriores. A partir de estas dos concentraciones, seleccionamos una concentración intermedia, siendo la de 100 g/L un punto intermedio entre la concentración mínima y máxima seleccionadas.

Finalmente, la comparación del secretoma se realizó a tres concentraciones de glucosa, siendo una mínima, media y máxima, de las cuales a partir de los resultados obtenidos por respirometría, seleccionamos a 30, 100 y 180 g/L.

La obtención del perfil respirométrico de *A. brasiliensis* ATCC9642, en un rango de varias concentraciones, nos ayudó a determinar el tiempo aproximado para llegar a la máxima producción de CO₂, el tiempo de la fase lag, consumo de oxígeno, etc. Como se mencionó el valor de μ_{CO_2} , resultó ser igual estadísticamente para todas las concentraciones, manteniéndose constante, éste resultado es todo lo contrario a lo reportado por Favela y col. (1998), observaron que al aumentar la concentración de glucosa en el medio, el valor de la tasa específica de producción de CO₂ disminuye, donde utilizaron concentraciones de 30-450 g/L de glucosa, el comportamiento de la producción de CO₂ fue similar al nuestro, donde tiende a aumentar conforme incrementamos la concentración de la fuente de carbono.

7.1.2 Tasas y cinéticas de producción de CO₂ de las concentraciones 30,100 y 180 g/L.

Como se mencionó, se seleccionaron tres concentraciones de glucosa 30, 100 y 180 g/L, posteriormente, se buscó la reproducibilidad técnica y biológica, realizándose cinco lotes del cultivo para cada concentración (cultivos por triplicado de cada concentración). Los

lotes fueron en cultivados en tiempos diferentes y nombrados: L0, L1, L2, L3 y L4, enumerándose de acuerdo a como se cultivaron durante el estudio (Anexo B).

El crecimiento de *A. brasiliensis* ATCC9642, se detuvo a punto posterior de haber alcanzado la mayor tasa de producción de CO₂, ya que la diferencia entre el punto máximo de producción de CO₂ y el punto posterior es mínima, oscilando entre un tiempo de 0.5-0.75 h, considerando que el estado fisiológico es similar en estos dos puntos, ya que se encuentra en crecimiento exponencial.

Al final de cada cultivo, se extrajo la proteína extracelular, obteniendo los siguientes valores de pH para los extractos proteicos de cada condición: 6.5 para 30 g/L, 6.3 para 100 g/L y 6.4 para 180 g/L, los cuales no fueron variables entre condiciones.

Las curvas de tasas y cinéticas de producción de CO₂ se muestran a continuación, siendo un total de 15 curvas por condición, el comportamiento de las curvas nos indica que hay variabilidad entre las réplicas, pero para tener un informe más preciso, se realizó un ANOVA, complementando con la prueba de Tukey, observando así qué lotes presentaron variación (Tabla 11).

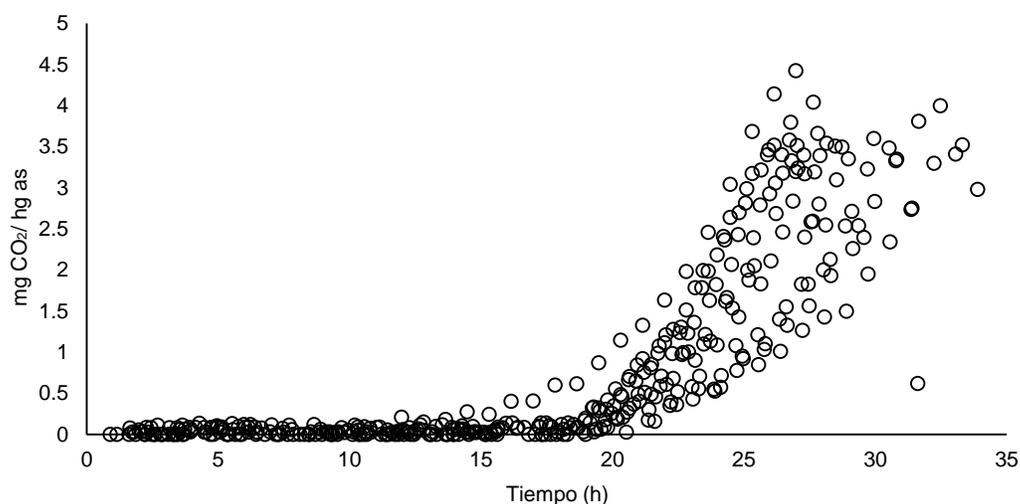


Figura 12. Tasas de producción de CO₂ de la concentración 30 g/L.

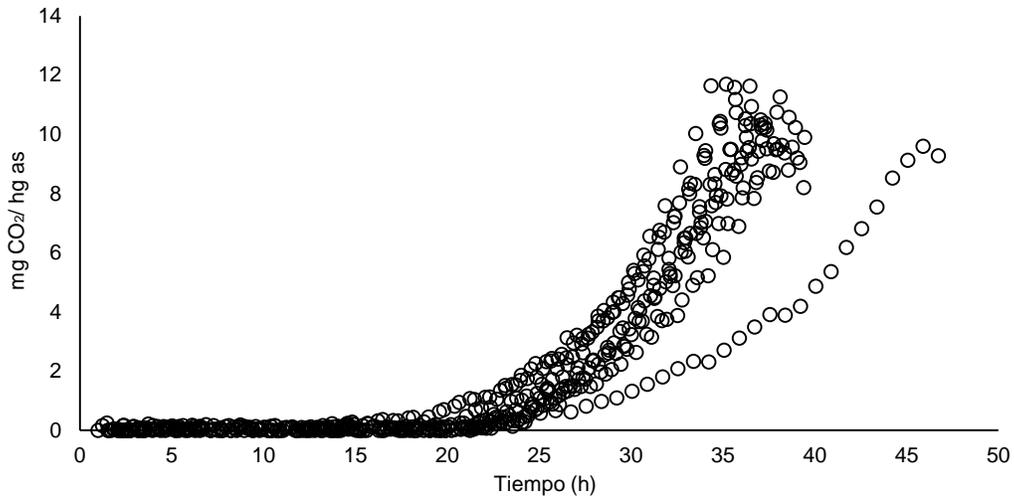


Figura 13. Tasas de producción de CO₂ de la concentración 100 g/L.

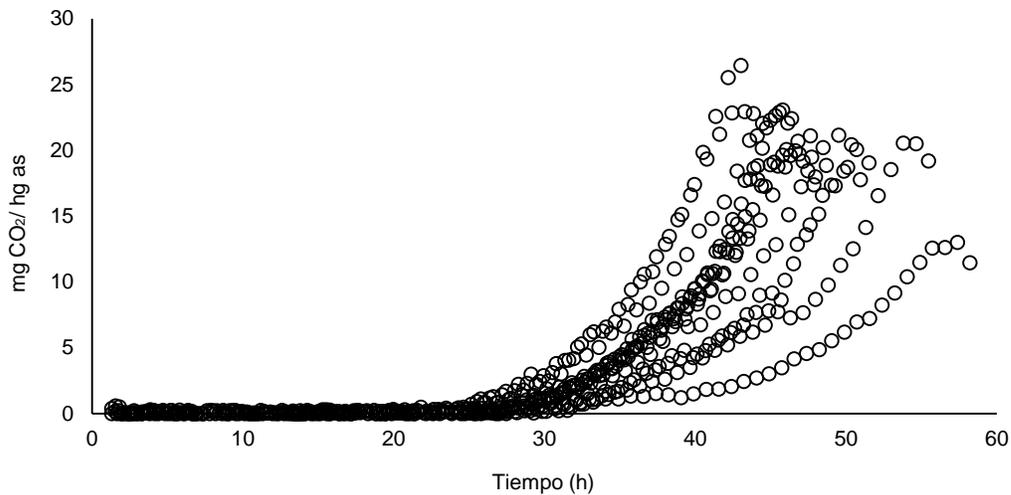


Figura 14. Tasas de producción de CO₂ de la concentración 180 g/L.

Al integrar los datos de las curvas anteriores obtenidas por respirometría se, obtiene la cinética de producción de CO₂, la cual nos va indicando indirectamente el estado fisiológico que se encuentra *Aspergillus brasiliensis*, midiendo indirectamente su crecimiento, observando el comportamiento de la producción de CO₂ en las figuras 15, 16 y 17 para las concentraciones 30, 100 y 180 g/L, respectivamente.

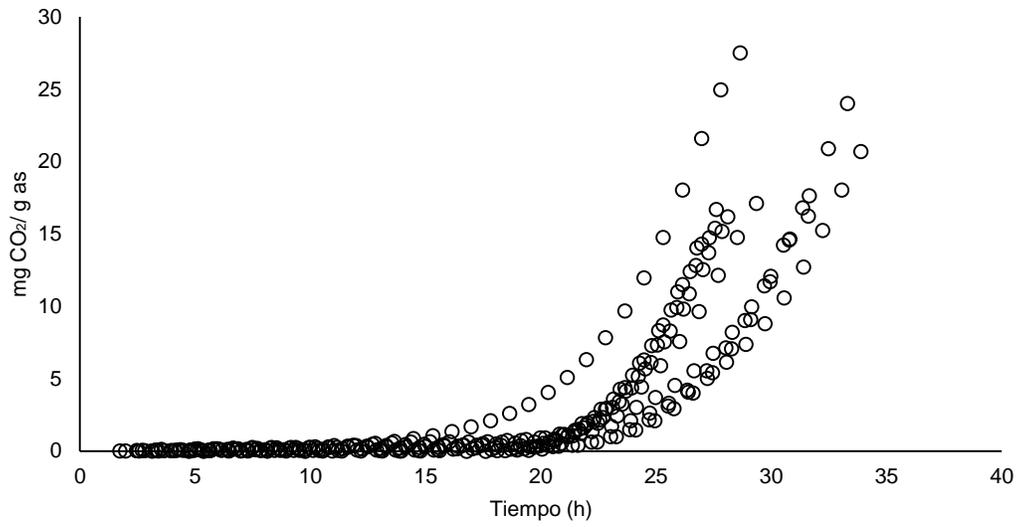


Figura 15. Cinéticas de producción de CO₂ de la concentración 30 g/L.

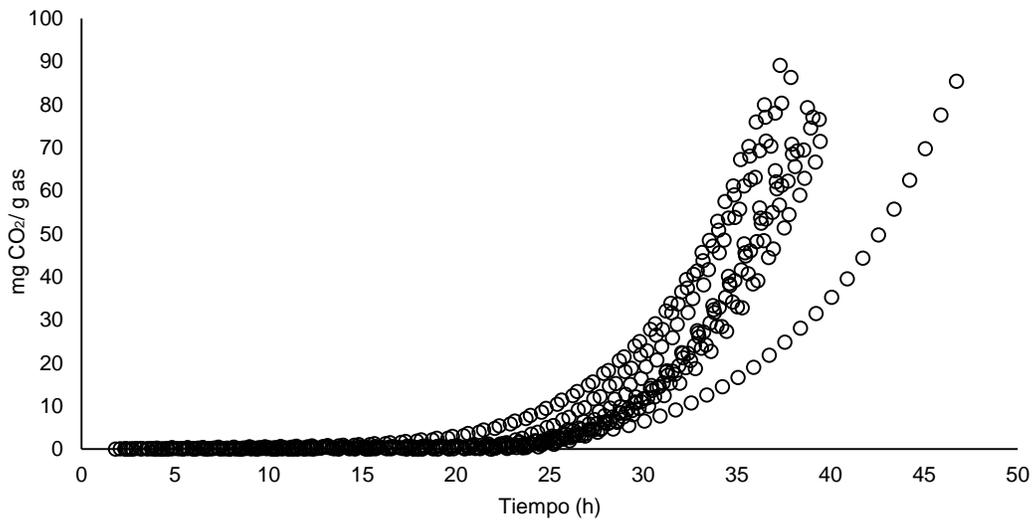


Figura 16. Cinéticas de producción de CO₂ de la concentración 100 g/L.

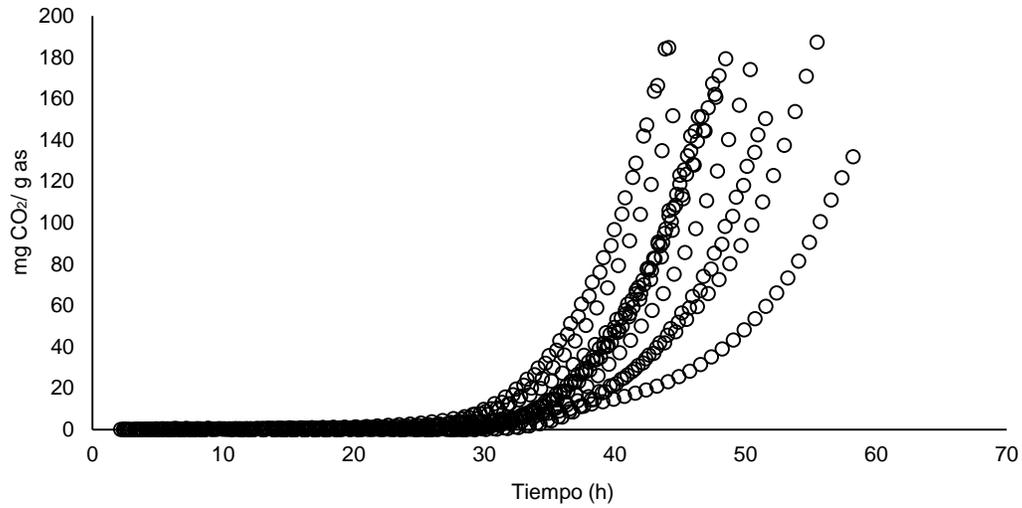


Figura 17. Cinéticas de producción de CO₂ de la concentración 180 g/L.

Como se mencionó se realizó ANOVA y prueba de Tukey, para observar reproducibilidad técnica y biológica en el crecimiento de *A. brasiliensis*, los parámetros mencionados anteriormente, se analizaron ahora entre los cinco lotes. A continuación se muestra la tabla 12, donde se resume la información obtenida.

Tabla 12. Resumen de los parámetros analizados en los cinco lotes.

Parámetro	Concentración (g/L)	Promedio	DE	ANOVA (F crítica=3.47) F	Lotes reproducibles	Lotes no reproducibles
mg CO ₂ /h g as (máximo producido)	30	3.61	0.33	1.44	Todos	Ninguno
	100	10.35	0.94	1.84	Todos	Ninguno
	180	20.86	2.90	2.36	Todos	Ninguno
mg O ₂ /h g as (máximo consumido)	30	1.81	0.39	2.28	Todos	Ninguno
	100	5.86	0.51	2.19	Todos	Ninguno
	180	11.93	1.91	3.75	Lote 0, 1, 2, 3 y 4	Sólo lote 0-4 son diferentes
mg CO ₂ /g as (máximo producido)	30	17.54	3.74	14.03	Lote 1, 2, 3 y 4	Lote 0
	100	76.22	7.21	5.88	Lote 1, 2, 3 y 5	Lote 0
	180	161.59	18.04	1.12	Todos	Ninguno
mg O ₂ /g as (máximo consumido)	30	12.61	1.11	2.62	Todos	Ninguno
	100	46.32	3.04	2.71	Todos	Ninguno
	180	93.47	11.03	2.41	Todos	Ninguno
Fase Lag (h)	30	18.94	1.36	2.43	Todos	Ninguno
	100	20.41	2.19	0.63	Todos	Ninguno
	180	26.83	2.53	4.25	Lote 0, 1, 2, 3 y 4	Sólo 3-4 son diferentes
Tiempo producción continua de CO ₂ (h)	30	9.49	2.02	20.86	Lotes 1,2,3 y 4	Lote 0
	100	17.33	1.34	17.07	Lotes 0-2, 0-4, 1-3 2-3, 2-4 y 3-4	Lotes 0-1, 0-3, 1-2, 1-4
	180	20.89	3.16	33.44	Lotes 1, 2, 3 y 4	Lote 0 y entre lote 1-2 son diferentes
Tiempo de cultivo (h)	30	29.38	2.18	5.64	Lote 0, 1, 2, 3 y 4	Son diferentes Lote 0-1 y Lotes 0-4
	100	38.57	2.51	1.11	Todos	Ninguno
	180	48.59	4.14	9.11	Entre lotes 0-3, 1-2, 1-3 1-4, 2-3, 2-4	Son diferentes entre 0-1, 0-2, 0-4 y 3-4
μ (1/h) Ecuación Exponencial	30	0.31	0.06	52.70	Lotes 1-2, 1-4, 2-4	Son diferentes lote 0-1, 0-2, 0-3, 0-4, 1-3, 2-3 y 3-4
	100	0.20	0.02	10.23	Lote 1,2,3, 4	Lote 0
	180	0.18	0.03	13.02	Lote 1, 2, 3 y 4	Lote 0

En la tabla 12, la mayor parte de los parámetros seleccionados para observar reproducibilidad en los lotes dieron un resultado positivo, indicando similitud entre lotes, siendo el lote 0 (primer lote realizado), el que no resultó ser reproducible en cuatro de los ocho parámetros analizados. Por otra parte, los parámetros de tiempo de producción continua y tasa específica, presentaron variabilidad entre lotes, siendo de los parámetros menos reproducibles; pero considerando que en la mayoría de los parámetros comparados presentan reproducibilidad entre lotes (L1, L2, L3 y L4), consideramos que el crecimiento del hongo fue reproducible. El lote 0 fue descartado, debido a que era un lote donde los métodos empleados se ponían en práctica, dando la posibilidad a errores durante la experimentación y así resultar muestras que no sean comparables entre condiciones y réplicas.

Para observar si el crecimiento del hongo no presentó dificultades por el oxígeno, se obtuvo el coeficiente respiratorio (C. R.), con los siguientes resultados: 0.94 (30 g/L), 1.14 (100 g/L) y 1.21 (180 g/L). Donde el hongo no tuvo deficiencia de oxígeno fue en la condición de 30 g/L, ya que observamos un C.R.=0.94, donde fue más probable que haya una ligera concentración de oxígeno elevada, comparada con las otras dos condiciones donde se observó un C. R. mayor a 1, entrando ligeramente a un sistema anaerobio (Vázquez, 2013). Por otra parte, el C.R. sugiere que para la condición de 30 g/L de glucosa, se llevaron a cabo reacciones anabólicas (principalmente formación de biomasa), mientras las condiciones 100 y 180 g/L de glucosa, se llevan reacción catabólicas (consumo de glucosa para formación de productos) (Volke y col. 2001)

Un parámetro considerado de importancia, es la tasa específica de producción de CO_2 (μ_{CO_2}), en este caso se determinó ajustando las cinéticas con el modelo exponencial, resultando valores diferentes a los obtenidos por las cinéticas completas, mostradas anteriormente. El resultado es que μ_{CO_2} tiende a disminuir como aumenta la concentración, siendo significativamente diferente el valor obtenido en 30 g/L de glucosa y siendo similar para 100 y 180 g/L de glucosa. A continuación se muestra la figura 18, donde se observa como desciende la tasa específica, siendo un resultado similar a lo reportado por Favela y col. (1998), observando que al aumentar la concentración de glucosa en el medio, el valor de la tasa específica de producción de CO_2 disminuye, donde utilizaron concentraciones de 30-450 g/L de glucosa.

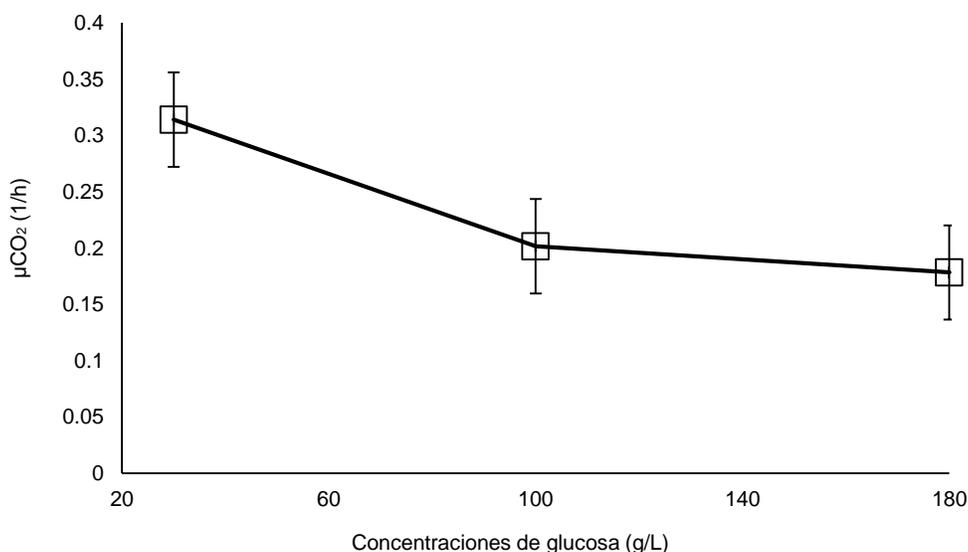


Figura 18. Tasas específicas de las concentraciones 30, 100 y 180 g/L.

Por lo tanto, se obtuvo reproducibilidad biológica y técnica en el crecimiento de *A. brasiliensis*, creciendo a tres concentraciones 30, 100 y 180 g/L, dando pauta a obtener muestras de proteínas de buena calidad, proteínas que presente los mismos niveles de expresión en el medio de cada concentración; éstas muestras permitirán realizar una identificación del secretoma del hongo más preciso para el estado fisiológico en el que se encontraban, siendo comparable el secretoma entre condiciones.

Resumiendo este capítulo, tenemos que para seleccionar tres concentraciones para el estudio, se evaluaron 7 concentraciones de glucosa desde 30-180 g/L, la concentración de 60 g/L fue descartada para los análisis estadísticos, por problemas con sus réplicas. Los parámetros comparados fueron la tasa de producción de CO₂ y consumo de O₂, CO₂ total producido y total de O₂ consumido, tiempo de la fase lag, tiempo de producción constante y la tasa específica estimada por dos modelos. Se seleccionaron tres concentraciones para el estudio del secretoma, siendo una mínima (30 g/L), una media (100 g/L) y una alta (180 g/L) L. De las concentraciones seleccionadas, se realizaron 5 lotes de cultivo de *A. brasiliensis* ATCC9642 (cada concentración cultivada por triplicado en cada lote), buscando reproducibilidad se analizaron los mismos parámetros, encontrando que el lote 0, presentó variación respecto al resto, probablemente por ser un lote de acondicionamiento presentó problemas que se reflejaron en los resultados de respirometría, y a la vez, se descartó las muestras de proteína para posteriores análisis.

En el siguiente capítulo se muestran los resultados de las muestras de proteína recuperadas de los cultivos reproducibles, siendo separadas por geles 1D-SDS-PAGE y 2D-PAGE, con el fin de encontrar alguna proteína que sea distinta entre las condiciones seleccionadas, a través de análisis de imágenes y por LC-MS/MS.

7.2 Separación de proteínas extracelulares.

Los extractos de proteína extracelular obtenidos en la fase de máxima tasa de producción de CO₂ a partir de tres diferentes concentraciones de nutrientes, fueron sometidos a separaciones 2D-PAGE y 1D-SDS-PAGE.

7.2.1. Cuantificación de proteína y separación en 1 y 2 dimensiones.

Separación en 2D-PAGE

Para los estudios del secretoma por geles bidimensionales, se usó el microensayo de Bradford para determinar la concentración de proteína en los extractos extracelulares previamente concentrados por ultrafiltración (10 kDa) y diafiltrados (10 KDa) con amortiguador TRIS/HCl 20 mM pH 7.2. La tabla 6 presenta la concentración de proteína para cada condición. Estos valores representan el valor promedio de los obtenidos en 4 cultivos que se realizaron por duplicado en tiempos diferentes; es decir; es el resultado de la proteína encontrada en los extractos ultra y diafiltrados de 8 unidades experimentales.

Tabla 13. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

Glucosa Inicial (g/L)	Proteína (µg/mL)	D.E*
30	540	125
100	775	145
180	820	410

*D.E. (Desviación estándar)

Aunque el valor promedio de la concentración de proteína en las muestras aumenta al incrementarse la concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo, las diferencias no son significativas entre las condiciones, debido a la alta variación que existe.

Para los estudios de secretoma en 2D-PAGE se utilizaron los extractos proteicos de los lotes 1 y 2.

A continuación se muestran los geles maestros (*Master*) de cada una de las muestras, estos geles se obtuvieron de geles realizados por duplicado, siendo analizados por medio del software PDQuest.

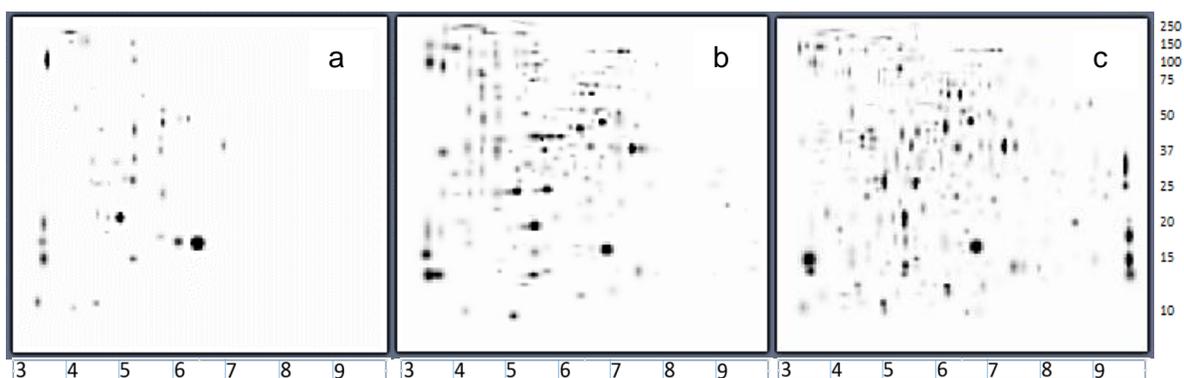


Figura 19. Geles maestros de los extractos proteicos obtenidos a partir de medios de cultivo con concentraciones iniciales de glucosa de (en g/L) 30 (a), 100 (b) y 180 (c) de los lotes 1 y 2. La primera separación se hizo con IPG con un rango de pH de 3 a 10 y la segunda con SDS-PAGE con T=12%.

Al comparar los geles se observa que el número de *spots* aumenta al incrementar la concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo. El conteo y localización de *spots* en los geles se hizo con el programa PDQuest utilizando el modo de comparación de experimentos. Debido a que el gel obtenido con una concentración de glucosa inicial de 180 g/L presentó el mayor número de *spots*, éste fue considerado como gel maestro. Con ello, se obtuvo información cuantitativa de la expresión total y diferencial de proteínas. El análisis cuantitativo de los geles demostró un total de 531 “spots”; de los cuales 43, 198 y 290 corresponden a las concentraciones de glucosa de 30, 100 y 180 g/L respectivamente (Fig. 9). La mayor proporción de los *spots* presentes en condición de 100 g/L (62%) son similares con la condición de 180 g/L, representando el 42% de los *spots* en esta última condición. En el gel proveniente de las muestras de 30 g/L, no se observaron *spots* únicos; el 4.6% de los *spots* identificados en los geles de la condición de 30 g/L son compatibles con la condición de 100 g/L; mientras que, el 13.9% son compatibles con 180 g/L. Estos resultados demuestran una mayor similitud entre los *spots* de los geles obtenidos con concentraciones iniciales de glucosa de 100 y 180 g/L.

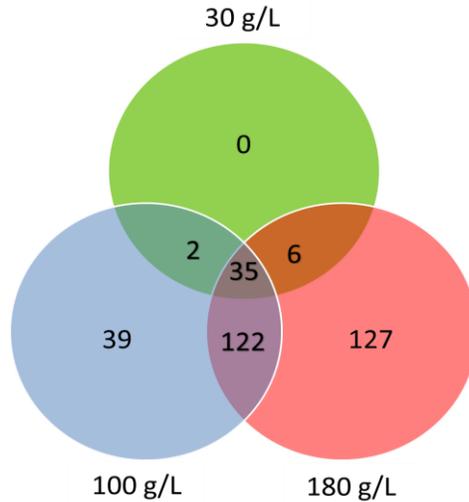


Figura 20. Número de *spots* identificados por cada condición.

Con base en los resultados obtenidos del análisis de los geles con el PDQuest, se seleccionaron *spots* considerados de buena calidad (reproducibles y con variaciones mínimas entre replicas); para ello, se establecieron los siguientes criterios:

- Que los *spots* presentes en gel maestro de cada condición se encontraran en los dos geles con los que se elaboró cada imagen (*Match*).

- Que la intensidad normalizada tenga un coeficiente de variación (C.V.) $\leq 20\%$.

- Que sea único de la condición o que se encuentre presente en dos o en las tres condiciones considerando que la intensidad normalizada tenga un C.V. $\leq 20\%$ para los *spots* de cada condición.

Tomando en cuenta estos criterios, el número de *spots* del gel maestro se redujo considerablemente. En la tabla 14, se muestran los *spots* al inicio y al fin del análisis:

Tabla 14. Número de *spots* en geles maestros y seleccionados por análisis de imagen.

Condición (g/L)	<i>Spots</i> gel maestro	<i>Spots</i> con match entre condiciones	<i>Spots</i> con CV menor al 20%	% de <i>spots</i> considerados de calidad por condición	# <i>spots</i> finales
30	43	42	2	4.65	0
100	198	135	34	17.17	8
180	290	227	52	17.93	22
Totales	531	404	88	16.58	30

Los *spots* finales se compararon entre condiciones, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 15). El valor analizado de los *spots* es la intensidad normalizada, el cual nos ayudó a observar si existe alguna diferencia en la intensidad de los *spots*. Para observar si el *spot* identificado en dos concentraciones presentaba la misma intensidad se realizó una prueba t de student, mientras que los *spots* localizados en las tres condiciones, se les realizó un ANOVA y prueba de Tukey. La distribución de los *spots* seleccionados se muestra en la figura 24.

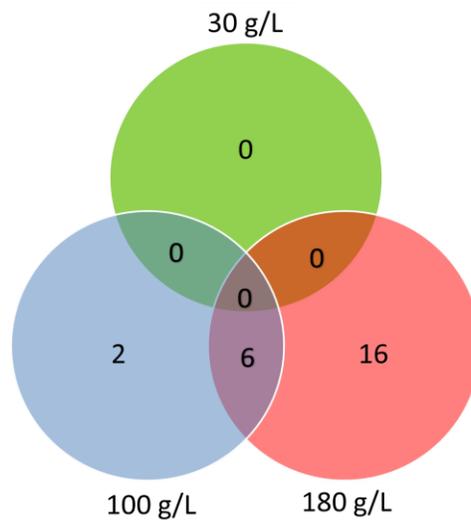
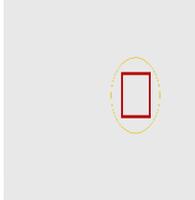
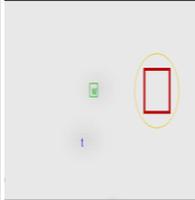
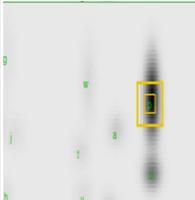
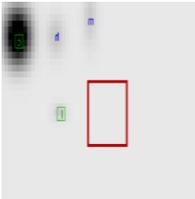
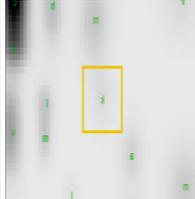
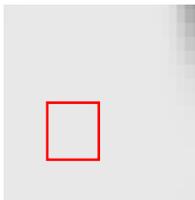
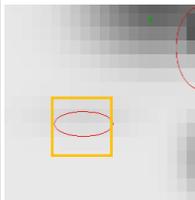
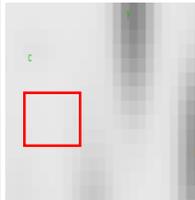
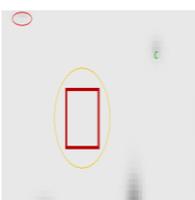
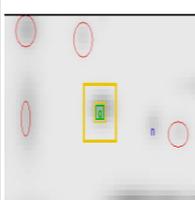


Figura 21. Diagrama de Venn con los *spots* seleccionados bajo ciertos criterios.

Tabla 15. Características de los *spots* seleccionados por análisis de imagen.

Condición g/L	Nombre <i>spot</i>	PM (aprox.)	pl (aprox.)	Intensidad	D.E*	C.V* (%)	Presencia	Expresión	Imagen <i>spot</i> Condición 30 g/L	Imagen <i>spot</i> Condición 100 g/L	Imagen <i>spot</i> Condición 180 g/L
30	ND	29.66	9.66	ND	ND	ND	<i>Spot</i> único	Solo se expresa en la condición 180 g/L			
100	ND			ND	ND						
180	SSP 9401			16057.26	1430.17	8.91					
30	ND	16.96	4.94	ND	ND	ND	Presente en las condiciones 100 y 180 g/L, no hay diferencias significativas.	Relación $180/100 = 1.17$			
100	SSP 4203			480.78	29.03	6.04					
180	SSP 3204			564.40	35.57	6.30					
30	ND	38.98	5.43	ND	ND	ND	<i>Spot</i> único	Solo se expresa en la condición 100 g/L			
100	SSP 5502			431.73	52.69	12.20					
180	ND			ND	ND	ND					
30	ND	53.10	5.19	ND	ND	ND	Presente en las condiciones 100 y 180 g/L, no hay diferencias significativas.	Relación $180/100=0.345$			
100	SSP 5603			2112.60	345.66	16.36					
180	SSP 4601			922.11	2.10	0.23					

* (D.E= Desviación estándar; C.V=Coficiente de variación y ND=No detectado)

Tabla 15. Características de los *spots* seleccionados por análisis de imagen (continuación).

Condición g/L	Nombre <i>spot</i>	PM (aprox.)	pl (aprox.)	Intensidad	D.E*	C.V* (%)	Presencia	Expresión	Imagen <i>spot</i> Condición 30 g/L	Imagen <i>spot</i> Condición 100 g/L	Imagen <i>spot</i> Condición 180 g/L
30	ND	136.75	5.02	ND	ND	ND	Presente en las condiciones 100 y 180 g/L, no hay diferencias significativas.	Relación 180/100=0.5130			
100	SSP 5801			698.28	79.95	11.45					
180	SSP 3906			357.80	16.22	16.22					
30	ND	55.11	6.76	ND	ND	ND	Presente en las condiciones 100 y 180 g/L, no hay diferencias significativas.	Relación 180/100=0.641			
100	SSP 7607			1573.99	314.60	19.99					
180	SSP 7701			1007.27	96.98	9.63					
30	ND	51.09	6.91	ND	ND	ND	Presente en las condiciones 100 y 180 g/L, no hay diferencias significativas.	Relación 180/100=0.719			
100	SSP 8601			814.62	111.08	13.64					
180	SSP 7606			1074.68	107.97	9.52					
30	ND	69.59	7.55	ND	ND	ND	<i>Spot</i> único	Solo se expresa en la condición 100 g/L			
100	SSP 8606			116.76	15.89	13.61					
180	ND			ND	ND	ND					

* (D.E= Desviación estándar; C.V=Coeficiente de variación y ND=No detectado)

Tabla 15. Características de los *spots* seleccionados por análisis de imagen (continuación).

Condición g/L	Nombre spot	PM (aprox.)	pI (aprox.)	Intensidad	D.E*	C.V* (%)	Presencia	Expresión	Imagen spot Condición 30 g/L	Imagen spot Condición 100 g/L	Imagen spot Condición 180 g/L
30	ND	31.20	9.15	ND	ND	ND	Presente en las condiciones 100 y 180 g/L, no hay diferencias significativas.	Relación 180/100=1.92			
100	SSP 9401			558.62	62.66	11.22					
180	SSP 8405			1074.68	29.13	2.71					
30	ND	57.29	4.63	ND	ND	ND	Spot único	Solo se expresa en la condición 180 g/L			
100	ND			ND	ND	ND					
180	SSP 3706			167.33	27.65	16.52					
30	ND	9.83	4.89	ND	ND	ND	Spot único	Solo se expresa en la condición 180 g/L			
100	ND			ND	ND	ND					
180	SSP 4001			2345.96	318.34	13.57					
30	ND	46.71	5.05	ND	ND	ND	Spot único	Solo se expresa en la condición 180 g/L			
100	ND			ND	ND	ND					
180	SSP 4604			89.42	16.88	18.88					

* (D.E= Desviación estándar; C.V=Coeficiente de variación y ND=No detectado)

Tabla 15. Características de los *spots* seleccionados por análisis de imagen (continuación).

Condición g/L	Nombre <i>spot</i>	PM (aprox.)	pl (aprox.)	Intensidad	D.E*	C.V*	Presencia	Expresión	Imagen <i>spot</i> Condición 30 g/L	Imagen <i>spot</i> Condición 100 g/L	Imagen <i>spot</i> Condición 180 g/L
30	ND	10.31	5.86	ND	ND	ND	Spot único	Solo se expresa en la condición 180 g/L			
100	ND			ND	ND						
180	SSP 5003			267.20	15.48	5.79					
30	ND	13.32	5.52	ND	ND	ND	Spot único	Solo se expresa en la condición 180 g/L			
100	ND			ND	ND						
180	SSP 5101			1406.11	140.71	10.01					
30	ND	11.91	5.67	ND	ND	ND	Spot único	Solo se expresa en la condición 180 g/L			
100	ND			ND	ND						
180	SSP 5103			731.49	6.66	0.91					
30	ND	24.15	5.48	ND	ND	ND	Spot único	Solo se expresa en la condición 180 g/L			
100	ND			ND	ND						
180	SSP 5301			4486.64	805.05	17.94					

* (D.E= Desviación estándar; C.V=Coeficiente de variación y ND=No detectado)

Tabla 15. Características de los *spots* seleccionados por análisis de imagen (continuación).

Condición g/L	Nombre <i>spot</i>	PM (aprox.)	pl (aprox.)	Intensidad	D.E*	C.V* (%)	Presencia	Expresión	Imagen <i>spot</i> Condición 30 g/L	Imagen <i>spot</i> Condición 100 g/L	Imagen <i>spot</i> Condición 180 g/L
30	ND	58.58	5.73	ND	ND	ND	<i>Spot</i> único	Solo se expresa en la condición 180 g/L			
100	ND			ND	ND						
180	SSP 5705			953.93	77.57	8.13					
30	ND	22.03	6.60	ND	ND	ND	<i>Spot</i> único	Solo se expresa en la condición 180 g/L			
100	ND			ND	ND						
180	SSP 7301			609.55	90.96	14.92					
30	ND	16.28	8.08	ND	ND	ND	<i>Spot</i> único	Solo se expresa en la condición 180 g/L			
100	ND			ND	ND						
180	SSP 8204			779.77	70.42	9.03					
30	ND	26.29	7.09	ND	ND	ND	<i>Spot</i> único	Solo se expresa en la condición 180 g/L			
100	ND			ND	ND						
180	SSP 8401			1060.59	32.18	3.03					

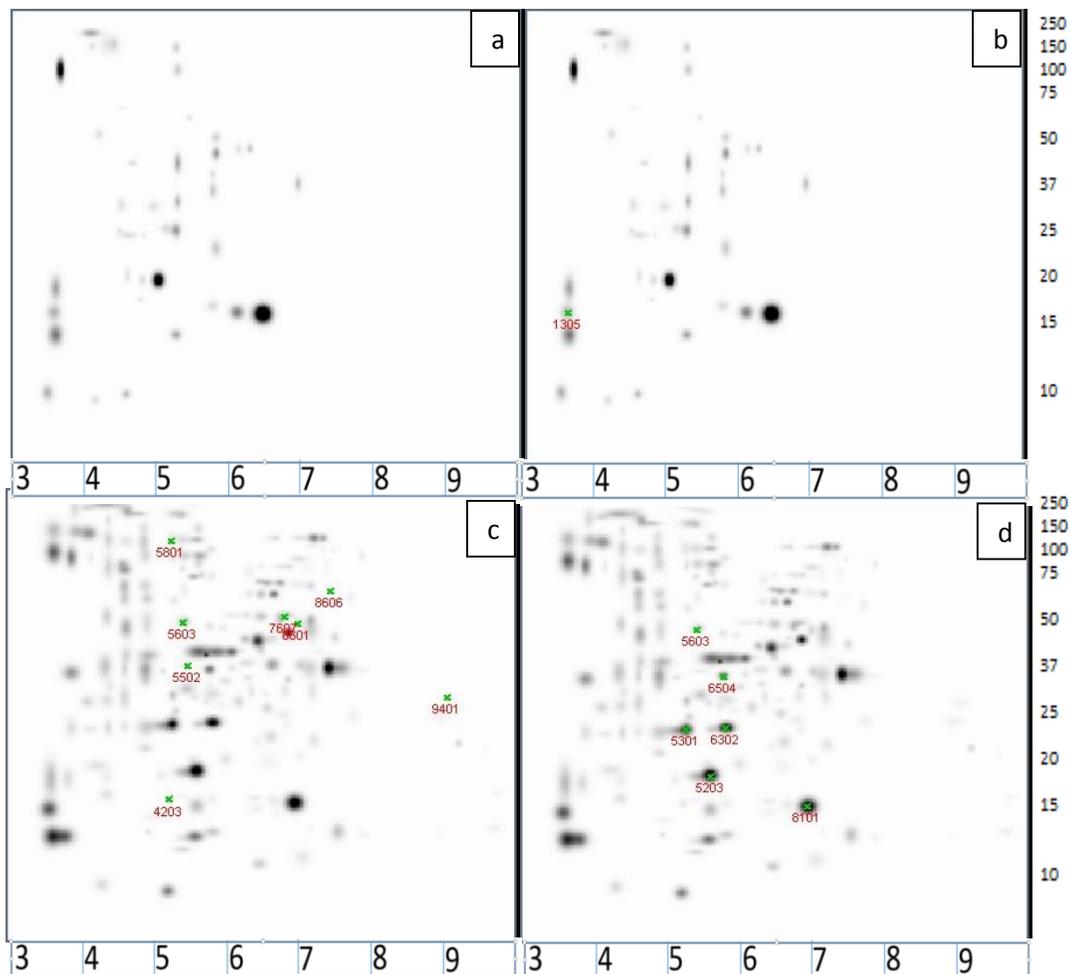
* (D.E= Desviación estándar; C.V=Coeficiente de variación y ND=No detectado)

Tabla 15. Características de los *spots* seleccionados por análisis de imagen (continuación).

Condición g/L	Nombre <i>spot</i>	PM (aprox.)	pl (aprox.)	Intensidad	D.E*	C.V* (%)	Presencia	Expresión	Imagen <i>spot</i> Condición 30 g/L	Imagen <i>spot</i> Condición 100 g/L	Imagen <i>spot</i> Condición 180 g/L
30	ND	43.25	7.80	ND	ND	ND	<i>Spot</i> único	Solo se expresa en la condición 180 g/L			
100	ND			ND	ND						
180	SSP 8603			448.57	61.34	13.67					
30	ND	58.44	8.25	ND	ND	ND	<i>Spot</i> único	Solo se expresa en la condición 180 g/L			
100	ND			ND	ND						
180	SSP 8702			465.09	78.13	16.80					
30	ND	58.29	7.50	ND	ND	ND	<i>Spot</i> único	Solo se expresa en la condición 180 g/L			
100	ND			ND	ND						
180	SSP 8705			338.45	14.63	4.32					
30	ND	14.04	9.71	ND	ND	ND	<i>Spot</i> único	Solo se expresa en la condición 180 g/L			
100	ND			ND	ND						
180	SSP 9204			20035.55	66.35	0.3311					

* (D.E= Desviación estándar; C.V=Coeficiente de variación y ND=No detectado)

Para el análisis de los *spots* por espectrometría de masas, se consideraron aquellos que, sin ayuda de un software de análisis de imagen, se apreciaron ser únicos; por otro lado, se tomaron 4 *spots* que se encontraban en las tres condiciones. Esta decisión de analizar *spots* sin un análisis de imagen previo, se debe a que en el momento de realizar el análisis en el equipo de LC-MS/MS, no se contó con el software PDQuest. Posteriormente, logramos obtenerlo y así realizamos el análisis de imagen descrito previamente, el cual también nos dio información relevante para realizar la tabla 16.



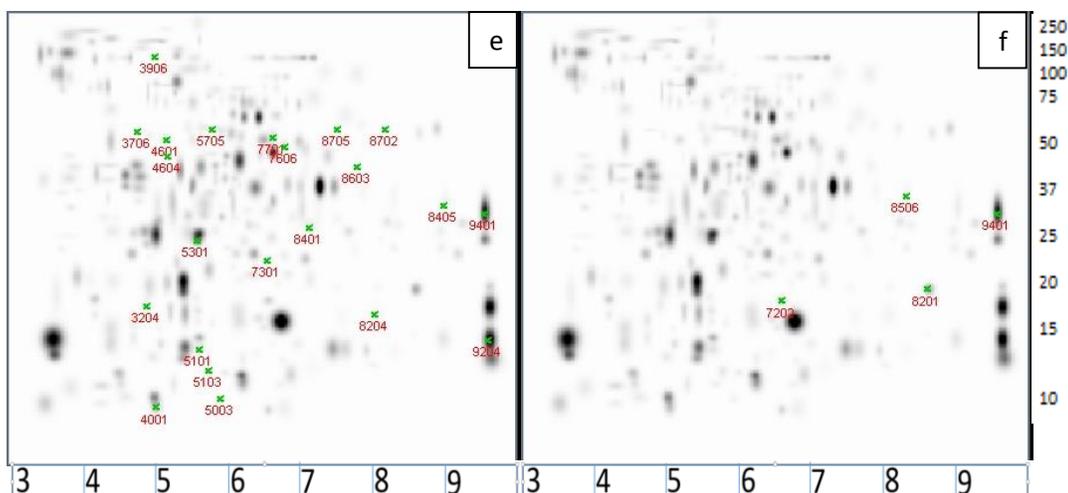


Figura 22. Las figuras a, c, e condiciones 30, 100 y 180 g/L, respectivamente, indican los *spots* seleccionados a partir del análisis de imágenes por el PDQuest, mientras que las figuras b, d, f condiciones 30, 100 y 180 g/L, respectivamente, corresponde a los *spots* seleccionados sin análisis de imagen e inyectados al LC-MS/MS. La primera separación se hizo con IPG con un rango de pH de 3 a 10 y la segunda con SDS-PAGE con T=12%.

En la figura 24, se compararon los *spots* seleccionados con y sin análisis de imágenes. Para la primera condición, con el análisis de imagen no se seleccionó ningún *spot* de acuerdo a los criterios establecidos, y sin análisis, seleccionamos sólo uno; para los geles de 100 g/L fueron 8 *spots* seleccionados por análisis de imagen y 6 sin análisis coincidiendo sólo el “*spot* 5606”; y para los geles de las muestras de la condición 180 g/L fueron seleccionados 22 *spots* a través del análisis de imagen y 4 *spots* seleccionados sin el análisis.

En la tabla 16, se muestra la información obtenida de los *spots* seleccionados sin análisis de imágenes que fueron inyectados al LC-MS/MS, y de igual manera se compararon con los datos entre condiciones.

Tabla 16. Características de los *spots* seleccionados sin análisis de imagen.

Condición g/L	Nombre <i>spot</i>	PM (aprox.)	pl (aprox.)	Intensidad	D.E*	C.V* (%)	Presencia	Expresión	Imagen <i>spot</i> Condición 30 g/L	Imagen <i>spot</i> Condición 100 g/L	Imagen <i>spot</i> Condición 180 g/L
30	SSP 1305	16.44	3.39	798.07	333.05	41.73	Se presenta en 30 y 100 g/L	No se calculó el fold entre <i>spots</i> debido a los CV son muy altos. Se seleccionó a "SSP 1305" para el LC-MS/MS			
100	SSP 0102			5213.82	7374.87	141.45					
180	ND			ND	ND	ND					
30	SSP 6303	16.37	6.72	4961.53	6675.86	134.55	Se presentó en las tres condiciones	No se calculó el fold debido a CV muy altos. Se seleccionó a "SSP 8101" para el LC-MS/MS.			
100	SSP 8101			19491.58	326.42	1.675					
180	SSP 7203			23714.62	8022.07	33.83					
30	SSP 3404	20.24	5.26	2195.00	2864.40	130.50	Se presentó en las tres condiciones	No se calculó el fold debido a CV muy altos. Se seleccionó a "SSP 5203" para el LC-MS/MS			
100	SSP 5203			15273.60	700.90	4.59					
180	SSP 4304			29901.38	19740.59	66.02					
30	SSP 5504	17.17	5.54	1010.13	96.78	9.58	Se presentó en las tres condiciones	No se calculó el fold debido a CV muy altos. Se seleccionó a "SSP 6302" para el LC-MS/MS			
100	SSP 6302			9486.62	2697.53	28.44					
180	SSP 5402			4328.22	1441.06	33.29					

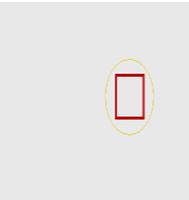
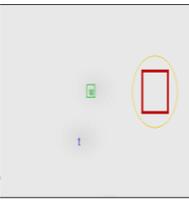
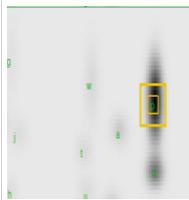
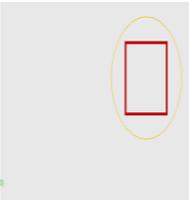
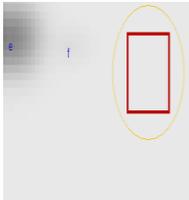
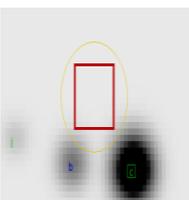
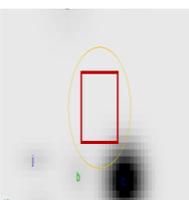
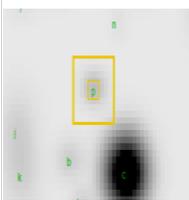
* (D.E= Desviación estándar; C.V=Coeficiente de variación y ND=No detectado)

Tabla 16. Características de los *spots* seleccionados sin análisis de imagen (continuación).

Condición g/L	Nombre <i>spot</i>	PM (aprox.)	pl (aprox.)	Intensidad	D.E	C.V* (%)	Presencia	Expresión	Imagen <i>spot</i> Condición 30 g/L	Imagen <i>spot</i> Condición 100 g/L	Imagen <i>spot</i> Condición 180 g/L
30	SSP 3510	25.16	4.93	398.99	510.16	127.86	Se presentó en las tres condiciones	No se calculó el fold debido a CV muy altos. Se seleccionó a "SSP 5301" para el LC-MS/MS			
100	SSP 5301			7452.66	655.61	8.80					
180	SSP 4401			10273.02	4441.43	43.23					
30	ND	37.62	5.63	ND	ND	ND	Se presentó en 100 Y 180 g/L	No se calculó el fold debido a CV muy altos. Se seleccionó a "SSP 6504" para el LC-MS/MS			
100	SSP 6504			3509.60	371.81	10.59					
180	SSP 5502			7726.19	6433.19	83.26					
30	ND	53.10	5.19	ND	ND	ND	Se presentó en 100 Y 180 g/L	Fold 100-180: Presenta sobreexpresión la condición 100 con un fold de 2.9. Se seleccionó a "SSP 5603"			
100	SSP 5603			2112.60	345.66	16.36					
180	SSP 4601			922.11	2.10	0.23					
30	ND	19.10	8.70	ND	ND	ND	<i>Spot</i> único	Sólo en 180 g/L. Se seleccionó para el LC-MS/MS			
100	ND			ND	ND	ND					
180	SSP 8201			5346.06	3138.54	58.71					

* (D.E= Desviación estándar; C.V=Coeficiente de variación y ND=No detectado)

Tabla 16. Características de los *spots* seleccionados sin análisis de imagen (continuación).

Condición g/L	Nombre <i>spot</i>	PM (aprox.)	pl (aprox.)	Intensidad	D.E	C.V* (%)	Presencia	Expresión	Imagen <i>spot</i> Condición 30 g/L	Imagen <i>spot</i> Condición 100 g/L	Imagen <i>spot</i> Condición 180 g/L
30	ND	29.66	9.66	ND	ND	ND	<i>Spot</i> único	Sólo en 180 g/L. Se seleccionó para el LC-MS/MS			
100	ND			ND	ND						
180	SSP 9401			16057.26	1430.17	8.91					
30	ND	34.37	8.36	ND	ND	ND	<i>Spot</i> único	Sólo en 180 g/L. Se seleccionó para el LC-MS/MS			
100	ND			ND	ND						
180	SSP 8506			1062.16	793.85	74.74					
30	ND	17.74	6.61	ND	ND	ND	<i>Spot</i> único	Sólo en 180 g/L. Se seleccionó para el LC-MS/MS			
100	ND			ND	ND						
180	SSP 7202			3439.85	3037.90	88.31					

* (D.E= Desviación estándar; C.V=Coeficiente de variación y ND=No detectado)

Separación en 1D.

Para la separación de las proteínas por 1D-SDS-PAGE, la cuantificación de proteína se realizó por el método de BCA (Pierce). Una vez cuantificada la proteína, se realizaron alícuotas de 100 µg para posteriormente, separarlas en un gel SDS-PAGE (T =12%). Una vez separadas las proteínas, se tiñó el gel con azul de Coomassie, las bandas se cortaron y destiñeron; posteriormente se realizó la digestión trípica sobre las proteínas separadas, los péptidos obtenidos se analizaron por espectrometría de masas (LC-MS/MS) como se indica en la sección de métodos y materiales.

Tabla 17. Cuantificación de proteína por el método de BCA (Pierce).

Glucosa Inicial (g/L)	Proteína (µg/mL)	D.E*
30	135	26.31
100	300	71.22
180	740	21.55

*D.E. (Desviación estándar)

Por este método de cuantificación de proteína, se obtiene que ésta aumenta de en función de la concentración de glucosa inicial. Además, se aprecia que existen diferencias significativas entre la proteína recuperada, y entre las condiciones, siendo la de mayor producción el medio de 180 g/L de glucosa. Para la separación de proteína por SDS-PAGE, se emplearon muestras obtenidas del lote 4.

Por el método “shotgun”, en total se obtuvieron 314 proteínas con rangos de peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) de 5 a 235 kDa y 3.9 a 12.25 respectivamente (Fig. 23). La mayoría de las proteínas se observan entre un rango de pI de 4-6.75, mientras otro grupo de proteínas se presenta a un pI mayor a 10. La distribución de proteínas en función de la concentración inicial de glucosa, indica que el 68% de las proteínas identificadas por el análisis proteómico masivo (*shotgun*) son comunes para las tres concentraciones de glucosa (Fig. 24). Además, el número de proteínas únicas para cada concentración aumenta al incrementar la concentración de glucosa en el medio. De las proteínas identificadas, 2, 9 y 25 fueron únicas para las concentraciones de 30, 100 y 180 g/L, respectivamente.

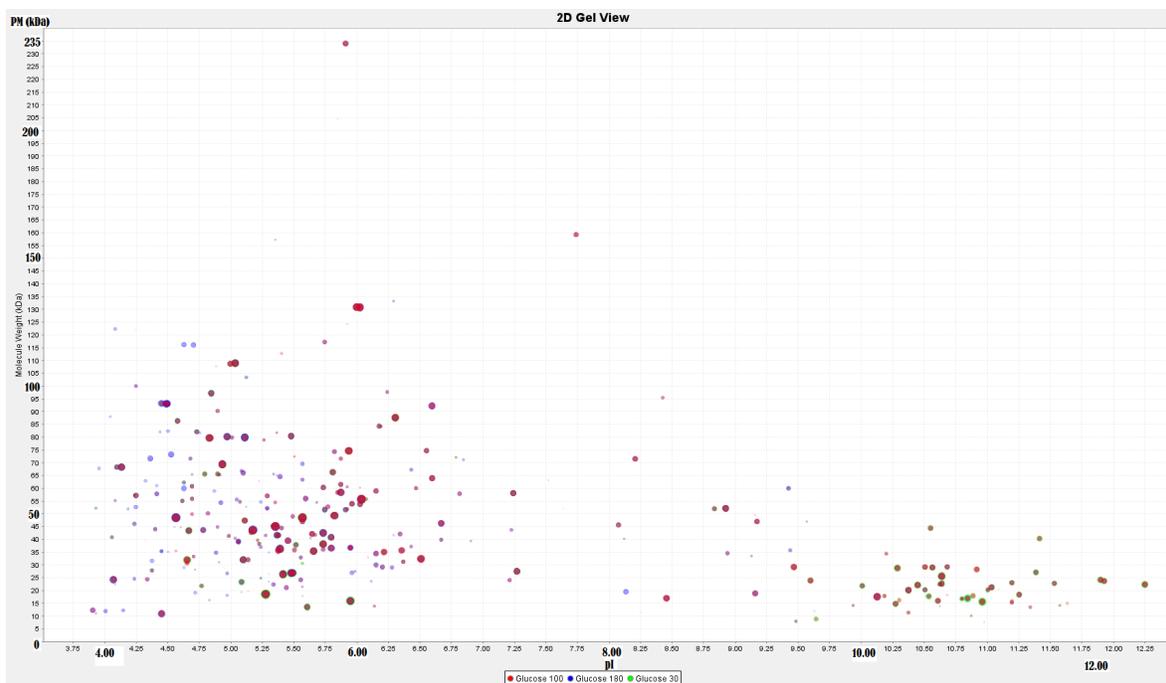


Figura 23. Gel 2D-virtual obtenido a partir de las muestras analizadas por LC-MS/MS (Ver anexo para mejor resolución).

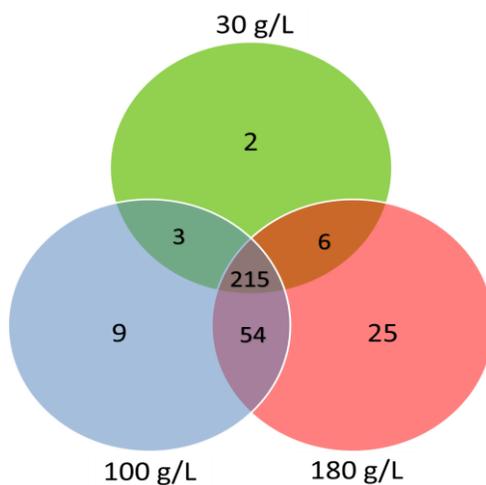


Figura 24. Diagrama de Venn de la distribución de las proteínas identificadas por el análisis de *shotgun* de las 3 concentraciones de glucosa (30, 100 y 180 g/L)

Comparando los resultados obtenidos por 2D-PAGE y 1D-SDS-PAGE, se observa una diferencia en el número y distribución de proteínas. En la Tabla 18 se presenta un resumen de los valores obtenidos por ambos procedimientos:

Tabla 18. Comparación de resultados obtenidos por ambos métodos.

Condición	(No.) Spots 2D-PAGE	(No.) Spots 1D-SDS- PAGE	(No.) Spots únicos 2D-PAGE	(No.) Spots únicos 1D-SDS- PAGE
30 g/L	43	226	0	2
100 g/L	198	281	39	9
180 g/L	290	300	127	25
PM (kDa)	10-250	5-235		
pI	3-10	3.9-12.25		
Spots Totales	314	331	166	36

De los tres extractos obtenidos a partir de las diferentes concentraciones de glucosa en el medio de cultivo, el secretoma separado por 1D-SDS-PAGE reportó mayor número de proteínas que los *spots* identificados por 2D-PAGE. La mayor diferencia en número de proteínas/*spots* se obtuvo con los medios de 30 y 100 g/L; siendo ésta de 425% y 42%, respectivamente. Entonces, tenemos que la comparación entre los dos métodos de cuantificación, separación e identificación de proteínas, ayudó a observar ciertos problemas en el momento de la purificación de las muestras, a su vez nos ayudará a complementar la información acerca de las proteínas identificadas.

Por lo tanto, las diferencias observadas pueden ser causa de una menor cantidad de proteína total usada para la separación 2D-PAGE, debido a importantes discrepancias entre los dos métodos usados para cuantificar proteína o al método de tinción empleado, no logrando detectar proteínas de expresión menor. Como se ha mencionado anteriormente, el análisis de proteína por Bradford dio resultados de 2-3 veces más proteína producida, que lo cuantificado por el método BCA (Pierce); estas diferencias posiblemente se deben a interferencias con el método de Bradford (García y Vázquez, 1998), por posibles contaminantes que no se eliminaron con el método de purificación de proteína.

Por otro lado, los resultados de proteína cuantificada para las condiciones 30 y 100 g/L de glucosa, demuestran que hay mayor producción de proteína en FES comparado con un estudio de Han y col. (2010), realizando un cultivo en FEL, empleando glucosa como fuente de carbono, dicho estudio empleo las concentraciones mencionadas anteriormente, teniendo baja producción de proteína extracelular por *A. terreus* NRRL 1960 (ATCC10020), produciendo concentraciones de proteína de 11.15 mg de proteína/L de medio para 30 g/L de glucosa y 10.56 mg de proteína/L de medio. Y de igual manera, Oda y col. (2006) demostraron tener mayor proteína secretada por *A. oryzae*, siendo de 4-6 veces mayor en FES que en FEL, pero usando salvado de trigo como fuente de carbono. Retomando la información obtenida por Han y col. (2010), se observa que la producción de proteína en cultivo líquidos se ve suprimida al aumentar la concentración de glucosa. Caso contrario a lo que observamos a nuestro estudio, donde al incrementar la glucosa 30 g/L a 100 g/L de glucosa y 100 g/L a 180 g/L de glucosa, la producción incrementa proporcionalmente..

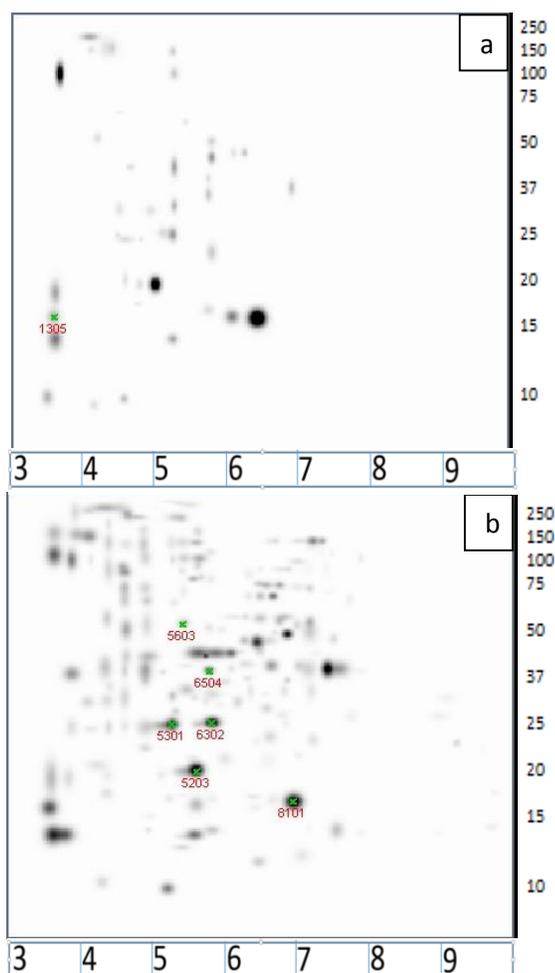
Comparando nuestros resultados con el trabajo de Avad y col. (2010), donde obtienen el secretoma de *A. niger* en un medio mínimo por FEL, usando glucosa como fuente de carbono, observan que la mayor parte de proteínas producidas por el hongo se encuentran en un rango de pI entre 4 y 7 y otras tantas en un rango de pI 8-11, y PM 40-100 kDa. Nuestros datos obtenidos por shotgun se asemejan, ya que la mayor parte de nuestras proteínas se presenta pI 4-6.75, y otras más 9-11; igualmente su PM va desde 15-100 kDa, pero ellos identificaron 102 proteínas únicas. Por otro lado, Yang y col. (2012), identificaron en el secretoma de *A. niger* por FEL usando glucosa, identificando en sus geles un aproximado de 478 spots, los cuales se distribuían en un rango de pI 3-10, presentando un PM de 14-100 kDa. Al realizar la comparación con la literatura, se observa que la distribución de nuestras proteínas en los geles es similar a los reportes mencionados, pero a su vez, las diferencias en el número de expresión de proteínas son importantes, considerando que las proteínas de los reportes son producidas en medios líquidos. La comparación de nuestros resultados con reportes similares en medio sólido, por el momento es imposible, ya que estos son casi inexistentes. Pero hay que considerar el trabajo por Oda y col. (2006). Donde comparó el secretoma de *A. terreus* producido en FES y FEL, encontró que hay mayor producción en FES, esto debido a que el hongo tiene que secretar una gran cantidad de enzimas para obtener sus nutrientes esenciales.

En resumen, las principales diferencias que existen entre los geles 2D-PAGE y el gel virtual obtenido por el gel 1D-SDS-PAGE, analizado por el LC-MS/MS, se debe, principalmente, a la sensibilidad del método empleado para la cuantificación de proteína, dando como resultado, geles 2D-PAGE inyectados con cantidades diferentes de proteína en cada condición. Por otra parte, los datos obtenidos por el shotgun, son muy similares con los dos trabajos mencionados anteriormente, siendo *A. niger* un hongo que comparte mucha similitud con *A. brasiliensis*, ya que éste anteriormente era considerado con el mismo nombre. La comparación de los dos métodos de cuantificación y separación de proteínas nos ayudó a observar, diferencias significativas, que se hubieran pasado por alto, si sólo se aplicará un único método. En el siguiente capítulo se identificarán las proteínas presenten en los *spots* seleccionados sin el análisis de imagen, que posiblemente den información acerca del efecto de la concentraciones del medio sobre el secretoma. Las proteínas cuantificadas por el método de “shotgun” no fueron caracterizadas.

7.3. Identificación de proteínas en los *spots* seleccionados de los geles bidimensionales.

En el capítulo anterior se realizó el análisis de imágenes a los geles bidimensionales obtenidos de muestras de tres concentraciones de glucosa: 30, 100 y 180 g/L. Seleccionando un total de 11 *spots* para su análisis por espectrometría de masas.

Cabe mencionar, que la obtención de la licencia del software de análisis de imágenes (PDQuest) no se obtuvo a tiempo, por lo cual seleccionamos los *spots* a analizar por espectrometría de masas de forma visual, observando algunos de ellos que fueran únicos de la condición y otros estuvieran presentes en las tres condiciones. Al contar con el PDQuest, el análisis realizado nos mostró un total de 30 *spots* con mejor reproducibilidad por las tres condiciones.



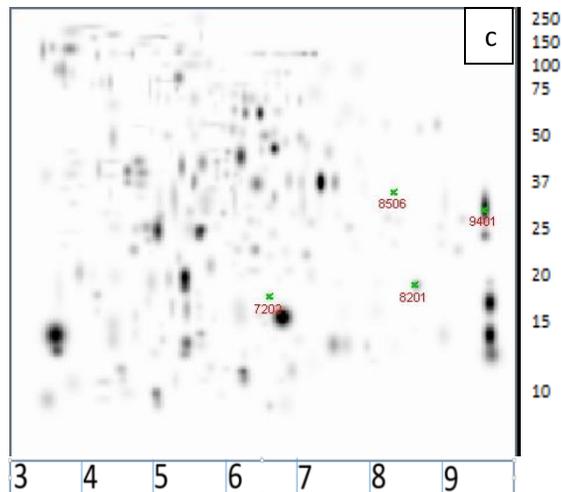


Figura 25. Distribución de los *spots* analizados por LC-MS/MS, 30 g/L (a), 100 g/L (b) y 180 g/L (c). La primera separación se hizo con IPG con un rango de pH de 3 a 10 y la segunda con SDS-PAGE con T=12%.

7.3.1. Identificación y caracterización de las proteínas.

Como se mencionó anteriormente, los *spots* analizados por LC-MS/MS fueron seleccionados sin un análisis de imágenes previo. Se seleccionó un total de 11 *spots*.

Los archivos Raw de los espectros de masas en tándem se procesaron en dos formatos: primero en formato MZXML y después a formato PKL, para su posterior análisis por medio del algoritmo de Mascot. Para la identificación de las proteínas se creó una base de datos con las proteínas de *Aspergillus brasiliensis* y *Aspergillus niger*, así obteniendo las secuencias FASTA y el ID de las secuencias. Con la información de las secuencias se caracterizaron las proteínas identificadas, empleando los siguientes algoritmos y bases de datos:

“Protein Blast” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se usó para la identificación de las proteínas, considerando porcentajes de identidad de 95-100%, también por medio de ésta base identificamos a la superfamilia a la que pertenecen.

“Signal P 4.1 server” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para identificar la presencia de péptido señal de secreción. Esto permite conocer si la proteína es secretada por vía clásica de secreción.

“Secretome P 2.0 server” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP>) para conocer si la proteína se secreta por vías alternas no convencionales; esto ocurre cuando se obtiene un “score” igual o mayor a 0.5.

“Pfam” (<http://pfam.xfam.org/>) permite identificar la familia a la que pertenece la proteína.

“Uniprot” (<http://www.uniprot.org/blast/>) es utilizado para conocer funciones biológicas y moleculares de la proteína; así como su peso molecular teórico.

La base “KEGG” (<http://www.kegg.jp/kegg/kegg2.html>) proporciona el número de caracterización de cada proteína, su clasificación y rutas metabólicas en las que participan.

En la tabla 19, se presentan las proteínas identificadas a partir de los 11 *spots* seleccionados

Tabla 19. Proteínas identificadas en los *spots* seleccionados.

Función putativa	Condiciones (g/L)	No. EC	Localización	Clase
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	30 y 100	4.1.1.49	Extracelular	Liasas y carboxilasas
Chaperona molecular Hsp70	100 y 180	2.7.3.3	Intracelular	Transferasas
Espermidina sintasa		2.5.1.16	Intracelular	Transferasas
Sacaropina deshidrogenasa [NAD+, formadora L-lisina]		1.5.1.7	Extracelular	Oxidorreductasas
Actina		2.1.1.85	Intracelular	Transferasas
Proteína hipotética AKAW 03471		ND	Extracelular	ND
Glutamato deshidrogenasa específica NADP	180	1.4.1.3	Extracelular	Oxidorreductasas
Formiato deshidrogenasa		1.2.1.2	Intracelular	Oxidorreductasas
Factor de elongación		3.6.5.3	Intracelular	Hidrolasas
Proteína hipotética ANI 1_1620024		ND	Intracelular	ND
Adenilato quinasa 1		2.7.4.11	Intracelular	Transferasas
Proteína hipotética ASPNIDRAFT 203715		ND	Extracelular	ND
Glutación S-transferasa Ure2	30, 100 y 180	2.5.1.18	Intracelular	Transferasas
Glutamil-tRNA (Gln) subunidad B amidotransferasa		6.3.5.7	Intracelular	Ligasas
Proteína de segregación cromosómica de familia ATPasa		ND	Intracelular	ND
Superóxido dismutasa (Cu-Zn)		1.15.1.1	Extracelular	Oxidorreductasas
Proteína hipotética ASPNIDRAFT 181371		ND	Intracelular	ND
Peroxirredoxina PRX1		1.11.1.15	Intracelular	Oxidorreductasas
Peroxirredoxina pmp20		1.11.1.15	Intracelular	Oxidorreductasas

Tabla 19. Función putativa, función asignada a partir de la homología con proteínas ya reportadas con una identidad del 95-100%; No. EC es el número asignado por su clasificación, la localización se identificó a través de SignalP y SecretomeP y la familia fue asignada a partir del Blastp y Pfam.

De las 19 proteínas identificadas 6 resultaron ser extracelulares, mientras que el resto son proteínas con funciones intracelulares (ambos tipos de proteínas identificadas por SignalP y SecretomeP). Las causas por las que se encontraron proteínas que normalmente están presentes y/o actúan al interior de la célula son diversas. Una de ellas es que las proteínas se liberaron durante la obtención del extracto extracelular o por lisis celular (Adav y col., 2010).

De las 19 proteínas identificadas, 4 fueron proteínas hipotéticas. Mencionando un estudio de Medina y col. (2005), ellos encontraron que el 27 % de las proteínas del secretoma de *A. flavus* corresponde a proteínas hipotéticas y sin identificar.

La mayor parte de las enzimas identificadas con función reconocida, pertenecen a la clase de oxidorreductasas y transferasas, las cuales participan en la degradación de lignina, y algunas de ellas reduciendo el peróxido de hidrógeno (Adav y col., 2010). Estas enzimas están presentes en las tres concentraciones evaluadas; posiblemente su expresión resulta del estrés oxidativo generado por los flujos de aireación empleados, esto indica que el oxígeno con el que era alimentado cada cultivo era muy alto en las tres concentraciones.

Algunas de las proteínas identificadas presentaron pesos moleculares mayores a los estimados por el análisis de imagen, tomando como referencia el marcador de peso molecular. No se descarta la probabilidad de diferencias mínimas, ya que pueden ser causa de modificaciones postraduccionales; las cuales modifican el peso molecular y el punto isoeléctrico, y a la vez, su distribución en el gel bidimensional. Pero una alta variabilidad puede indicar que existió la posibilidad de que las muestras hayan sufrido proteólisis durante su producción, almacenamiento o preparación, antes de ser separado por los geles 2D-PAGE (Bouws y col., 2008).

7.3.2. Proteínas identificadas como intracelulares.

Como se observa en la tabla 12, el 68 % de las proteínas identificadas corresponden a proteínas intracelulares, 3 de ellas resultaron hipotéticas. Para comprender mejor el papel que juegan estas proteínas intracelulares sobre el efecto de la concentración del medio, sería recomendable completar la información con un estudio proteómico intracelular. Pero

gracias a informes que existen en la literatura, se obtiene información acerca de su expresión en nuestro estudio.

Proteínas de estrés osmótico: La presencia de altas concentraciones de los componentes del medio, hace que la presión osmótica en el medio se incremente; esto generó un estrés osmótico sobre el microorganismo. Por lo tanto, tenemos que al aumentar las concentraciones del medio, generamos un estrés a *A. brasiliensis* ATCC9642, reflejándose en la síntesis de la enzima chaperona Hsp70, una enzima que se sobreexpresa cuando se presenta estrés de choque térmico, que fue identificada en procesos de osmoadaptación en *A. nidulans*, por Kim y col. (2007 y 2008), donde ellos incrementa la concentración de KCl en el medio de cultivo que emplean. Además esta enzima también recientemente fue encontrada en el secretoma de *S. cerevisiae*, donde incrementan las concentraciones de glucosa en el medio hasta 2% de glucosa (Giardina y col., 2014).

Proteínas involucradas el crecimiento celular: Se identificaron proteínas necesarias para el crecimiento microbiano. Principalmente, en la síntesis de ácidos nucleicos y, sólo de una es identificada su participación en la cadena respiratoria. Estas enzimas son: la espermidina sintasa (Bushell y Bull, 1974; Jin y col., 2002) y actina (Blanco y col., 2002; EMBL-EBI, 2015), presentes en las condiciones de 100 y 180 g/L; factor de elongación 1-alpha (Asif, 2006; EMBL-EBI, 2015), adenilato quinasa 1 (EMBL-EBI, 2015; Carrasco y col., 2001) y formiato deshidrogenasa (Schirwitz y col., 2007; Luke y col., 2008), presentes en el medio de 180 g/L; proteína de segregación cromosómica de la familia ATPasa (Ben y col., 2003 y 2005; Castilla, 2008) y glutamil-tRNA (Gln) subunidad B amidotransferasa (EMBL-EBI, 2015; Uniprot, 2015), presentes en los tres medios. De las proteínas identificadas, tres se encontraron en los tres medios de cultivo, mientras que el resto se localizó sólo en las condiciones de 100 y 180 g/L de glucosa. Probablemente, en las condiciones con altas concentraciones existió una mayor concentración de estas proteínas, debido a una mayor producción de biomasa, así como una mayor tasa lisis, dando como resultado una alta cantidad de proteína intracelular liberada comparándose con el medio de 30 g/L. Por lo tanto, se descartó la idea de que no se expresaron en la concentración mínima, sino más bien esta no fue detectable por el método de tinción sobre los geles bidimensionales, a causa de que se liberan en concentraciones mínimas en la condición de 30 g/L de glucosa. .

Enzimas de estrés oxidativo: Las enzimas peroxirredoxina pmp20 y PRX1 (Rhee y col., 2012; Giardina y col., 2014) y glutatión S-transferasa Ure2 (Fraser y col., 2002; Carberry y col., 2006) se encontraron en los tres medios, la presencia de estas proteínas nos indica que existe la presencia de reactivos procedentes de oxígeno y nitrógeno que juegan el papel de radicales libres; pero hay que considerar que en hongos filamentosos, la glutatión S-transferasa Ure2 participa en la resistencia de metales y xenobióticos, siendo muy diferente a la enzima homóloga procedente *S. cerevisiae*, donde es encargada de regular el nitrógeno (Fraser y col., 2002), por lo tanto, se podría decir que la presencia de estas enzimas es causa de las altas concentraciones de oxígeno en los tres medios y la alta presencia de metales en el medio, pero en contraste con los resultados obtenidos por respirometría, podemos decir que un ligero estrés oxidativo se dio en la condición de 30 g/L, ya que ésta tuvo un valor menor a 1, por el otro lado las concentraciones elevadas (100 y 180 g/L), presentaron un C. R mayor a 1, y la presencia de este tipo de enzimas sea causa por la alta presencia de metales que componen el medio, llegando a esta conclusión basándonos en el comportamiento de la glutatión S-transferasa reportada por Fraser y col.(2002)

Otras enzimas: Se identificaron dos proteínas hipotéticas (ASPNI DRAFT 181371 y ANI 1_1620024). Las cuales comparten similitud con proteínas expresadas por *A. niger* ATCC1015 y CBS 513.88, respectivamente.

7.3.3. Proteínas identificadas como extracelulares.

Para la identificación de las proteínas que forman parte del secretoma y son secretadas por péptidos señal, nos auxiliamos del algoritmo SignalP, para así predecir si la proteína presenta péptido señal. El servidor confirma a través de un resultado afirmativo. Si la proteína no presenta péptido señala a través de SignalP, entonces se realizó un análisis a través del servidor SecretomeP, para observar si la proteína presenta rutas de secreción alternas con valor de *score* mayor a 0.5. Han y col., 2010, para evitar la existencia de falsos positivos, toman valores de “*score*” \geq 0.98.

Proteínas involucradas el crecimiento celular: Se identificaron dos proteínas que participan en el metabolismo de aminoácidos; moléculas esenciales para la formación de proteínas y por ende para el crecimiento celular. Estas proteínas son la glutamato deshidrogenasa específica de NADP, presente en la condición de 180 g/L (Díaz, 2007; EMBI-EBI, 2015), y la sacaropina deshidrogenasa NAD⁺ formadora de L-lisina (EMBL-

EBI, 2015), presente en las tres concentraciones. La glutamato deshidrogenasa específica de NADP, participa en las rutas metabólicas de aminoácidos como la alanina, aspartato, glutamato, arginina, prolina y D-glutamina (EMBL-EBI, 2015), es posible que esta enzima no se encuentre ausente en las otras dos condiciones, sino debido a que son concentraciones de glucosa más bajas, su producción es mínima en estas dos condiciones comparadas con 180 g/L; por lo tanto, su identificación en el gel se hace más difícil. Por otro lado, la sacaropina deshidrogenasa NAD⁺ formadora de L-lisina participa en la biosíntesis y degradación de lisina, se presentó en las condiciones 100 y 180 g/L, la ausencia en la condición de 30 g/L, tal vez se deba a una baja concentración de ésta en el medio, y al separarse en los geles bidimensionales no se detecta a través del análisis de imágenes, por lo que la concentración de glucosa influyó sobre la concentración de esta enzima, cabe mencionar que la síntesis de la sacaropina deshidrogenasa se debe a que participa en la vía de α -aminoadipato, una ruta única para hongos y euglénidos (Ekanayake y col., 2010), por lo tanto, es una enzima esencial para *A. brasiliensis*.

Enzimas de estrés oxidativo: La superóxido dismutasa evita que radicales de superóxido y peróxido de hidrógeno ataquen formando componentes tóxicos para la célula (Bárbara y col., 1995) y además participa como alérgeno en la aspergilosis y aspergiloma (Hamilton y col., 1995; Blanco y col., 1998; Casquero y col., 2009). Se identificó en las tres condiciones. Se podría sugerir que su presencia es causa de una alta presencia de oxígeno durante el crecimiento, pero al comparar los C.R. podemos decir que existe un ligero estrés oxidativo, sólo en la condición 30 g/L de glucosa, donde su presencia es adjudicada al oxígeno presente en el medio, mientras que en las condiciones 100 g/L y 180 g/L, la presencia de la superóxido dismutasa sea causa por las altas concentraciones de glucosa, pero para asegurar esta hipótesis, tendríamos que realizar un seguimiento específico hacia esta enzima.

Enzimas que se inhiben a altas concentraciones de glucosa: La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa es una enzima de la ruta de la gluconeogénesis, ha sido identificada en otros estudios de secretoma (Han y col., 2010; Giardina y col., 2014). La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa a bajas concentraciones de glucosa tiene una mayor expresión en *S. cerevisiae*, y al aumentar la concentración su expresión disminuye (Giardina y col., 2012 y 2014), indicando que la regulación genética de ésta enzima en *S. cerevisiae* es diferente comparándose con *A. nidulans* y otros hongos (Hynes y col., 2001). Por lo tanto, al ser identificada la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa en las concentraciones 30 y 100 g/L,

consideramos que la glucosa presente en el medio no es suficiente para reprimir su expresión, mientras que una concentración alta como es 180 g/L, tiene mayor efecto inhibitorio sobre las enzimas de la gluconeogénesis en *A. brasiliensis* ATCC 9642.

Otras enzimas: En el secretoma de *A. brasiliensis* ATCC9642 se identificaron dos proteínas hipotéticas (AKAW_03471 y ASPNIDRAFT_203715), las cuales presentaron homología con secuencias provenientes de *A. kawachii* IFO 4308.

También se encontró que la mayoría de las proteínas identificadas se presentaban O-glicosiladas y N-glicosiladas (68%). Fueron 5 proteínas extracelulares y 8 proteínas intracelulares. Oda y col. (2006) mencionan que la mayoría de las proteínas que conforman el secretoma se encuentran glicosiladas. La glicosilación de las proteínas representa un problema para la identificación, por lo que una desglicosilación previa al análisis de masas es recomendable, incrementando el número de proteínas identificadas (Oda y col. 2006; Han y col., 2010; Callegari y Navarrete, 2012).

Por lo tanto, a partir de los resultados descritos anteriormente, concluimos lo siguiente:

Al aumentar la concentración de glucosa en el medio, aumenta el estrés osmótico, así sobreexpresando la síntesis de proteínas que se traducen bajo estrés de choque térmico, como es la chaperona Hsp70, que responde en este caso al estrés osmótico, la cual se expresó en las dos concentraciones más altas (100 y 180 g/L).

Al incrementar la glucosa, aumenta la expresión de algunas proteínas en el secretoma, como puede ser la glutamato deshidrogenasa específica de NADP y sacaropina deshidrogenasa NAD⁺ formadora de L-lisina.

El aumento de la concentración de glucosa va inhibiendo la expresión de enzimas que participan en la gluconeogénesis, resultando ser similar a otro estudio. La expresión de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa se llevó a cabo en las concentraciones de 30 y 100 g/L; concluyendo que a una concentración considerablemente alta, que es 100 g/L, aún no se inhibe por completo la síntesis de ésta enzima; mientras que en 180 g/L se considera ausente.

Existe estrés oxidativo en las tres condiciones estudiadas, dado que se identificaron un mayor número de enzimas que participan en los procesos de control sobre este tipo de estrés, siendo enzimas intra y extracelulares.

La identificación de unos cuantos *spots* nos da una idea sobre los procesos que está realizando nuestro microorganismo para su adaptación en el medio estudiado. Pero es recomendable aplicar algún otro método de separación e identificación de proteínas, que nos pueda proporcionar información extra, así logrando una mejor identificación de nuestras proteínas, ya que cada método tiene sus ventajas y desventajas; pues si aplicamos únicamente un método, es posible que se pierda información relevante. Callegari y Navarrete (2002), recomiendan un estudio completo del sistema enzima-proteico, ya que todas las proteínas interactúan para ayudar a mantener al hongo sobreviviendo en el medio en que crece, mientras que Girard y col. (2012), proponen no trabajar con medios simples, ya que sólo se conoce sólo una fracción del proteoma, lo más recomendable es trabajar con medios completos para conocer mejor la mayoría de las enzimas que produce, algo similar menciona Do Vale y col.(2012), que la expresión de las enzimas es proporcional a la complejidad del medio.

Si queremos tener un mejor entendimiento de los procesos adaptación y respuesta del microorganismo a los medios con los que se trabajen. Particularmente, recomendaría realizar un estudio completo del proteoma, siendo proteínas intra y extracelulares estudiadas a fondo; puesto que, como menciona Callegari y col. (2012), la importancia de identificar el secretoma puede ayudar a interpretar mejor el genoma, para propiciar mejora en los microorganismos de interés industrial. Desde mi punto de vista, se logrará un mayor conocimiento conjugando los dos tipos de proteínas, debido a que, como se ha mencionado, todas las proteínas participan en la sobrevivencia del hongo.

A continuación se presentan la siguientes tablas, de las cuales se muestra las proteínas identificadas en los *spots* tomados de cada condición y, mostrando la información obtenida en cada una de las bases mencionadas.

Tabla 20. Proteínas identificadas en las concentraciones 30, 100 y 180 g/L.

Proteína	No. EC	Spot (SSP)	No. Acceso	% Cobertura	PM kDa Teórico	Signal p	Secretome p	Familia	Rutas metabólicas	Localización	N-Gly	O-Gly
Peroxirredoxina pmp20	1.11.1.15	8201	XP_001395908.1	34.52	18,586	N	0.37	Redoxinas	Metabolismo del glutatión	Peroxisoma	N	S
		5203		54.17								
		1305		18.45								
Superóxido dismutasa [Cu-Zn]	1.15.1.1	5301	XP_001391459.1	55.19	15.96	N	0.89	Sod_Cu	2 superóxido + 2 H ⁺ = O ₂ + H ₂ O ₂	Citosol	S	S
1305		XP_001399884.1	14.29	Espacio intermembrana mitocondrial						S	N	
Superóxido dismutasa										Núcleo		
Glutatión S-transferasa	2.5.1.18	6302	XP_001398731.2	62.45	26.12	N	0.39	GST_N_2 GST_C	Metabolismo de glutatión Metabolismo de xenobióticos y fármacos por citocromo P450	ND	S	S
Glutamil-tRNA (Gln) amidotransferasa subunidad B	6.3.5.7	6302	XP_001399860.2	6.49	66.78	N	0.089	GatB_N GatB_Yqey	Biosíntesis de aminoacil tRNA	Mitocondria	S	S
Proteína de segregación de cromosoma de la familia ATPasa	ND		XP_001398958.2	0.91	254.18	N	0.18	ND	ND	ND	S	S
Proteína hipotética ASPNIDRAFT_181371*	X	8101	EHA24355.1	15.70	69.57	N	0.09	HSP70	ND	ND	S	S
Peroxirredoxina PRX1	1.11.1.15		XP_001401704.2	28.30	23.33	N	0.36	AhpC-TSA 1-cysPrx_C	Metabolismo de glutatión	ND	S	S

(*) Proteína referenciada de *A. niger* ATCC1015, el resto son referencias de *A. niger* CBS 513.88, N=No; S=Sí y ND=No disponible.

Tabla 21. Proteínas identificadas presentes en dos condiciones.

Proteína	No. EC	Spot (SSP)	Condición (g/L)	No. Acceso	% Cobertura	PM kDa Teórico	Signal p	Secretome p	Familia	Rutas metabólicas	Localización	N-Gly	O-Gly
Proteína hipotética AKAW_03471**	ND	8506	100 y 180	GAA85357.1	28.93	22.55	Y	0.80606	ND	ND	ND	N	S
		8201			62.44								
Actina	2.1.1.85	8201	100 y 180	XP_001396595.1	8.53	41.61	N	0.08	Actina	S-adenosil-L-metionina + proteína L-histidina = S-adenosil-L-homocisteína + proteína Ntau-metil-L-histidina]	Filamentos de actina Puntas celulares Cuello de brote celular Complejo Ino80 Complejo histona transferasa NuA4 Membrana prosporo Complejo Swr1	S	S
Sacaropina deshidrogenasa NAD+, formadora L-lisina	1.5.1.7	5603	100 y 180	XP_001399884.1	39.26	41,38	N	0.53	AlaDh_PNT_N, AlaDh_PNT_C	Biosíntesis y degradación de lisina	Citoplasma	N	S
Espermidina sintasa	2.5.1.16	6504	100 y 180	XP_001392771.2	66.21	33.35	N	0.09	Síntesis espermidina	Metabolismo cisteína, metionina, arginina, prolina y alanina. Metabolismo de glutatión	ND	N	S
Chaperona molecular Hsp70**	2.7.3.3	5603	100 y 180	GAA85596.1	16.80	69.46	N	0.09	HSP70	Metabolismo de arginina y prolina	ND	S	S
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	4.1.1.49	1305	30 y 100	XP_001394256.1	2	66.30	N	0.81	PEPCK_ATP	Glucólisis/ Gluconeogénesis Ciclo de Krebs Metabolismo de piruvato Biosíntesis de metabolitos secundarios y antibióticos	Citosol	S	S

(**) Proteína referenciada de *A. kawachii* IFO 4308, el resto son referencias de *A. niger* CBS 513.88, N=No; S=Si y ND=No disponible.

Tabla 22. Proteínas identificadas presentes como únicas de la condición 180 g/L.

Proteína	No. EC	Spot SSP	No. Acceso	% Cobertura	PM kDa Teórico	Signal p	Secretome p	Familia	Rutas metabólicas	Localización	N-Gly	O-Gly
Glutamato deshidrogenasa específica de NADP	1.4.1.3	7202	XP_001401464.1	14.57	49.38	N	0.53	ELFV_dehydrog_N, ELFV_dehydrog	Metabolismo de alanina, aspartato, glutamato, arginina, prolina, D-glutamina y D-glutamato	Citosol	S	N
		9401		18.70								
Formiato deshidrogenasa	1.2.1.2	9401	XP_001396580.2	29.29	39.51	N	0.25	2-Hacid_dh,2-Hacid_dh_C	Metabolismo de glioxilato y dicarboxilato	Citosol	S	N
Factor de elongación alfa-1	3.6.5.3	9401	XP_001398942.1	12.89	49.958	N	0.53	GTP_EFTU, GTP_EFTU_D2, GTP_EFTU_D3	GTP + H ₂ O = GDP + Fosfato GTP + H ₂ O = GDP + Fosfato	Citoplasma	S	N
				9.09			0.88					
				12.15			0.28					
Proteína hipotética ANI_1_1620024	ND	9401	XP_001400294.2	33.62	26.97	N	0.07	FAA_hydrolasa	ND	Mitocondria	S	N
Adenilato quinasa 1	2.7.4.11	9401	XP_001392085.1	30.89	26.97	N	0.36	ADK, ADK_lid	Metabolismo de purinas	Mitocondria	S	N
Proteína hipotética ASPNIDRAFT_203715*	ND	9401	EHA20419.1	13.11	28.63	N	0.95	Porin_3	ND	Citoplasma Citosol Espacio intermembrana mitocondrial	N	S

(*) Proteína referenciada de *A. niger* ATCC1015, el resto son referencias de *A. niger* CBS 513.88, N=No; S=Sí y ND=No disponible.

8. CONCLUSION.

Se logró una reproducibilidad técnica y biológica en el crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* ATCC9642, logrando obtener muestras de proteína comparables; pero por problemas en los métodos de cuantificación de proteína, hubo diferencias en la comparación entre los métodos de separación de proteína (2D-PAGE y 1-SDS-PAGE), identificando un mayor número de proteínas por la separación en una dimensión e identificación por LC-MS/MS, dichas proteínas no fueron caracterizadas.

Las imágenes obtenidas por los geles bidimensionales, se analizaron por PDQuest identificando proteínas reproducibles, pero no fueron analizadas por LC-MS/MS, ya que el análisis de las imágenes fue posterior al análisis por espectrometría de masas. Se seleccionaron un total de 11 *spots* sin análisis previo en PDQuest; a simple vista estos *spots* se definieron como únicos o compartidos entre las condiciones evaluadas.

De los *spots* seleccionados se identificaron 19 proteínas, 13 de ellas, caracterizadas con funciones intracelulares, las otras 6 con funciones extracelulares. De las 6 secretadas, dos son hipotéticas, dos participan en el crecimiento celular, una en la ruta de la gluconeogénesis y una es expresada bajo estrés oxidativo.

De acuerdo con los resultados obtenidos y la información reportada, el efecto de la glucosa en el secretoma se vio reflejado en la inhibición de enzimas de la gluconeogénesis, enzimas de estrés oxidativo y en una mayor sobreexpresión de las proteínas que participan en el crecimiento celular, además se observó que no se suprime la producción de proteína a concentraciones altas.

Para comprender mejor todo el sistema enzimático-proteico que usa el hongo para su adaptación a medios hipertónicos, se recomienda un análisis total del secretoma; así como, de las proteínas intracelulares; lo que proporcionará información más completa sobre los procesos que se llevan a cabo para dar respuesta a estímulos externos de la célula.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, M. E., Gutiérrez, M., Viniegra, G. & Favela, E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 43, 808-814
- Adav, S. S., Li, A. A., Manavalan, A., Punt, P., & Sze, S. K. (2010). Quantitative iTRAQ Secretome Analysis of *Aspergillus niger* Reveals Novel Hydrolytic Enzymes. [Article]. *Journal of Proteome Research*, 9(8), 3932-3940.
- Aguilar, C. N., Favela-Torres, E., Viniegra-Gonzalez, G., & Augur, C. (2002). Culture conditions dictate protease and tannase production in submerged and solid-state cultures of *Aspergillus niger* Aa-20. [Article]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 102, 407-414.
- Alegre, A. C. P., Polizeli, M., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Guimaraes, L. H. S. (2009). Production of thermostable invertases BY *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. [Article]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(3), 612-622.
- Ali, H. K. Q., & Zulkali, M. M. D. (2011). Design Aspects of Bioreactors for Solid-state Fermentation: A Review. [Review]. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 25(2), 255-266.
- Arenas Guzmán, R. (2008). *Micología médica ilustrada* (3 era. ed.). México: McGraw-Hill Interamericana.
- Arias Cifuentes, E. L., & Piñeros Espinoza, P. A. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C.
- Asif, A. R., Oellerich, M., Armstrong, V. W., Riemenschneider, B., Monod, M., & Reichard, U. (2006). Proteome of conidial surface associated proteins of *Aspergillus fumigatus* reflecting potential vaccine candidates and allergens. [Article]. *Journal of Proteome Research*, 5(4), 954-962.

- ATCC. (2014). *Aspergillus brasiliensis* Varga et al. (ATCC® 9642™). Retrieved Noviembre, 2014: <http://www.atcc.org/products/all/9642.aspx#generalinformation>
- Baker, S. E. (2006). *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. [Article; Proceedings Paper]. Medical Mycology, 44, S17-S21.
- Ben-Yehuda, S., Fujita, M., Liu, X. S., Gorbatyuk, B., Skoko, D., Yan, J., et al. (2005). Defining a centromere-like element in *Bacillus subtilis* by identifying the binding sites for the chromosome-anchoring protein RacA. [Article]. Molecular Cell, 17(6), 773-782.
- Ben-Yehuda, S., Rudner, D. Z., & Losick, R. (2003). RacA, a bacterial protein that anchors chromosomes to the cell poles. [Article]. Science, 299(5606), 532-536.
- Biesebeke, R. T., van Biezen, N., de Vos, W. M., van den Hondel, C., & Punt, P. J. (2005). Different control mechanisms regulate glucoamylase and protease gene transcription in *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentation. [Article]. Applied Microbiology and Biotechnology, 67(1), 75-82.
- Blanco, J. L., Guedeja-Marrón, J., Caballero, J., & García, M. E. (1998). Aspergilosis: mecanismos de patogenicidad implicados y aproximación al diagnóstico de laboratorio. Revista Iberoamericana de Micología, 15 10-15.
- Bouws, H., Wattenberg, A., & Zorn, H. (2008). Fungal secretomes - nature's toolbox for white biotechnology. [Review]. Applied Microbiology and Biotechnology, 80(3), 381-388.
- Bushell, M. E. B., A. T. (1974/03/01). Polyamine, Magnesium and Ribonucleic Acid Levels in Steady-state Cultures of the Mould *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 81.
- Caccia, D., Dugo, M., Callari, M., & Bongarzone, I. (2013). Bioinformatics tools for secretome analysis. [Review]. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 1834(11), 2442-2453.

- Eduardo Callegari and Mario Navarrete (2012). The Use of Mass Spectrometry for Characterization of Fungal Secretomes, Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles, Dr Jeevan Prasain (Ed.), ISBN: 978-953-51-0141-3, InTech, DOI: 10.5772/30908. Available from: <http://www.intechopen.com/books/tandem-mass-spectrometry-applications-and-principles/the-use-of-mass-spectrometry-for-characterization-of-fungal-secretomes>
- Carberry, S., Neville, C. M., Kavanagh, K. A., & Doyle, S. (2006). Analysis of major intracellular proteins of *Aspergillus fumigatus* by MALDI mass spectrometry: Identification and characterisation of an elongation factor 1B protein with glutathione transferase activity. [Article]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 341(4), 1096-1104.
- Carrasco, A. J., Dzeja, P. P., Alekseev, A. E., Pucar, D., Zingman, L. V., Abraham, M. R., et al. (2001). Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels. [Article]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(13), 7623-7628.
- Casquero, José; Urcia, Flor y Sanchez, Elizabeth. Antígenos nativos de *Aspergillus fumigatus* con utilidad para el inmunodiagnóstico de aspergiloma. Rev. Perú. med. exp. salud pública [online]. 2009, vol.26, n.2 [citado 2015-06-17], pp. 182-186. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172646342009000200008&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1726-4634.
- Castilho, L. R., Polato, C. M. S., Baruque, E. A., Sant' Anna, G. L., & Freire, D. M. G. (2000). Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. [Article]. Biochemical Engineering Journal, 4(3), 239-247.
- Castillo, G., & Villafañe, C. (2003). Recuperación de Ni y Co de laterita ferruginosa del estado Cojedes a través de la biolixiviación con cultivos DE *Aspergillus niger* Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

- Chávez González, M. L., Rodríguez Durán, L. V., Rodríguez Herrera, R., & Noé Aguilar, C. (2009). Aspectos básicos de la fermentación en medio sólido. *Ciencia Acierta*, 20,
- de Oliveira, J., van Passel, M. W. J., Schaap, P. J., & de Graaff, L. H. (2011). Proteomic Analysis of the Secretory Response of *Aspergillus niger* to D-Maltose and D-Xylose. [Article]. *Plos One*, 6(6), 9.
- Denmark, T. U. o. Center for Biological Sequence Analysis, 2015: from <http://www.cbs.dtu.dk/index.shtml>
- Do Vale, L. H. F., Gomez-Mendoza, D. P., Kim, M. S., Pandey, A., Ricart, C. A. O., Filho, E. X. F., et al. (2012). Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. [Article]. *Proteomics*, 12(17), 2716-2728.
- Domon, B., & Aebersold, R. (2006). Review - Mass spectrometry and protein analysis. [Review]. *Science*, 312(5771), 212-217.
- Díaz González, S. (2007). NAD-glutamato deshidrogenasa de *Haloferax mediterranei*, clonaje, secuenciación y expresión. Purificación y propiedades de la enzima nativa y recombinada., Universidad de Alicante, Alicante.
- Ekanayake, D. K., Andi, B., Bobyk, K. D., West, A. H., & Cook, P. F. (2010). Glutamates 78 and 122 in the Active Site of Saccharopine Dehydrogenase Contribute to Reactant Binding and Modulate the Basicity of the Acid-Base Catalysts. [Article]. *Journal of Biological Chemistry*, 285(27), 20756-20768.
- Encarnación Guevara, S. M. (S/A). El proteoma, una herramienta para el análisis global del estado celular de organismos microbianos. In E. Romero Martínez & J. C. Martínez Romero (Eds.), *Microbios*. México: Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ertola, R., Yantorno, O., & Mignone, C. (1994). *Microbiología Industrial* (pp. 104). Washington, US.

- Favela-Torres, E., Cordova-Lopez, J., Garcia-Rivero, M., & Gutierrez-Rojas, M. (1998). Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. [Article]. *Process Biochemistry*, 33(2), 103-107.
- Figueroa Montero, A. A. (2011). Modelamiento de la transferencia de calor y masa (agua) en un biorreactor de charolas para fermentación en medio sólido. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Fraser, J. A., Davis, M. A., & Hynes, M. J. (2002). A gene from *Aspergillus nidulans* with similarity to URE2 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a glutathione S-transferase which contributes to heavy metal and xenobiotic resistance. [Article]. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2802-2808.
- García Arellano, H., & Vázquez Duhalt, R. (1998). Cuantificación de proteínas: una revisión. *Biotecnología*, 3, 77-88.
- García Triana, B., García Morales, O., Clapes Hernández, S., Rodes Fernández, L., & García Piñeiro, J. C. (1995). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutasa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 14. Retrieved from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03001995000100001&lng=es&nrm=iso
- García, V. (2004). Introducción a la microbiología: EUNED.
- Giardina, B. J., Stanley, B. A., & Chiang, H. L. (2014). Glucose induces rapid changes in the secretome of *Saccharomyces cerevisiae*. [Article]. *Proteome Science*, 12, 21.
- Giraldo, M. A., da Silva, T. M., Salvato, F., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Guimaraes, L. H. S. (2012). Thermostable invertases from *Paecilomyces variotii* produced under submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues. [Article]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 28(2), 463-472.
- Girotti, M. R. (2010). Análisis proteómico de los mecanismos moleculares de progresión tumoral relacionados con la proteína Sparc. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.

- Grajek, W. (1987). Comparative-studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid-state fermentation. [Article]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26(2), 126-129.
- Hamilton, A. J., Holdom, M. D., & Hay, R. J. (1995). Specific recognition of purified Cu, Zn superoxide-dismutase from *Aspergillus-fumigatus* by immune human sera. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(2), 495-496.
- Han, M. J., Kim, N. J., Lee, S. Y., & Chang, H. N. (2010). Extracellular proteome of *Aspergillus terreus* grown on different carbon sources. [Article]. *Current Genetics*, 56(4), 369-382.
- Hashemi, M., Mousavi, S. M., Razavi, S. H., & Shojaosadati, S. A. (2013). Comparison of submerged and solid state fermentation systems effects on the catalytic activity of *Bacillus sp* KR-8104 alpha-amylase at different pH and temperatures. [Article]. *Industrial Crops and Products*, 43, 661-667.
- Hill, T. W., & Kafe, E. (2001). Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *FUNGAL GENETICS NEWSLETTER*, 48, 20-21
- Hynes, M. J., Draht, O. W., & Davis, M. A. (2002). Regulation of the acuF gene, encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. [Article]. *Journal of Bacteriology*, 184(1), 183-190.
- Jin, Y., Bok, J. W., Guzman-de-Pena, D., & Keller, N. P. (2002). Requirement of spermidine for developmental transitions in *Aspergillus nidulans*. [Article]. *Molecular Microbiology*, 46(3), 801-812.
- Kim, Y., Nandakumar, M. P., & Marten, M. R. (2007). Proteome map of *Aspergillus nidulans* during osmoadaptation. [Article]. *Fungal Genetics and Biology*, 44(9), 886-895.
- Kim, Y., Nandakumar, M. P., & Marten, M. R. (2008). The state of proteome profiling in the fungal genus *Aspergillus*. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 7(2), 87-94.

- Klose, J. (2009). From 2-D electrophoresis to proteomics. [Article]. *Electrophoresis*, 30, S142-S149.
- Kniemeyer, O. (2011). Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. [Review]. *Proteomics*, 11(15), 3232-3243.
- Krijgsheld, P., Altelaar, A. F. M., Post, H., Ringrose, J. H., Muller, W. H., Heck, A. J. R., et al. (2012). Spatially Resolving the Secretome within the Mycelium of the Cell Factory *Aspergillus niger*. [Article]. *Journal of Proteome Research*, 11(5), 2807-2818.
- Laboratories, K. (1995). KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). 2015, Link: <http://www.genome.jp/kegg/>
- Laboratory, E. M. B. The European Bioinformatics Institute. 2015, from <http://www.ebi.ac.uk/>
- Laboratory, P. E. M. B. Pfam 28.0. Link: <http://pfam.xfam.org/>
- Liebler, D. C. (2002). *Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- Luke, I., Butland, G., Moore, K., Buchanan, G., Lyall, V., Fairhurst, S., et al. (2008). Biosynthesis of the respiratory formate dehydrogenases from *Escherichia coli*: characterization of the FdhE protein. [Article]. *Archives of Microbiology*, 190(6), 685-696.
- Matute, L. (2011). Estudio comparativo del proceso de obtención de un aditivo enzimático mediante fermentaciones microbianas sólida y sumergida de afrechillo de trigo. Universidad de Carabobo, Valencia, España.
- Medina, M. L., Haynes, P. A., Breci, L., & Francisco, W. A. (2005). Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. [Article]. *Proteomics*, 5(12), 3153-3161.
- Medina, M. L., Kiernan, U. A., & Francisco, W. A. (2004). Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. [Article]. *Fungal Genetics and Biology*, 41(3), 327-335.

- Meijer, M., Houbraken, J., Dalhuijsen, S., Samson, R. A., & de Vries, R. P. (2011). Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black *Aspergilli*. [Article]. *Studies in Mycology* (69), 19-30.
- Gerardo-Mendoza, I., González-Ayala, J.M. y Favela-Torres, E. 2003. Evaluación de la agrolita como soporte inerte para la producción de invertasa por fermentación en medio sólido con *Aspergillus niger*. X Congreso Nacional de la SMBB. Puerto Vallarta, Jal. 8-12, sept. 2003..
- Mojica, T., Sánchez, O., & Bobadilla, L. (2003). La Proteómica, otra cara de la genómica. *Nova*, 1, 13-16
- Morales Sánchez, D., & Gallo Ramírez, L. E. (2006). Plataformas de proteómica. Paper presented at the Métodos Físico-Químicos en Biotecnología.
- 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. [Article]. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3448-3457.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. [Article]. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81-84.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R., & Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. [Review]. *Current Science*, 77(1), 149-162.
- Pando-Robles, V., & Batista, C. F. (2008). Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas In A. Lopez-Munguia (Ed.), *Una ventana al quehacer científico* (pp. 97-108). México, D.F., UNAM: Instituto de Biotecnología.
- Papagianni, M., Nokes, S. E., & Filer, K. (2001). Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: Effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. [Article]. *Food Technology and Biotechnology*, 39(4), 319-326.

- Punt, P. J., van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J., & van den Hondel, C. (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. [Review]. *Trends in Biotechnology*, 20(5), 200-206.
- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 1(0717-3458).
- Rajan, A., & Nair, A. J. (2011). A comparative study on alkaline lipase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 in submerged and solid-state fermentation using economically and industrially feasible substrate. [Article]. *Turkish Journal of Biology*, 35(5), 569-574.
- Ramesh, M. V., & Lonsane, B. K. (1991). Regulation of alpha-amylase production in *Bacillus-licheniformis* m27 by enzyme end-products in submerged fermentation and its overcoming in solid-state fermentation system. [Article]. *Biotechnology Letters*, 13(5), 355-360.
- Reyes-Ocampo, I., González-Brambila, M., & López-Isunza, F. (2013). Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12, 41-56
- Rhee, S. G., Woo, H. A., Kil, I. S., & Bae, S. H. (2012). Peroxiredoxin Functions as a Peroxidase and a Regulator and Sensor of Local Peroxides. [Review]. *Journal of Biological Chemistry*, 287(7), 4403-4410.
- Romero Gómez, S. d. J. (2001). Producción de Invertasa por *Aspergillus niger* en Fermentación Líquida y Fermentación Sólida, Universidad Autónoma Metropolitana, Distrito Federal, México.
- Romero-Gomez, S. J., Augur, C., & Viniestra-Gonzalez, G. (2000). Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. [Article]. *Biotechnology Letters*, 22(15), 1255-1258.
- Ruíz, H. A., Rodríguez, R. M., Rodríguez, J., Contreras, J. C., & Aguilar, C. N. (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido, *Revista mexicana de ingeniería química*. Vol. 6, No.1 (2007) 33-40 AMIDIQ, 6 7

- Santiago Vispo, N. (2004). *Combinatoria molecular* (1ra. Edición ed.). La Habana 10600, Cuba: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.
- Schirwitz, K., Schmidt, A., & Lamzin, V. S. (2007). High-resolution structures of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. [Article]. *Protein Science*, 16(6), 1146-1156.
- Shah, P., Powell, A. L. T., Orlando, R., Bergmann, C., & Gutierrez-Sanchez, G. (2012). Proteomic Analysis of Ripening Tomato Fruit Infected by *Botrytis cinerea*. [Article]. *Journal of Proteome Research*, 11(4), 2178-2192.
- te Biesebeke, R., Ruijter, G., Rahardjo, Y. S. P., Hoogschagen, M. J., Heerikhuisen, M., Levin, A., et al. (2002). *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations - Progress report on a multi-disciplinary project. [Article]. *Fems Yeast Research*, 2(2), 245-248.
- Torres, L. R., & Aguilar Osorio, G. (2012). El estado actual del proteoma de *Aspergillus*. *BioTecnología*, 16, 129-151.
- Tsang, A., Butler, G., Powlowski, J., Panisko, E. A., & Baker, S. E. (2009). Analytical and computational approaches to define the *Aspergillus niger* secretome. [Article]. *Fungal Genetics and Biology*, 46, S153-S160.
- UniProt, EMBL-EBI, SIB, & PIR. (2002). Uniprot. 2015
- Varga, J., Kocsube, S., Toth, B., Frisvad, J. C., Perrone, G., Susca, A., et al. (2007). *Aspergillus brasiliensis* sp nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. [Article]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1925-1932.
- Vázquez Vanegas, A. M. (2013), Producción de xilanasas por *Aspergillus sp.* En fermentación sumergida y fermentación en medio sólido, Universidad Iberoamericana, Distrito Federal, México.
- Viniestra-González, G. (1997). Solid state fermentation: Definition, characteristics, limitations and monitoring. [Proceedings Paper]. *Advances in Solid State Fermentation*, 5-22.

- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., Romero-Gomez, S. D., Diaz-Godinez, G., & Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. [Article]. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 157-167.
- Volke Sepúlveda, T., Favela Torres, E. y Gutiérrez Rojas, M., 2001. Biodegradación de altas concentraciones de hexadecano por *Aspergillus niger* en cultivo en medio sólido. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería de la SMBB, Veracruz, Veracruz, 10-14 de septiembre, 2001.
- Wysocki, V. H., Resing, K. A., Zhang, Q. F., & Cheng, G. L. (2005). Mass spectrometry of peptides and proteins. [Article]. *Methods*, 35(3), 211-222.
- Yang, X., Sun, J. Y., Guo, J. L., & Weng, X. Y. (2012). Identification and proteomic analysis of a novel gossypol-degrading fungal strain. [Article]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(4), 943-951.

ANEXOS

Anexo A. Valores de parámetros de las tasas y cinéticas de crecimiento de 30-180 g/L

Tabla A. Valores de parámetros obtenidos de la tasa y cinética de producción de CO₂ de las concentraciones de 30-180 g/L

Parámetro	Concentración g/L						
	30	60	100	120	140	160	180
mg CO ₂ /h g as (máximo producido)	4.00	7.36	11.27	15.74	16.07	18.70	19.60
	4.03	nd	11.00	13.25	17.95	18.92	20.93
Promedio	4.02	7.36	11.13	14.50	17.01	18.81	20.26
mg O ₂ /h g as (máximo consumido)	2.08	4.08	6.54	9.02	9.25	11.59	12.62
	1.94	nd	6.86	8.06	10.46	11.48	12.82
Promedio	2.01	4.08	6.70	8.54	9.85	11.54	12.72
mg CO ₂ /g as (máximo producido)	31.33	82.30	154.86	197.53	238.91	292.40	317.92
	39.13	nd	154.72	191.69	244.14	274.28	319.76
Promedio	35.23	82.30	154.79	194.61	241.52	283.34	318.84
mg O ₂ /g as (máximo consumido)	37.55	77.28	128.88	177.37	192.15	244.49	248.61
	38.72	nd	148.95	174.13	217.19	238.28	257.47
Promedio	38.14	77.28	138.91	175.75	204.67	241.39	253.04
Fase Lag (h)	21.23	21.32	23.90	20.12	23.99	20.45	25.90
	19.81	nd	18.74	21.03	22.00	22.20	22.33
Promedio	20.52	21.32	21.32	20.58	22.99	21.33	24.11
Tiempo producción continua de CO ₂ (h)	6.42	10.08	12.38	15.00	15.58	20.83	18.33
	8.25	nd	15.42	15.00	15.84	19.17	22.09
Promedio	7.34	10.08	13.90	15.00	15.71	20.00	20.21
Tiempo de cultivo (h)	70.73	70.82	71.11	62.62	71.19	70.45	71.28
	71.15	nd	63.32	62.70	70.33	70.53	70.25
Promedio	70.94	70.82	67.22	62.66	70.76	70.49	70.76
μ (1/h) Ecuación logística	0.37	0.24	0.23	0.23	0.23	0.21	0.23
	0.21	nd	0.21	0.21	0.21	0.21	0.20
Promedio	0.29	0.24	0.22	0.22	0.22	0.21	0.22
μ (1/h) Ecuación Gompertz	0.23	0.16	0.15	0.15	0.14	0.12	0.14
	0.14	nd	0.14	0.14	0.14	0.13	0.13
Promedio	0.19	0.16	0.14	0.14	0.14	0.13	0.14

Tabla A.1. ANOVA de la tasa máxima de CO₂.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	358.12	5	71.62	73.93	2.6265E-05	4.39
Dentro de los grupos	5.81	6	0.97			
Total	363.93	11				

Tabla A.2. ANOVA de la tasa de consumo de O₂.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	148.32	5	29.66	139.17	4.0605E-06	4.39
Dentro de los grupos	1.28	6	0.21			
Total	149.60	11				

Tabla A.3. ANOVA de la producción total de CO₂.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	103761.32	5	20752.26	548.39	6.8145E-08	4.39
Dentro de los grupos	227.05	6	37.84			
Total	103988.37	11				

Tabla A. 4. ANOVA de la producción total de CO₂

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	62824.05	5	12564.81	130.12	4.9562E-06	4.39
Dentro de los grupos	579.38	6	96.56			
Total	63403.43	11				

Tabla A.4. ANOVA del tiempo de la fase lag.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	20.72	5	4.14	1.01	0.49	4.39
Dentro de los grupos	24.66	6	4.11			
Total	45.38	11				

Tabla A.5 ANOVA del tiempo de producción continua de CO₂.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	223.65	5	44.73	18.19	0.0014	4.39
Dentro de los grupos	14.76	6	2.46			
Total	238.41	11				

Tabla A.6. ANOVA de la tasa específica de producción de CO₂ (Modelo Logístico).

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.0087	5	0.0017	0.82	0.58	4.39
Dentro de los grupos	0.0129	6	0.0021			
Total	0.0216	11				

Tabla A.7. ANOVA de la tasa específica de producción de CO₂ (Modelo Gompertz).

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.0043	5	0.0009	1.10	0.45	4.39
Dentro de los grupos	0.0047	6	0.0008			
Total	0.0090	11				

Anexo B. Tablas de los valores de los parámetros en cada concentración.

Tabla B.1. Parámetros obtenidos por respirometría condición 30 g/L.

Parámetro	Concentración 30 g/L				
	Lote 0	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
mg CO ₂ /h g as (máximo producido)	4.42	3.22	4.04	3.48	3.80
	3.41	3.58	3.50	3.60	3.51
	3.99	3.52	3.54	3.19	3.40
Promedio	3.94	3.44	3.69	3.42	3.57
mg O ₂ /h g as (máximo consumido)	2.07	1.83	2.19	2.03	2.08
	0.74	1.97	1.87	1.89	1.86
	1.10	1.95	1.97	1.71	1.90
Promedio	1.30	1.92	2.01	1.88	1.95
mg CO ₂ /g as (máximo producido)	27.51	14.74	15.92	16.82	16.69
	20.70	15.40	17.55	16.24	15.18
	24.03	14.32	14.64	17.12	16.19
Promedio	24.08	14.82	16.04	16.73	16.02
mg O ₂ /g as (máximo consumido)	14.53	11.42	12.50	12.99	13.93
	12.25	11.46	12.80	11.82	11.83
	13.23	10.88	14.64	12.29	12.62
Promedio	13.34	11.25	13.31	12.37	12.79
Fase Lag (h)	15.32	18.15	19.32	20.53	19.28
	18.90	18.40	19.57	21.62	17.87
	19.15	18.65	18.98	19.37	18.95
Promedio	17.79	18.40	19.29	20.51	18.70
Tiempo producción continua de CO ₂ (h)	11.67	8.33	8.33	10.00	7.5
	14.17	8.33	8.16	9.16	9.16
	13.33	7.50	9.16	9.16	8.33
Promedio	13.06	8.05	8.55	9.44	8.33
Tiempo de cultivo (h)	28.65	27.32	28.48	31.37	27.62
	33.90	27.56	29.57	31.61	27.87
	33.31	26.98	28.98	29.37	28.12
Promedio	31.95	27.29	29.01	30.78	27.87
μ (1/h) Ecuación Exponencial	0.225	0.355	0.369	0.292	0.345
	0.219	0.375	0.323	0.287	0.334
	0.224	0.390	0.363	0.276	0.334
Promedio	0.223	0.373	0.352	0.285	0.338

Tabla B2. Parámetros obtenidos por respirometría condición 100 g/L

Parámetro	Concentración 100 g/L				
	Lote 0	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
mg CO ₂ /h g as (máximo producido)	10.50	10.95	8.79	11.27	11.7
	11.64	8.99	9.79	9.37	10.76
	9.60	10.53	9.63	10.58	11.18
Promedio	10.58	10.16	9.40	10.41	11.21
mg O ₂ /h g as (máximo consumido)	5.50	6.35	5.22	6.19	6.87
	5.98	5.19	5.81	5.46	6.21
	5.10	6.25	5.62	5.91	6.28
Promedio	5.53	5.93	5.55	5.85	6.45
mg CO ₂ /g as (máximo producido)	86.34	80.34	76.56	74.56	75.93
	89.14	70.37	68.49	66.62	79.27
	85.44	64.69	77.05	71.42	77.04
Promedio	86.97	71.80	74.03	70.87	77.41
mg O ₂ /g as (máximo consumido)	43.68	49.29	48.53	45.74	51.56
	46.4	43.38	43.97	42.62	50.46
	44.63	41.47	48.42	46.06	48.62
Promedio	44.90	44.71	46.97	44.81	50.21
Fase Lag (h)	18.73	20.73	20.23	21.45	17.7
	17.32	20.98	19.65	21.70	19.62
	26.73	21.23	19.90	21.12	19.03
Promedio	20.93	20.98	19.93	21.42	18.78
Tiempo producción continua de CO ₂ (h)	18.33	15.83	18.33	16.67	17.50
	19.17	15.00	17.50	16.66	18.33
	19.16	15.00	18.33	17.50	16.67
Promedio	18.89	15.28	18.05	16.94	17.50
Tiempo de cultivo (h)	37.90	37.40	39.4	38.95	36.03
	37.32	36.82	37.98	39.2	38.78
	46.73	37.07	39.06	39.45	36.53
Promedio	40.65	37.10	38.81	39.20	37.11
μ (1/h) Ecuación Exponencial	0.164	0.219	0.197	0.215	0.223
	0.176	0.213	0.219	0.192	0.204
	0.144	0.238	0.203	0.211	0.205
Promedio	0.161	0.224	0.207	0.206	0.211

Tabla B3. Parámetros obtenidos de respirometría condición 180 g/L

Parámetro	Concentración 180 g/L				
	Lote 0	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
mg CO ₂ /h g as (máximo producido)	20.54	19.95	22.61	20.06	20.75
	13	20.05	22.89	18.71	26.44
	21.10	19.6	23.06	21.15	22.92
Promedio	18.21	19.87	22.85	19.97	23.37
mg O ₂ /h g as (máximo consumido)	11.21	11.38	12.69	11.63	12.4
	6.66	11.9	13.07	10.83	15.54
	11.09	11.45	12.42	12.66	14.02
Promedio	9.65	11.58	12.73	11.71	13.99
mg CO ₂ /g MSI (máximo producido)	187.41	167.32	144.3	150.42	151.92
	131.99	160.85	151.29	142.61	184.17
	179.35	171.24	142	174.23	184.75
Promedio	166.25	166.47	145.86	155.75	173.61
mg O ₂ /g as (máximo consumido)	97.59	96.82	85.55	90.47	93.49
	67.26	95.28	90.83	101.34	110.28
	90.46	100.77	82.09	87.86	111.89
Promedio	85.10	97.62	86.16	93.22	105.22
Fase Lag (h)	28.82	25.82	26.98	31.53	24.45
	29.07	26.9	28.08	29.28	23.87
	22.65	25.48	27.48	28.7	23.28
Promedio	26.85	26.07	27.51	29.84	23.87
Tiempo producción continua de CO ₂ (h)	25.83	20.83	18.33	19.16	19.16
	28.33	20	17.5	20.83	19.17
	25	21.66	17.5	20.83	19.16
Promedio	26.39	20.83	17.78	20.27	19.16
Tiempo de cultivo (h)	55.48	47.48	46.15	51.53	44.45
	58.23	47.73	46.4	50.95	43.87
	48.48	47.98	45.81	50.37	43.87
Promedio	54.06	47.73	46.12	50.95	44.06
μ (1/h) Ecuación Exponencial	0.134	0.179	0.203	0.171	0.183
	0.122	0.180	0.206	0.176	0.220
	0.152	0.172	0.205	0.190	0.183
Promedio	0.136	0.177	0.204	0.179	0.195

Distribución de proteínas identificadas por *shotgun*.

